

Chromogranines : de la découverte à la fonction

**Dominique Aunis
Marie-Hélène
Metz-Boutigue**

Les granines sont des protéines présentes dans les granules de sécrétion à cœur dense de la plupart des cellules endocrines et neuroendocrines, ainsi que des neurones centraux et périphériques. Deux protéines de cette famille, découverte pour la plus ancienne depuis 1965, présentent de manière spécifique des homologies de séquence, les distinguant des autres membres. Ce sont les chromogranines A et B, deux protéines majoritaires dans les granules chromaffines de la médullo-surrénale. Les structures primaires de ces deux protéines sont connues, mais leurs fonctions biologiques restent à déterminer. Elles possèdent une boucle disulfure caractéristique dans leur domaine N-terminal qui jouerait un rôle dans le tri et le routage de ces protéines vers les granules de sécrétion de la voie réglée. Ces deux protéines ont la capacité de lier de grandes quantités de calcium, ce qui suggère un rôle plus général dans l'homéostasie du calcium intracellulaire. Les chromogranines A et B subissent un processus de dégradation récurrente en peptides extrêmement actifs lors de leur stockage dans le granule de sécrétion, puis lorsqu'elles sont libérées. Les pistes de recherche actuelles tendent à caractériser ces peptides de dégradation et à leur assigner un rôle biologique. Plusieurs ont ainsi été identifiés mais leur fonction n'est pas totalement établie.

ADRESSE

D. Aunis, M.H. Metz-Boutigue : Biologie de la communication cellulaire, Inserm U. 338, Institut fédératif des neurosciences 37, 5, rue Blaise-Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France.

TIRÉS À PART

D. Aunis.

En 1965, Karen Helle, jeune chercheuse norvégienne en stage post-doctoral dans le laboratoire d'Herman Blaschko, à l'Université d'Oxford, démontra par une approche immunologique inédite à l'époque qu'une protéine spécifique des granules chromaffines, soluble et de masse moléculaire élevée, était co-sécrétée avec les catécholamines de la glande surrénale stimulée par l'acétylcholine [1]. Ce fut la première donnée expérimentale qui

montrait que la libération de la noradrénaline et de l'adrénaline de ces cellules neuroendocrines avait lieu par exocytose; les anticorps contre cette protéine furent par la suite utilisés comme marqueurs de la libération des nerfs sympathiques périphériques, permettant ainsi d'étendre ce mécanisme de libération aux neurotransmetteurs [2, 3].

La stimulation de la glande surrénale entraîne la libération d'un grand nombre de protéines solubles qui sont toutes contenues dans les gra-

nules de sécrétion. La protéine découverte par Karen Helle fut baptisée chromogranine A [4]. Rapidement on s'est rendu compte des caractères soluble, thermostable, riche en acides aminés acides et ubiquitaire de cette protéine [5]. En fait, ces propriétés physico-chimiques caractérisèrent l'ensemble des protéines présentes dans les granules de sécrétion à cœur dense (GSCD). A ce jour, elles constituent une famille de protéines collectivement dénommées *granines*, qui comprend la chromogranine A (CGA), la chromogranine B (CGB) encore appelée sécrétogranine I, la sécrétogranine II (SgII) également dénommée chromogranine C, les sécrétogranines III (SgIII, ou antigène 1B1075) et IV (SgIV, ou HSL-19) et les protéines 7B2 et NESP55.

Le granule de sécrétion

Les GSCD des cellules endocrines, neuroendocrines et des neurones stockent des hormones, des peptides, des neurotransmetteurs, etc. Le plus étudié de ces organites et le mieux caractérisé à l'heure actuelle est le granule des cellules chromaffines (figure 1).

Le granule chromaffine (GC) possède un volume de $6,5 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^3$ et un diamètre moyen externe de 250 nm. Son pH interne est de 5,5. Les concentrations en catécholamines, ATP, calcium, et protéines sont très élevées ce qui conduit à une pression osmotique dépassant l'isoosmolarité. Cependant, les interactions entre les différents constituants, en annulant les charges, ramènent la pression intragranulaire à des valeurs isoosmotiques [6] permettant au GC de se comporter en solution comme un osmomètre parfait. Les chromogranines jouent un grand rôle dans ce processus. Du fait du pH intragranulaire acide, les catécholamines forment avec l'ATP un réseau de liaisons électrostatiques résultant des quatre charges négatives de l'ATP et de la charge positive des amines réduisant ainsi l'osmolarité par un facteur de 2 à 3. Il s'y rajoute un abaissement supplémentaire dû aux propriétés polyélectrolytiques des CGA et des CGB qui interagissent avec les complexes catécholamines/ATP par de nombreuses liaisons électrostatiques et hydrophobes

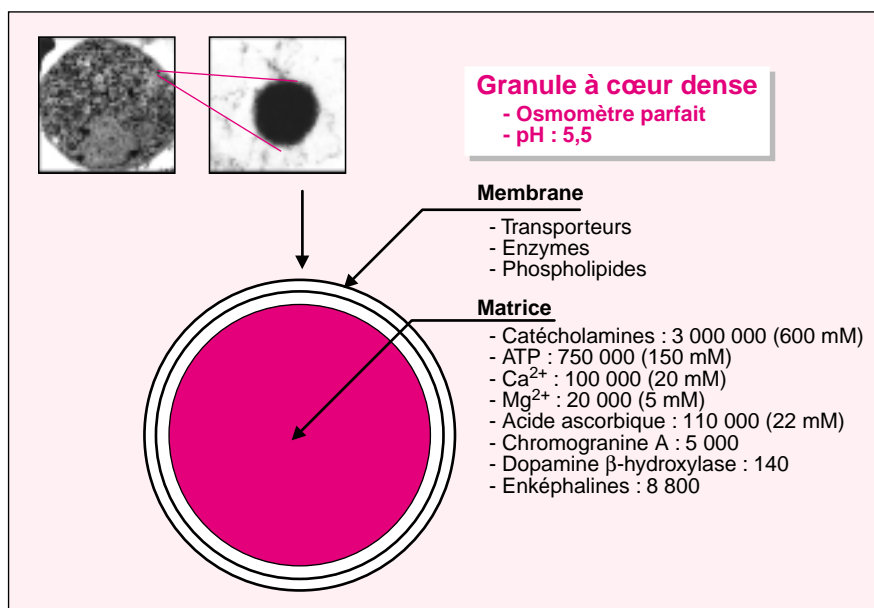


Figure 1. Exemple de granule à cœur dense: le granule chromaffine de la médullo-surrénale. La cellule chromaffine de la médullo-surrénale se caractérise par l'abondance des granules à cœur dense visibles en microscopie électronique. Ces structures qui ont le même diamètre (250 nm) sont limitées par une membrane. Le granule chromaffine contient des concentrations très élevées en catécholamines, ATP, et cations; la pression osmotique théorique par simple sommation dépasse 800 mOsmol, mais elle tombe à 320 mOsmol à cause des interactions entre les molécules, la chromogranine A assurant la stabilisation des complexes formant un gel non-rigide. Cette propriété permet au granule de se comporter comme un osmomètre parfait (sa résistance à l'hypo- et à l'hyperosmolarité est exceptionnelle). Le pH intragranulaire est de 5,5, soit une cinquantaine de protons libres par granule compte tenu de son volume. L'acidification est assurée par une pompe à protons couplée au transporteur des catécholamines. L'acide ascorbique est le co-substrat d'enzymes dans des réactions d'oxydo-réduction, dont l'hydroxylation de la dopamine en noradrénaline.

sans néanmoins former de supracomplexes stables et rigides. Les études en RMN montrent que l'intérieur du GC ne correspond pas à un gel protéique rigide du fait d'un réseau d'interactions en trois dimensions, mais au contraire à un milieu fluide bien que la viscosité y soit quatre fois plus élevée que celle de l'eau.

Les chromogranines agissent donc comme des stabilisateurs osmotiques du fait de leur nature acide. Cette interaction avec les catécholamines représente un mécanisme qui limite la diffusion dans le cytoplasme des amines à faible perméabilité, de telle sorte que la perte des molécules par diffusion est largement compensée par le transport actif intravésiculaire, conduisant ainsi à l'accumulation des amines dont les concentrations

deviennent très élevées, voisines de 600 mM.

Les chromogranines dans l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire

La forte concentration en calcium dans les GSCD (20 mM) et le nombre important de granules par cellule (10 000) représentent des éléments majeurs dans l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire. Les chromogranines jouent un rôle secondaire passif important. En effet, la CGA lie de grandes quantités de calcium selon deux modes: un premier avec une capacité de 75 mol de Ca^{2+} par mol de CGA et une affinité modérée ($K_d = 54 \mu\text{M}$) et un second de capacité dix fois plus forte (750 mol/mol) mais

d'affinité 20 fois plus faible [7]. Cette dépendance au calcium, qui a été retrouvée pour la protéine recombinante, dépend de facteurs ioniques, de la température et du pH, qui interviennent dans l'organisation de la protéine en hélices α et feuillets β [8]. La CGB peut lier 100 mol de Ca^{2+} par mol de protéine avec une affinité faible ($K_d = 2 \text{ mM}$) à pH 5,5. Compte tenu des concentrations en CGA et CGB, le Ca^{2+} intragranulaire est quasiment totalement lié et non libre.

Les GC possèdent un récepteur à l'inositol (1,4,5)-triphosphate [Ins(1,4,5)P₃] qui fonctionnerait comme un canal calcium [9]. CGA et CGB interagiraient avec ce récepteur à IP₃, modulant son activité : en réponse à l'IP₃, les granules dans l'espace sous-plasmalemmal participeraient au processus d'exocytose en libérant du Ca^{2+} , alors que les granules des couches plus profondes capteraient le calcium libre. Cependant, cette hypothèse, étayée par quelques données expérimentales, ne fait pas l'unanimité.

Propriétés structurales des chromogranines

Après la découverte de la CGA puis de la CGB [10] et de la SgII [11], les anticorps spécifiques ont permis de révéler leur localisation ubiquitaire et leur dégradation protéolytique dans les GSCD conduisant à la formation d'une large gamme de peptides [5].

En 1986, une grande avancée a été franchie avec le clonage de la CGA bovine [12, 13]. Le gène de la CGA est unique : il comprend 15 kbp, en incluant les régions régulatrices en amont, et l'ARN messager comprend 2 100 bases. Le cadre de lecture code pour une protéine de 449 acides aminés ce qui lui confère une masse moléculaire de 48 kDa. Les 18 premiers acides aminés forment la séquence signal qui est responsable du passage de la protéine native au travers de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux. Depuis, les séquences de CGA de nombreuses espèces ont été décrites permettant d'établir les domaines hautement conservés de la protéine [5, 14].

Le gène de la CGA de bovidé comprend 8 exons (figure 2A) : l'exon I ainsi qu'une portion de l'exon II contiennent le peptide signal. Le domaine amino-terminal commence

à la fin de l'exon II, l'exon III code pour une boucle disulfure S-S et une partie du peptide vasostatine I jusqu'au résidu 44, puis l'exon IV pour le domaine carboxy-terminal de la vasostatine I. L'exon V poursuit jusqu'au carboxy-terminal de la vasostatine II (résidu 100) ; les exons VI et VII codent pour de longs fragments centraux, alors que le dernier exon VIII code pour la partie carboxy-terminale de la protéine, des acides aminés 404 à 431.

Le premier clonage de la CGB humaine a été réalisé en 1987 [15]. L'ARN messager de la CGB comprend 2 600 bases, codant pour une protéine de 626 acides aminés et de masse moléculaire de 71,5 kDa. La protéine est codée par 5 exons, trois exons en région amino-terminale jusqu'au résidu 44, un long exon IV de plus de cinq cents acides aminés et un court exon V carboxy-terminal (figure 2B).

Il n'y a pas de reconnaissance immunologique croisée entre les deux protéines CGA et CGB. Néanmoins, les parties amino-terminales ont chacune une boucle disulfure caractéristique, et l'analyse montre pour l'exon III des deux protéines une homologie de 42 % et pour les exons VIII et V, en région carboxy-terminale des formes A et B, une homologie de 44 %. La similitude s'arrête à ces domaines, les régions centrales ne présentant aucune homologie (figure 3).

Ces deux protéines montrent une richesse particulière en acide glutamique (25 %) et en proline (10 %). De nombreux sites dibasiques sont répartis tout au long des séquences des CGA et de CGB ; plusieurs sont localisés dans les régions amino-terminales correspondant à des fins exoniques, ce qui impliquerait une activité fonctionnelle importante pour ces domaines, en particulier le peptide vasostatine I issu de la CGA.

La séquence de la SgII ne présente aucune homologie de séquence avec celles de CGA et de CGB [16]. La composition exonique est également très divergente (figure 2C), avec un seul long exon qui code pour la protéine entière. Il en est de même pour les autres granines telles que SgIII (1B1075) qui n'est présente que dans les vésicules axonales et dendritiques des neurones [17], SgIV (HISL-19) identifiée dans les îlots pancréatiques

et les GSCD de quelques types cellulaires endocrines [18] et SgV (7B2) présente dans les GSCD de nombreuses cellules endocrines et nerveuses [19]. La dernière protéine caractérisée, NESP55 pour *neuroendocrine secretory protein* de masse moléculaire de 55 kDa, découverte à partir d'une banque d'ARNm de cellules chromaffines [20] ne présente aucune similitude ni avec les chromogranines, ni avec les sécrétogranines. Ainsi ne doit-on considérer comme *chromogranines* que les deux protéines CGA et CGB, les autres protéines formant la sous-famille des sécrétogranines ; sécrétogranines et chromogranines appartiennent à la famille des *granines*, protéines présentes dans les GSCD.

La localisation chromosomique des gènes de la CGA, CGB et SgII a été déterminée chez quelques espèces. Ces gènes sont présents dans le génome haploïde sous forme unique et le gène de la CGA est localisé chez l'homme sur le chromosome 14 en position q32-q32.3 [21].

Modifications post-traductionnelles des chromogranines

Nous avons décrit récemment les 7 modifications post-traductionnelles de la CGA bovine [22] : deux copules *O*-glycosylées identiques qui sont localisées sur les résidus Ser₁₈₆ et Thr₂₃₁ et composées de l'enchaînement NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1, et cinq phosphorylations dont quatre portées sur les résidus sérine Ser₈₁, Ser₃₀₇, Ser₃₇₂, Ser₃₇₆ et une sur le résidu tyrosine Tyr₁₇₃. Les deux sites de glycosylation sont situés en région centrale de la protéine. Ils représentent un obstacle majeur à la dégradation intragranulaire et extracellulaire de ce domaine, qui se focalise de manière récurrente sur les régions amino- et carboxy-terminales [23]. A l'exception de la Tyr₁₇₃, les sites de la CGA qui portent les modifications sont hautement conservés entre les espèces. Trois des quatre résidus sérine phosphorylés sont localisés sur la partie carboxy-terminale de la protéine dans un domaine très conservé. La signification des phosphorylations n'est pas connue à l'heure actuelle. Les difficultés de purification de la CGA humaine liées à son origine

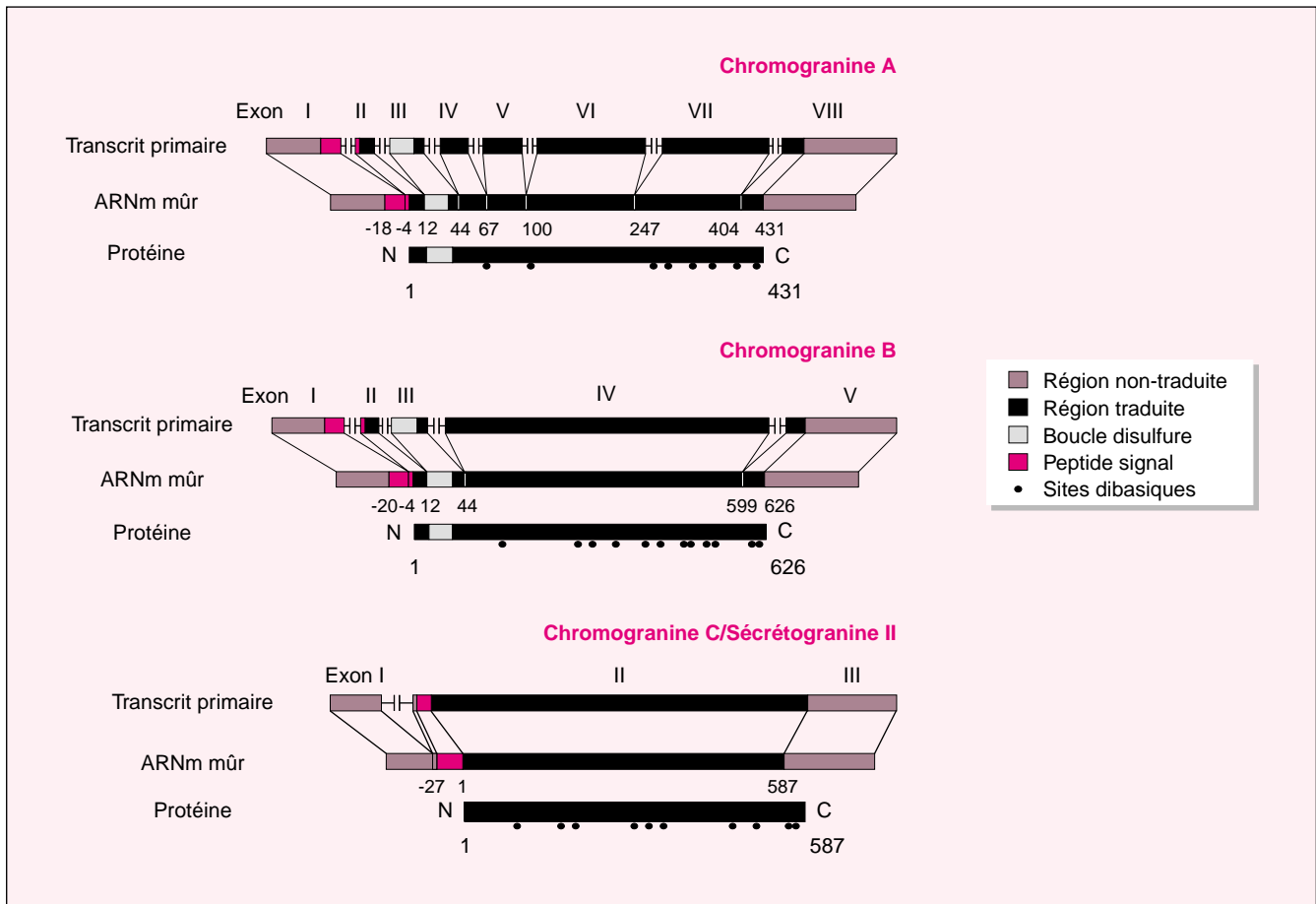


Figure 2. **Organisation structurale des exons des gènes de CGA, CGB et SgII.** Les gènes de CGA et CGB sont constitués respectivement de 8 exons/7 introns et de 5 exons/4 introns. L'organisation donnée sur cette figure concerne les protéines bovines mais une organisation similaire prévaut pour les protéines d'autres espèces (souris, homme). Les exons I de CGA et CGB codent pour une région non traduite de l'ARNm et un large fragment du peptide signal. Les exons II codent pour les 3 derniers résidus du peptide signal et les 13 premiers résidus du domaine amino-terminal de la protéine mûre. Les exons III codent pour la boucle disulfure amino-terminale. L'exon IV de la CGA code pour un fragment conservé à plus de 90% à travers les espèces. Les exons VI et VII de la CGA et IV de la CGB codent pour des régions variables selon les espèces (< 41% d'homologie entre bœuf et rat). Les exons VIII de la CGA et V de la CGB codent pour une région carboxy-terminale très conservée ainsi que pour une région non traduite de l'ARNm. Le domaine 1-76 de la CGA (vasostatine I) est très conservé (97%, 86% d'homologie entre bœuf/homme et bœuf/rat), ainsi que le domaine carboxy-terminal 316-431 (> 87% d'homologie pour bœuf/rat/homme/porc/cheval): la conservation de ces domaines indique des régions importantes pour la structure et l'expression des fonctions biologiques. De même, pour la CGB, le domaine 1-41 amino-terminal est conservé à plus de 80% d'homologie entre bœuf/homme/rat/souris et le domaine carboxy-terminal également (> 90% d'homologie). L'organisation structurale de la SgII est totalement différente de celle des CGA et CGB. Toute la phase codante est contenue dans un seul exon. L'exon I code pour une région non traduite de l'ARNm. En revanche, la conservation de l'ensemble de la protéine SgII est forte entre les espèces (> 65% d'homologie).

n'ont pas permis d'établir les modifications post-traductionnelles de la protéine normale. Récemment, les modifications ont été étudiées pour le long fragment protéique 79-439 qui est sécrété dans les urines de patients atteints de carcinomes: trois sites d'O-glycosylation dans la partie centrale de la protéine et trois sites de phosphory-

lation dans le domaine carboxy-terminal [24]. La structure des copules glycaniques varie d'un site à l'autre et au sein du même site, composées de di-, tri- et tétrasaccharides. L'origine carcinoïde de la protéine explique ces divergences, la structure de la copule glycanique correspondant aux antigènes T et Tn des glycoprotéines d'ori-

gine tumorale. Ces copules protègent la protéine contre la dégradation protéolytique expliquant ainsi les grandes quantités de fragments de CGA retrouvés dans les urines des patients.

Bien que la séquence de la CGB soit bien établie, aucune analyse structurale sur les modifications post-traductionnelles n'a à ce jour été réalisée.

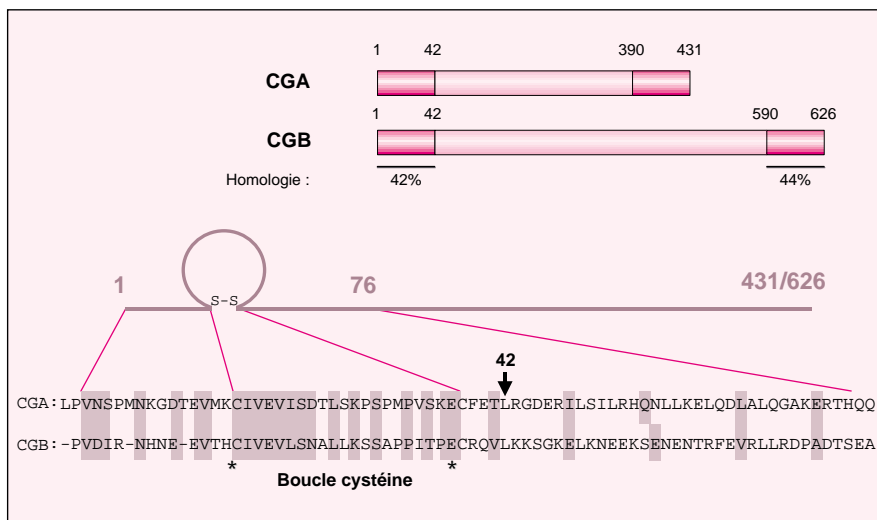


Figure 3. **Séquences homologues des CGA et CGB globales et amino-terminales.** Les CGA et CGB présentent des homologies de séquence dans les domaines amino- et carboxy-terminaux où elles atteignent 42 % et 44 % respectivement. Ces séquences encadrent la région médiane plus variable. La comparaison de séquence dans le domaine 1-76 montre une conservation importante au niveau de la boucle disulfure qui résulte d'un pont S-S entre deux résidus cystéine formé par action d'une isomérase.

Des résultats préliminaires de notre laboratoire semblent montrer que les modifications post-traductionnelles de la CGB sont nombreuses, complexes et diverses.

Genèse du granule de sécrétion : rôle des chromogranines

Les chromogranines sont localisées dans les GSCD des cellules endocrines et neuroendocrines ainsi que des neurones périphériques et centraux. Il n'y a pas d'autre localisation cellulaire à l'exception du réticulum endoplasmique rugueux où la protéine est transitoirement synthétisée et de l'appareil de Golgi où elle est modifiée et empaquetée. La concentration en CGA des GSCD est élevée (figure 1). Comme nous l'avons vu, les interactions entre l'ATP et les catécholamines en présence de calcium abaissent la pression osmotique intragranulaire à la valeur de 320 mOsmol, et la CGA aide à stabiliser les complexes. De plus, CGA et CGB présentent une capacité à l'auto-agrégation qui dépend du pH et des ions Ca^{2+} . Au pH de 5,5, la CGA forme des homotétramères et un mélange équimoléculaire de CGA et CGB forme à

ce pH des hétérotétramères de type CGA_2CGB_2 . Les régions responsables de ces interactions sont les domaines codés par les exons 4-7 pour ce qui concerne la CGA et l'exon 4 pour la CGB.

La présence de 5 000 molécules de CGA dans chaque GSCD nécessite un processus spécifique de concentration dans l'appareil de Golgi d'où sont issus les GSCD. Les GSCD sont les organites de stockage de la voie de sécrétion dite réglée alors que des vésicules petites et claires (SV), présentes dans toutes les cellules, caractérisent l'autre voie de sécrétion des protéines, dite voie constitutive. Les protéines de ces deux voies sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux et se dirigent vers l'appareil de Golgi pour y subir les modifications post-traductionnelles avant d'être empaquetées dans les SV ou les GSCD. Dans la partie la plus distale du complexe de Golgi, le réseau trans-golgien, les voies constitutive et réglée divergent [25]. Les protéines de la voie constitutive sont présentes dans les SV qui, lors de l'étape finale, fusionnent avec la membrane plasmique sans stimulus extérieur. Les protéines de la voie de sécrétion régulée se distinguent des

protéines de sécrétion constitutives en étant empaquetées dans des GSCD immatures. Ces organites qui ont une durée de vie courte subissent des processus de maturation extrêmement actifs impliquant leur fusion et la séparation d'éléments non impliqués dans la composition finale du GSCD mature. Les chromogranines sont stockées dans les GSCD et subissent le processus d'exocytose en réponse à l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire lors de la stimulation de la cellule. Du fait des concentrations élevées des chromogranines, ces protéines ont servi de modèle pour l'étude des processus de condensation et de tri vers les GSCD.

Les deux domaines des CGA et des CGB présentant des homologies de séquence fortes ont été hypothétiquement impliqués dans le tri. Ces domaines sont représentés par les régions amino-terminale, codée par l'exon 3, et carboxy-terminale, codée par l'exon 8 de la CGA et par l'exon 5 de la CGB. La boucle résultant de la liaison des deux cystéines du domaine amino-terminal de la CGB joue un rôle majeur dans la liaison de la protéine avec la membrane du granule assurant le tri et la condensation de la protéine [26]. En pratiquant une délétion en 16-37 de la CGB humaine, l'expression ectopique de la protéine mutée après transfection dans les cellules PC12 conduisit à l'absence de la protéine dans les GSCD et à sa présence dans les SV. Ce résultat démontre l'importance de la boucle disulfure dans l'étape de tri. En fait, il existerait deux classes de protéines : celles qui sont compétentes pour le tri et l'agrégation, et celles qui ne seraient compétentes que pour l'agrégation (figure 4). Ces dernières seraient dirigées vers la voie réglée par interaction directe avec les protéines à double compétence. Les chromogranines auraient alors une importance capitale en tant que facilitateurs pour le tri d'autres protéines utilisant la voie réglée telles que les prohormones. L'importance de la boucle disulfure dans le tri a été renforcée à la suite d'expériences lors desquelles le simple motif correspondant a été inclus dans des protéines de fusion : c'est ainsi que la protéine $\alpha 1$ -anti-trypsine normalement sécrétée de manière constitutive est déviée vers la

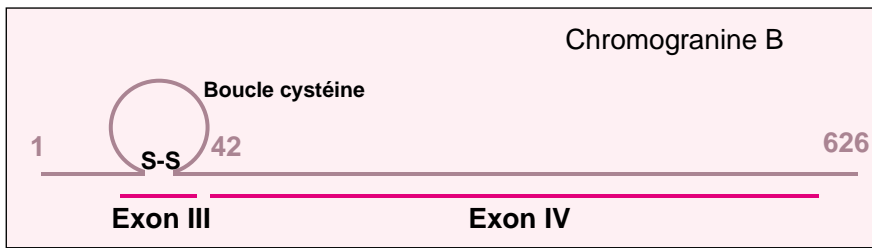


Figure 4. **Caractérisation des domaines de la CGB impliqués dans le tri de la protéine.** L'exon III du gène de la CGB code pour le domaine 13-44, incluant la boucle disulfure. Ce domaine a la propriété de se lier à la membrane du complexe trans-golgien et à celle du granule de sécrétion. Cet arrimage sur un récepteur non identifié permet de fixer quelques molécules de CGB, assurant ensuite la condensation d'autres molécules par l'exon IV, au centre de la protéine.

voie réglée lorsque la protéine de fusion contient la séquence de la boucle CGB. Cependant, la présence de la boucle n'assure cette prise en charge qu'à des taux faibles, ceux-ci devenant plus conséquents lorsque deux boucles à chaque extrémité de la protéine sont présentes sur l' α 1-antitrypsine de fusion. Cette observation indiquerait que non seulement la séquence est cruciale, mais que probablement la structure tri-dimensionnelle associée à la boucle interviendrait dans le processus.

La CGB a la capacité de se lier à la membrane du complexe trans-golgien, ainsi qu'à celle des GSCD. Cette liaison dépend du motif de la boucle disulfure qui assure spécifiquement le tri. La CGA possède également une boucle similaire à celle de la CGB dans son exon 3; cependant, à ce jour, aucune donnée n'a confirmé qu'elle jouerait un rôle analogue. L'oligodimérisation de la CGA a été décrite, la boucle disulfure étant impliquée dans ce processus [27]. L'agrégation de la CGA est un phénomène Ca^{2+} - et pH-dépendant pour lequel les domaines codés par les exons 4-7 pourraient être impliqués, mais la démonstration reste à faire.

Quelle est la spécificité de la boucle disulfure dans le processus de tri ? Il est vrai que CGA et CGB étant présentes de manière ubiquitaire dans les GSCD de nombreuses cellules endocrines, neuroendocrines et nerveuses, il serait tentant de généraliser cette fonction de tri et d'agrégation. Cependant, la protéine SgII, également présente dans ces mêmes orga-

nelles, est triée vers les GSCD alors que la boucle disulfure n'est pas présente dans cette protéine. Cette protéine possède donc un signal qui lui est spécifique et diffère de celui des CGA et CGB. D'autres protéines sans boucle telles que la proopiomélanocortine, la pro-insuline et la proenkephaline auraient des séquences spécifiques contenant l'information en vue du tri granulaire dans le réseau trans-golgien, cette séquence non identifiée permettant la liaison à la carboxypeptidase E.

Localisation des chromogranines

La CGA a été isolée pour la première fois des GC de la médullo-surrénale et, plus tard, elle fut détectée dans les GSCD des nerfs sympathiques périphériques ainsi que dans les régions cérébrales riches en neurones adrénergiques. Par la suite, les techniques immunocytochimiques faisant appel à des anticorps spécifiques ont permis de découvrir la CGA dans de nombreuses glandes endocrines et les tissus tumoraux correspondants. Il en est de même pour la CGB et la SgII.

Ces protéines apparaissent ubiquitaires [5, 14]. Chez l'homme, la CGA est principalement localisée dans la médullo-surrénale. Les quantités de CGA rapportées aux protéines totales dans la glande pituitaire, dans le pancréas, dans l'estomac et l'intestin et dans les glandes endocrines restantes représentent respectivement 25 %, 5 %, 5 % et 1 % des quantités de pro-

téine présentes dans la glande surrénale. La CGA est également détectée dans les cellules neuroendocrines dispersées du poumon, de la prostate, des tissus mammaires, dans les cellules myoendocrines du cœur, etc. De nombreuses associations ont été établies comme CGA/CGB/SgII/NPY, CGA/PTH, CGA/insuline, CGA/glucagon, CGA/polypeptide PP, CGA/facteur atrial natriurétique, TSH/CGA/CGB/SgII, CGA/calcitonine, LH/CGA/CGB/SgII, CGA/somatostatine, etc. La présence de la CGA dans les cellules neuroendocrines en fait un marqueur histopathologique de tumeurs neuroendocrines.

Plus récemment, la CGA a été détectée dans la rate, le thymus et les polymorphonucléaires, ainsi que dans des glandes exocrines, comme les glandes salivaires ou les cellules alvéolaires de type II du poumon. Les deux protéines CGA et CGB présentent des concentrations variables selon les tissus et les types cellulaires, quelquefois l'une est présente alors que l'autre est absente comme dans la glande parathyroïde chez le mouton, les cellules entérochromaffines de la paroi gastrique de l'homme ou la glande pituitaire intermédiaire du bovin.

Dans le système nerveux central, la CGA est localisée dans les neurones où elle représente 0,01-0,02 % de la quantité de CGA de la médullo-surrénale. Les neurones ne sont pas exclusivement noradrénergiques puisque la co-localisation avec de nombreux transmetteurs, peptidergiques ou non, a été démontrée par immunocytochimie ou hybridation *in situ*. Des régions cérébrales sont particulièrement riches en CGA, comme la couche des cellules pyramidales de l'hippocampe, le septum, l'hypothalamus, l'amygdale, le noyau accumbens, le ganglion basal, le cervelet. Le cortex de rat se caractérise par la présence de nombreuses cellules CGA-positives dispersées.

Dans la maladie d'Alzheimer, la CGA est abondamment présente dans les plaques séniles [28], ainsi que dans les corps de Lewi chez les malades atteints de Parkinson et les corps de Pick chez les malades atteints de démence [29]. La signification de ces résultats reste inconnue: récemment, nous avons observé que la vasostatine I

(peptide 1-76 de la CGA) est capable d'induire l'activation des cellules microgliales de cerveau de rat en culture primaire et l'apoptose des neurones dans un système de co-culture avec les cellules microgliales [30]. Cependant, le lien n'est pas fait entre cette activation des cellules microgliales, par la CGA ou des peptides dérivés, et certaines neuropathologies dégénératives [31].

Dégradation des chromogranines

Très tôt, l'utilisation des anticorps dirigés contre la CGA, la CGB ou la SgII révéla l'existence de composés immunoréactifs de nature peptidique mais de masse moléculaire plus petite que celle des protéines elles-mêmes. Un exemple est donné dans la *figure 5* qui montre que la CGA native des GC apparaît en précurseur de nombreux dérivés résultant de la dégradation protéolytique de la protéine.

Plusieurs enzymes protéolytiques identifiées dans les GSCD sont responsables de la dégradation des protéines granulaires, en particulier des prohormones comme par exemple la proenképhaline-A dans les GC de la médullo-surrénale [32], y incluant les chromogranines et les sécrétogranines. CGA et CGB ainsi que SgII portent sur leur séquence des sites dibasiques, points d'attaque potentiels pour ces enzymes. La plupart de ces sites sont extrêmement conservés entre les espèces.

Dans les GC de la médullo-surrénale, CGA et CGB sont attaquées sur leurs deux extrémités amino- et carboxy-terminales, engendrant une multitude de fragments de taille variable, allant de quelques amino-acides à plusieurs dizaines de kDa [23, 32, 33].

La dégradation des chromogranines est spécifique du tissu et du type cellulaire [34, 35], ce qui rend complexe la panoplie des peptides issus de ces protéines. Dans la médullo-surrénale de bovidé, 50% de la CGA et plus de 85% de la CGB sont dégradés, alors que dans le pancréas la dégradation est totale et, dans le cerveau, moins active. Cette complexité augmente encore dans les tissus tumoraux tels que les insulinomes, les carcinomes, etc., dans lesquels la dégradation diverge totalement de

celle opérant dans les tissus sains correspondants [5, 35]. Tous les peptides dérivés des chromogranines et des sécrétogranines sont libérés en réponse à un stress dans la circulation sanguine, mais également dans la lymphe, le liquide synovial, le liquide céphalo-rachidien, et certaines sécrétions exocrines comme la salive [36].

L'idée que les chromogranines seraient des précurseurs de peptides actifs relève de l'observation que leur dégradation s'apparente à celle des prohormones et des proneuropeptides. Le premier peptide permettant d'étayer cette hypothèse fut la pan-

créastatine, un peptide de 49 acides aminés dérivé de la CGA, isolé du pancréas de porc, qui a la propriété d'inhiber la sécrétion d'insuline du pancréas endocrine stimulée par le glucose [37]. Ce peptide a par la suite été isolé chez d'autres espèces, avec cependant des activités très variables. Néanmoins, ce fut la première évidence d'un peptide dérivé de la CGA possédant une activité biologique [5, 38, 39]. Ce peptide aurait également d'autres propriétés, comme par exemple d'augmenter chez la souris la mémoire de rétention et de réverser l'amnésie induite par la scopolamine.

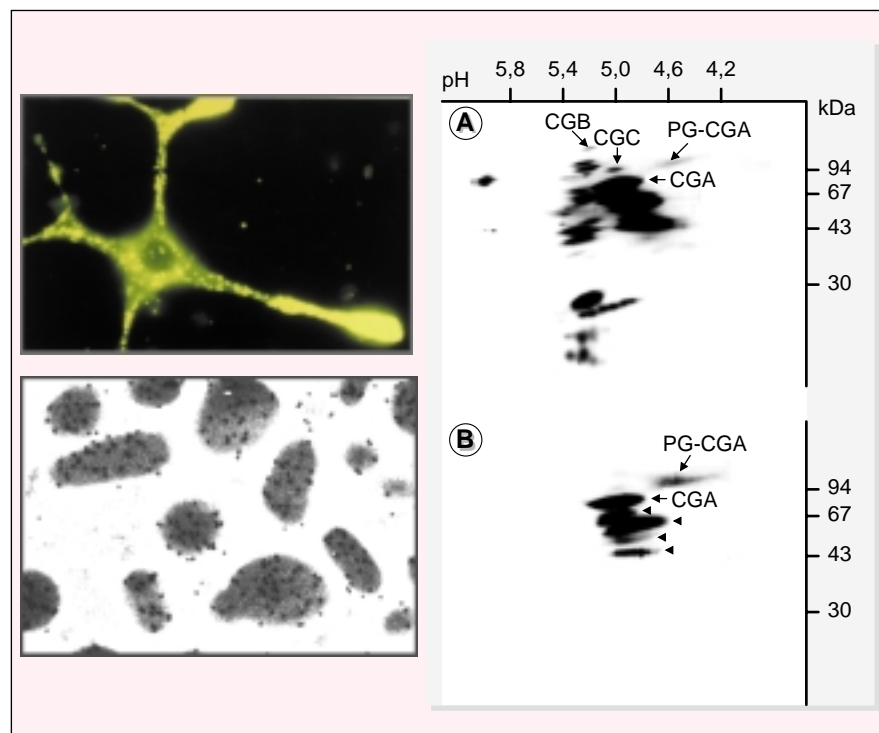


Figure 5. Localisation de la CGA et de la CGB dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines. Avec un anticorps anti-CGA spécifique, l'immunofluorescence est confinée sous forme ponctuelle correspondant au GC, comme le confirme la localisation ultrastructurale utilisant des particules d'or fixées à l'immunoglobuline. La séparation électrophorétique en deux dimensions des protéines solubles de la matrice des GC purifiés dévoile de nombreuses espèces protéiques: les espèces CGA, CGB et SgII (marquée CGC) comme indiquée en A. Un anticorps dirigé contre la forme native de la CGA (spot CGA en A) révèle plusieurs espèces peptidiques de masse moléculaire plus faible (B) démontrant le processus de dégradation protéolytique de la CGA. Une même observation vaut pour la CGB et la SgII. La tache PG-CGA correspond au protéoglycane, composé de dermatane sulfate (48%), chondroïtine 4- et 6-sulfate (47%) et d'héparane sulfate (5%), présent dans les GC, les cellules PC12 et le cerveau. Le rôle de cette forme particulière de la CGA mineure, qui n'existe pas pour la CGB, n'est pas connu actuellement.

Depuis, d'autres peptides ont été caractérisés (vasostatine I, vasostatine II, parastatine, catestatine...) avec des activités diverses, démontrant ainsi le rôle de prohormones joué par la CGA (figure 6). De même, deux peptides issus de la CGB et un peptide issu de la SgII (sécrétoneurine) ont été identifiés. Cependant, la grande interrogation réside dans le fait qu'aucun récepteur spécifique de ces peptides n'a pu être caractérisé jusqu'à ce jour.

Plus récemment, notre laboratoire a fait la découverte d'activités antibactériennes et antifongiques associées à des peptides, issus de la dégradation de la CGA et de la CGB, présents dans les granules de sécrétion ainsi que dans les neutrophiles polymorphonucléaires, les milieux infectieux, les liquides de cicatrisation et les fluides post-opératoires [40-42]. Ces peptides sont actifs contre une variété de bactéries, de champignons et de levures. Le peptide le plus intéressant est la vasostatine I, qui possède à la fois des propriétés antibactériennes vis-à-vis des bactéries à Gram-positif, et antifongiques avec un large spectre à l'encontre de champignons filamenteux et de levures. Un peptide court de 20 résidus, localisé dans la séquence de la vasostatine I après la boucle, possède l'activité remarquable de traverser la membrane de champignons et de levure, provoquant ensuite leur mort (figure 7). Les résultats étayaient l'idée que ces peptides contribueraient à l'immunité innée, représentant un bouclier naturel de première défense lors d'infections, en particulier dans les états de stress, ces situations induisant la libération massive des composants des GSCD. L'immunité innée est le rempart de défense conservé des formes de vie les plus primitives jusqu'à l'homme. La récente mise en évidence du rôle fondamental de la réponse immunitaire innée chez les mammifères, et de son interdépendance avec la réponse immunitaire adaptative, a provoqué un regain d'intérêt pour les peptides antibactériens à des fins thérapeutiques. Dans ce cadre, les peptides antibactériens et antifongiques présents dans les GSCD, issus non seulement des CGA et CGB mais aussi de la proenképhaline [40], pourraient jouer un rôle de neuroimmunomodulateur, qui reste néanmoins à approfondir.

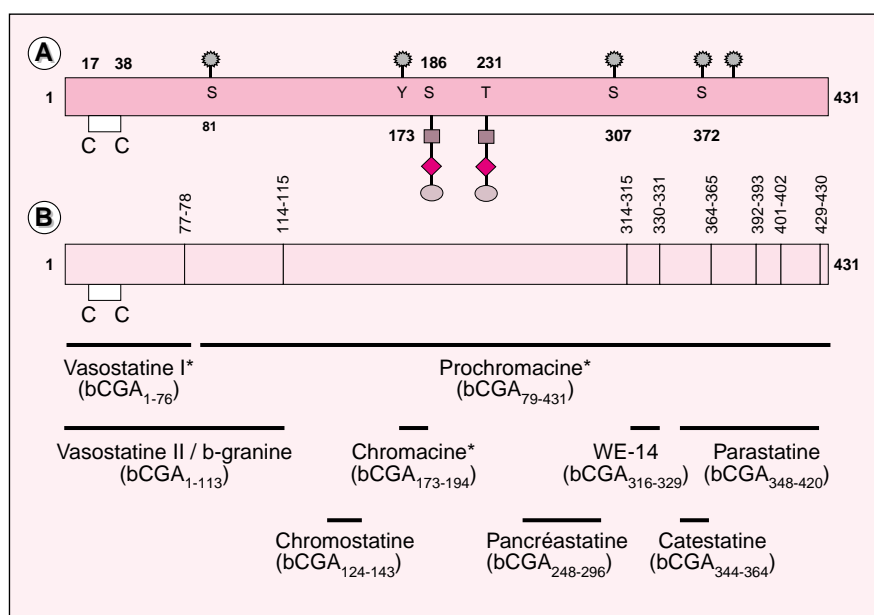


Figure 6. **Peptides naturels dérivés de la CGA.** A. Les modifications post-traductionnelles sont indiquées: 5 sites de phosphorylation (81, 173, 307, 372, 376) et 2 sites de O-glycosylation (186 et 231). B. La position des peptides dérivés de la CGA bovine caractérisés à ce jour est indiquée, ainsi que celle des sites dibasiques. Le peptide vasostatine I est hautement conservé, avec des caractéristiques multifonctionnelles (voir figure 7). La parastatine a été décrite comme un inhibiteur de la sécrétion de l'hormone PTH; le peptide hautement conservé WE-14 potentialise de l'histamine, provoquée par les immunoglobulines IgE, la libération par les mastocytes de rat. La chromostatine inhibe la contraction vasculaire induite par l'endothéline, la catestatine inhibe la libération des catécholamines évoquée par la stimulation du récepteur de l'acétylcholine des cellules chromaffines de la médullo-surrénale et module la libération de l'histamine au niveau des récepteurs de type H₁. * Peptides possédant une activité antimicrobienne et/ou antifongique.

Conclusions

Bien que beaucoup de travaux aient été réalisés depuis la découverte de la première chromogranine il y a plus de trente ans, des questions importantes sont sans réponse. La structure, l'expression et la localisation des chromogranines et des sécrétogranines étant maintenant établies, la question fondamentale de leur(s) fonction(s) biologique(s) reste posée. Un rôle majeur semble être celui de précurseur de peptides, mais le rôle biologique des peptides dérivés reste incertain tant que les récepteurs spécifiques n'auront pas été caractérisés et les mécanismes d'action bien établis.

D'un point de vue phylogénétique, les chromogranines sont présentes à travers tout le règne animal, puisqu'elles ont été identifiées chez les mammi-

fères, les oiseaux, les crustacés, les amphibiens, les arthropodes... De plus, une forme immunologiquement apparentée à la CGA de mammifère a été détectée chez la paramécie (figure 8), ce qui fait remonter dans l'échelle de temps à plus de 400 millions d'années. Or, le trichocyste de la paramécie contient des éléments assurant sa défense contre les prédateurs. Dans le même ordre d'idée, les cellules chromaffines de la médullo-surrénale interviennent dans les états de stress pour libérer les catécholamines, de nombreux peptides actifs tels que les enképhalines, et les chromogranines et leurs panoplies de peptides dérivés : cette libération intervient non pas dans les états de repos, mais dans les états d'activation liés à la protection de l'organisme. Qu'y apportent les peptides dérivés des chromogranines?

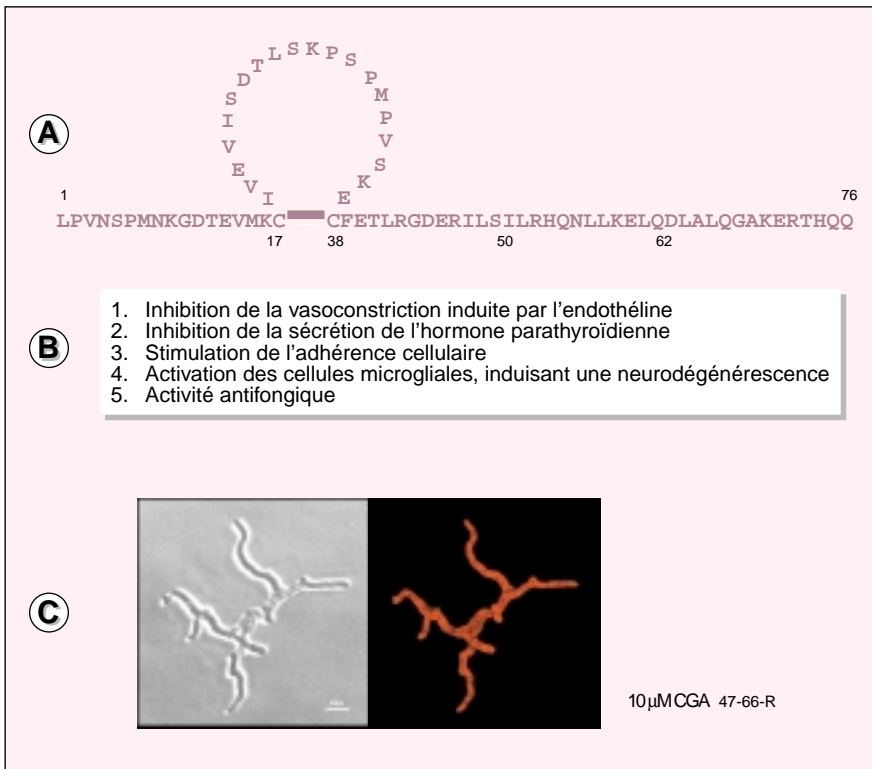


Figure 7. **Propriétés de la vasostatine I, peptide naturel dérivé de la CGA. A.** Structure primaire de la vasostatine I bovine (bCGA₁₋₇₆). **B.** Activités biologiques de la vasostatine I rapportées à ce jour. **C.** Le peptide (bCGA₄₇₋₆₆) a été dénommé chromofungine: marqué à la rhodamine et suivi en microscopie confocale, ce peptide pénètre dans le champignon filamentueux *Aspergillus fumigatus*, provoquant sa mort.

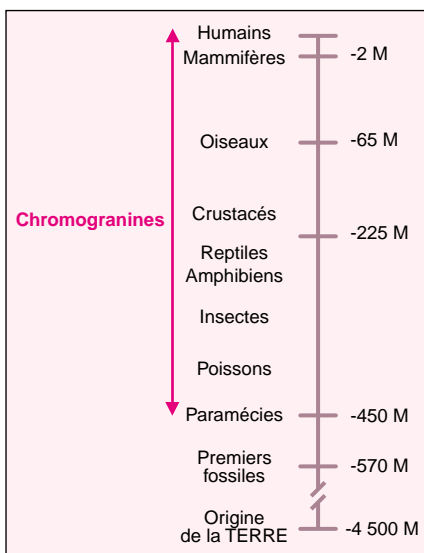


Figure 8. **Évolution phylogénétique de la CGA.** La protéine a pu être identifiée dans de nombreuses espèces, du poisson à l'homme. Une forme immunologiquement apparentée a été décrite chez la paramécie.

Il s'agirait d'un rôle de sentinelles dans le maintien de l'homéostasie, au travers des multiples protections qu'assureraient ces peptides.

La fonction d'une protéine peut être élucidée par la création d'animaux génétiquement modifiés. Plusieurs laboratoires ont tenté de produire des souris avec une délétion conditionnelle ou non du gène codant pour la CGA. A ce jour, cette stratégie a été un échec, ce qui démontrerait l'importance, et ceci très précocement, de la protéine ou de ses peptides dérivés. La délétion du gène codant pour la CGB n'induit apparemment pas de changement de phénotype de l'animal, ce qui peut s'expliquer par le rôle majeur joué par la CGA et la suppléance de la CGB par la CGA.

Ainsi, au travers des nombreuses incertitudes qui les caractérisent, les chromogranines et les sécrétogranines représentent-elles encore un défi pour les années à venir ■

RÉFÉRENCES

1. Banks P, Helle KB. The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem J* 1965; 97: 40C-1C.
2. Smith AD. Secretion of proteins (chromogranin A and dopamine β -hydroxylase) from a sympathetic neuron. *Phil Trans Roy Soc Lond B* 1970; 261: 363-70.
3. Aunis D. Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int Rev Cytol* 1998; 181: 213-320.
4. 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: 58-9.
5. Simon JP, Aunis D. Biochemistry of the chromogranin A protein family. *Biochem J* 1989; 262: 1-13.
6. Kopell WN, Westhead EW. Osmotic pressures of solutions of ATP and catecholamines relating to storage in chromaffin granules. *J Biol Chem* 1987; 257: 5707-10.
7. Reiffen FU, Gratzl M. Ca^{2+} binding to chromaffin vesicle matrix proteins: effects of pH, Mg^{2+} and ionic strength. *Biochemistry* 1986; 25: 4402-6.
8. Yoo SH. pH- and Ca^{2+} -dependent aggregation properties of secretory vesicle matrix proteins and the potential role of chromogranins A and B in secretory vesicle biogenesis. *J Biol Chem* 1996; 271: 1558-65.
9. Yoo SH. Coupling of the IP_3 receptor/ Ca^{2+} channel with Ca^{2+} storage proteins chromogranins A and B in secretory granules. *Trends Neurosci* 2000; 23: 424-8.
10. Fischer-Colbrie R, Frischlenschlager I. Immunological characterization of secretory proteins of chromaffin granules: chromogranin A, chromogranin B and enkephalin-containing peptides. *J Neurochem* 1985; 44: 1854-61.
11. Rosa P, Zanini A. Characterization of adenohipophyseal polypeptides by two-dimensional gel electrophoresis. *Mol Cell Endocrinol* 1981; 24: 181-93.
12. Iacangelo A, Affolter H, Eiden L, Herbert E, Grimes M. Bovine chromogranin A: its sequence and the distribution of its messenger RNA in tissues. *Nature* 1986; 323: 82-6.
13. Benedum U, Bauerle P, Konecki D, et al. The primary structure of bovine CGA: a representative for a class of acidic secretory proteins common to a variety of peptidergic cells. *EMBO J* 1986; 5: 1495-502.
14. Winkler H, Fischer-Colbrie R. The chromogranin A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992; 49: 497-528.
15. Benedum U, Lamoroux A, Konecki D, et al. The primary structure of human secretogranin I (chromogranin B): comparison with chromogranin A reveals homologous terminal domains and a large intervening variable region. *EMBO J* 1987; 6: 1203-11.

RÉFÉRENCES

16. Gerdes H, Rosa P, Phillips E, *et al.* The primary structure of human sécrétogranine II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation. *J Biol Chem* 1989; 264: 12009-15.
17. Ottiger HP, Battenberg EF, Tsou AP, Bloom FE, Stutcliffe JG. 1B1075: a brain- and pituitary-specific mRNA that encodes a novel chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles. *J Neurosci* 1990; 10: 3135-47.
18. Krisch K, Horvat G, Krisch I, *et al.* Immunohistochemical characterization of a novel secretory protein (defined by monoclonal antibody H1SL-19) of peptide hormone producing cells which is distinct from chromogranin A, B and C. *Lab Invest* 1988; 58: 411-20.
19. Iguchi H, Natori S, Nawata H, *et al.* Presence of the novel pituitary protein 7B2 in bovine chromaffin granules: possible co-release of 7B2 and catecholamine as induced by nicotine. *J Neurochem* 1987; 49: 1810-4.
20. Ischia R, Lovisetti SP, Hogue AR, Wolkerdorfer M, Winkler H, Fischer-Colbrie R. Molecular cloning and characterization of NESP55, a novel chromogranin-like precursor of a peptide with 5-HT1B receptor antagonist activity. *J Biol Chem* 1997; 272: 11657-62.
21. Simon-Chazottes D, Wu H, Parmer RJ, *et al.* Assignment of the chromogranin A (Chga) locus to homologous regions on mouse chromosome 12 and rat chromosome 6. *Genomics* 1993; 17: 252-5.
22. Strub JM, Sorokine O, Van Doorselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Phosphorylation and O-glycosylation of bovine chromogranin A from adrenal medullary chromaffin granules and their relationship with biological activities. *J Biol Chem* 1997; 272: 11928-36.
23. Metz-Boutigue MH, Garcia-Sablone P, Hogue-Angeletti R, Aunis D. Intracellular and extracellular processing of chromogranin A: determination of cleavage sites. *Eur J Biochem* 1993; 217: 247-57.
24. Gadroy P, Stridsberg M, Capon C, *et al.* Phosphorylation and O-glycosylation sites of human chromogranin A (CGA79-439) from urine of patients with carcinoid tumors. *J Biol Chem* 1998; 273: 34087-97.
25. Tooze SA, Huttner WB. Cell-free protein sorting to the regulated and constitutive secretory pathways. *Cell* 1990; 60: 837-47.
26. Glombik MM, Krömer A, Salm T, Huttner WB, Gerdes HH. The disulfide-bonded loop of chromogranin B mediates membrane binding and directs sorting from the trans-Golgi network to secretory granules. *EMBO J* 1999; 18: 1059-70.
27. 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: 1223-31.
28. Muñoz DG. Chromogranin A-like immunoreactive neurites are major constituents of senile plaques. *Lab Invest* 1991; 64: 826-32.
29. 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: 13-6.
30. Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Taupenot L, *et al.* Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 14339-46.
31. Ciesielski-Treska J, Aunis D. Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. In: Helle KB, Aunis D, eds. *Chromogranins, functional and clinical aspects*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000: 291-8.
32. Dillen L, Miserez B, Claeys M, Aunis D, De Potter W. Posttranslational processing of proenkephalins and chromogranins/secretogranins. *Neurochem Int* 1993; 22: 315-52.
33. Strub JM, Garcia-Sablone P, Lonning K, *et al.* Processing of chromogranin B in bovine adrenal medulla: identification of secretolytic, the endogenous C-terminal fragment of residues 614-626 with antibacterial activity. *Eur J Biochem* 1995; 229: 356-68.
34. Cetin Y, Aunis D, Bader MF, *et al.* Chromostatin, a chromogranin A-derived bioactive peptide, is present in human pancreatic insulin (β) cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2360-4.
35. Kimura N, Funakoshi A, Aunis D, Tateishi K, Miura W, Nagura H. Immunohistochemical localization of chromostatin and pancreastatin, chromogranin A-derived bioactive peptides, in normal and neoplastic neuroendocrine tissues. *Endocrinol Pathol* 1995; 6: 35-43.
36. Kanno T, Asada N, Yanase H, *et al.* Salivary secretion of highly concentrated chromogranin A in response to noradrenaline and acetylcholine in isolated and perfused rat submandibular glands. *Exp Physiol* 1999; 84: 1073-83.
37. Tatemoto K, Efendic S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, Barchas JD. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature* 1986; 324: 476-8.
38. Eiden LE. Is chromogranin a prohormone? *Nature* 1987; 325: 301.
39. Helle KB, Angeletti RH. Chromogranin A: a multipurpose prohormone? *Acta Physiol Scand* 1994; 152: 1-10.
40. Metz-Boutigue MH, Goumon Y, Lugardon K, Strub JM, Aunis D. Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18: 249-66.
41. Strub JM, Goumon Y, Lugardon K, *et al.* Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *J Biol Chem* 1996; 271: 28533-40.
42. Lugardon K, Raffner R, Goumon Y, *et al.* Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem* 2000; 275: 19745-53.

* GLOSSAIRE *

CGA : chromogranine A.
CGB : chromogranine B.
SgII : sécrétogranine II.
GC : granule chromaffine.
GSCD : granule de sécrétion à cœur dense.
SV : vésicule claire.

Remerciements

Le travail des auteurs a bénéficié de l'aide de l'Inserm, du ministère de la Recherche, de l'Université Louis-Pasteur de Strasbourg, de la Région Alsace, de la direction des recherches études et techniques de la DGA, de l'ARC, de la Ligue contre le cancer, de la Fondation pour la recherche médicale, de la Fondation recherche et partage et de l'Institut Meiji à Odowara (Japon).

Summary

Chromogranins : from the discovery to the function

Granins are proteins constituents of dense core secretory granules in endocrine and neuroendocrine cells and in central and peripheral neurons. Two proteins of this family, of which the oldest has been described for the first time in 1965, share specific structure homologies and thus should be considered apart. These two members are chromogranin A and chromogranin B, two major components of adrenal medullary secretory chromaffin granules. The primary structure of these two proteins is well characterized, however their biological function is not yet fully elucidated. A typical disulfide loop is present on their N-terminal domain that could play a role in protein sorting in secretory granules of the regulated pathway. Chromogranins A and B bind large amounts of calcium which suggests that they could be involved in regulating intracellular calcium homeostasis. Within secretory granules and once released in the extracellular space, these two proteins are actively processed into degradation peptides. Most recent advances have aimed at characterizing these peptides and at assigning biological role to them. Several chromogranin-derived peptides have been identified so far, however their biological function is not fully identified.