

Transport vésiculaire dans les cellules neuroendocrines : l'annexine II est une protéine essentielle de l'exocytose contrôlée

Les cellules neuroendocrines et les neurones communiquent par émission et réception de molécules chimiques hautement spécialisées. Ces molécules sont stockées dans des vésicules (neurotransmetteurs) ou des granules (hormones, neuropeptides) et libérées par exocytose. L'exocytose est un mécanisme étroitement contrôlé par le calcium impliquant : (1) la mobilisation des granules ou des vésicules ; (2) leur mise en place au niveau des sites d'exocytose et (3) la fusion entre les membranes vésiculaires et plasmique qui permet la libération des produits de sécrétion vers l'espace extracellulaire. L'aspect moléculaire de l'exocytose est resté méconnu pendant de nombreuses

années. Grâce à la convergence de techniques issues de la biochimie, de la biologie et de la génétique, une première cartographie des protéines impliquées dans l'exocytose a pu être établie. Les résultats obtenus révèlent un mécanisme général de fusion entre vésicules et membrane cible pour l'ensemble des étapes du circuit vésiculaire intracellulaire. Ce modèle unitaire serait applicable à l'exocytose, avec la spécificité d'être étroitement contrôlé de telle sorte que la fusion soit asservie à une variation cytosolique de calcium [1-3].

La libération des neurotransmetteurs par les neurones est un phénomène rapide qui a lieu dans la milliseconde qui suit la stimulation [4]. Cela

implique un prépositionnement des vésicules synaptiques au niveau de la membrane plasmique. Selon le modèle SNARE (*SNAP receptors*) [1], cet arrimage des vésicules se ferait grâce à un complexe macromoléculaire impliquant des éléments vésiculaires (synaptobrevine et synaptotagmine), des éléments présynaptiques (SNAP-25 et syntaxine) et des partenaires cytosoliques dont une ATPase (NSF) et les protéines SNAP (*soluble NSF attachment protein*) (*m/s* n° 6-7, vol. 9, p. 802, n° 8-9, vol. 9, p. 1000) (figure 1). L'hydrolyse de l'ATP par NSF (*N-ethyl maleimide-sensitive fusion*) favoriserait la fusion entre les membranes vésiculaire et plasmique en produisant la dissociation du complexe SNARE. Le processus de fusion lui-même, en particulier l'intervention éventuelle de protéines fusio-gènes et le rôle des lipides membranaires, reste à l'heure actuelle très mal compris.

A l'inverse, les cellules neuroendocrines sécrètent les neuropeptides et neurohormones par un processus lent de plusieurs centaines de millisecondes [5]. Ce délai est dû au faible nombre de granules arrimés à la membrane plasmique dans une cellule neuroendocrine au repos. La présence de synaptobrevine, de syntaxine et de SNAP-25 et l'inhibition de la sécrétion par les toxines clostridiales [6] indiquent que l'accostage des granules à la membrane plasmique pourrait requérir la formation du complexe SNARE. Néanmoins, à l'état de repos, l'essentiel de la population granulaire est maintenu à l'écart de la membrane plasmique par un filet d'actine [7] et leur mise en place dans le site d'exocytose requiert probablement l'intervention d'un certain nombre d'étapes dont les bases moléculaires restent à élucider.

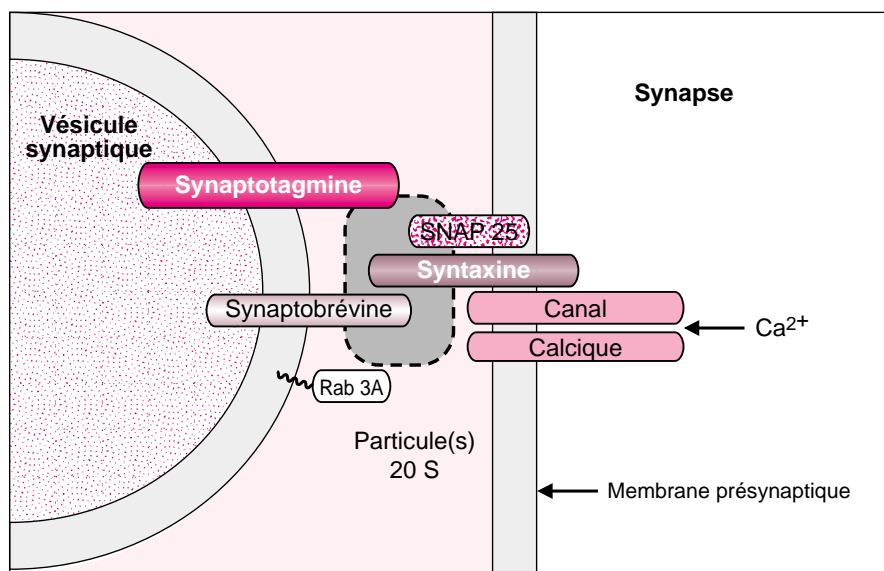


Figure 1. **Modèle de l'arrimage des vésicules synaptiques à la membrane présynaptique.** Il se ferait grâce à un complexe macromoléculaire impliquant des éléments vésiculaires (synaptobrevine et synaptotagmine), des éléments présynaptiques (SNAP-25 et syntaxine) et des partenaires cytosoliques dont une ATPase (NSF) et les protéines SNAP. Syntaxine et synaptobrevine seraient liées par l'intermédiaire du complexe NSF/SNAP (en gris).

L'annexine II : quelques atouts physiques pour l'exocytose

L'annexine II (p36) fait partie d'une famille de protéines sensibles au calcium et capables de se fixer de manière réversible à des phospholipides membranaires [8, 9]. Les annexines possèdent en commun

une séquence répétitive de 70 acides aminés contenant un site de liaison pour les phospholipides, un site de liaison pour l'actine et un alignement de 17 acides aminés qui correspond à un site potentiel de liaison pour le calcium différent du motif classique de type EF rencontré dans bon nombre de calcioprotéines

(figure 2). L'analyse tridimensionnelle indique que les annexines sont organisées en quatre domaines constitués chacun de cinq hélices α et formant en leur milieu un pore hydrophile. L'ensemble forme une structure plane et légèrement incurvée avec une face convexe présentant les sites de liaison du calcium qui s'appuie contre la bicouche lipidique et une face concave rapprochant les domaines amino- et carboxyterminaux [10]. L'annexine II est une particularité de la famille puisqu'elle existe au sein de la cellule sous la forme d'un monomère ou sous la forme d'un hétérotétramère constitué de deux molécules de p36 étroitement liées à deux molécules de p11 (figure 2). La molécule p11 est une protéine de 91 acides aminés dont la séquence présente une forte homologie avec les protéines de la famille S-100 abondantes dans le cerveau et dont on ignore encore les fonctions. Le domaine aminoterminal de p36 contient le site d'interaction avec p11 et des sites de phosphorylation pour les protéines kinases C (PKC) et pp60^{src} qui jouent un rôle important dans la régulation de l'activité biologique (figure 2). A l'instar des autres membres de la famille, l'annexine II possède la faculté de réticuler les filaments d'actine et d'agréger les membranes biologiques en présence de calcium [9]. Toutefois, l'annexine II tétramérique est la seule protéine de la famille capable d'induire une agrégation membranaire en présence de concentrations micromolaires de calcium [11]. Les molécules de p36 ont également la faculté de s'organiser dans une bicouche lipidique pour y former un canal ionique transmembranaire [10].

L'annexine II a pendant longtemps été considérée comme une protéine non fusiogène, capable de rapprocher suffisamment des bicouches lipidiques jusqu'à établir des contacts mais incapable de produire une fusion membranaire. Cependant une étude récente de Regnoulf *et al.* [12] indique que la phosphorylation par la PKC du tétramère d'annexine II ayant établi des contacts membranaires pourrait induire un changement conformationnel de la protéine

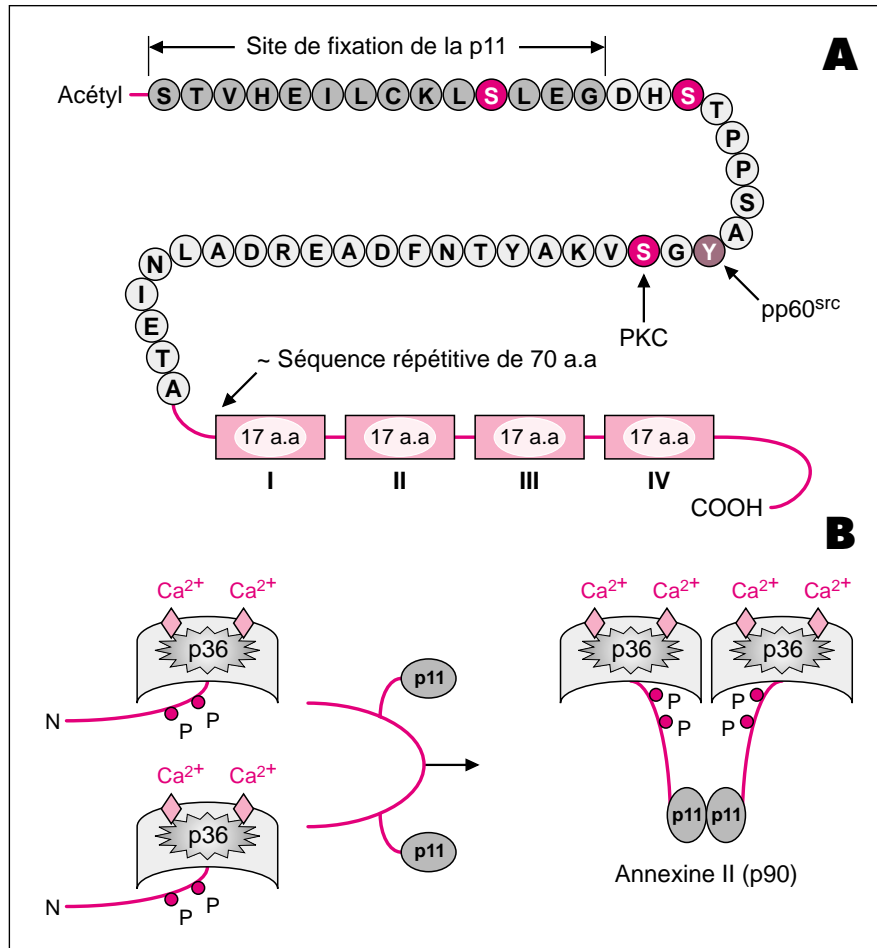


Figure 2. **Représentation schématique de l'annexine II.** L'annexine II est une protéine de 36 kDa comprenant deux domaines fonctionnels. Le domaine aminoterminal, constitué des 30 premiers acides aminés, comprend le site de liaison pour la p11 et les sites de phosphorylation (sérines et tyrosine). Le domaine carboxyterminal est organisé en quatre séquences répétitives de 70 résidus contenant chacune un site de liaison pour le calcium, un site pour l'actine et un site pour les phospholipides. Cette séquence de 70 acides aminés (a.a.) caractérise les annexines. Elle contient une séquence de 17 acides aminés qui est un site potentiel de liaison du calcium. Dans la cellule, deux molécules d'annexine II peuvent s'associer à deux molécules de p11 et former ainsi un hétérotétramère de 90 kDa. Seul le tétramère p90 peut agréger des membranes biologiques en présence de concentrations micromolaires de calcium et provoquer leur fusion après phosphorylation par la protéine kinase C. Code à une lettre des acides aminés : A : Ala ; C : Cys ; D : Asp ; E : Glu ; F : Phe ; G : Gly ; H : His ; I : Ile ; K : Lys ; L : Leu ; M : Met ; N : Asn ; P : Pro ; Q : Gln ; R : Arg ; S : Ser ; T : Thr ; V : Val ; W : Trp ; Y : Tyr.

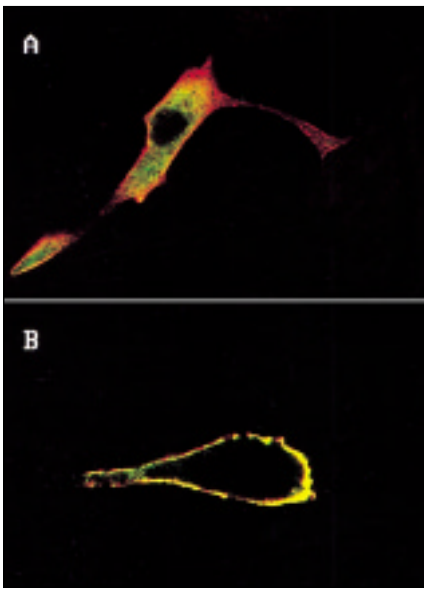


Figure 3. Localisation intracellulaire de l'annexine II (p36) et de p11 dans les cellules chromaffines à l'état de repos (A) et stimulées par la nicotine (B). L'image obtenue par microscopie confocale montre une coupe optique de cellules doublement marquées par un anticorps polyclonal de lapin anti-p36 révélé par un deuxième anticorps couplé à la fluorescéine et par un anticorps monoclonal anti-p11 révélé par un deuxième anticorps couplé à la rhodamine. Dans la cellule au repos, p36 (vert) est essentiellement cytosolique tandis que p11 (rouge) se trouve en périphérie sous la membrane plasmique. La stimulation par la nicotine produit une translocation de p36 vers la périphérie: l'apparition d'une couleur orange révèle la co-localisation de p36 et de p11 dans la région subplasmalemmale (x 1000).

conduisant à la fusion des membranes. Ce résultat inattendu offre un cadre conceptuel extrêmement séduisant dans lequel le tétramère d'annexine II, après avoir facilité l'arrimage des granules de sécrétion dans une cellule neuroendocrine stimulée, deviendrait à l'aide de la PKC une véritable protéine fusio-gène permettant l'étape ultime de l'exocytose. De fait, des observations morphologiques ultrastructurales révèlent la présence d'annexine II dans une zone de pontage entre les granules et la membrane plasmique lorsque des cellules chromaffines sont stimulées par un agoniste cholinergique tel que la nicotine [13].

L'annexine II: sa présence dans la zone subplasmalemmale est essentielle à l'exocytose des granules de sécrétion

La cellule chromaffine de la médullosurrénale est un modèle expérimental illustrant parfaitement la richesse et la complexité des mécanismes moléculaires contrôlant la libération du granule de sécrétion neuroendocrine. Les techniques de perméabilisation sélective de la membrane plasmique ont permis d'observer que l'exocytose ne concerne pas uniquement des protéines membranaires. En effet, les cellules chromaf-

lines perméabilisées perdent rapidement un certain nombre de protéines cytosoliques et sont progressivement incapables de sécréter. Certaines de ces protéines sont des éléments essentiels de l'exocytose puisqu'il est possible de restaurer la sécrétion en réintroduisant dans le cytoplasme les protéines solubles perdues [14]. La réintroduction d'annexine II purifiée permet un rétablissement partiel de la sécrétion des catécholamines [15]. Cette propriété requiert spécifiquement la forme tétramérique de l'annexine II et nécessite une étape de phosphorylation par la PKC. Ces données ont conforté l'annexine II dans son rôle de protéine cytosolique susceptible d'être impliquée dans la machinerie moléculaire de l'exocytose. Cependant, d'autres travaux indiquent que l'annexine II ne peut restaurer la sécrétion des cellules perméabilisées sans la participation d'une protéine de faible poids moléculaire de nature inconnue [9] et qu'une préparation cytosolique dépourvue d'annexine II peut également stimuler la fonction sécrétrice [16]. A ce jour, la participation et l'importance de l'annexine II au cours du processus d'exocytose reste donc une question largement controversée.

Dans l'espoir d'apporter des éléments nouveaux à ce débat, nous

avons récemment étudié la localisation de l'annexine II dans les cellules chromaffines à l'aide de techniques biochimiques et immunocytochimiques [17]. Nos résultats montrent que p36 est essentiellement cytosolique et soluble dans les cellules chromaffines au repos (figure 3A). La molécule p11 se trouve associée au cytosquelette de la région subplasmalemmale (figure 3A) mais, curieusement, uniquement dans les cellules de type adrénérique. La stimulation des cellules chromaffines par la nicotine produit une « translocation » de p36 vers le cytosquelette périphérique (figure 3B), aussi bien dans les cellules adrénériques que noradrénériques. Cette translocation est suivie d'une phosphorylation qui semble avoir lieu dans la région subplasmalemmale où se trouve la PKC [17]. Nous avons évalué l'importance fonctionnelle de la translocation et de la phosphorylation de p36 en microinjectant dans les cellules chromaffines un peptide synthétique de 12 acides aminés dont la séquence est analogue au domaine aminoterminal de p36 contenant les sites phosphorylables par la PKC. Ce peptide bloque complètement la translocation de p36 stimulée par un sécrétagogue aussi bien dans les cellules adrénériques que noradrénériques et inhibe fortement l'activité sécrétrice estimée par ampérométrie sur chaque cellule micro-injectée (figure 4). La translocation de l'annexine II vers la région subplasmalemmale où se trouvent les sites d'exocytose et sa phosphorylation semblent donc être des événements majeurs de l'exocytose. A la lumière des résultats récemment publiés montrant que la phosphorylation par la PKC fait de l'annexine II une protéine fusio-gène [12], il est tentant d'impliquer l'annexine II dans l'étape de fusion entre membranes granulaire et plasmique. La présence d'annexine II phosphorylée au niveau de la membrane plasmique des cellules stimulées ainsi que l'inhibition de la sécrétion observée lorsque p36 est maintenue dans le cytosol sont des arguments sérieux en faveur de cette hypothèse.

La présence exclusive de p11 dans les cellules adrénériques [17] pose

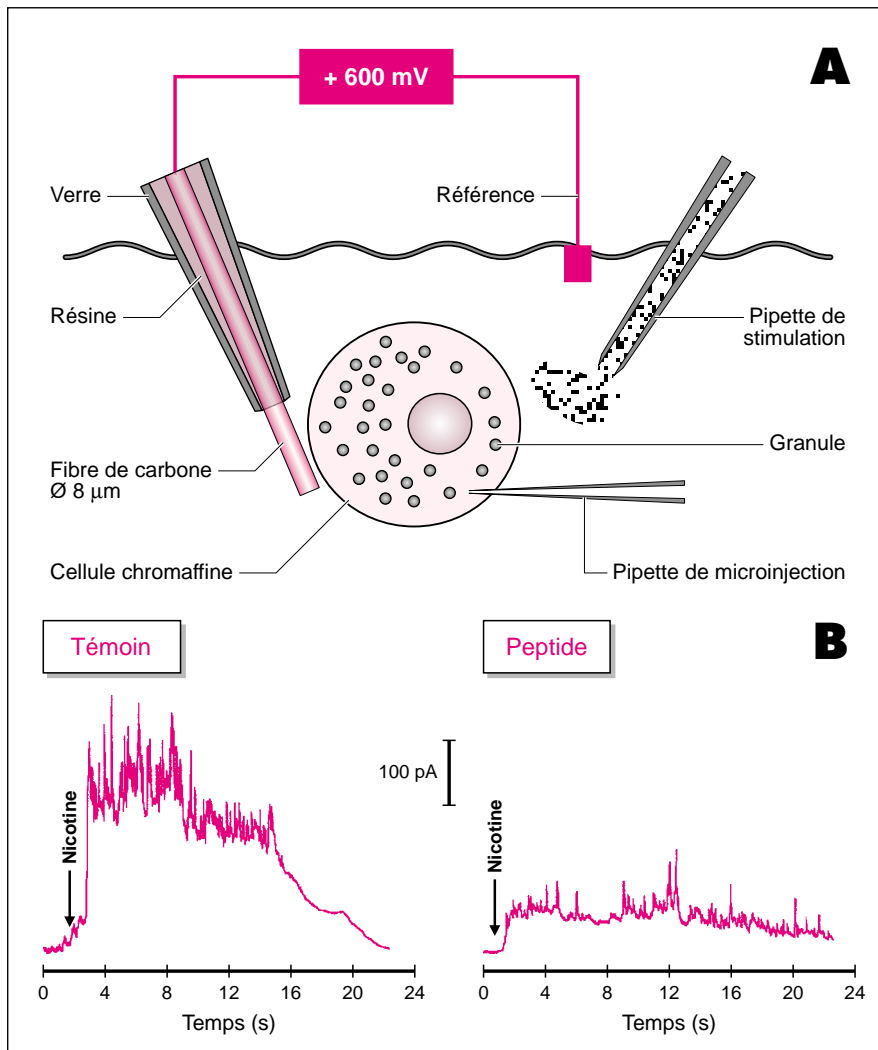


Figure 4. **Effet d'un peptide synthétique correspondant au domaine aminoterminal de p36 (peptide p36[15-26]) sur l'exocytose des catécholamines.** (A) Schéma illustrant la méthode utilisée pour estimer l'activité sécrétrice d'une cellule chromaffine isolée. Le peptide synthétique est introduit dans le cytoplasme de chaque cellule par micro-injection à l'aide d'une micropipette. La cellule est ensuite stimulée par une application locale de nicotine et la sécrétion des catécholamines est mesurée par ampérométrie. Cette méthode consiste à oxyder les catécholamines libérées dans le milieu extracellulaire et à capter le courant formé à l'aide d'une électrode en fibre de carbone placée contre la cellule. (B) **Activité sécrétrice d'une cellule micro-injectée avec de l'eau (contrôle) et d'une cellule micro-injectée avec le peptide p36 [15-26].** La stimulation par la nicotine produit une augmentation rapide du courant détecté par la fibre de carbone. Le profil du signal montre une série de pics correspondant à la libération des catécholamines stockées dans un seul granule. La micro-injection du peptide p36 [15-26] réduit de plus de 60% l'activité sécrétrice estimée en intégrant l'aire délimitée par la courbe de courant.

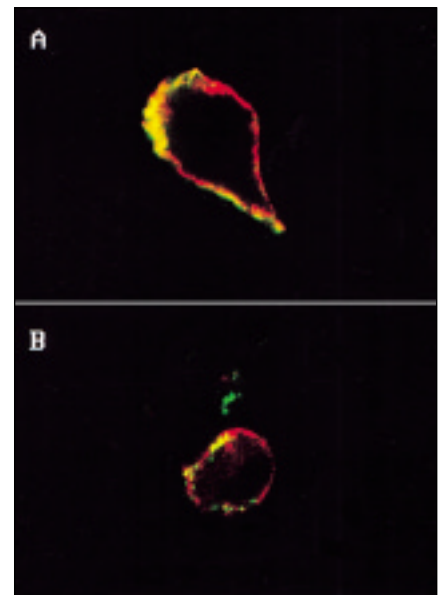


Figure 5. **Double marquage visualisant par microscopie confocale la présence de p11 et l'activité sécrétrice de cellules chromaffines perméabilisées et stimulées par 10 µM (A) ou 100 µM (B) de calcium.** Les cellules chromaffines perméabilisées sont stimulées par une élévation de calcium dans le milieu d'incubation en présence d'anticorps anti-dopamine-β-hydroxylase. La dopamine-β-hydroxylase étant une enzyme intragranulaire, elle n'est accessible à l'anticorps qu'au niveau des sites d'exocytose. Les cellules sont ensuite fixées puis marquées avec un anticorps anti-p11. Les anticorps anti-dopamine-β-hydroxylase sont révélés par un deuxième anticorps couplé à la fluorescéine tandis que les anticorps anti-p11 sont révélés par un anticorps couplé à la rhodamine. L'apparition de sites d'exocytose (vert) uniquement dans les cellules exprimant p11 (rouge) montre que seules les cellules adrénérgiques sont capables de répondre à une stimulation par 10 µM de calcium. En revanche, une stimulation par une concentration plus forte de calcium (100 µM) produit l'apparition de sites d'exocytose aussi bien dans les cellules adrénérgiques contenant p11 que dans les cellules noradrénérgiques dépourvues de p11 (x 1500).

la double question du rôle de p11 dans les cellules adrénérergiques et de l'identité de la cible de p36 dans les cellules noradrénérergiques. Nous avons tenté de répondre à la première en comparant la translocation de p36 dans les deux types cellulaires. Nos observations soulignent une différence importante de sensibilité au calcium : ainsi, la translocation de p36 nécessite des concentrations de calcium de l'ordre de 100 μ M dans les cellules noradrénérergiques alors que 10 μ M suffisent dans les cellules adrénérergiques [17]. Nous avons alors comparé l'activité sécrétrice des cellules adrénérergiques et noradrénérergiques et, à notre grande surprise, observé que les cellules noradrénérergiques requièrent des concentrations de calcium dix fois plus importantes pour déclencher l'exocytose (figure 5). La présence de p11 dans la région subplasmalemmale et la formation possible du tétramère d'annexine II semblent donc conférer à la machinerie de l'exocytose une plus grande sensibilité au calcium. Ces résultats mettent en lumière des différences fondamentales entre cellules adrénérergiques et noradrénérergiques qui se distinguent non seulement par la nature du transmetteur synthétisé et libéré, mais également par le fonctionnement du processus de libération.

Conclusion et perspectives

Malgré des progrès constants et souvent stimulants, la nature de la participation de l'annexine II au processus d'exocytose reste énigmatique. La présence d'une activité sécrétrice résiduelle dans une cellule stimulée n'ayant formé que peu ou pas d'annexine II tétramérique dans sa zone subplasmalemmale pourrait plaider en faveur de l'existence de deux voies parallèles d'exocytose. Ainsi, un double mécanisme d'exocytose a été décrit dans des cellules épithéliales : leur sécrétion apicale impliquerait une annexine, alors que la sécrétion basolatérale nécessite la formation du complexe SNARE. Plus simplement, la participation de l'annexine II pourrait être requise au niveau de l'accostage des granules de sécrétion à la membrane plasmique

puisque qu'une cellule neuroendocrine stimulée peut libérer jusqu'à 4000 granules alors qu'elle n'a au départ que 200 à 300 granules arrivés au niveau des sites d'exocytose. Dans ce contexte, l'annexine II pourrait avoir une action sur le cytosquelette d'actine et/ou sur la mise en place des interactions protéiques du complexe SNARE. Toutefois, l'exocytose est une machinerie multiprotéique dont le but ultime est de conduire à la fusion membranaire. Malgré les progrès remarquables accomplis ces dernières années, les bases moléculaires des interactions protéines-membranes restent à l'heure actuelle très mal connues. L'annexine II est à ce jour le seul élément identifié du processus d'exocytose capable *in vitro* de produire, en présence de calcium, une fusion entre deux membranes. L'élucidation des relations entre les propriétés structurales de l'annexine II et la dynamique des membranes au cours de la sécrétion neuroendocrine devrait permettre d'accorder à l'annexine II une place définitive dans la machinerie protéique conduisant à l'exocytose ■

RÉFÉRENCES

- Rothman JE. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 1994 ; 372 : 55-62.
- Südhof TC, De Camilli P, Nieman H, Jahn R. Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell* 1993; 75: 1-4.
- Deloye F, Schiavo G, Doussau F, Montecucco C, Poulain B. Mode d'action moléculaire des neurotoxines botuliques et tétanique. *Med Sci* 1996; 12: 175-82.
- Llinas R, Steinberg IZ, Walton K. Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* 1981 ; 33: 323-51.
- Chow RH, von Rüden L, Neher E. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 1992; 356: 60-3.
- Burgoyne RD, Morgan A, Barbard JO, Chamberlain LH, Glenn DE, Kibble AV. SNAPs and SNAREs in exocytosis in chromaffin cells. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 653-8.
- Aunis D, Bader MF. The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J Exp Biol* 1988; 139: 253-66.

- Raynal P, Pollard HB. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994 ; 1197 : 63-93.
- Waisman DM. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem* 1995; 149/150: 301-22.
- Burger A, Berendes R, Liemann S, Benz J, Hofman A, Göttig P, Huber R, Gerke V, Thiel C, Römisch J, Weber K. The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a peripheral membrane protein. *J Mol Biol* 1996; 257: 839-47.
- Drust DS, Creutz CE. Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* 1988; 331: 88-91.
- Regnouf F, Sagot I, Delouche B, Devillers G, Cartaud J, Henry JP, Pradel LA. *In vitro* phosphorylation of annexin II heterotetramer by protein kinase C. Comparative properties of the unphosphorylated and phosphorylated annexin II on the aggregation and fusion of chromaffin granule membranes. *J Biol Chem* 1995; 270: 27143-50.
- Nakata T, Sobue K, Hirokawa N. Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 1990; 110: 13-25.
- Sarafian T, Aunis D, Bader MF. Loss of proteins from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells essential for exocytosis. *J Biol Chem* 1987; 262: 16671-6.
- Sarafian T, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF. The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol* 1991; 114: 1135-47.
- Wu YN, Wagner PD. Calpactin-depleted cytosolic proteins restore Ca^{2+} -dependent secretion to digitonin-permeabilized bovine chromaffin cells. *FEBS Lett* 1991; 282: 197-9.
- Chasserot-Golaz S, Vitale N, Sagot I, Delouche B, Dirrig S, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF. Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol* 1996; 133: 1217-36.

Sylvette Chasserot-Golaz

Chargée de recherche à l'Inserm.

Marie-France Bader

Directeur de recherche à l'Inserm.

Inserm U. 338, Biologie de la Communication Cellulaire, 5, rue Blaise-Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France.

TIRÉS À PART

M.F. Bader.