



HAL
open science

Analyse des mouvements des granules de sécrétion à proximité de la membrane plasmique par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente

Sébastien Huet

► **To cite this version:**

Sébastien Huet. Analyse des mouvements des granules de sécrétion à proximité de la membrane plasmique par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente. Biophysique [physics.bioph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT: . tel-00090014

HAL Id: tel-00090014

<https://theses.hal.science/tel-00090014>

Submitted on 25 Aug 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PIERRE & MARIE CURIE (Paris VI)
Ecole Doctorale Inter///Bio

Mémoire de Thèse

présenté par

Sébastien Huet

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Pierre & Marie Curie (Paris VI)
Spécialité : Interface Physique Biologie

**Analyse des mouvements des granules de sécrétion à
proximité de la membrane plasmique par
microscopie de fluorescence à excitation par onde
évanescence**

Soutenue publiquement le 30 Juin 2006 devant le jury composé de :

Mme Laurence Salomé
Mme Marie-France Bader
Mr Antoine Triller
Mr Jean-Francois Joanny
Mr Jean-Pierre Henry
Mme Sophie Cribier

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Co-directeur de thèse
Co-directrice de thèse

UNIVERSITE PIERRE & MARIE CURIE (Paris VI)
Ecole Doctorale Inter///Bio

Mémoire de Thèse

présenté par

Sébastien Huet

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Pierre & Marie Curie (Paris VI)
Spécialité : Interface Physique Biologie

**Analyse des mouvements des granules de sécrétion à
proximité de la membrane plasmique par
microscopie de fluorescence à excitation par onde
évanescence**

Soutenu publiquement le 30 Juin 2006 devant le jury composé de :

Mme Laurence Salomé
Mme Marie-France Bader
Mr Antoine Triller
Mr Jean-Francois Joanny
Mr Jean-Pierre Henry
Mme Sophie Cribier

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Co-directeur de thèse
Co-directrice de thèse

Remerciements

A quelques jours de la fin de cette aventure de plus de quatre ans, je me demande encore ce qui a bien pu me pousser à choisir le Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Sécrétion pour effectuer mon stage de DEA puis ma thèse. Lorsque je suis venu à l'IBPC pour la première fois, j'ai traversé des couloirs quelques peu défraîchis et encombrés d'objets insolites, je me suis retrouvé face à de grands bocaux contenant une substance bizarre dont j'ai appris beaucoup plus tard qu'il s'agissait d'agar-agar, j'ai même croisé Claire en train de râler (certaines mauvaises langues diront que c'est un pléonasme) ; j'entrais dans un monde étrange... J'ai ensuite subi ma première réunion avec Jean-Pierre (la première d'une longue série...) au début de laquelle j'ai fait une erreur stratégique : je me suis installé dans le canapé du bureau. Jean-Pierre a alors commencé à me parler de granules de sécrétion, d'exocytose, de protéines Rab et d'autres choses toutes plus exotiques les unes que les autres pour le jeune opticien que j'étais alors et pour qui les connaissances en biologie se limitaient à ce que j'avais appris au lycée. Je me suis alors progressivement enfoncé dans le canapé en écoutant Jean-Pierre me décrire le monde "merveilleux" de la sécrétion régulée. Pourquoi donc, après ce premier contact plutôt déroutant, ai-je choisi de m'aventurer dans cet univers inconnu alors que j'aurais pu aller travailler sur des sujets "normaux" comme le refroidissement d'atomes par laser, la diffusion Raman stimulée ou le retournement temporel par conjugaison de phase ? Je crois que c'est justement la volonté de découvrir un monde qui m'était jusque là totalement étranger qui a été à l'origine de ce choix. J'en arrive alors à ce pourquoi je me suis lancé dans ce long préambule. En effet, si j'ai pu apprendre tant de choses au cours de ces quatre années, c'est bien grâce à toutes les personnes que j'ai rencontrées au cours de ma thèse et en particulier celles que j'ai côtoyées au sein du laboratoire. Merci donc à vous tous de m'avoir ouvert les portes de ce monde complexe et fascinant de la biologie cellulaire (promis, j'essaierai d'être moins grandiloquent dans la suite).

Après ces remerciements généraux, passons à présents aux remerciements plus personnalisés. Je tiens ainsi à remercier tout d'abord Marie-France Bader et Laurence Salomé pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Merci également à Jean-François Joanny et Antoine Triller d'avoir bien voulu faire parti de mon jury.

Merci à Jean-Pierre Henry qui m'a encadré tout au long de cette thèse. Même si nous n'avons pas toujours été d'accord sur tout, j'ai particulièrement apprécié son ouverture et sa manière toujours positive et volontaire d'aborder les questions scientifiques que nous avons cherché à résoudre ensemble au cours de ces quatre années. Merci aussi pour l'autonomie qu'il m'a accordée tout au long de cette thèse, j'espère en avoir fait bon usage. Juste une petite question : pourra-t-on un jour se tutoyer ?

Merci aussi à ma seconde cheffe Sophie Cribier qui, après que j'aie eu réussi à la "coincer" dans son bureau, était toujours disponible pour répondre à mes questions. Je savais qu'à chaque fois que je montais la voir, j'en avais pour un bon moment (certaines personnes de l'institut que je ne nommerais pas insinuent que Sophie est assez bavarde...). Son point de vue quelque peu extérieur au sujet s'est souvent révélé très pertinent. Contrairement à ce qu'elle a souvent affirmé, je ne pense pas que le fait d'avoir deux directeurs de thèse ait été un handicap en raison de la dilution des responsabilités que cela entraîne. Je crois au contraire que cela m'a permis de profiter de deux sensibilités différentes et complémentaires.

Merci à Samuel Tran avec qui j'ai travaillé pendant plus de trois ans sur le montage de microscopie à onde évanescente. Je crois que le fait d'être deux à travailler en parallèle sur ce montage a vraiment été une grande chance. En ce qui me concerne, je pense que cette collaboration au jour le jour nous a permis de progresser plus rapidement et de résoudre efficacement les nombreux problèmes expérimentaux que nous avons rencontrés. Merci donc Samuel de m'avoir supporté durant trois ans. J'envie tes futurs élèves, ils auront pour professeur la personne la plus agréable à vivre que j'ai eu l'occasion de rencontrer depuis 27 ans.

Merci aussi à Erdem Karatekin pour son aide lors de l'écriture de l'article soumis à *The Biophysical Journal* et pour toutes les discussions scientifiques ou non que nous avons pu avoir ensemble au cours de ma thèse. Surtout, n'oublie pas que les ultrasons sont dangereux pour tes gonades !!!

Merci au couple infernal, aux Laurel et Hardy de l'UPR 1929, à savoir François Darchen et Claire Desnos. Je ne comprends toujours pas comment ils peuvent travailler ensemble depuis plus de 15 ans... Sans ces deux phénomènes, ma thèse aurait sans doute eu une saveur nettement moins biologique. Je suis ainsi très reconnaissant à Claire et François de m'avoir

permis de travailler avec eux pour tenter de percer les secrets du complexe Rab27A/MyRIP/Myosine Va. Si le fait d'être un homme m'a heureusement permis de ne pas avoir à danser le rock avec François lors de la soirée organisée au cours de chaque réunion annuelle du Club Exocytose/Endocytose (pour plus de détails à ce sujet, voir une certaine CD), j'ai en revanche beaucoup profité du fait que François s'est toujours montré disponible lorsque j'arrivais dans son bureau afin de lui poser des questions qui, je l'espère, sont devenues de moins en moins bêtes au fur et à mesure de l'avancée de ma thèse (c'est ainsi François qui m'a confirmé que l'eau distillée n'était pas un milieu de culture idéal !). Un petit message pour Claire : si tu veux, un jour, nous écrivons ensemble un article sur la remarquable stabilité du nombre de granules de sécrétion à proximité de la membrane plasmique dans les cellules BON.

Merci également à l'ensemble des membres de l'UPR 1929 que j'ai côtoyé au cours de ma thèse. Ils ont tous contribué à faire de ce laboratoire un endroit agréable et chaleureux. J'espère pouvoir retrouver une telle ambiance au sein l'équipe que je vais rejoindre lors de mon post-doc. Je tiens à remercier tout particulièrement Bruno Gasnier, ce fut une grande chance de pouvoir discuter avec quelqu'un qui ne peut pas s'empêcher de dire des choses intelligentes. Merci également à Corinne Sagné dont je n'oublierais pas de sitôt les fous rires à propos des blattes américaines ou lors des discussions du vendredi midi à la cantine du ministère. Merci aussi à Irène, Viviane, Anna, Anne, Raquel, Caroline, Christophe, Cécile, Gian-Carlo, Solenne et à tous les autres...

Merci à mes parents, frères et sœur pour leur soutien sans faille tout au long de ces quatre années. Même si ce que je faisais au laboratoire leur a toujours semblé un peu nébuleux, ils n'ont jamais cessé de m'encourager. Merci à mon cousin Nicolas car c'est quand même un peu grâce à lui si j'en suis arrivé là. Merci aussi à ma chère grand-mère qui veut toujours que je lui explique ce sur quoi je travaille mais s'affole quand je commence à parler de mutations génétiques.

Pour terminer je voudrais remercier les deux personnes sans qui je n'aurais sans doute jamais eu l'occasion d'écrire ces remerciements.

Merci tout d'abord à Isabelle Fanget, la championne de la culture cellulaire et de l'électroporation, personne d'autre n'est jamais parvenu à me préparer des cellules aussi belles que les tiennes. Sans toi, je ne me serais sans doute jamais retrouvé à étudier les mouvements

des granules de sécrétion dans des cellules surexprimant MyRIP ou la MyoVa-tail (voir plus loin pour plus de détails). Je me souviendrais encore longtemps des manips de stimulation où l'un prenait les images et criait "top" toutes les dix secondes pour que l'autre appuie sur le bouton de déclenchement des flashes UV. Je n'oublierais pas non plus les séances de "bâchage express" dans lesquelles tu excelles, les montages d'étagères bancales, les miettes de pain au chocolat sur mon bureau, j'en passe et des meilleures... Grâce à toi, quand j'entends quelqu'un dire qu'il a plié ses cadeaux, qu'il s'est mis en caisse ou que sa fille est berchue, j'arrive à décoder. Je crois que la pause thé du milieu de l'après-midi va beaucoup me manquer.

Merci enfin à Catherine qui a supporté sans broncher mon mutisme d'après manips ratées (ce qui est arrivé souvent) et qui ne m'a (presque) jamais reproché les soirées ou les week-ends passés au laboratoire. Ton soutien permanent s'est révélé essentiel dans les moments difficiles. Je suis désolé pour François et Claire mais je ne pouvais quitter le laboratoire sans emmener avec moi une personne aussi exceptionnelle.

Publications

Revue à comité de lecture :

Desnos C., Schonn J.S., **Huet S.**, Tran V.S., El-Amraoui A., Raposo G., Fanget I., Chapuis C., Menasche G., De Saint Basile G., Petit C., Cribier S., Henry J.P., Darchen F., *Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites.* J Cell Biol 163(3):559-70 (2003)

Article soumis à *The Biophysical Journal* et en cours de révision à la date de soumission du manuscrit de thèse :

Huet S., Tran V.S., Karatekin E., Fanget I., Cribier S., Henry J.P., *Analysis of transient behavior in complex single particle trajectories: application to secretory vesicle dynamics in endocrine cells.*

Article soumis à *Molecular Biology of the Cell* :

Desnos C.[#], **Huet S.**[#], Fanget I., Chapuis C., Böttiger C., Cheney R.E., Racine V., Sibarita J.B., Henry J.P., Darchen F. *Myosin Va control the recruitment of secretory granules to release sites.*

([#]contributions égales à ce travail)

Autres :

Tran V.S., Marion-Audibert A.M., Karatekin E., **Huet S.**, Cribier S., Guillaumie K., Chapuis C., Desnos C., Darchen F., Henry J.P., *Serotonin secretion by human carcinoid BON cells.* Ann N Y Acad Sci 1014 :179-88 (2004)

Sommaire

1. INTRODUCTION GENERALE	17
1.1. LE CYCLE DE SECRETION	17
1.1.1. La biogénèse par bourgeonnement à partir du réseau trans-golgien.....	19
1.1.2. La maturation	20
1.1.3. La migration en périphérie de la cellule.....	21
1.1.4. L'accrochage à la membrane plasmique	22
<i>1.1.4.1. L'étape d'accostage</i>	<i>23</i>
<i>1.1.4.2. L'étape d'arrimage : la formation du complexe SNARE</i>	<i>23</i>
<i>1.1.4.3. L'accrochage à la membrane : une étape de reconnaissance.....</i>	<i>24</i>
1.1.5. La régulation de l'assemblage du complexe SNARE et la préparation à la fusion	25
<i>1.1.5.1. Les protéines régulant l'assemblage du complexe SNARE</i>	<i>25</i>
<i>1.1.5.2. Le recrutement de protéines régulatrices via la synthèse locale de lipides....</i>	<i>26</i>
<i>1.1.5.3. Le calcium et l'assemblage du complexe SNARE.....</i>	<i>27</i>
1.1.6. L'exocytose	27
<i>1.1.6.1. La fusion via un pore lipidique</i>	<i>27</i>
<i>1.1.6.2. La fusion via un pore protéique</i>	<i>30</i>
<i>1.1.6.3. Le senseur calcique de l'exocytose : la synaptotagmine</i>	<i>31</i>
1.1.7. Le recyclage des granules	32
1.1.8. Conclusion.....	34
1.2. LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE A EXCITATION PAR ONDE EVANESCENTE POUR L'ETUDE DU PROCESSUS DE SECRETION REGULEE	35
1.2.1. Principe de la microscopie TIRF	36
1.2.2. Avantages et inconvénients de la microscopie TIRF vis-à-vis des microscopies confocale et à deux photons	38
1.2.3. Les montages de TIRF	39
1.2.4. Application de la microscopie TIRF à l'étude de la sécrétion régulée	41

1.2.5. Conclusion, but du travail	43
2. METHODE D'ANALYSE DES TRAJECTOIRES COMPLEXES.....	45
2.1. INTRODUCTION	45
2.2. PRINCIPE DE LA METHODE D'ANALYSE DES TRAJECTOIRES COMPLEXES MISE AU POINT	46
2.3. DISCUSSION	48
2.3.1. Le choix des paramètres de classification	48
2.3.1.1. La détection des périodes de confinement.....	48
2.3.1.2. La détection des zones de mouvement dirigé	51
2.3.2. L'utilisation d'une fenêtre d'analyse de taille variable	53
2.3.3. L'application de la méthode à d'autres problèmes biologiques	54
2.4. CONCLUSION	55
3. LA DYNAMIQUE DES GRANULES DE SECRETION DANS LA REGION JUXTA-MEMBRANAIRE	57
3.1. INTRODUCTION	57
3.1.1. Le transport à longue portée le long des microtubules.....	58
3.1.2. La capture en périphérie de la cellule	60
3.1.3. Le contrôle de l'accès à la membrane plasmique	61
3.1.3.1. Le cortex d'actine : une "barrière" bloquant l'accès des granules à la membrane plasmique.....	61
3.1.3.2. Le cortex d'actine contrôle la mobilité des granules en périphérie de la cellule	62
3.1.3.3. La myosine V : un moyen de se déplacer le long des filaments d'actine.....	63
3.1.4. L'accrochage à la membrane plasmique	66
3.2. CARACTERISATION DES MOUVEMENTS DES GRANULES DE SECRETION DANS LA REGION JUXTA-MEMBRANAIRE	67
3.2.1. Justification du choix des cellules BON pour l'analyse des mouvements des granules de sécrétion	68

3.2.2. Analyse globale des trajectoires des granules de sécrétion en périphérie de la cellule	69
3.2.3. Les mouvements des granules liés à la membrane plasmique	73
3.2.3.1. <i>La distance séparant les granules de la membrane plasmique ne peut pas être déterminée de manière simple</i>	73
3.2.3.2. <i>Analyse des mouvements des granules "résidants"</i>	74
3.2.3.3. <i>Analyse des mouvements dans les cellules "décalottées"</i>	79
3.2.4. Les mouvements des granules liés au cortex d'actine	82
3.2.4.1. <i>Les observations en double marquage</i>	82
3.2.4.2. <i>Analyse de l'effet de la jasplakinolide</i>	85
3.2.4.3. <i>Analyse de l'effet de la latrunculine B</i>	87
3.2.5. Les mouvements des granules liés aux microtubules	88
3.2.5.1. <i>Les observations en double marquage</i>	88
3.2.5.2. <i>Analyse de l'effet du nocodazole</i>	90
3.2.6. Les transitions entre catégories de mouvements	91
3.3. LE ROLE DE RAB27A ET MYRIP DANS L'ACCROCHAGE DES GRANULES DE SECRETION AU CORTEX D'ACTINE	92
3.4. LE ROLE DE LA MYOSINE Va DANS LA CAPTURE DES GRANULES DE SECRETION EN PERIPHERIE DE LA CELLULE ET LEUR ACCROCHAGE A LA MEMBRANE PLASMIQUE	97
3.4.1. La distribution des granules de sécrétion au sein de la cellule dépend de MyRIP et de la myosine Va	97
3.4.1.1. <i>La MyoVa tail se localise à la surface des granules de sécrétion</i>	98
3.4.1.2. <i>La MyoVa tail provoque l'agrégation des granules de sécrétion</i>	100
3.4.1.3. <i>L'agrégation des granules de sécrétion requiert l'accrochage de la MyoVa tail à la surface de ces organites par l'intermédiaire de la protéine MyRIP</i>	104
3.4.1.4. <i>L'inhibition de l'expression de la myosine Va par interférence à l'ARN modifie la répartition des granules de sécrétion au sein des cellules mais n'induit pas la formation d'agrégats</i>	107
3.4.2. La Myosine Va contrôle le recrutement et la mobilité des granules de sécrétion dans la région juxta-membranaire	109
3.4.2.1. <i>La myosine Va participe au recrutement des granules en périphérie de la cellule</i>	109
3.4.2.2. <i>La MyoVa tail modifie la mobilité des granules en périphérie de la cellule</i>	113

3.4.3. L'inhibition de la sécrétion provoquée par la MyoVa tail est principalement due à un défaut d'accrochage des GS à la membrane plasmique	116
3.5. DISCUSSION	121
3.5.1. L'arrivée sur les microtubules et la capture en périphérie de la cellule	121
3.5.2. Le rôle du cortex d'actine	126
3.5.3. L'accrochage à la membrane	129
3.5.4. L'exocytose des granules de sécrétion	132
3.6. CONCLUSION	133
4. <u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	135
4.1. LES DEVELOPPEMENTS METHODOLOGIQUES.....	135
4.1.1. La mesure de la distance séparant les granules de la membrane plasmique	136
4.1.2. La combinaison de la microscopie TIRF avec d'autres techniques d'imagerie ou d'électrophysiologie.....	138
4.2. LES PERSPECTIVES BIOLOGIQUES	139
4.2.1. L'architecture de la région juxta-membranaire.....	139
4.2.2. La régulation des mouvements le long des microtubules	140
4.2.3. La régulation du mode d'accrochage des granules à l'actine.....	140
4.2.4. L'accrochage à la membrane plasmique.....	141
4.2.5. L'effet de la stimulation sur les mouvements des granules	142
5. <u>MATERIELS ET METHODES</u>	143
5.1. BIOLOGIE CELLULAIRE.....	143
5.1.1. Culture et transfection des cellules BON	143
5.1.1.1. Conditions de culture	143
5.1.1.2. Transfection par électroporation	143
5.1.2. Culture et transfection des cellules PC-12	144
5.1.2.1. Conditions de culture	144
5.1.2.2. Transfection par lipofection.....	144
5.1.3. Culture des cellules COS-7	145

5.1.4. Les différentes constructions plasmidiques utilisées.....	145
5.1.5. Immunomarquage de cellules	147
5.1.6. Obtention des cellules décalottées	149
5.2. LE MONTAGE DE MICROSCOPIE TIRF	149
5.2.1. Description du poste d'imagerie.....	149
5.2.1.1. Le montage de microscopie.....	149
5.2.1.2. Les observations en double marquage	151
5.2.1.3. La stimulation des cellules par photolibération de calcium	151
5.2.2. Calibration de l'épaisseur d'évanescence.....	152
5.2.2.1. Mesure de l'épaisseur d'évanescence	152
5.2.2.2. Mesure de l'angle d'incidence du faisceau laser au niveau de l'interface verre/cellule.....	156
5.3. OBSERVATIONS EN EPIFLUORESCENCE	158
5.4. ETUDE DES TRAJECTOIRES DES GRANULES DE SECRETION	158
5.4.1. Suivi tridimensionnel des granules de sécrétion.....	158
5.4.1.1. Suivi des granules dans le plan de focalisation du microscope.....	158
5.4.1.2. Evaluation des mouvements des granules suivant l'axe orthogonal au plan de focalisation.....	159
5.4.1.3. Evaluation de la précision de la méthode de suivi tridimensionnel.....	160
5.4.1.4. Validation de la méthode de suivi tridimensionnel	161
5.4.2. Calcul des coefficients de diffusion à partir des trajectoires décrites par les granules	162
5.5. LA METHODE DE CORRELATION D'IMAGES	163
5.6. ANALYSES STATISTIQUES.....	163
<u>ANNEXE : PROTOCOLES SUPPLEMENTAIRES</u>	<u>165</u>
5.7. TEST DE SECRETION SUR POPULATION.....	165
5.8. Etablissement des lignées stables.....	165
5.9. TRANSFECTION DES CELLULES BON PAR LIPOFECTION POUR LES EXPERIENCES D'INTERFERENCE A L'ARN.....	166

5.10. Co-IMMUNOPRECIPITATION.....	166
<u>ABREVIATIONS :.....</u>	<u>167</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	<u>169</u>

La cellule, entité élémentaire de tout organisme vivant, est une structure extrêmement complexe autant du point de vue de son architecture que des différents processus se déroulant en son sein (Figure 1). Au cours des cinquante dernières années, les progrès réalisés à la fois dans la description et dans la compréhension d'une telle organisation ont été considérables. Ceci a initialement été rendu possible grâce à la mise au point de techniques génétiques et biochimiques. Leur utilisation a en effet été notamment à l'origine de l'identification des molécules responsables des différentes fonctions cellulaires. L'étude de l'architecture interne de la cellule a quant à elle bénéficié des progrès réalisés dans le domaine de l'imagerie optique et surtout électronique.

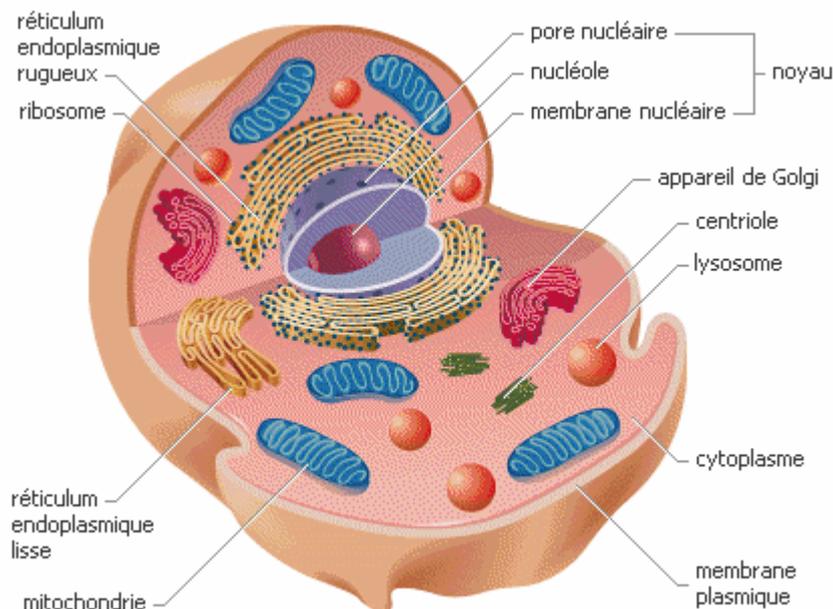


Figure 1 : Schéma d'une cellule eucaryote présentant les principaux organites intracellulaires. Illustration tirée de l'encyclopédie Encarta©.

L'inconvénient majeur de ces différentes méthodes d'analyse est leur incapacité à rendre compte de la dynamique précise des phénomènes se produisant au sein des cellules. C'est le développement, depuis une vingtaine d'années, de nouvelles techniques à l'interface entre la biologie et la physique qui a permis d'accéder à cette dynamique. L'une d'entre elles s'est révélée particulièrement bien adaptée à l'étude des mécanismes intracellulaires, c'est la microscopie de fluorescence (Figure 2). En effet, grâce à la mise au point de marqueurs fluorescents spécifiques, il a été possible d'observer directement sur cellules vivantes le comportement d'un organite ou d'une protéine particulière. L'imagerie de fluorescence a ainsi été mise à profit pour étudier des phénomènes aussi variés que la division cellulaire,

l'organisation du cytosquelette ou le transport intracellulaire. Cette dénomination générale d'imagerie de fluorescence regroupe en fait plusieurs techniques possédant chacune leurs propres spécificités. Ce mémoire de thèse porte sur l'application de l'une d'entre elles, la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente, à l'analyse du phénomène de sécrétion régulée d'hormones.

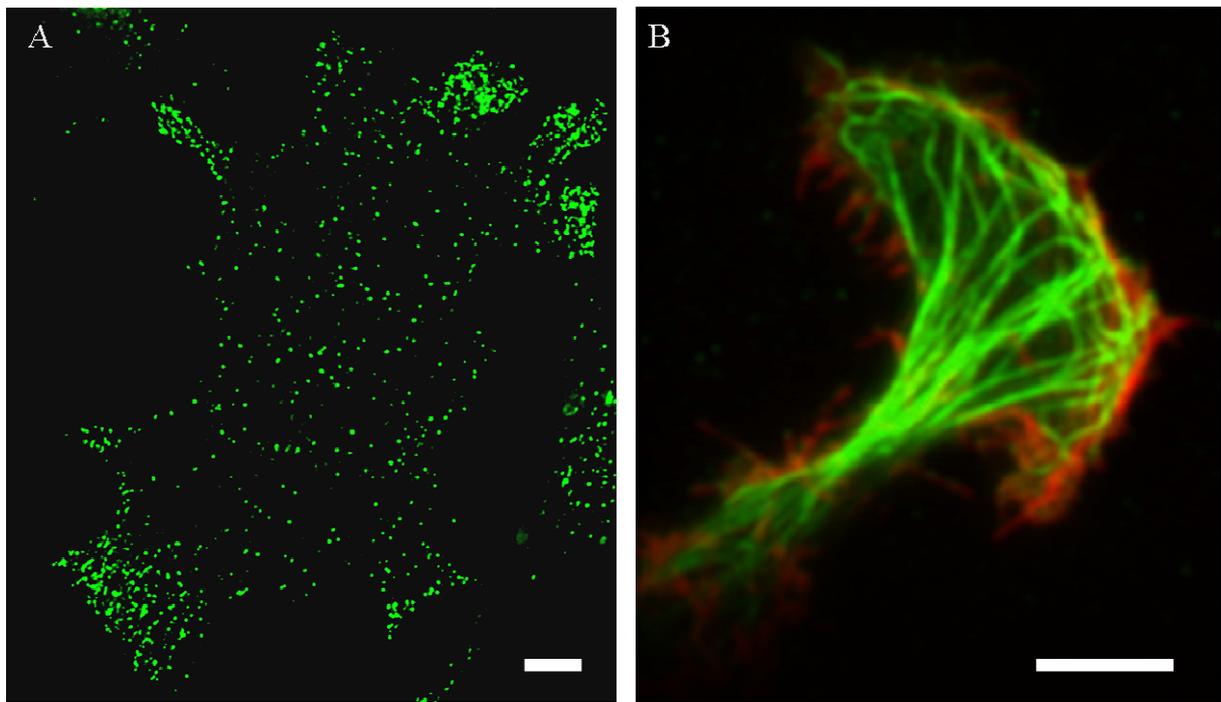


Figure 2 : Exemples d'images obtenues par microscopie de fluorescence. (A) Image obtenue en microscopie à épifluorescence puis traitée par déconvolution, d'une cellule neuroendocrine de la lignée BON dont les granules de sécrétion sont marqués par le neuropeptide Y fusionné à la GFP (*Green Fluorescent Protein*). (B) Image en microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente d'une cellule BON dont les réseaux de microtubules (canal vert) et d'actine (canal rouge) sont marqués par des anticorps fluorescents. Barre d'échelle : 5 μm .

1. Introduction générale

Comme au sein de tout système complexe, la communication entre les différentes parties d'un organisme vivant est d'une importance primordiale. Cette fonction de communication est notamment assurée par le mécanisme de sécrétion régulée qui met en œuvre l'émission, au niveau de cellules spécialisées, de substances messagères portant une information destinée à des cellules cibles.

L'une des principales manifestations de ce phénomène de sécrétion régulée est la libération de neurotransmetteurs et d'hormones. Ainsi, au sein du système nerveux, la communication entre neurones a lieu notamment au niveau des synapses dites chimiques. L'extrémité émettrice d'un neurone libère dans la fente synaptique un signal sous la forme de neurotransmetteurs. Ce signal, en se fixant sur des récepteurs spécifiques situés à l'extrémité réceptrice d'un autre neurone, permet la propagation de l'influx nerveux. Dans le cas des glandes endocrines, la communication entre cellules est induite par la libération d'hormones dans la circulation sanguine. Cette voie de communication permet ainsi des interactions à longue portée.

Bien que possédant des propriétés différentes notamment en termes cinétiques ou de "rayon d'action", la sécrétion hormonale et celle des neurotransmetteurs mettent en jeu des mécanismes biologiques similaires. Si, au cours des dernières décennies, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension de ces mécanismes, il reste encore de nombreuses zones d'ombre à éclaircir concernant en particulier l'étude de leurs dynamiques et leurs régulations.

1.1. Le cycle de sécrétion

Les travaux réalisés par Katz et ses collègues dans les années 1950 sur la jonction neuromusculaire de grenouille (Katz, 1962) ont permis de démontrer que la libération de neurotransmetteurs et par extension, d'hormones, repose sur la fusion d'un organite spécialisé (vésicule synaptique (VS) pour les neurotransmetteurs et granule de sécrétion (GS) pour les hormones), contenant les molécules informatives, avec la membrane plasmique de la cellule. Ceci induit le déversement du contenu de cet organite dans la fente synaptique ou le flux sanguin.

La sécrétion des neurotransmetteurs ou des hormones est ainsi l'aboutissement d'un mécanisme complexe dans lequel les VS ou les GS jouent un rôle essentiel. Ces organites subissent en effet un cycle décomposable en plusieurs étapes depuis leur formation à partir d'organites pré-existants jusqu'à leur recyclage éventuel au niveau de la membrane plasmique. Dans ce qui suit, nous nous proposons de décrire succinctement ces différentes étapes dans le cas particulier des GS (Figure 3). Contrairement au schéma classique du cycle de sécrétion, nous n'avons pas ici défini de phase d'amorçage de la fusion (étape de "priming", voir (Sudhof, 2004)) en raison de l'absence de consensus au sujet de ce qu'englobe exactement une telle phase. Les différents mécanismes qui sont généralement associés à cette étape d'amorçage sont cependant abordés dans un paragraphe intitulé "La régulation de l'assemblage du complexe SNARE et la préparation à la fusion".

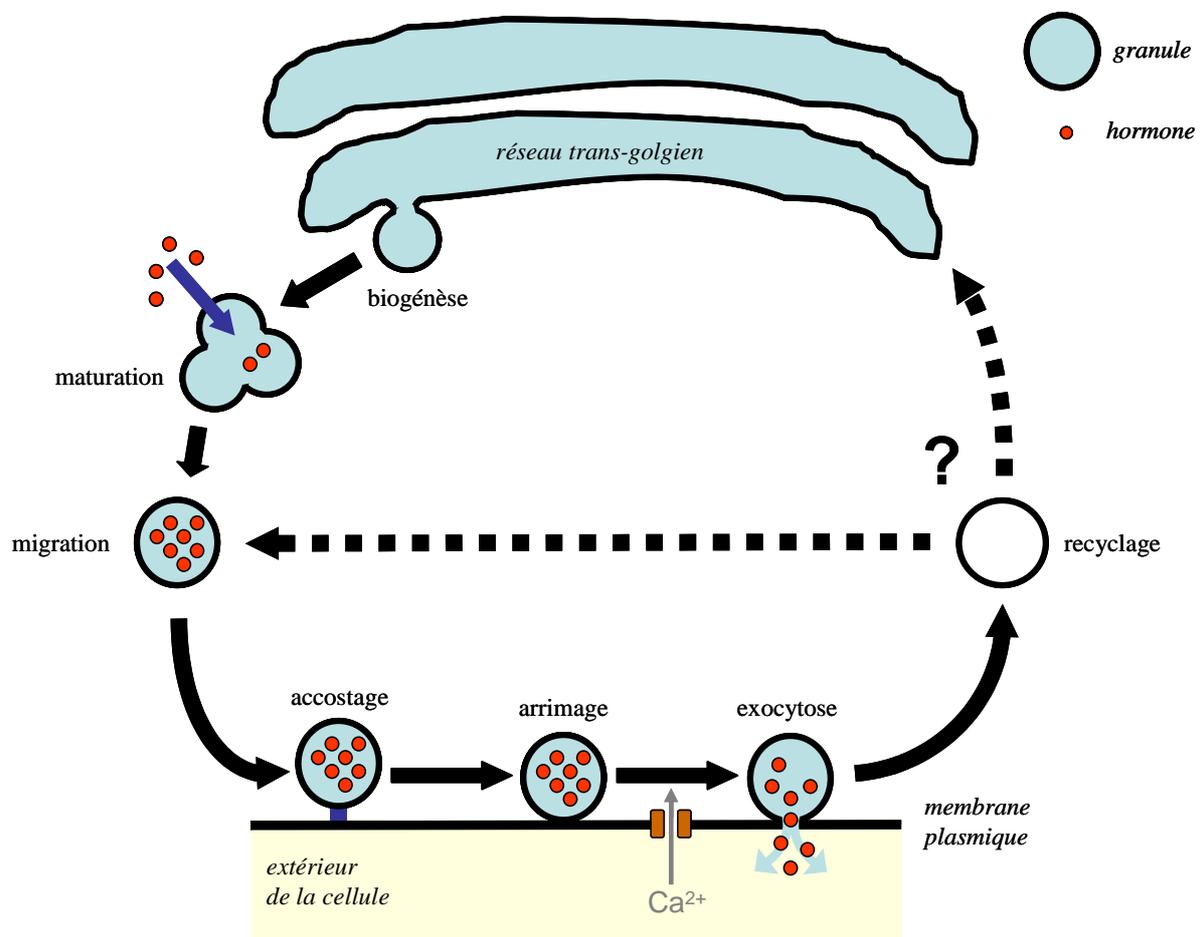


Figure 3 : Les différentes étapes du cycle de sécrétion. Les GS sont formés par bourgeonnement au niveau du réseau *trans*-golgien. Au cours de leur maturation, ces organites migrent jusqu'à la périphérie de la cellule. L'association avec la membrane plasmique se déroule alors en deux étapes : l'accostage qui permet l'établissement d'un premier lien relativement lâche puis l'arrimage qui se caractérise par un attachement plus stable. Lors de la fusion des GS avec la membrane plasmique, déclenchée par l'influx de calcium, les molécules messagères sont déversées dans le milieu extracellulaire. Les GS peuvent alors soit fusionner complètement avec la membrane soit se refermer. Ces deux possibilités conditionnent probablement le mode de recyclage de ces organites. Schéma adapté de (Sudhof, 1995).

1.1.1. La biogénèse par bourgeonnement à partir du réseau *trans*-golgien

Les GS sont formés par bourgeonnement à partir du réseau *trans*-golgien (Figure 4, pour une revue, voir (Tooze, Martens et al., 2001)). Ce mécanisme débute par l'agrégation, au niveau de la membrane de ce réseau *trans*-golgien, de protéines destinées à se retrouver à l'intérieur des GS. Afin de contrôler le contenu de ces GS, ces phénomènes d'agrégation et d'interaction avec la membrane sont sélectifs. Ils semblent impliquer notamment des signaux d'adressage sous forme de séquences peptidiques et des interactions spécifiques avec certains lipides ou protéines membranaires. Il a ainsi été montré que la chromogranine B, une protéine présente dans les GS des cellules neuroendocrines, possédait une séquence signal lui permettant d'être dirigée spécifiquement vers la voie de sécrétion régulée (Chanat, Weiss et al., 1993 ; Kromer, Glombik et al., 1998). Le bourgeonnement de la membrane golgienne au niveau de ces agrégats de protéines permet ensuite leur internalisation dans des granules dits immatures. La manière dont la formation des agrégats protéiques pourrait activer ce bourgeonnement reste à définir. Certains auteurs ont suggéré que l'interaction de ces agrégats avec la membrane du réseau *trans*-golgien pouvait aboutir à la formation de micro-domaines lipidiques jouant un rôle important lors de ce processus de bourgeonnement (Thiele and Huttner, 1998).

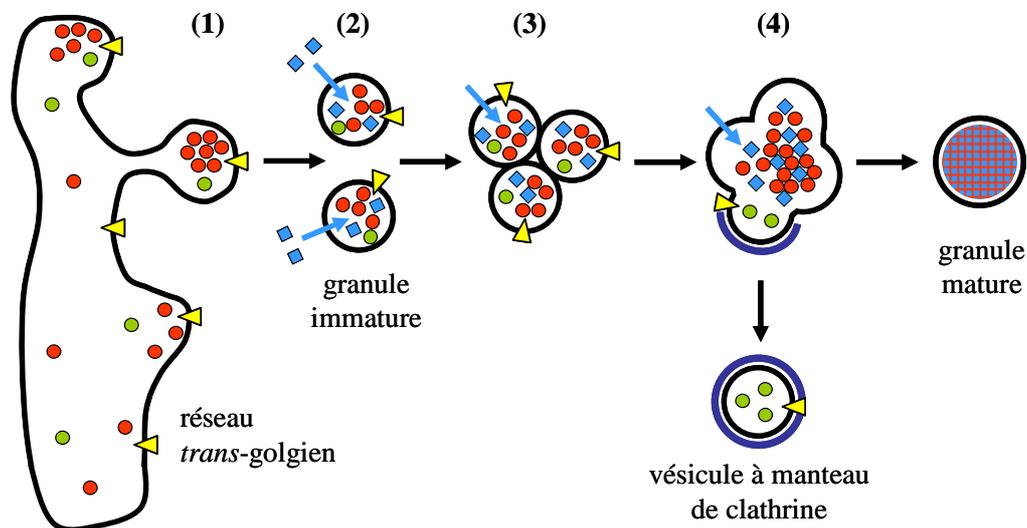


Figure 4 : Biogénèse et maturation des GS. (1) Agrégation au niveau de la membrane du réseau *trans*-golgien des protéines destinées à se retrouver au sein des GS. (2) Formation des granules immatures par bourgeonnement à partir du réseau *trans*-golgien. (3) Fusion homotypique entre granules immatures. (4) Reprise de membrane *via* la formation de vésicules à manteau de clathrine à la surface des granules et condensation progressive du contenu intragranulaire. Parallèlement à ces étapes de fusion et de reprise de membrane, différentes molécules sont accumulées à l'intérieur des granules grâce à un transport actif à travers la membrane de cet organelle (représenté par les flèches bleues). D'après (Tooze, Martens et al., 2001).

Outre la chromogranine, de nombreuses autres molécules sont internalisées au sein des granules au moment de leur biogénèse. Ainsi, ces organites néo-formés contiennent notamment différentes catégories de peptides (enképhalines, somatostatine...) dont beaucoup ont un rôle de substance messagère (Winkler, Apps et al., 1986).

1.1.2. La maturation

Une fois formés par bourgeonnement à partir du réseau *trans*-golgien, les granules subissent un processus complexe de maturation. Celui-ci débute par des fusions homotypiques entre ces granules immatures (impliquant entre 3 et 5 granules, voir Figure 4) qui semblent faire intervenir les protéines SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*, (Wendler, Page et al., 2001)), une famille de protéines membranaires également impliquées dans la fusion des GS avec la membrane plasmique (voir plus loin dans cette introduction). Ces événements de fusion induisent la formation de granules de taille plus importante et présentant un excès de membrane (Tooze, Flatmark et al., 1991 ; Desnos, Laran et al., 1995). Afin d'une part, de résorber cet excès de membrane et d'autre part, d'extraire certaines protéines des granules (protéines membranaires ou intragranulaires), l'étape suivante du phénomène de maturation se caractérise par une reprise de membrane *via* la formation de vésicules à manteau de clathrine à la surface de ces granules (Figure 4, voir (Kuliawat, Klumperman et al., 1997 ; Klumperman, Kuliawat et al., 1998)).

Parallèlement à ces étapes de fusion et de reprise de membrane, la maturation des granules est également marquée par leur remplissage progressif en différents éléments. Ainsi, par exemple, les hormones de nature non peptidique telles que les monoamines (adrénaline, sérotonine...), dont la synthèse se déroule au moins partiellement dans le cytoplasme, sont accumulées à l'intérieur des granules immatures *via* leur transport à travers la membrane granulaire. Ce transport est un processus actif qui fait intervenir deux types de protéines membranaires : l'ATPase/pompe à protons vésiculaire (V-ATPase) et un transporteur vésiculaire spécifique du type d'hormone à transporter. L'activité de la V-ATPase induit une concentration luminale d'ions H^+ . Les transporteurs vésiculaires, fonctionnant en antiports, tirent alors parti de ce gradient de protons pour accumuler les hormones à des concentrations très élevées dans les granules (Njus, Kelley et al., 1986). Ainsi, dans le cas des monoamines, chaque molécule d'hormone est importée dans le granule en échange de l'extrusion de deux ions H^+ par des transporteurs appelés VMAT pour Vesicular MonoAmine Transporters

(Figure 5, pour une revue, voir (Henry, Sagne et al., 1998)). Outre les hormones de nature non peptidique, des molécules d'ATP, d'acide ascorbique, ainsi que des ions Ca^{2+} sont accumulés au sein des granules immatures *via* différents mécanismes de transport actif à travers la membrane granulaire.

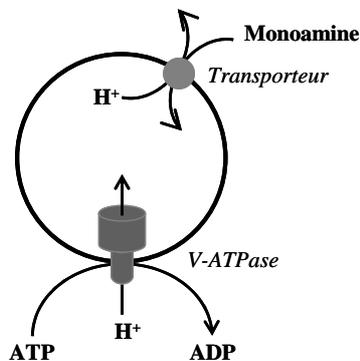


Figure 5 : Le remplissage en hormone. La pompe à proton vésiculaire permet d'accumuler des protons à l'intérieur du GS. Le transporteur VMAT tire alors parti de ce gradient pour concentrer les monoamines au sein des GS.

La maturation des granules se traduit également par une condensation progressive de leur contenu. A terme, l'intérieur de ces organites est ainsi constitué d'une matrice à cœur protéique extrêmement compacte. Les protéines constituant cette matrice, comme en particulier les chromogranines A et B, assurent la chélation des éléments accumulés à haute concentration au sein des granules (monoamines, Ca^{2+} ...), permettant ainsi de maintenir l'équilibre osmotique avec l'extérieur de cet organite (Kopell and Westhead, 1982 ; Videen, Mezger et al., 1992).

1.1.3. La migration en périphérie de la cellule

Afin d'être rapidement mobilisable pour une libération d'hormones, les GS sont accumulés à proximité de la membrane plasmique. Ceci nécessite tout d'abord de transporter les GS depuis leur site de biogénèse au niveau du réseau *trans*-golgien jusqu'à la périphérie de la cellule puis de les retenir dans cette zone corticale. Ce processus de transport puis de rétention périphérique des GS met en jeu le cytosquelette de microtubules et de filaments d'actine.

C'est ainsi probablement le déplacement sur de longues distances des GS le long des microtubules qui permet à ces organites d'atteindre rapidement la zone corticale (Tooze and Burke, 1987 ; Wacker, Kaether et al., 1997 ; Neco, Giner et al., 2003). Le réseau d'actine, particulièrement dense en périphérie de la cellule (Nakata and Hirokawa, 1992), participerait ensuite au maintien de ces GS à proximité de la membrane plasmique (Rudolf, Salm et al., 2001). Ce transport jusqu'à la périphérie de la cellule semble avoir lieu alors que les GS sont

encore immatures (Tooze, Flatmark et al., 1991 ; Rudolf, Salm et al., 2001), le processus de maturation se déroulant alors au sein du cytosquelette sous-membranaire. La fonction exacte du réseau d'actine cortical dans la dynamique du processus de sécrétion régulée reste cependant mal définie. En effet, si ce réseau semble jouer un rôle dans la rétention des GS en périphérie de la cellule, il pourrait également être impliqué dans la dispersion de ces organites au sein de la région juxta-membranaire (Rudolf, Kogel et al., 2003) et dans la régulation du nombre de GS pouvant accéder à la membrane plasmique (Trifaro, Rose et al., 2000).

Ces multiples rôles joués par le cytosquelette dans la mobilité et la répartition des vésicules seront discutés en détail dans la partie consacrée à l'analyse de la dynamique des GS par microscopie TIRF (voir la partie 3. intitulée "La dynamique des granules de sécrétion dans la région juxta-membranaire").

1.1.4. L'accrochage à la membrane plasmique

La manière dont les GS s'arriment à la membrane plasmique reste à l'heure actuelle relativement mal définie. Plusieurs arguments suggèrent cependant que cet arrimage se déroule suivant le même scénario général que celui mis en jeu dans la plupart des processus intracellulaires impliquant la fusion entre une vésicule de transport et une membrane cible. Ce scénario peut être décomposé en deux étapes (pour des revues, voir (Jahn, Lang et al., 2003 ; Ungermann and Langosch, 2005)) : l'établissement d'un premier contact relativement lâche et réversible (étape "d'accostage" ou de "*tethering*") entre la vésicule et la membrane cible est suivi d'un accrochage nettement plus stable permettant un rapprochement des deux membranes destinées à fusionner (étape "d'arrimage" ou de "*docking*") (Figure 6).

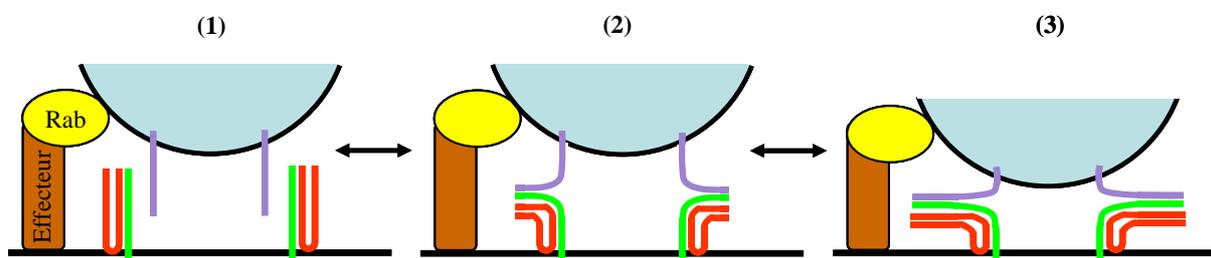


Figure 6 : Accrochage à la membrane plasmique. (1) Etape d'accostage permettant d'établir un premier lien entre le GS et la membrane plasmique. (2) et (3) Etape d'arrimage marquée par l'assemblage progressif du complexe SNARE à partir des extrémités N-terminales des protéines le constituant.

1.1.4.1. L'étape d'accostage

Les protéines à activité GTPasique de la famille Rab semblent jouer un rôle déterminant lors de l'établissement du premier lien entre les deux membranes. Ces protéines sont considérées comme des "interrupteurs moléculaires", passant d'une forme liée au GDP, inactive et soluble, à une forme liée au GTP, active et associée aux membranes (Takai, Sasaki et al., 2001). Présentes, sous leur conformation active, à la surface des vésicules, ces protéines Rab pourraient réguler le recrutement d'effecteurs permettant de lier ces vésicules à la membrane cible. Ces effecteurs, ou facteurs d'accostage, sont généralement des complexes protéiques de taille importante. Le mieux caractérisé d'entre eux est le complexe exocyste qui est recruté par la protéine Rab Sec4p lors de la fusion de vésicules de transport avec la membrane plasmique chez la levure. Un complexe équivalent existe chez les mammifères. Son association avec les vésicules se ferait *via* la protéine Ral dont les propriétés sont proches de celles des Rab (Mark, Jilkina et al., 1996 ; Moskalenko, Henry et al., 2002). Ce complexe exocyste est impliqué dans les phénomènes d'exocytose polarisée comme la formation du cône de croissance dans les neurones ou l'établissement de l'asymétrie entre membrane apicale et baso-latérale dans les cellules épithéliales (Hsu, TerBush et al., 2004). Plusieurs travaux récents suggèrent également qu'il pourrait jouer un rôle dans l'accrochage des GS et des VS à la membrane plasmique (Polzin, Shipitsin et al., 2002 ; Tsuboi, Ravier et al., 2005). Il existe cependant plusieurs autres candidats potentiels pouvant servir de facteurs d'accostage dans le cas de la sécrétion régulée. Il a ainsi par exemple été récemment suggéré que la rabphiline et la granophiline, des effecteurs de la protéine Rab27 présente sur les GS, pourraient jouer ce rôle (Gomi, Mizutani et al., 2005 ; Tsuboi and Fukuda, 2005 ; Tsuboi and Fukuda, 2006).

1.1.4.2. L'étape d'arrimage : la formation du complexe SNARE

Le processus au centre de l'étape d'arrimage est très probablement la formation d'un complexe protéique destiné à lier de manière stable les vésicules à la membrane plasmique : le complexe SNARE. Ce complexe, qui joue également un rôle essentiel dans l'étape d'exocytose, est impliqué dans la majorité des nombreux phénomènes intracellulaires mettant en jeu la fusion entre deux membranes (Jahn, Lang et al., 2003). Dans le cas des GS et des VS, il est constitué de trois protéines : la synaptobrevine/VAMP2 au niveau des vésicules (v-SNARE) et la syntaxine 1 et la SNAP25 (*synaptosomal associated protein of 25 kDa*) au niveau de la membrane plasmique (t-SNARE). La mise en place du complexe met en jeu des motifs

particuliers, appelés motifs SNARE, qui sont présents sur chacune de ces trois protéines. C'est en effet l'association de ces motifs, initialement peu structurés, pour former un faisceau de quatre hélices α parallèles, qui constitue le cœur du complexe SNARE ("*core complex*", voir Figure 7).

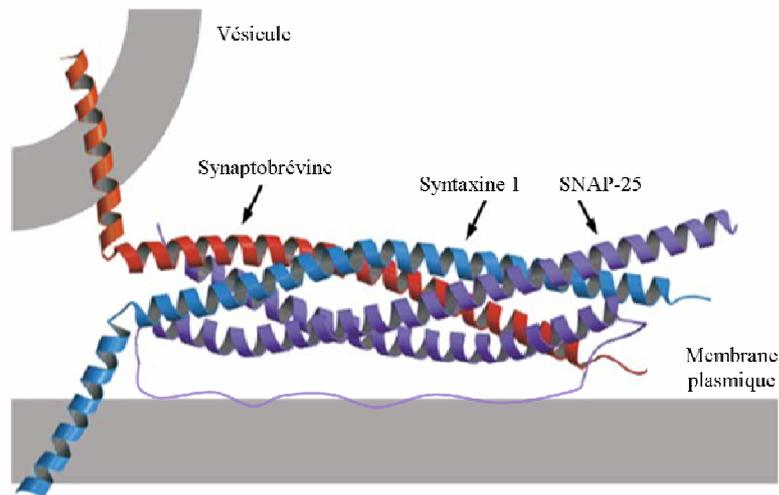


Figure 7 : Le complexe SNARE. La synaptobrevine, sur les vésicules, s'associe avec la syntaxine 1 et la SNAP25, sur la membrane plasmique, pour former un faisceau de quatre hélices α parallèles. D'après (Bonifacino and Glick, 2004).

Il semble que la mise en place de ce complexe tripartite soit précédée par l'association au niveau de la membrane plasmique de la syntaxine 1 et de la SNAP25, cet ensemble recrutant ensuite la synaptobrevine présente sur les vésicules (An and Almers, 2004 ; Fasshauer and Margittai, 2004). La formation progressive du complexe SNARE complet à partir des extrémités N-terminales des protéines (*i.e.* des extrémités cytoplasmiques) permettrait alors, à la manière d'une "fermeture éclair", de rapprocher les membranes cellulaires et vésiculaires (voir Figure 6, (Melia, Weber et al., 2002 ; Sorensen, Wiederhold et al., 2006)). Ce modèle de mise en place progressive du complexe SNARE reste cependant controversé. Ainsi, une étude récente suggère plutôt que l'assemblage de ce complexe soit un mécanisme concerté impliquant simultanément plusieurs sites d'interaction le long des protéines SNARE (Han and Jackson, 2006).

1.1.4.3. L'accrochage à la membrane : une étape de reconnaissance

Le phénomène de fusion membranaire ne se limite pas uniquement à l'exocytose des vésicules de sécrétion au niveau de la membrane plasmique. En effet, la grande majorité des échanges

entre compartiments intracellulaires mettent en jeu ce processus (Jahn, Lang et al., 2003). Il existe donc nécessairement une étape de reconnaissance entre membranes afin d'assurer la spécificité de ces événements de fusion.

L'hypothèse initiale formulée par Rothman suggérait que la formation du complexe SNARE avait un rôle déterminant dans cette étape de reconnaissance (Rothman, 1994). Ainsi, la fusion entre deux membranes particulières serait associée à l'assemblage d'un complexe formé de protéines SNARE spécifiques. Plusieurs arguments indiquent cependant que cette vision doit être nuancée. Des études *in-vitro* suggèrent en effet qu'un v-SNARE donné puisse pouvoir s'apparier avec plusieurs sortes de t-SNARES (Fasshauer, Antonin et al., 1999 ; Brandhorst, Zwillig et al., 2006). L'analyse des cinétiques de sécrétion sur des cellules chromaffines de souris n'exprimant pas la SNAP25 a de plus montré que l'absence de cette protéine pouvait être partiellement compensée par l'expression d'un de ses homologues, la SNAP23 (Sorensen, Nagy et al., 2003). Enfin, il est vraisemblable que l'étape d'accostage, qui se déroule avant l'assemblage du complexe SNARE, soit au moins en partie responsable de la spécificité des événements de fusion (Zerial and McBride, 2001).

1.1.5. La régulation de l'assemblage du complexe SNARE et la préparation à la fusion

La mise en place du complexe SNARE formé en *trans* (*i.e.* entre deux membranes différentes) permet non seulement l'arrimage des vésicules à la membrane plasmique mais constitue également une des étapes majeures de la préparation à la fusion de ces organites. En effet, comme cela sera décrit plus loin dans cette introduction, le complexe SNARE joue sans doute un rôle important dans le processus d'exocytose. Cette formation du complexe *trans* est un phénomène hautement régulé dont nous allons aborder quelques aspects dans ce qui suit.

1.1.5.1. Les protéines régulant l'assemblage du complexe SNARE

Les nombreuses protéines contrôlant l'assemblage du complexe SNARE agissent à des niveaux différents en inhibant ou en favorisant cet assemblage. Le rôle exact de beaucoup d'entre elles restent cependant à l'heure actuelle mal défini.

La protéine NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), associée à sa protéine adaptatrice SNAP (*soluble NSF attachment protein*), aurait une fonction préparatoire à l'association du complexe *trans* grâce à sa capacité à dissocier les complexes *cis* (*i.e.* formé sur la même membrane) éventuellement présents au niveau des vésicules ou de la membrane plasmique (Sollner,

Bennett et al., 1993 ; Banerjee, Barry et al., 1996). Cette propriété de dissociation est spécifique des complexes *cis* et requiert l'hydrolyse d'ATP. Elle permettrait également un recyclage des protéines du complexe SNARE qui, lors de l'étape d'exocytose, passe d'une conformation *trans* à une conformation *cis*.

Une autre classe de protéines impliquées dans la régulation de l'assemblage du complexe SNARE sont les protéines Sec1/Munc18 (pour une revue, voir (Rizo and Sudhof, 2002)) qui se lient à la syntaxine 1. Une telle interaction n'a cependant lieu que dans le cas où la syntaxine 1 est dans une conformation dite fermée. Sachant qu'une telle conformation est incompatible avec l'assemblage du complexe SNARE, il a été proposé que Munc18 ait une fonction inhibitrice sur la mise en place de ce complexe *via* une stabilisation de la conformation fermée de la syntaxine 1. La protéine Munc13, en induisant la dissociation de Munc18 et de la syntaxine, permettrait alors l'ouverture de cette syntaxine favorisant ainsi l'assemblage du complexe *trans*. Ce modèle a cependant récemment été remis en cause à la suite de travaux sur des mutants de syntaxine ne pouvant adopter une conformation fermée (Han and Jackson, 2006).

Enfin, il est possible que les effecteurs de protéines Rab impliqués par ailleurs dans l'étape d'accostage des vésicules à la membrane plasmique jouent également un rôle dans la régulation de l'assemblage du complexe *trans*. Un tel mécanisme a notamment été mis en évidence dans le cas de la fusion homotypique entre endosomes précoces. Ainsi, l'interaction entre le facteur d'accostage EEA1 (*early endosome antigen 1*) et la syntaxine 13 semble contrôler ce processus de fusion (McBride, Rybin et al., 1999).

1.1.5.2. Le recrutement de protéines régulatrices via la synthèse locale de lipides

La préparation de l'étape de fusion est également marquée par une synthèse locale de lipides particuliers au niveau du futur site d'exocytose à la suite de l'activation d'enzymes spécifiques. Ainsi, par exemple, la synthèse de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) par la phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5-kinase) serait stimulée par ARF6, une protéine à activité GTPasique passant de la surface des GS à la membrane plasmique lorsqu'elle est activée (Bader, Doussau et al., 2004). Ces lipides seraient impliqués dans le recrutement de nombreuses protéines telles que Munc13 ou les Mints, une famille de protéines se liant à Munc18. Ils interagissent également avec la synaptotagmine, considérée comme le senseur calcique potentiel de l'exocytose (voir la partie consacrée à cette étape). Ces lipides pourraient donc jouer un rôle non seulement dans la régulation de l'assemblage du

complexe SNARE mais également dans l'étape de fusion (pour une revue, voir (Klenchin and Martin, 2000)).

1.1.5.3. Le calcium et l'assemblage du complexe SNARE

La question cruciale de la dépendance au calcium de l'assemblage du complexe SNARE reste aujourd'hui encore largement débattue. En effet, s'il est clair que la fusion des vésicules avec la membrane plasmique, déclenchée par une élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, nécessite la présence du complexe *trans* (voir la partie consacrée à l'exocytose), il reste à définir si ce complexe est déjà en place avant la montée de Ca^{2+} .

Plusieurs études portant sur les effets des neurotoxines clostridiales (Hua and Charlton, 1999), d'anticorps dirigés contre certaines zones des protéines SNARE (Xu, Rammner et al., 1999) ou de mutations ponctuelles de ces protéines (Sorensen, Wiederhold et al., 2006) sur les cinétiques de sécrétion semblent ainsi montrer que le complexe *trans* existerait sous une forme au moins partiellement assemblée dans les cellules au repos. Toutefois, d'autres travaux suggèrent au contraire que l'assemblage du complexe SNARE est induit par la montée de Ca^{2+} (Chen, Scales et al., 1999).

1.1.6. L'exocytose

Le phénomène d'exocytose se caractérise par la fusion de la membrane vésiculaire avec la membrane plasmique permettant ainsi la libération des hormones ou des neurotransmetteurs contenus dans ces vésicules à l'extérieur de la cellule. Le déroulement exact de ce processus déclenché par une élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire est aujourd'hui encore sujet à controverse (pour des revues, voir (Mayer, 2002 ; Chernomordik and Kozlov, 2003 ; Jahn, Lang et al., 2003)). Deux hypothèses ont ainsi été proposées pour décrire la fusion entre les membranes vésiculaire et cellulaire.

1.1.6.1. La fusion via un pore lipidique

La première étape du processus de fusion consisterait en un rapprochement des membranes destinées à fusionner jusqu'à des distances de quelques nanomètres entre les deux feuillettes lipidiques proximaux (*i.e.* ceux tournés vers le cytoplasme, voir Figure 8). Du fait notamment des répulsions électrostatiques entre ces deux feuillettes, il est probable que ce processus

nécessite l'intervention de protéines capables de tirer les deux membranes l'une vers l'autre. Le complexe SNARE, en s'assemblant progressivement à la manière d'une "fermeture éclair", apparaît comme le candidat idéal pour effectuer un tel rapprochement (voir Figure 6).

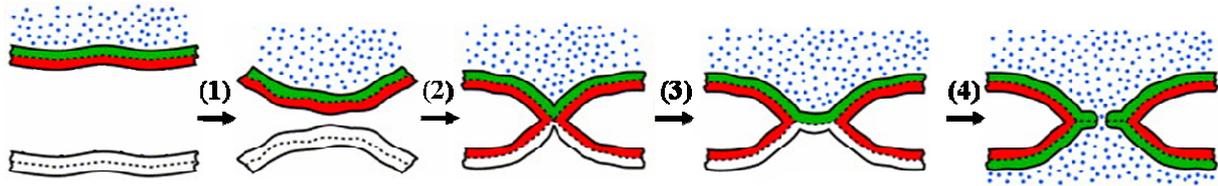


Figure 8 : Fusion via un pore lipidique. (1) Rapprochement des deux membranes. (2) Formation du pédoncule lipidique (3) Hémifusion. (4) Formation du pore de fusion. D'après (Chernomordik and Kozlov, 2005)

Il semble ensuite que les deux feuillet proximaux entrent en contact *via* la formation d'un "pédoncule" lipidique dont l'extension progressive permet d'accéder à un état dit d'hémifusion (Figure 8). A ce stade, les feuillet distaux sont toujours disjoints ("diaphragme" d'hémifusion) et par conséquent les échanges entre l'intérieur de la vésicule et le milieu extracellulaire sont bloqués. Si l'hypothèse du passage par un pédoncule lipidique est essentiellement fondée sur des études théoriques (Kozlovsky and Kozlov, 2002 ; Marrink and Mark, 2003), l'existence d'un stade d'hémifusion a en revanche été mise en évidence expérimentalement dans le cas de systèmes modèles (Heuvingh, Pincet et al., 2004 ; Giraudo, Hu et al., 2005 ; Xu, Zhang et al., 2005).

Contrairement à la question des protéines éventuellement impliquées dans cette étape d'hémifusion, celle du rôle des lipides dans ce processus a été étudiée en détail sur des systèmes modèles (Chernomordik, Chanturiya et al., 1995 ; Chanturiya, Leikina et al., 1999). Il semble ainsi que la présence de lipides en forme de "cône" (*i.e.* présentant de petites têtes polaires comme l'acide phosphatidique) au sein des feuillet proximaux puisse faciliter l'hémifusion en favorisant la courbure de ces feuillet (Figure 9). De tels lipides semblent effectivement être synthétisés au niveau du site de contact entre le GS et la membrane plasmique notamment *via* la phospholipase D (Bader, Doussau et al., 2004).

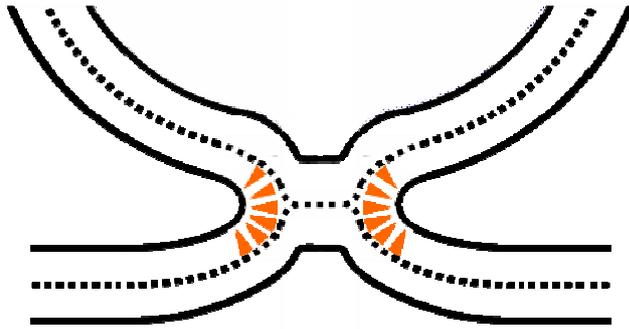


Figure 9 : L'hémifusion est favorisée par la présence de certains lipides au sein des feuillet proximaux. Les lipides à "petite" tête polaire (représentés par des triangles oranges) favorisent l'hémifusion en induisant une courbure négative des membranes.

L'étape suivante du mécanisme se caractérise par la formation d'un pore de fusion, dont le diamètre a été estimé à quelques nanomètres, permettant de connecter l'intérieur de la vésicule au milieu extracellulaire (voir Figure 8, pour des revues, voir (Lindau and Alvarez de Toledo, 2003 ; An and Zenisek, 2004)) Du point de vue lipidique, l'apparition de ce pore est sans doute due à la déstabilisation du diaphragme d'hémifusion (Chernomordik and Kozlov, 2003). Suivant les auteurs, la durée de vie d'un tel pore de fusion varie de quelques millisecondes à plusieurs secondes (Aravanis, Pyle et al., 2003 ; Perrais, Kleppe et al., 2004 ; Han and Jackson, 2006), suggérant que ses caractéristiques exactes diffèrent d'un système à l'autre. S'il ne se referme pas, ce pore s'élargit progressivement conduisant ainsi à la fusion complète entre la vésicule et la membrane plasmique (Albillos, Dernick et al., 1997). Dans le cas des GS, l'origine de cet élargissement semble être le gonflement osmotique de la matrice intragranulaire induit par les échanges ioniques entre le contenu du GS et le milieu extracellulaire (pour une revue, voir (Amatore, Bouret et al., 2000)).

Plusieurs protéines semblent jouer un rôle d'une part dans l'ouverture du pore de fusion puis dans le contrôle de sa stabilité et de son éventuelle expansion mais leurs mécanismes d'action ne sont généralement pas définis avec certitude. Il semble ainsi que le complexe SNARE soit un acteur majeur du processus d'ouverture du pore en particulier *via* les domaines transmembranaires des protéines le constituant (Ungermann and Langosch, 2005). La tension exercée par ce complexe sur le diaphragme d'hémifusion pourrait en effet promouvoir sa déstabilisation (Chernomordik and Kozlov, 2003). D'autres acteurs protéiques pourraient cependant favoriser cette ouverture comme notamment la synaptotagmine (voir plus loin). Cette protéine, tout comme la dynamine, qui participe au recyclage des vésicules (voir la partie consacrée au recyclage), ou Munc 18, a également été impliquée dans le contrôle de l'expansion du pore de fusion (pour une revue, voir (An and Zenisek, 2004)).

1.1.6.2. La fusion via un pore protéique

Le modèle précédent impliquant la formation d'un pore de nature lipidique place les SNARE au centre du dispositif conduisant à la fusion. Ce modèle est cependant en contradiction avec certains travaux effectués chez la levure montrant que les complexes en *trans* semblent pouvoir se dissocier bien avant la fusion homotypique entre vacuoles (Ungermann, Sato et al., 1998). Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas de l'exocytose de granules corticaux d'œuf d'oursin (Coorsen, Blank et al., 1998).

Un mécanisme alternatif de fusion faisant intervenir la mise en place d'un pore de nature protéique (Figure 10) a alors été suggéré à la suite des travaux réalisés dans le groupe de Mayer sur la fusion vacuolaire dans la levure (Peters, Bayer et al., 2001). Dans ce modèle, le complexe SNARE joue un rôle direct uniquement lors du rapprochement des deux membranes destinées à fusionner, le pore de fusion étant ensuite formé par l'accolement en *trans* de deux secteurs V_0 de l'ATPase vacuolaire (Figure 10). Ce serait alors la dissociation progressive des sous-unités de chaque secteur V_0 qui permettrait l'invasion du pore par les lipides membranaires puis sa dilatation. Des travaux effectués sur le poisson torpille (Morel, Dedieu et al., 2003) ou la drosophile (Hiesinger, Fayyazuddin et al., 2005) suggèrent que ce mécanisme de fusion pourrait s'appliquer au cas de l'exocytose de neurotransmetteurs. Alternativement à cette implication des secteurs V_0 , il a récemment été proposé que la structure annulaire formée par les domaines transmembranaires des protéines du complexe SNARE pourrait constituer le pore de fusion (Han, Wang et al., 2004).

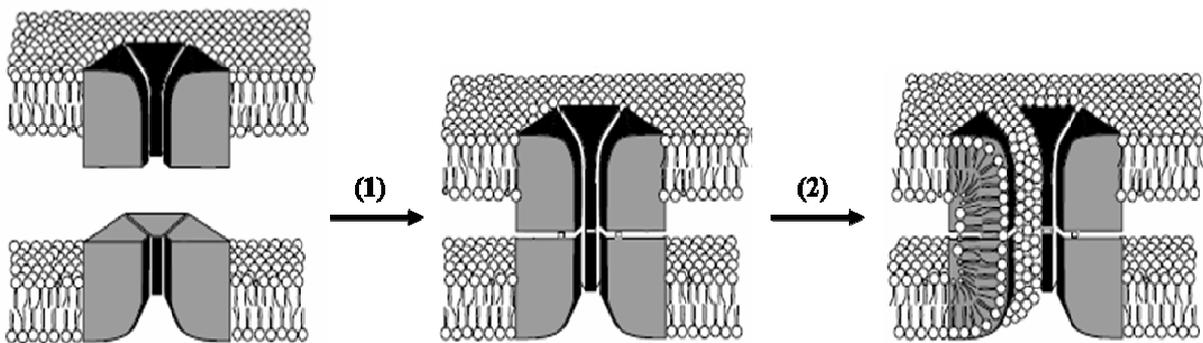


Figure 10 : Fusion via un pore protéique. (1) Formation du pore de fusion par accolement des secteurs V_0 de l'ATPase. (2) Dissociation des sous-unités des secteurs V_0 permettant l'invasion du pore par les phospholipides puis sa dilatation. D'après (Mayer, 2002).

Cette hypothèse du pore protéique reste aujourd'hui encore très controversée. Ainsi, l'étape d'invasion du pore par des phospholipides lors de la dissociation du complexe protéique à

l'origine de la formation de ce pore est vraisemblablement très coûteuse en énergie. Au cours de ce processus, la partie hydrophobe des phospholipides se retrouve en effet au contact du canal aqueux formé par l'accolement des deux complexes protéiques (Figure 10). Ce modèle semble donc difficilement compatible avec l'expansion du pore observée expérimentalement.

1.1.6.3. Le senseur calcique de l'exocytose : la synaptotagmine

La fusion des vésicules avec la membrane plasmique est déclenchée par une élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire. De nombreuses études désignent la synaptotagmine 1 comme étant la protéine à l'origine de cette sensibilité au calcium du phénomène de fusion membranaire (pour des revues, voir (Koh and Bellen, 2003 ; Sudhof, 2004)). Cette protéine, présente sur la membrane des GS et des VS, possède deux domaines C2 pouvant lier chacun plusieurs ions Ca^{2+} . Ces domaines ont la capacité de s'insérer partiellement dans les membranes en présence de calcium. Il a de plus été montré que la synaptotagmine 1 interagissait avec le complexe SNARE, cette interaction étant dépendante du niveau de Ca^{2+} intracellulaire. Enfin, il semble que le calcium puisse également induire l'oligomérisation de cette protéine.

Ces différentes propriétés de la synaptotagmine ont permis d'élaborer différents modèles permettant d'expliquer sa fonction lors de l'étape d'exocytose. L'un de ces modèles suggère que cette protéine serait impliquée directement dans l'ouverture du pore de fusion (Sudhof, 2004). Ainsi, avant la montée de calcium, les membranes vésiculaire et cellulaire seraient maintenues dans un état d'association métastable (peut-être dans un état d'hémifusion) grâce au complexe SNARE. L'élévation du niveau de Ca^{2+} , en provoquant une insertion dans les membranes des domaines C2 de la synaptotagmine, induirait une déstabilisation de ces membranes et la formation du pore de fusion. Ce modèle, qui fait intervenir le calcium à une étape très tardive du processus d'exocytose, permettrait d'expliquer le délai très bref (< 1 ms) observé entre l'élévation de Ca^{2+} et la fusion des VS dans les neurones. Une étude récente analysant l'effet de mutants de la synaptotagmine sur la fusion des GS semble confirmer le rôle de cette protéine dans l'ouverture du pore de fusion mais montre également qu'elle serait impliquée dans la dilatation de ce pore (Wang, Bai et al., 2006).

1.1.7. Le recyclage des granules

Le devenir d'un GS après la libération de son contenu à l'extérieur de la cellule est une question controversée ayant fait l'objet de nombreux travaux.

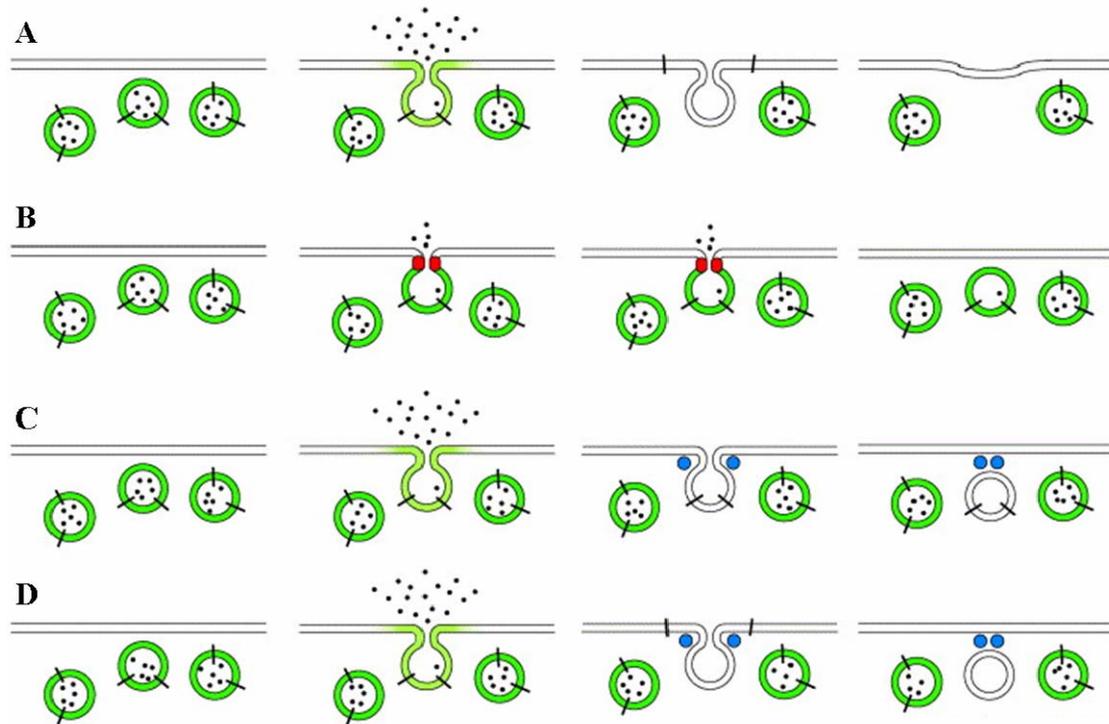


Figure 11 : Le devenir des GS après la fusion. (A) Fusion complète avec la membrane plasmique. (B-D) Différents scénarios de refermeture des GS après la fusion. (B) Refermeture des GS sans diffusion des protéines et des lipides de la membrane de ces organites vers la membrane plasmique. (C) Refermeture des GS avec diffusion des lipides de la membrane de ces organites vers la membrane plasmique mais sans perte des protéines membranaires. (D) Refermeture des GS avec diffusion des protéines et des lipides de la membrane de ces organites vers la membrane plasmique. D'après (An and Zenisek, 2004).

Selon la vision classique, les GS fusionnent complètement avec la membrane plasmique (Figure 11A) ce qui implique une augmentation de la surface cellulaire et un passage des constituants membranaires des GS dans la membrane plasmique (Albillos, Dernick et al., 1997 ; Takahashi, Kishimoto et al., 2002 ; Allersma, Wang et al., 2004). Le processus d'endocytose dépendant de la clathrine permet alors à la fois de contrebalancer cette augmentation de surface et de recycler les protéines et les lipides vésiculaires (pour des revues, voir (Slepnev and De Camilli, 2000 ; Mousavi, Malerod et al., 2004)). Ce processus se caractérise par une invagination de la membrane plasmique due à la formation, au niveau de cette membrane, d'un "manteau" composé de protéines adaptatrices AP2 et de triskélions de clathrine (Figure 12). Un tel bourgeonnement semble se produire préférentiellement au niveau de domaines membranaires particuliers dans lesquels sont concentrés certains des éléments

composants initialement la membrane des GS (cholestérol, phosphoinositides...), permettant ainsi un recyclage efficace de ces constituants vésiculaires (Takei and Haucke, 2001). La dynamine, protéine à activité GTPasique, jouerait ensuite un rôle essentiel dans la fission entre la région invaginée et la membrane plasmique grâce à un effet de constriction au niveau du "cou" de cette région invaginée. Cette étape de fission implique également une polymérisation locale d'actine dont le rôle exact reste à définir (Merrifield, Perrais et al., 2005). Après le désassemblage de leur manteau AP2/clathrine *via* des protéines telles que l'auxiline ou la synaptojanine, les vésicules d'endocytose nouvellement formées sont dirigées vers les endosomes.

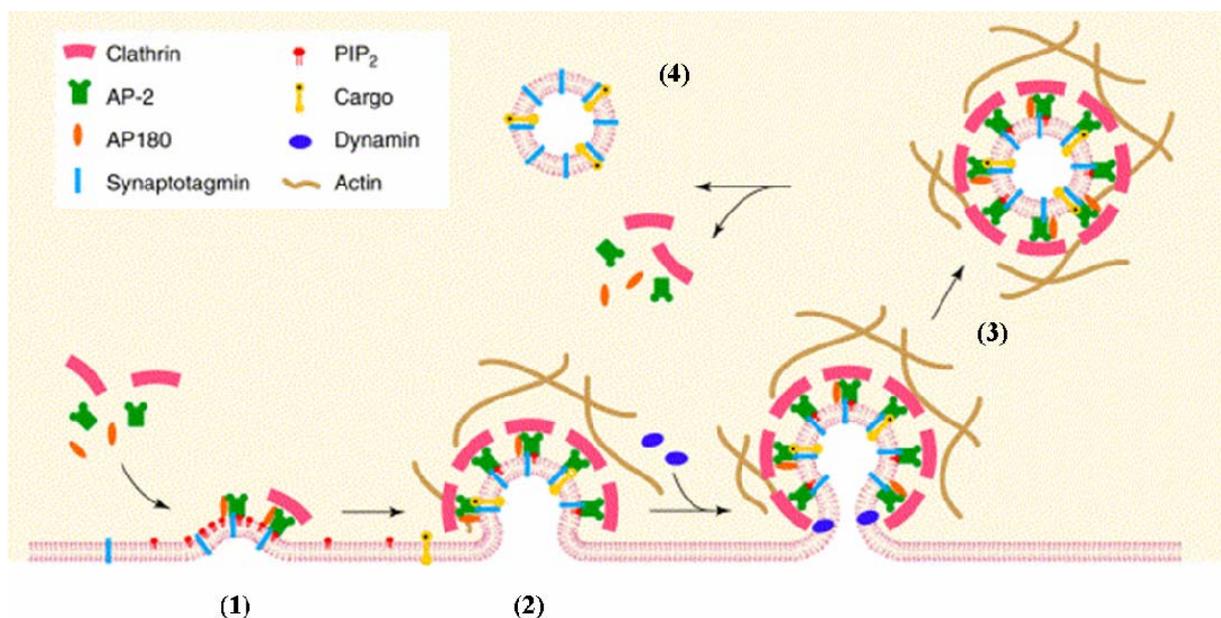


Figure 12 : L'endocytose dépendant de la clathrine. (1) Mise en place du manteau de clathrine. (2) Bourgeonnement de la membrane plasmique. (3) Fission entre la vésicule d'endocytose et la membrane plasmique. (4) Désassemblage du manteau de clathrine. D'après (Takei and Haucke, 2001).

Par opposition à cette vision classique dans laquelle les GS sont des organites à "usage unique", différentes observations suggèrent l'existence d'un mécanisme alternatif dans lequel les GS pourraient se refermer après avoir libéré tout ou partie de leur contenu à travers un pore de fusion (voir Figure 11), permettant ainsi leur éventuelle réutilisation (Henkel and Almers, 1996). Un tel phénomène de refermeture a été mis en évidence dans le cas des VS (pour des revues, voir (Palfrey and Artalejo, 1998 ; An and Zenisek, 2004)). Après leur réacidification et leur remplissage en neurotransmetteurs, ces VS sont alors réutilisées en cas de nouvelle stimulation de la synapse (Sudhof, 2004). Ce processus constituerait une voie de recyclage des VS plus rapide que celle impliquant l'endocytose dépendant de la clathrine. Dans le cas des GS, si plusieurs travaux démontrent que ces organites peuvent se refermer

après leur fusion avec la membrane plasmique (Ales, Tabares et al., 1999 ; Holroyd, Lang et al., 2002 ; Taraska, Perrais et al., 2003), leur éventuelle réutilisation pour une nouvelle libération d'hormones est controversée. Une telle réutilisation suppose notamment que les protéines formant la matrice intragranulaire ou présentes à la membrane des GS ne sont pas perdues (par diffusion dans le milieu extracellulaire ou la membrane plasmique, voir Figure 11) au moment de la fusion "incomplète" de ces organites avec la membrane plasmique. Certaines de ces protéines permettent en effet l'accumulation au sein des GS de nouvelles molécules messagères ou sont nécessaires à une nouvelle fusion. Plusieurs études ont mis en évidence une conservation partielle de l'intégrité des GS en cas de fusion incomplète (Tsuboi and Rutter, 2003 ; Perrais, Kleppe et al., 2004 ; Obermuller, Lindqvist et al., 2005). Toutefois, l'éventuelle réutilisation de ces organites n'a toujours pas été clairement mise en évidence. Le mécanisme moléculaire conduisant à la refermeture des GS reste à l'heure actuelle très mal défini. Il semble que la dynamine, déjà impliquée dans la fission des vésicules à manteau de clathrine, y joue un rôle important (Graham, O'Callaghan et al., 2002 ; Tsuboi, McMahon et al., 2004).

Les deux voies de recyclage présentées ci-dessus semblent coexister à la fois au sein des neurones et des cellules endocrines. L'importance relative de chacune d'entre elles pourrait alors dépendre du mode de stimulation utilisé pour activer la libération d'hormones ou de neurotransmetteurs (Fulop, Radabaugh et al., 2005 ; Harata, Choi et al., 2006).

1.1.8. Conclusion

Il apparaît donc que le processus de sécrétion régulée est un phénomène biologique particulièrement complexe. Les vésicules de sécrétion effectuent en effet un cycle décomposable en plusieurs étapes dont la plupart restent à ce jour seulement partiellement comprises. Le travail présenté dans ce mémoire de thèse se restreint à l'étude du comportement des GS au voisinage de la membrane plasmique. En termes d'étapes du cycle de sécrétion, ceci englobe la fin de la phase de migration de ces organites vers la périphérie cellulaire, leur accrochage à la membrane plasmique ainsi que leur éventuelle fusion avec cette membrane en cas de stimulation de la cellule.

1.2. La microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente pour l'étude du processus de sécrétion régulée

L'étude de la sécrétion régulée grâce à l'utilisation de méthodes biologiques dites "classiques" comme les techniques génétiques ou biochimiques a permis d'obtenir une vision globale des différentes étapes du processus. Ces méthodes sont également à l'origine de la mise en évidence des protéines impliquées dans ce mécanisme. Cependant, l'analyse précise de composantes particulièrement complexes du phénomène de sécrétion régulée comme la fusion des vésicules avec la membrane plasmique ou la dynamique de ces organites au sein de la cellule a nécessité le développement de nouvelles approches à l'interface entre la biologie et la physique.

Des progrès considérables ont ainsi été réalisés dans la compréhension de la dynamique et de la régulation de l'étape de fusion des vésicules de sécrétion (GS ou VS) avec la membrane plasmique grâce au développement depuis une quinzaine d'années des techniques d'électrophysiologie qui permettent d'analyser ce processus à l'échelle de la vésicule unique. Ainsi, par exemple, l'ampérométrie à fibre de carbone, grâce à sa capacité à mesurer la libération de molécules messagères induite par la fusion d'un seul granule, est à l'origine de nombreuses avancées au sujet de la formation et de la dynamique du pore de fusion (pour une revue, voir (Lindau and Alvarez de Toledo, 2003)).

L'inconvénient majeur des différentes méthodes mentionnées ci-dessus réside dans l'impossibilité d'observer directement les étapes du cycle de sécrétion se déroulant au sein de la cellule, condition pourtant nécessaire à leur étude détaillée. C'est le développement des techniques de microscopie de fluorescence au cours des trente dernières années qui a rendu possible de telles observations. L'une de ces techniques s'est notamment révélée particulièrement bien adaptée à l'analyse des étapes du cycle ayant lieu au voisinage de la membrane plasmique, c'est la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente, plus connue sous le nom de microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence). Dans ce qui suit nous allons décrire le principe de cette méthode d'imagerie ainsi que son application à l'étude de la sécrétion régulée (pour une revue, voir (Steyer and Almers, 2001)).

1.2.1. Principe de la microscopie TIRF

La microscopie de fluorescence "classique" apparaît à première vue comme un outil de choix pour l'étude de la dynamique des vésicules à l'intérieur de la cellule grâce notamment à l'utilisation de protéines fluorescentes permettant de marquer spécifiquement ces organites. Cependant, les observations réalisées avec ce type de microscopie montrent qu'il est difficile d'obtenir des images de qualité suffisante pour discerner des vésicules individuelles, condition pourtant nécessaire à l'analyse de leur comportement (voir Figure 14B). Ce problème trouve son origine dans le mode d'excitation de la fluorescence. En effet, la lampe d'excitation éclairant la totalité du volume cellulaire, l'image nette des vésicules présentes dans le plan de focalisation du microscope se superpose à un fond continu dû à la fluorescence de celles situées hors de ce plan. Etant donnée la densité généralement élevée de vésicules, ce fond continu réduit fortement le rapport signal à bruit (RSB) des images obtenues, rendant les observations difficiles.

Deux approches, reposant sur le principe de la section optique, permettent de résoudre ce problème. La première consiste à collecter spécifiquement la fluorescence provenant du plan de focalisation du microscope, c'est notamment sur ce principe que fonctionne le microscope confocal (Pawley, 1996). La seconde approche a recours à une excitation sélective des fluorophores situés dans ce plan de focalisation. C'est cette solution qui est utilisée dans le cas de la microscopie TIRF grâce à l'excitation de la fluorescence au moyen d'une onde optique aux propriétés particulières, l'onde évanescente.

Une telle onde évanescente peut être obtenue lorsque qu'un rayon lumineux, traversant un milieu 1 d'indice n_1 , rencontre un milieu 2 d'indice plus faible n_2 . Dans le cas où l'angle d'incidence α du faisceau au niveau de cette interface est faible, une partie de la lumière est réfractée et se propage dans le milieu 2 (Figure 13). Cependant, si cet angle d'incidence dépasse un angle critique ($\alpha \geq \alpha_c$ avec $\alpha_c = \arcsin(n_2/n_1)$), le faisceau subit une réflexion totale, il n'y a plus de rayon réfracté. Dans ce cas, les lois de l'électromagnétisme, interdisant une discontinuité du champ électromagnétique au niveau de l'interface, prévoient l'existence dans le milieu 2 d'un champ électromagnétique dit évanescent dont l'intensité décroît exponentiellement lorsque l'on s'éloigne de cette interface (Goos and Hänchen, 1947) avec

une profondeur de pénétration caractéristique δ ($I(z) = I_0 \exp(-z/\delta)$). Cette profondeur de pénétration, aussi appelée épaisseur d'évanescence, vérifie la relation :

$$\delta = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2(\alpha) - n_2^2}}, \quad (1)$$

avec λ la longueur d'onde du faisceau lumineux incident.

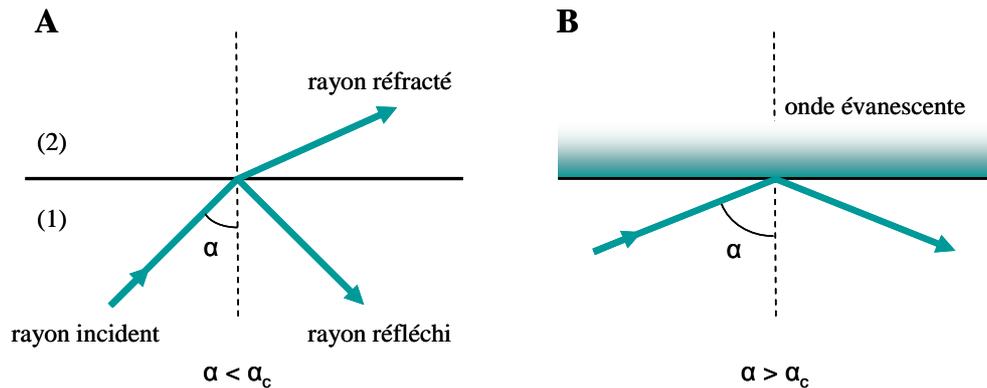


Figure 13 : Réfraction au niveau d'un dioptré plan. (A) Pour un angle d'incidence inférieur à l'angle critique, la faisceau incident est partiellement réfracté. (B) Pour un angle d'incidence supérieur à l'angle critique, le faisceau est totalement réfléchi. Une onde évanescente dont l'intensité décroît exponentiellement lorsque l'on s'éloigne de l'interface est alors présente dans le milieu 2.

En faisant se réfléchir un faisceau laser au niveau d'une interface verre/milieu cellulaire ($n_1 \approx 1,5$ et $n_2 \approx 1,3 - 1,4$) comme dans le cas de cellules adhérentes sur une lamelle, il est ainsi possible de générer une onde évanescente excitant spécifiquement la fluorescence au voisinage de l'interface. La profondeur de pénétration utilisée étant généralement comprise entre 50 et 200 nm, c'est-à-dire très inférieure à la profondeur de champ du microscope ($\approx 1 \mu\text{m}$), l'objectif initial d'amélioration du RSB des observations grâce à l'excitation sélective des fluorophores présents dans le plan de focalisation est atteint. En contrepartie, l'utilisation de cette méthode est restreinte à l'étude de phénomènes se produisant au voisinage de l'interface verre/cellule. Par conséquent, l'application de cette technique à l'analyse du processus de sécrétion régulée permet d'observer spécifiquement les vésicules localisées dans la région juxta-membranaire (Figure 14C). Le RSB des images obtenues est alors suffisant pour suivre le devenir de ces vésicules de manière individuelle.

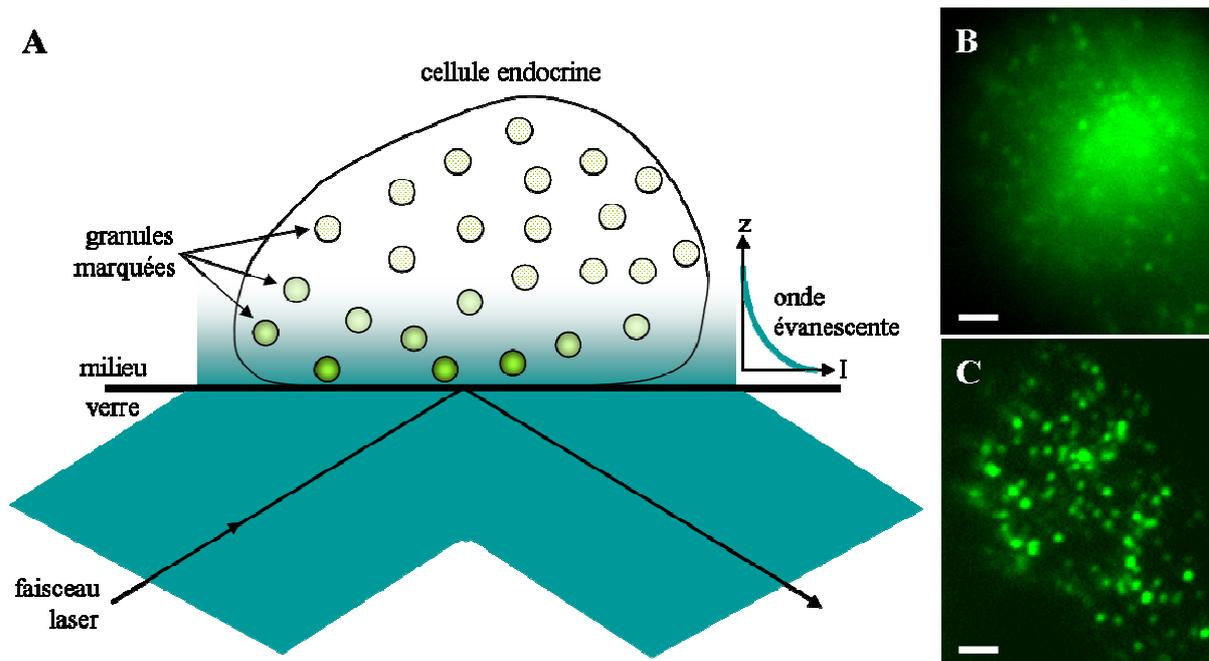


Figure 14 : Observation des granules en microscopie TIRF. (A) L'excitation des granules marquées *via* une onde évanescente permet d'observer spécifiquement les GS présents au voisinage de la membrane plasmique. (B) Observation en épifluorescence d'une cellule neuroendocrine de la lignée BON dont les GS sont marqués par la protéine chimérique NPY-GFP. (C) La même cellule observée en microscopie TIRF. Barre d'échelle pour (B) et (C) : 2 µm

1.2.2. Avantages et inconvénients de la microscopie TIRF vis-à-vis des microscopies confocale et à deux photons

Il existe principalement trois techniques d'imagerie fondées sur le principe de la section optique : les microscopies confocale, TIRF et à deux photons. Le principe des méthodes confocale et TIRF a été décrit précédemment. La microscopie à deux photons repose quant à elle sur une excitation bi-photonique des fluorophores au niveau du point de focalisation d'un laser (White, Squirrell et al., 2001).

L'inconvénient majeur de la microscopie TIRF par rapport aux deux autres types de microscopies réside dans l'impossibilité d'observer des phénomènes se produisant à distance de la périphérie cellulaire. En revanche, pour des observations au voisinage de la membrane plasmique, la microscopie TIRF offre deux principaux avantages.

D'une part, elle permet *a priori* une acquisition d'image plus rapide car elle est la seule des trois techniques ne nécessitant pas un balayage point par point. Cette différence de cadence d'acquisition tend cependant à diminuer du fait du développement de modes de balayage multi-point (spinning disk confocal microscopy, (Graf, Rietdorf et al., 2005)).

D'autre part, la technique TIRF possède une meilleure résolution spatiale suivant l'axe orthogonal au plan de focalisation. En effet, l'épaisseur de la section optique obtenue à l'aide

d'un montage confocal ou à deux photons ($\approx 0,5 \mu\text{m}$) est nettement plus importante que dans le cas du système TIRF pour lequel l'épaisseur de cette section est comparable à la profondeur de pénétration de l'onde évanescente ($\approx 50\text{-}200 \text{ nm}$).

Ces deux avantages font de la microscopie TIRF la méthode d'imagerie la plus performante pour l'observation de processus biologiques se produisant au niveau de la membrane plasmique ou à proximité de celle-ci.

1.2.3. Les montages de TIRF

Les montages optiques développés pour permettre des observations en microscopie TIRF peuvent être classés en deux catégories (pour une revue, voir (Axelrod, 2001)).

La première catégorie de montages se caractérise par un découplage entre les voies d'excitation et de détection de la fluorescence (Figure 15A). Le faisceau laser destiné à générer l'onde évanescente vient frapper l'interface lamelle/cellule après avoir traversé un prisme de verre. La détection de la fluorescence est réalisée du côté opposé, généralement *via* un objectif à immersion plongeant dans le milieu baignant les cellules observées.

Le second type de montages utilise un microscope inversé, l'excitation de la fluorescence et sa détection se faisant à travers l'objectif (Figure 15B). Cette configuration implique d'utiliser des objectifs à grande ouverture numérique. En effet, l'angle d'incidence du faisceau laser au niveau de l'interface verre/cellule étant limité par cette ouverture numérique et d'après l'équation (1), seul un objectif dont l'ouverture numérique est supérieure à 1,37 (pour un indice cellulaire moyen voisin de 1,37, voir Matériels et méthodes) permet d'obtenir une excitation par onde évanescente. Cette limitation s'est révélée problématique dans le cas des objectifs à immersion à huile classiques dont l'ouverture numérique maximale n'excède généralement pas 1,4. Il a donc fallu attendre le développement d'objectifs spéciaux à très grande ouverture numérique (Axelrod, 2001) pour pouvoir réaliser des observations en microscopie TIRF à l'aide de cette configuration.

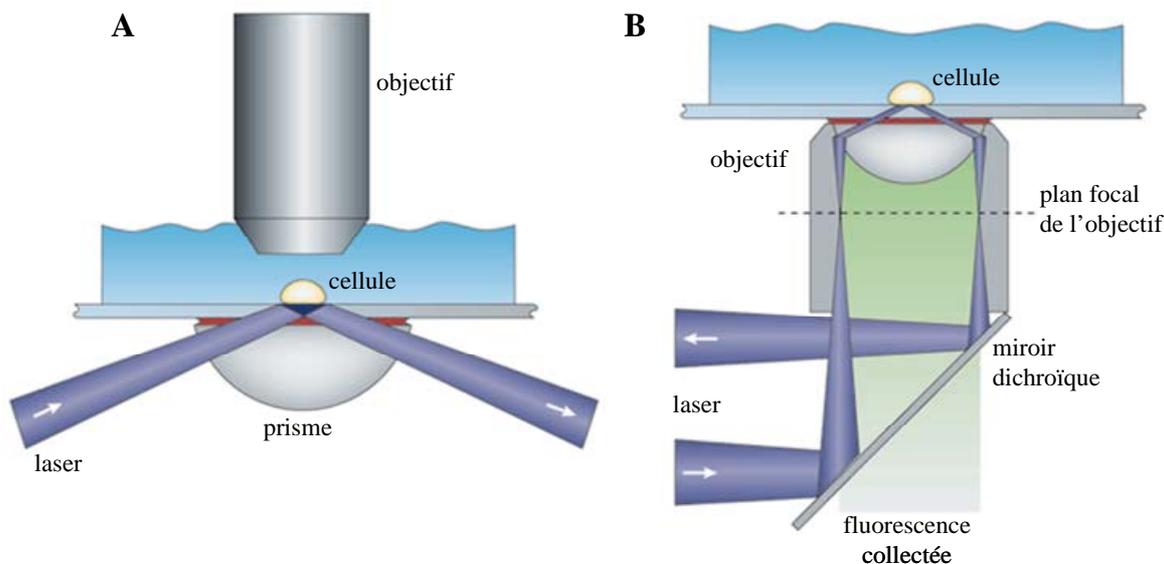


Figure 15 : Les deux catégories de montage utilisées en microscopie à onde évanescente. (A) Montage avec prisme caractérisé par un découplage entre les voies d'excitation et de détection de la fluorescence. (B) Montage pour lequel l'excitation de la fluorescence et sa détection se font à travers l'objectif. D'après (Steyer and Almers, 2001)

Chacune de ces deux catégories de montages possède ses propres avantages. Ainsi, dans le cas de la configuration utilisant un prisme, grâce à la dissociation des voies d'observation et d'excitation, il est relativement simple de faire varier la profondeur de pénétration de l'onde évanescente en changeant l'angle d'incidence du faisceau laser. Ceci se révèle beaucoup plus délicat à mettre en place pour le second type de montages en raison de la complexité du trajet optique du faisceau laser à l'intérieur de l'objectif. Cette caractéristique du système avec prisme a été exploitée pour le développement de microscopes de TIRF à épaisseur d'évanescence variable permettant notamment des mesures absolues de distances membrane plasmique/substrat pour l'étude de l'adhérence cellulaire (Oliveczky, Periasamy et al., 1997 ; Stock, Sailer et al., 2003). L'inconvénient principal de la configuration avec prisme réside dans l'accessibilité très limitée à la préparation biologique ce qui la rend difficilement utilisable pour des applications nécessitant l'emploi de systèmes de micro-manipulation (stimulation de cellules uniques, micro-injection...).

En pratique, la majorité des équipes scientifiques réalisant des observations en microscopie TIRF pour des applications biologiques utilisent le système pour lequel l'excitation de la fluorescence se fait à travers l'objectif. Au laboratoire, nous avons toutefois opté pour l'autre configuration (voir Matériels et méthodes) afin de pouvoir contrôler précisément les caractéristiques de l'onde évanescente d'excitation.

Les développements récents observés du point de vue technique pour la microscopie TIRF ont essentiellement consisté en l'association de ce type de ce système avec d'autres méthodes d'imagerie. Ainsi, par exemple, la qualité des observations a pu être améliorée grâce à l'utilisation d'une excitation par onde évanescente de nature bi-photonique (Schapper, Goncalves et al., 2003). De même, la technique de TIRF a été combinée avec des méthodes telles que la mesure du transfert résonnant d'énergie de fluorescence (FRET) (Riven, Kalmanzon et al., 2003 ; An and Almers, 2004) ou la microscopie à force atomique (Mathur, Truskey et al., 2000) pour étudier différents processus biologiques.

1.2.4. Application de la microscopie TIRF à l'étude de la sécrétion régulée

C'est Axelrod qui, en 1981 (Axelrod, 1981), a été le premier à utiliser la microscopie TIRF à des fins d'imagerie cellulaire pour étudier les mécanismes d'adhérence sur un substrat. Cette technique a ensuite été appliquée à l'observation de phénomènes aussi variés que la dynamique du cytosquelette en périphérie de la cellule (Krylyshkina, Anderson et al., 2003 ; Kuhn and Pollard, 2004), le phénomène de réparation membranaire (Jaiswal, Andrews et al., 2002) ou l'endocytose de récepteurs *via* la formation de vésicules à manteau de clathrine (Merrifield, Perrais et al., 2005). L'analyse du processus de sécrétion régulée apparaît toutefois comme le domaine pour lequel l'utilisation de la microscopie à onde évanescente s'est révélée la plus féconde (Steyer, Horstmann et al., 1997 ; Oheim, Loerke et al., 1998). Cette méthode a en effet permis d'étudier deux aspects particuliers du cycle de sécrétion régulée : le mouvement des vésicules au voisinage de la membrane plasmique et leur fusion avec cette membrane.

Les trajectoires de vésicules individuelles dans le plan de focalisation du microscope ont ainsi été déterminées grâce à l'application de méthodes de suivi de particules uniques aux images obtenues en microscopie TIRF (Lang, Wacker et al., 1997 ; Tsuboi, DaSilva Xavier et al., 2003). De plus, plusieurs études ont utilisé le fait que l'excitation par onde évanescente de la fluorescence décroît exponentiellement lorsque l'on s'éloigne de l'interface, pour quantifier le mouvement des vésicules suivant l'axe orthogonal au plan de focalisation grâce à la mesure des variations de leur intensité (voir Matériels et Méthodes et (Oheim and Stuhmer, 2000 ; Johns, Levitan et al., 2001 ; Li, Bai et al., 2004)). L'analyse de ces trajectoires tridimensionnelles a montré que le comportement des vésicules dans la région juxta-membranaire est loin d'être simple, reflétant ainsi les interactions multiples que ces organites

développent avec leur environnement (Steyer and Almers, 1999 ; Manneville, Etienne-Manneville et al., 2003). Ces différentes interactions ainsi que leurs rôles dans la dynamique vésiculaire seront discutées en détail dans la partie consacrée à l'étude des mouvements de ces organites par microscopie TIRF (voir la partie 3. intitulée "La dynamique des granules de sécrétion dans la région juxta-membranaire").

L'utilisation de l'imagerie TIRF pour observer directement des événements d'exocytose uniques a permis non seulement de progresser dans la description du processus de fusion proprement dit, mais aussi d'étudier sa localisation au niveau de la membrane plasmique.

Cette technique a ainsi été mise en œuvre pour étudier la question complexe du devenir des vésicules après la libération de leur contenu dans le milieu extracellulaire (voir le paragraphe au sujet du recyclage des GS). Elle a notamment permis l'observation directe des deux voies pouvant être empruntées par les vésicules après l'ouverture du pore de fusion à savoir leur étalement complet dans la membrane plasmique (Allersma, Wang et al., 2004 ; Ma, Bindokas et al., 2004) ou leur refermeture (Taraska, Perrais et al., 2003). Dans le contexte d'une telle refermeture, plusieurs équipes ont étudié la diffusion de constituants de la membrane des vésicules vers la membrane plasmique (Tsuboi and Rutter, 2003 ; Taraska and Almers, 2004) ainsi que celle de protéines intra-vésiculaires vers l'extérieur de la cellule (Perrais, Kleppe et al., 2004) en cas d'absence d'expansion du pore de fusion (voir Figure 11). Cette question est d'une grande importance car elle conditionne vraisemblablement l'éventuelle réutilisation de ces vésicules pour une nouvelle libération d'hormones ou de neurotransmetteurs (voir plus haut dans cette introduction). La microscopie TIRF a aussi été utilisée pour mettre en évidence les protéines impliquées dans ce mécanisme de refermeture (Tsuboi, McMahon et al., 2004).

Cette méthode d'imagerie a également permis d'étudier la localisation des événements d'exocytose à la surface de la membrane plasmique dans les cellules neuroendocrines. En effet, si, dans le cas des neurones, il ne fait plus de doute que la fusion des VS se concentre dans des zones actives, la question de l'existence de telles régions spécialisées à la membrane des cellules endocrines reste peu explorée. L'observation directe des événements d'exocytose par microscopie TIRF a permis de montrer que de tels événements ne se répartissaient pas de manière aléatoire à la surface des cellules (Oheim, Loerke et al., 1999 ; Allersma, Wang et al., 2004). Il semble ainsi qu'il existe des microdomaines (de diamètre inférieur à 1 μ m) au niveau desquels l'exocytose se produit de manière privilégiée. Ces résultats sont corroborés par des travaux montrant les corrélations existant entre la répartition des événements de fusion et

celles de la syntaxine 1 (Ohara-Imaizumi, Nishiwaki et al., 2004) ou des canaux calciques (Becherer, Moser et al., 2003) au sein de la membrane plasmique.

1.2.5. Conclusion, but du travail

La microscopie TIRF apparaît donc comme un outil de choix pour l'étude des dernières étapes du phénomène de sécrétion régulée. En effet, grâce à la possibilité d'observer "*in situ*" la dynamique et la fusion de vésicules uniques en périphérie de la cellule, cette technique d'imagerie permet d'accéder à des phénomènes généralement analysés de manière indirecte. Ceci est particulièrement vrai pour l'étude des mouvements des vésicules dans la région juxta-membranaire. Or la compréhension des mécanismes à l'origine de tels mouvements est d'une grande importance car ils conditionnent une étape majeure du cycle de sécrétion à savoir le transport de la vésicule jusqu'à son futur site d'exocytose.

L'objectif de cette thèse était donc l'application de la microscopie TIRF à l'étude de cette dynamique vésiculaire en périphérie de la cellule. Dans cette optique, deux approches ont été développées en parallèle. La première a consisté en une analyse fine des trajectoires vésiculaires afin de déterminer les différents types de comportements décrits par ces vésicules et de comprendre en quoi ils reflétaient les interactions que ces organites développent avec leur environnement. La deuxième approche, menée en étroite collaboration avec l'équipe de François Darchen au sein du laboratoire, a été d'utiliser la microscopie TIRF afin de définir la nature de ces interactions à l'échelle protéique. Nous avons ainsi en particulier étudié l'assemblage protéique liant les vésicules au cytosquelette d'actine.

Reflétant ces deux points de vue, ce manuscrit de thèse se décompose en deux parties. La première décrit la mise au point d'une méthode d'analyse des trajectoires vésiculaires permettant leur caractérisation précise. Dans la seconde, cette méthode d'analyse est exploitée afin de préciser le déroulement des différentes étapes aboutissant à l'arrivée de la vésicule au niveau de la membrane plasmique. Cette partie décrit également les travaux réalisés sur le rôle du complexe protéique Rab27A/MyRIP/MyosineV lors de ces étapes finales du cycle de sécrétion régulée.

2. Méthode d'analyse des trajectoires complexes

2.1. Introduction

La microscopie TIRF permet d'étudier les mouvements des GS au sein de la zone juxta-membranaire. En effet, à partir des séquences d'images obtenues (cadence d'acquisition égale à 10 Hz), il est possible de déterminer les trajectoires tridimensionnelles de ces GS (voir Matériels et méthodes). Ces trajectoires sont généralement complexes. Elles se caractérisent ainsi souvent par différentes phases de mouvement avec, par exemple, une période de déplacement brownien qui fait suite à un arrêt temporaire ou à une phase de mouvement suivant une direction privilégiée (Vidéo 1). Une telle complexité n'est pas spécifique à la dynamique des GS, elle se retrouve également dans les mouvements d'objets biologiques aussi variés que des fourmis à la recherche de nourriture (Wolf and Wehner, 2000) ou des protéines diffusant au sein de la membrane plasmique (Fujiwara, Ritchie et al., 2002). Sachant que les interactions que l'objet biologique étudié développe avec son environnement sont à l'origine des déplacements décrits par cet objet, une meilleure compréhension de ces interactions passe alors par le développement de méthodes précises d'analyse des trajectoires permettant notamment de mettre en évidence et de caractériser les différentes phases de mouvement qu'elles contiennent.

De nombreuses méthodes d'étude des dynamiques d'objets biologiques uniques ont recours à des paramètres calculés pour les trajectoires entières (Kusumi, Sako et al., 1993 ; Carlsson, Shah et al., 2002 ; Li, Xiong et al., 2004). De telles méthodes globales, en masquant l'existence d'éventuels comportements transitoires, ne permettent généralement pas une caractérisation pertinente de trajectoires complexes. D'autres approches ont été développées afin de pouvoir détecter des périodes de mouvement transitoires au sein d'une même trajectoire. Différentes méthodes d'analyse ont ainsi été mises au point pour étudier, par exemple, le confinement temporaire de protéines ou de lipides diffusant dans la membrane plasmique (Meier, Vannier et al., 2001 ; Fujiwara, Ritchie et al., 2002) ou la dynamique complexe de la chromatine au sein du noyau (Bornfleth, Edelmann et al., 1999 ; Levi, Ruan et al., 2005). Cependant, ces méthodes permettent généralement la détection d'un seul type de comportement transitoire (confinement, mouvement dirigé...). Elles sont donc difficilement

applicable à des problématiques biologiques différentes telles que, notamment, l'analyse des déplacements des GS dans la région juxta-membranaires. En effet, comme le soulignent de précédents travaux (Oheim and Stuhmer, 2000 ; Manneville, Etienne-Manneville et al., 2003), ces organites présentent une grande variété de dynamiques.

Il apparaît donc que l'étude des GS au voisinage de la membrane plasmique nécessite le développement d'une méthode permettant de détecter et de caractériser, de la façon la plus exhaustive possible, les différents types de mouvements transitoires susceptibles d'être décrits par ces organites. Afin d'être efficace, une telle méthode doit surmonter les deux difficultés majeures associées à l'analyse des trajectoires complexes à savoir, d'une part, la détection de périodes transitoires dont la durée, souvent très variable, n'est pas connue *a priori* et, d'autre part, la discrimination entre des comportements réellement non-diffusifs et les périodes de mouvement purement brownien qui peuvent présenter transitoirement des tendances au confinement ou au mouvement dirigé. Dans ce qui suit, nous décrirons une nouvelle méthode d'analyse remplissant ces différents critères. Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'un article soumis à *The Biophysical Journal* (manuscrit joint à la fin de cette partie) et en cours de révision au moment de l'écriture de ce mémoire de thèse.

2.2. Principe de la méthode d'analyse des trajectoires complexes mise au point

Dans cette partie, nous donnerons uniquement un aperçu rapide de la méthode d'analyse mise au point. La description détaillée de cette méthode ainsi que l'évaluation de son efficacité pour la caractérisation des mouvements des GS sont réalisées dans le manuscrit joint.

Afin de décrire la dynamique des GS, quatre catégories de mouvement ont été définies (voir Figure 16 et (Kusumi, Sako et al., 1993)) : (1) les périodes dites d'arrêt durant lesquelles la mobilité des GS est proche de la limite de résolution de l'algorithme de suivi de particule, (2) la catégorie contrainte associée à un mouvement brownien gêné par des obstacles ou restreint à l'intérieur d'une zone de taille limitée qui elle même peut diffuser (GS se déplaçant à l'intérieur d'une cage ou maintenus par une "laisse"), (3) la catégorie diffusives pour laquelle les GS décrivent un mouvement brownien et, enfin, (4) la catégorie dirigée correspondant à un mouvement brownien auquel se superpose un déplacement dans une direction particulière.

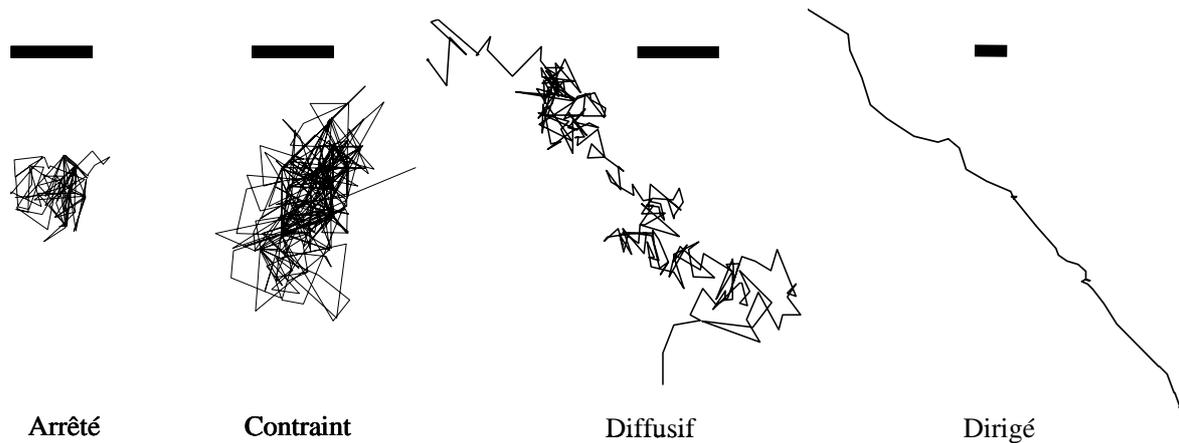


Figure 16 : Les quatre catégories de mouvement utilisées pour caractériser la dynamique des vésicules.
Barre d'échelle : 100 nm.

La détection de ces quatre catégories de mouvement est réalisée grâce au calcul des variations, le long des trajectoires vésiculaires, des trois paramètres suivants : le coefficient de diffusion (D), la concavité de la courbe du déplacement quadratique moyen (MSD pour *mean square displacement*) en fonction du temps (paramètre Dev) et l'asymétrie de la trajectoire (paramètre $Asym$). Chacun de ces paramètres permet de mettre en évidence un type de mouvement particulier. Le coefficient de diffusion, qui quantifie la mobilité des vésicules, est ainsi utilisé pour repérer les périodes d'arrêt. Les mouvements de type contraint sont, quant à eux, détectés grâce à la mesure de la courbure du MSD. Enfin, l'évaluation de l'asymétrie, qui permet de caractériser la forme des trajectoires, donne accès aux périodes dirigées. Sachant que ces paramètres mesurent des déviations par rapport au mouvement brownien, les périodes de trajectoires restant non classifiées sont alors de nature diffusive.

Afin de détecter des comportements transitoires, les trois paramètres de classification sont calculés le long des trajectoires à l'aide d'une fenêtre d'analyse "glissante". Le choix de la largeur de cette fenêtre est un point important car il conditionne en grande partie l'efficacité de la méthode mise au point. En effet, une fenêtre d'analyse trop longue ne permet pas de détecter des périodes transitoires brèves tandis qu'une fenêtre trop courte empêche une caractérisation fiable de la portion de trajectoire étudiée. A cette première difficulté s'ajoute le fait que la durée de ces périodes transitoires ne peut pas être définie *a priori*. Afin de surmonter ces deux problèmes, nous avons utilisé une fenêtre d'analyse de largeur variable. Cette largeur est alors optimisée tout au long de la trajectoire afin de s'adapter au mieux à la durée des comportements transitoires non browniens que l'on cherche à détecter.

Une autre difficulté inhérente à l'analyse de trajectoires d'objets uniques tient dans le fait que même une trajectoire purement diffusive peut présenter temporairement une tendance au mouvement dirigé ou contraint. Par conséquent, la distinction entre des comportements réellement non diffusifs et un mouvement brownien nécessite de définir des seuils de détection précis pour les paramètres *Asym* et *Dev*. De tels seuils sont déterminés grâce à l'analyse du comportement de ces paramètres lorsqu'ils sont appliqués à des trajectoires browniennes simulées.

Le calcul, puis le seuillage des paramètres de classification le long des trajectoires suivant la méthodologie décrite ci-dessus, permet une caractérisation précise et fiable des mouvements des vésicules en périphérie de la membrane cellulaire. Il apparaît ainsi que la grande majorité des comportements transitoires présents au sein des trajectoires sont détectés grâce à cette méthode.

2.3. Discussion

La méthode d'étude des trajectoires d'objets uniques présentée ici permet donc de détecter et de caractériser efficacement les différents types de mouvements transitoires susceptibles d'être décrits par les GS dans la région juxta-membranaire. Dans ce que suit, nous discuterons tout d'abord deux aspects essentiels de cette méthode à savoir le choix des paramètres de classification et le calcul de ces paramètres le long des trajectoires *via* une fenêtre d'analyse glissante de longueur variable. Nous aborderons ensuite la question de l'applicabilité de cette méthode à l'analyse de mouvements d'origines biologiques différentes.

2.3.1. Le choix des paramètres de classification

2.3.1.1. La détection des périodes de confinement

L'analyse de la courbe du MSD est l'outil généralement utilisé pour classifier une trajectoire ou une portion de trajectoire. La concavité de cette courbe donne ainsi notamment accès à la nature du mouvement (contraint, diffusif ou dirigé, voir (Qian, Sheetz et al., 1991)). La méthode décrite ici exploite cette approche afin de détecter les périodes d'arrêt, grâce au

calcul du coefficient de diffusion, ou de mouvement contraint, à travers l'évaluation de la concavité du MSD *via* le paramètre *Dev*.

Si la mesure du coefficient de diffusion est la méthode la plus généralement utilisée pour quantifier la mobilité des objets étudiés et ainsi mettre en évidence les périodes d'arrêt (Kusumi, Sako et al., 1993), il n'existe en revanche pas de méthode standard pour déterminer la présence de mouvement contraint. Une approche souvent employée pour détecter un comportement sous-diffusif consiste en un ajustement de la courbe du MSD par une loi de puissance ($MSD(\Delta t) = C.(\Delta t)^\alpha$, voir (Feder, Brust-Mascher et al., 1996)). Le facteur de puissance α obtenu permet alors d'évaluer la concavité du MSD, $\alpha < 1$ étant synonyme de mouvement sous-diffusif. L'inconvénient majeur d'une telle approche réside dans le fait que l'incertitude sur la position des objets suivis peut induire la détection de périodes sous-diffusives artificielles (Martin, Forstner et al., 2002). Dans nos conditions expérimentales, ce problème rend l'utilisation du facteur de puissance mal adaptée à la classification des trajectoires vésiculaires.

Une méthode alternative a été développée par Kusumi et ses collaborateurs (Kusumi, Sako et al., 1993) pour évaluer la concavité du MSD. Elle consiste à mesurer la déviation relative entre la courbe du MSD et l'ajustement linéaire des premiers points de cette courbe. C'est également sur ce principe que se fonde la classification des trajectoires à partir du paramètre *Dev*. Contrairement à l'analyse *via* le facteur de puissance, nous avons montré que cette approche est peu sensible à la résolution limitée de l'algorithme de suivi de particule utilisé.

Le paramètre *Dev* diffère cependant de celui utilisé par Kusumi. Ce dernier détermine en effet la déviation de la courbe du MSD par rapport à la linéarité en un seul point de cette courbe, rendant cette évaluation relativement sensible aux fluctuations statistiques du MSD. Le moyen le plus simple de limiter ce problème est de moyenniser cette déviation sur plusieurs points de la courbe. C'est cette solution qui est utilisée dans le cas du paramètre *Dev*. Cela permet d'analyser des MSD plus courts et donc de raccourcir la largeur minimale de la fenêtre d'analyse utilisée pour la détection des périodes contraintes.

Malgré ces efforts pour diminuer la largeur minimale de la fenêtre d'analyse, les méthodes fondées sur l'utilisation du MSD pour mettre en évidence des périodes de mouvement contraint nécessitent dans tous les cas l'utilisation de fenêtres relativement larges (plus de 75

points pour le paramètre Dev). En effet, en raison des propriétés statistiques du MSD, la concavité de la courbe de ce MSD ne peut être évaluée de manière correcte que dans le cas où cette courbe comporte plusieurs dizaines de points (voir la partie *Principles of the transient motion analysis* dans l'article soumis à *The Biophysical Journal* et (Qian, Sheetz et al., 1991)). Cette limitation rend l'analyse du MSD mal adaptée à la détection de zones de confinement de courtes durées.

Parmi les différentes méthodes alternatives développées pour l'étude de ce type de comportement, celle mise au point par Simson et ses collaborateurs (Simson, Sheets et al., 1995) s'est révélée particulièrement efficace. En résumé, cette méthode consiste à évaluer la surface S explorée par la particule suivie pendant une période donnée (les mouvements considérés sont bidimensionnels) et à la comparer à une surface de référence S_r correspondant à celle que cette particule aurait dû explorer si son déplacement avait été purement brownien. Si $S < S_r$, la portion de trajectoire analysée est considérée comme confinée. S_r est calculée à partir du coefficient de diffusion moyen de l'objet suivi. Une telle approche permet de détecter efficacement des zones de confinement composées de moins de 50 points (détection de périodes de confinement de 5 à 10 s avec une cadence d'acquisition de 3 Hz, voir (Simson, Sheets et al., 1995)) ce qui est très difficile *via* l'analyse du MSD. Elle ne se révèle cependant fiable que dans le cas où le coefficient de diffusion de la particule reste relativement constant au cours de la trajectoire (Daumas, Destainville et al., 2003). Une telle condition n'étant pas remplie dans le cas des vésicules de sécrétion, cette méthode se révèle difficilement applicable à l'analyse de la dynamique de ces organites en périphérie de la cellule. Toutefois, une étude récente a montré qu'en adaptant l'approche développée par Simson, il était possible d'obtenir une détection efficace des mouvements confinés, même dans le cas d'un coefficient de diffusion variant au cours de la trajectoire (Meilhac, Le Guyader et al., 2006). Il serait donc intéressant de tester cette nouvelle méthode dans le cas des trajectoires vésiculaires.

Parmi les différentes approches mises au point pour mettre en évidence des mouvements contraints, celle quantifiant la courbure du MSD par l'intermédiaire du paramètre Dev semble donc bien adaptée à l'étude des mouvements des GS. Comme cela a été mentionné plus haut, la principale limitation associée à l'utilisation de ce paramètre concerne la détection de comportements transitoires de courtes durées. La caractérisation des trajectoires vésiculaires montre cependant que la durée moyenne des périodes contraintes est de l'ordre de 200 points¹

¹Du point de vue de l'analyse purement mathématique des trajectoires, c'est le nombre de points qui permet de caractériser de façon pertinente la durée d'une période transitoire.

(20 s avec une cadence d'acquisition de 10 Hz), c'est-à-dire nettement supérieure à la largeur minimale des fenêtres d'analyse utilisées pour la détection de ce type de périodes (75 points). Ceci suggère que, au moins dans le cas des GS, les périodes de mouvement confiné sont suffisamment longues pour pouvoir être détectées efficacement *via* le paramètre *Dev*.

2.3.1.2. La détection des zones de mouvement dirigé

De manière similaire au cas des trajectoires de nature contrainte, les mouvements dirigés sont souvent mis en évidence grâce à l'étude de la concavité du MSD (Qian, Sheetz et al., 1991 ; de Win, Pierson et al., 1999 ; Manneville, Etienne-Manneville et al., 2003). Cependant, comme cela a été discuté précédemment, cette approche ne permet pas d'analyser des portions courtes de trajectoires. Elle est, par conséquent, peu adaptée à la caractérisation de trajectoires vésiculaires pour lesquelles les périodes de mouvements dirigés durent généralement moins de 30 points (3 s avec une cadence d'acquisition de 10 Hz).

La plupart des autres méthodes développées afin de déterminer si une trajectoire est de nature dirigée reposent sur la mise en évidence de la présence d'une direction de déplacement privilégiée (Saxton, 1993 ; Bornfleth, Edelmann et al., 1999 ; de Win, Pierson et al., 1999). C'est cette approche que nous avons mise en œuvre dans le cas de la caractérisation des mouvements des GS. Le paramètre d'asymétrie utilisé *Asym*, qui évalue la déformation de la portion de trajectoire analysée suivant une direction particulière, permet de détecter des mouvements dirigés de courte durée. Nous avons ainsi montré que ce paramètre permet de faire la distinction entre un comportement dirigé et brownien pour des trajectoires d'au moins 10 points.

L'inconvénient majeur de ces méthodes par rapport à celles fondées sur l'analyse du MSD réside dans le fait qu'elles sont relativement sensibles à l'incertitude sur le positionnement des objets suivis. En effet, ce bruit sur la position de la particule risque de masquer l'existence d'une direction de déplacement privilégiée, en particulier dans le cas où la vitesse de déplacement suivant cette direction est faible (Figure 17). Ce problème ne semble cependant pas critique dans le cas des GS. En effet, le déplacement cumulé suivant une direction particulière lors des phases de mouvement dirigé ($\sim 1,2 \mu\text{m}$ sachant qu'en moyenne la vitesse de transport est de $\sim 0,6 \mu\text{m/s}$ et la durée des périodes dirigées est de $\sim 2 \text{ s}$) est nettement supérieur à l'incertitude sur le positionnement des GS ($\sim 30 \text{ nm}$). Par conséquent, les portions de trajectoires dirigées se caractérisent par une forte dissymétrie facilement détectable *via* le paramètre *Asym*.

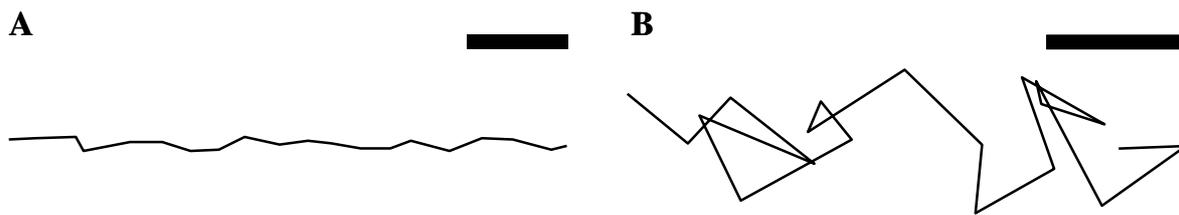


Figure 17 : Effet de l'incertitude sur le positionnement des GS vis-à-vis de la détection des périodes dirigées. (A) Période dirigée simulée de 20 points caractérisée par une vitesse de transport de $0.6 \mu\text{m/s}$ et un bruit sur la position de la particule de 30 nm. Pour cette portion de trajectoire $Asym = 2,2$. Barre d'échelle : 200 nm. (B) Période dirigée simulée de 20 points caractérisée par une vitesse de transport de $0.1 \mu\text{m/s}$ et un bruit sur la position de la particule de 30 nm. Pour cette portion de trajectoire $Asym = 0,6$. Barre d'échelle : 50 nm.

Il est également intéressant de noter que si ce paramètre d'asymétrie est bien adapté à la détection de courtes périodes de nature dirigée (moins de 50-100 points), il semble que, pour des mouvements dirigés se maintenant pendant de plus longues durées, l'analyse de la courbe du MSD soit préférable (Saxton, 1994). Il apparaît en effet que l'asymétrie moyenne attendue pour une trajectoire purement brownienne devient indépendante de la longueur de cette trajectoire dès que celle-ci dépasse une vingtaine de points (voir la partie intitulée *Optimizing detection sensitivity : setting thresholds and minimum crossing times* dans l'article soumis à *The Biophysical Journal* et (Saxton, 1993)). Ainsi, même une trajectoire brownienne de durée infinie présente en général une asymétrie non nulle (Rudnick and Gaspari, 1987). Par opposition, les fluctuations statistiques de la courbe du MSD par rapport à la linéarité diminuent lorsque l'on considère des trajectoires diffusives de durées croissantes (Qian, Sheetz et al., 1991). Par conséquent, alors que la courbure positive minimale du MSD nécessaire pour distinguer un mouvement dirigé d'un mouvement diffusif décroît pour des trajectoires dont la durée augmente, la valeur seuil d'asymétrie permettant une telle distinction reste fixe. Il en résulte que de longues périodes dirigées sont détectables plus facilement grâce à l'analyse du MSD plutôt qu'en ayant recours au paramètre *Asym*.

Pour clore cette partie concernant le choix des paramètres de classification, il paraît important de mentionner qu'un moyen de mettre en évidence plus efficacement les comportements non diffusifs (dirigés ou contraints) au sein des trajectoires vésiculaires pourrait être d'analyser conjointement deux paramètres adaptés à la détection du type de mouvement considéré. Par exemple, les mouvements contraints pourraient être détectés en évaluant simultanément la courbure du MSD *via* le paramètre *Dev* et la probabilité de confinement à l'aide de la méthode développée par Simson (Simson, Sheets et al., 1995). Le principe d'une telle approche a été

décrit par Saxton dans le cas des mouvements dirigés (Saxton, 1994), son efficacité reste cependant à démontrer pour l'analyse de la dynamique d'objets biologiques.

2.3.2. L'utilisation d'une fenêtre d'analyse de taille variable

La méthode d'étude des mouvements décrite ici permet la détection de comportements temporaires grâce à l'utilisation d'une fenêtre d'analyse se déplaçant le long de la trajectoire étudiée. La longueur de cette fenêtre est variable et s'adapte à la durée des périodes transitoires rencontrées afin de pouvoir les détecter efficacement. Pour chaque point de la trajectoire, le paramètre de classification étudié est ainsi calculé pour des fenêtres d'analyse de différentes tailles centrées sur le point considéré. Seules sont alors retenues la valeur du paramètre et la longueur de fenêtre correspondant à une probabilité maximale de comportement non brownien.

Si cette approche permet de mettre en évidence la majorité des comportements transitoires décrits par les GS, elle s'avère relativement peu précise en ce qui concerne la définition de la position exacte des transitions entre les différents types de mouvement. Une intervention manuelle est ainsi nécessaire afin de redéfinir la durée des périodes non-diffusives détectées automatiquement, celles-ci incorporant en effet souvent à leurs extrémités des portions de mouvement brownien. Les tests menés sur des transitions simulées montrent cependant que cette correction manuelle permet de définir relativement précisément la position de ces transitions (~1,5 s pour la précision la plus faible qui concerne les transitions entre les périodes de mouvements diffusif et contraint dont la durée est voisine respectivement de 10 et 20 s). Le recours à l'intervention manuelle possède toutefois l'inconvénient d'accroître la durée d'analyse des trajectoires.

Ce problème est vraisemblablement dû au fait que la variation de taille de la fenêtre d'analyse permettant de déterminer sa longueur optimale est réalisée en conservant cette fenêtre centrée sur le point de la trajectoire considéré. Dans le cas, par exemple, d'une transition d'un mouvement diffusif vers un mouvement dirigé, ceci implique en effet que pour un point P_0 situé au voisinage d'une transition, la fenêtre d'analyse définit un segment de trajectoire comportant une partie diffusive et une partie dirigée (Figure 18). Si la valeur d'asymétrie associée à ce segment est suffisamment élevée, celui-ci sera alors englobé dans la période dirigée. Par conséquent, afin de limiter ce risque d'incorporer une portion de mouvement brownien dans une période non diffusive, il faudrait optimiser la longueur de la fenêtre

d'analyse en déplaçant ses extrémités indépendamment de part et d'autre du point P_0 . La mise en place d'une telle approche permettrait vraisemblablement une automatisation complète de la méthode d'analyse des mouvements.



Figure 18 : Incorporation de portions de mouvement brownien au niveau des extrémités de périodes non diffusives. Exemple d'une trajectoire simulée présentant une transition (marquée par un point rouge) entre un mouvement brownien et un mouvement dirigé. Le segment de trajectoire surligné en bleu et centré sur le point P_0 est caractérisé par une asymétrie supérieure à la valeur limite permettant de distinguer entre mouvements diffusif et dirigé. Ce segment est donc considéré comme faisant partie de la période dirigée. La portion de ce segment située avant la transition et caractérisée par un mouvement diffusif est donc incorporée au sein de cette période dirigée. Barre d'échelle : 200 nm.

2.3.3. L'application de la méthode à d'autres problèmes biologiques

Les méthodes de suivi de particule unique sont depuis une quinzaine d'années appliquées à un nombre toujours croissant de problématiques biologiques (Wolf and Wehner, 2000 ; Heun, Laroche et al., 2001 ; Levi, Serpinskaya et al., 2006). L'analyse des trajectoires obtenues se révèle cependant souvent délicate pour deux raisons principales. D'une part, ces trajectoires sont généralement complexes, la particule suivie changeant de comportement au cours de son déplacement. D'autre part, pour des trajectoires dont la durée et les résolutions spatiale et temporelle sont limitées, il s'avère souvent difficile de faire la distinction entre un comportement non diffusif spécifique de l'objet étudié et les fluctuations statistiques associées au mouvement brownien. Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode d'analyse générale permettant de caractériser ces mouvements d'objets biologiques de natures différentes. Les différentes équipes utilisant des techniques de suivi de particule unique possèdent en effet généralement leur propre méthode d'analyse des trajectoires (Ghosh and Webb, 1994 ; Steyer and Almers, 1999 ; Vazquez, Belmont et al., 2001 ; Lakadamyali, Rust et al., 2003). Ces méthodes sont cependant souvent trop spécifiques pour être généralisables à d'autres problématiques.

Bien qu'ayant été mise au point dans l'optique particulière de la description de la dynamique des GS dans la région juxta-membranaire, la méthode d'analyse décrite ici semble pouvoir être appliquée relativement simplement à l'étude de mouvements d'origines différentes.

L'approche développée permet en effet de détecter les quatre catégories de comportements distinguées généralement afin de caractériser les déplacements d'objets uniques (arrêt, mouvements contraint, diffusif et dirigé). De plus, la mise en évidence de comportements transitoires dont les durées caractéristiques sont différentes de celles obtenues pour les GS semble possible grâce à l'utilisation d'une fenêtre d'analyse de longueur variable.

Cette question de la durée des mouvements analysés reste cependant un aspect critique dans une optique de généralisation de la méthode. En effet, comme cela a été discuté précédemment, les portions de trajectoires décrivant un type de mouvement spécifique ne sont détectées efficacement par les trois paramètres de classification utilisés que dans le cas où elles comportent un nombre de points supérieur à une valeur minimale (par exemple, 75 points pour les périodes contraintes). Le seul moyen de contourner cette limitation, inhérente à toute méthode d'analyse de trajectoires, est d'adapter la cadence d'acquisition utilisée pour obtenir ces trajectoires aux temps caractéristiques attendus pour les mouvements des objets biologiques étudiés. Ainsi par exemple, si l'étude des déplacements saisonniers d'oiseaux migrateurs ne requiert pas plus de deux mesures de position par jour (Croxall, Silk et al., 2005), l'analyse de la diffusion de phospholipides dans la membrane plasmique nécessite des cadences d'acquisition supérieures à 10^4 Hz (Fujiwara, Ritchie et al., 2002).

La méthode d'analyse de trajectoires présentée ici possède cependant une spécificité qui mérite d'être soulignée : contrairement à la grande majorité des méthodes utilisées jusqu'à maintenant qui se restreignent à la caractérisation de trajectoires en deux dimensions, celle-ci a été mise au point dans le but d'analyser des mouvements tridimensionnels. Or, il apparaît que, grâce au développement de systèmes d'imagerie tels que la microscopie bi-photonique ou à déconvolution, les trajectoires à étudier sont de plus en plus souvent en trois dimensions (Li, Xiong et al., 2004 ; Levi, Ruan et al., 2005). Ceci souligne donc l'intérêt potentiel de la méthode mise au point pour l'étude de telles trajectoires.

2.4. Conclusion

La méthode d'analyse des trajectoires présentée permet donc de caractériser précisément la dynamique complexe des GS dans la région juxta-membranaire. Du point de vue biologique, une telle caractérisation est une source d'informations intéressantes concernant deux aspects du processus de sécrétion régulée. D'une part, les mouvements décrits par les GS étant le

reflet des interactions qu'ils développent avec leur environnement, leur étude permet de mieux comprendre à la fois l'architecture de la région juxta-membranaire et la manière dont les GS interagissent avec une telle architecture. D'autre part, grâce à l'analyse des transitions entre les différents types de déplacement, il devrait être possible de préciser la dynamique du processus de sécrétion en périphérie de la cellule en déterminant notamment par quelles étapes passent un GS avant d'atteindre sa destination finale, à savoir la membrane plasmique. La partie suivante de ce mémoire de thèse est notamment consacrée à l'application de cette méthode d'analyse aux trajectoires vésiculaires afin de tenter d'approfondir ces différentes questions.

Analysis of transient behavior in complex trajectories: application to secretory vesicle dynamics.

Sébastien Huet*, Erdem Karatekin*, Viet Samuel Tran*, Isabelle Fanget*,
Sophie Cribier[†] and Jean-Pierre Henry*

**Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UPR 1929, Institut de Biologie
Physico-Chimique (IBPC), 75005 Paris, France*

[†]CNRS UMR 7099, IBPC and Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

Running Title: Analysis of complex vesicle trajectories

Contact authors:

Jean-Pierre Henry and Erdem Karatekin

Institut de Biologie Physico-Chimique, CNRS UPR 1929, 13 rue Pierre et Marie Curie,
75005 Paris, France.

Tel.: 33-1-58-41-50-13; Fax: 33-1-58-41-50-23;

E-mail: jean-pierre.henry@ibpc.fr, erdem.karatekin@ibpc.fr

Keywords: complex 3-dimensional trajectories; single-particle tracking; mean square displacement analysis; TIRFM, total internal reflection fluorescence microscopy; endocrine cells

ABSTRACT

Analysis of trajectories of dynamical biological objects such as breeding ants or cell organelles is essential to reveal the interactions they develop with their environments. Many previous works used a global characterization, based on parameters calculated for entire trajectories. In cases where transient behavior was detected, this usually concerned only a particular type, such as confinement or directed motion. However, these approaches are not appropriate in situations in which the tracked objects may display many different types of transient motion. We have developed a method to analyze exhaustively the different kinds of transient behaviors that the tracked objects may exhibit. The method discriminates stalled periods, constrained and directed motions from random dynamics by evaluating the diffusion coefficient, the mean square displacement curvature and the trajectory asymmetry along individual trajectories. To detect transient motions of various durations, these three parameters are calculated along the trajectories using a rolling analysis window whose width is variable. This method was applied to the study of secretory vesicle dynamics in the subplasmalemmal region of human carcinoid BON cells. Analysis of transitions between transient motion periods, combined with plausible assumptions about the origin of each motion type, leads to a model of dynamical subplasmalemmal organization.

INTRODUCTION

Complex trajectories are present at all scales in biology. Migrating birds travel thousands of kilometers every year (1). On a smaller scale, ants describe circuitous paths of tens of meters when looking for food (2). Neurons can move hundreds of micrometers in the developing cerebral cortex (3), while organelle traffic in the cytoplasm occurs on the micron scale (4). Finally, diffusion of proteins in the plasma membrane can occur on the nanometer scale (5). These trajectories are often characterized by transient behaviors such as temporary confinement in a particular zone followed by periods of random diffusion or directed movement. Scrutinizing these multifaceted trajectories is essential in revealing the biophysical processes which generate them and the interactions of the tracked objects with their environment.

Study of complex trajectories requires an appropriate analysis method to extract and characterize the transient behaviors they contain. This characterization should allow both the classification of the transient motion (diffusive, constrained, directed...) and the evaluation of associated parameters (diffusion coefficient, velocity...). Some efforts in dissecting such complex trajectories have been made to study various biological processes such as fibroblast migration (6), microtubule dependent transport of pigment granules in melanophores (7) or protein motions in the cell membrane (8,9). However, the methods developed to analyze these trajectories are usually designed to highlight only a particular behavior such as confinement or directed motion. In consequence, these methods are rather specific and can hardly be applied to other biological systems.

In this article, we describe an efficient motion analysis method allowing detection and characterization of the different kinds of transient movement a single particle may exhibit. This method overcomes the two main difficulties associated with the analysis of complex trajectories: (i) detection of transient periods whose durations are highly variable and not known *a priori* and (ii) discrimination between true non-diffusive behavior and temporary apparent directed or confined periods originating from pure Brownian dynamics.

We have applied our analysis method to the study of secretory vesicle dynamics near the plasma membrane of endocrine BON cells. The BON cell line, which secretes serotonin, is derived from a human carcinoid tumor (10). Secretory products of these tumors are responsible for symptoms such as flush, diarrhea, and vasoconstriction. Individual secretory vesicles were imaged using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM), also called evanescent wave microscopy. This technique exploits evanescent wave properties to selectively image fluorophores in an aqueous or cellular medium very near a glass surface (11,12). Thus, movements and fusion of individual labeled vesicles located near the plasma membrane can be observed with low background due to the absence of out-of-focus fluorescence (13,14). Using typical penetration decay constants of 100-300 nm for the evanescent wave, the observed region corresponds to a 200-600 nm deep layer of cytoplasm located just beneath the plasma membrane.

In various cell types, previous TIRFM studies have shown that vesicle behavior near the plasma membrane is far from simple: the mobility of a vesicle seems to depend on its distance from the plasma membrane (15,16) and some vesicles exhibit non-Brownian dynamics such as constrained or directed motion (14,17). This diversity of motion behavior is perhaps not surprising, given the complexity of the vesicle environment in this region of the cell: subplasmalemmal vesicles are immersed in a dense cytoskeleton of actin filaments and

microtubules (18) and can also interact with the plasma membrane. This brings up the important question of whether vesicle dynamics can reveal the interactions that these vesicles develop with their environment. In this context, the analysis method presented here should give precise information on the relationship between secretory vesicles, cytoskeleton and cellular membrane.

Indeed, our initial application of the analysis method to the dynamics of secretory vesicles in BON cells has demonstrated the utility of the method in terms of the detailed information one can extract. First of all, in this system we have found that about half the vesicles switched from one motion type to another at least once during the observation time (mean trajectory duration ~ 30 s); thus motion-type transitions are frequent events which deserve close scrutiny. Looking more closely into the transitions, we have discovered that they are reversible and have quite distinct probabilities of occurrence between different motion types. Most notably, transitions between directed and stalled or constrained periods of motion seem to be "prohibited", while the majority of the transitions involve diffusive and directed periods of motion. Combined with information on the origin of the interactions generating the different kinds of motion, these transition probabilities immediately suggest a dynamic model of subplasmalemmal organization.

MATERIALS AND METHODS

TIRFM setup

An upright microscope (BX50WI, Olympus, Tokyo) was adapted to TIRFM by the prism approach (12) (see Fig. 1 for a schematic view of the setup). To generate the evanescent wave, light from a 488 nm argon laser (177-G02, Spectra Physics, Newport, Irvine, CA) radially entered a BK7 glass hemisphere and was reflected from its planar face at a supercritical angle. To excite the fluorescence of labeled vesicles with the evanescent wave, the hemisphere was optically coupled with the glass coverslip, on which cells were cultured, using immersion oil (518 C, Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Oberkochen, Germany). The hemisphere also played the role of a light condenser for bright-field observations.

The intensity of the evanescent wave employed to illuminate secretory vesicles declines exponentially in the normal direction to the interface. The penetration depth δ is defined as the distance over which the intensity falls off to $1/e$ of its value at the surface, and is given by:

$$\delta = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_g^2 \cos^2(\theta) - n_c^2}}, \quad (1)$$

where $\lambda = 488$ nm is the wavelength of the laser beam, θ its incidence angle and n_g and n_c are the refractive indices of the glass coverslip and the cell medium, respectively (see *Calibration of the evanescence depth*). A convenient aspect of this TIRFM setup is its ability to illuminate a given cell at different evanescence depths to analyze behaviors of vesicles located more or less deeply into the cytoplasm. According to Eq. 1, the penetration depth can be modified by changing the incidence angle of the laser beam reaching the sample (19). To vary this angle, we used a telecentric system composed of a movable mirror and a lens whose focal point coincided with the center of the hemispheric prism. A translation of the mirror changed the incidence angle of the laser beam and, as a result, the evanescence depth, without modifying

the illuminated area on the coverslip (Fig. 1). Using this setup, a given cell could be studied successively at different evanescence depths.

During timelapse acquisition, the laser power was attenuated to ~1 mW and illumination was restricted to image acquisition by a shutter coupled to the camera in order to minimize photobleaching. Cells were observed through a water immersion objective (60X, 0.9 NA, Olympus), and frames were captured with a CDD camera (CoolSnap HQ, Photometrics, Roper Scientific, Tucson, AZ). Under the conditions of observation used, one pixel corresponded to 107.5 nm. Unless stated otherwise, frames were acquired for 60 seconds at 10 Hz using Metamorph software (Universal Imaging Corporation, Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA).

Calibration of the evanescence depth

In order to know the thickness of the cell region illuminated using TIRFM, the penetration depth of the evanescent wave must be determined. However, this is a function of the refractive index of the cell medium (see Eq. 1) which is not well defined. Consequently, the evanescence depth had to be evaluated experimentally. To do so, intensities of fluorescent beads adsorbed onto living COS-7 cells were measured as functions of their vertical positions, as previously described by Steyer and Almers (14). These measurements were repeated for different incidence angles of the laser beam. The evanescent wave profiles thus obtained were well fitted by simple exponential decays which corresponded to the theoretical profiles. From these fits, evanescence depths between 200 to 300 nm were obtained with a relative error of 15%. Using Eq. 1, we then deduced an average refractive index, n_c for the cell medium of 1.37 ± 0.01 , in agreement with previous estimations (20,21). It was assumed that the same refractive index was also valid for BON cells. Penetration depths used for timelapse imaging and 3-dimensional (3D) single particle tracking were calculated with this cell medium refractive index.

Cell culture and vesicle labeling

COS-7 cells were routinely cultured in DMEM containing 4.5 g/L glucose and supplemented with 10% FBS in 5% CO₂ at 37°C. The human carcinoid BON cell line was kindly provided by C.M. Townsend (University of Texas Medical Branch, Galveston, TX). BON cells were maintained in DMEM-nutrient mix F-12 (1:1), supplemented with 10% FBS in 5% CO₂ at 37°C. Dense core secretory vesicles were labeled using the fluorescent chimera NPY-GFP which is the fusion between the human pro-neuropeptide Y and the enhanced green fluorescent protein (22). This chimera specifically labels vesicles by accumulating inside these organelles. Expression of NPY-GFP in BON cells was obtained by transfection with a plasmid encoding this chimera (a gift of W. Almers, Oregon Health Sciences University, Portland, OR). In brief, cells ($2 \cdot 10^6$ in PBS) were mixed with DNA vectors (2.5-10 µg) and transfected by electroporation using a PS10 electropulsator (Jouan, Thermo Electron Corporation, Woburn, MA). Stable transfectants were selected in the presence of 800 µg/ml G418 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) and screened by fluorescence microscopy to detect NPY-GFP expression. One BON NPY-GFP clone, named BC6, was selected and plated on uncoated glass-bottom dishes (P50G-1.5-14-F, MatTek Cultureware, Ashland, MA). Observations were performed at 31-33°C, between 48-72 hours after plating.

3-Dimensional single particle tracking of secretory vesicles

Time-lapse sequences of BON cells, whose vesicles were labeled with NPY-GFP, were acquired to analyze vesicle movements. In these sequences, most vesicles appeared as diffraction limited fluorescent spots, since their sizes were similar to those obtained with 200 nm diameter fluorescent beads. However, a spot may appear artificially large due to the blooming effect in fluorescence detection, depending on the display settings chosen. Thus, in a collection of spots with different brightnesses such as the vesicles in Video 1, the brightest spots appear larger than the diffraction limit. From the stacks of images (see Video 1 for a representative example acquired at 10 Hz, with an evanescence depth of 200 nm), 2D vesicle trajectories were obtained by single particle tracking (SPT) using the Metamorph software. We did SPT one vesicle at a time. The position of a given vesicle (x, y coordinate) on each frame was detected as the centroid of the fluorescent spot corresponding to that vesicle (23). To minimize positioning error, it was important to exclude as much of the image background as possible from the centroid calculation. This was achieved by setting a threshold brightness. Pixel values below the threshold were taken to be zero whereas those above remained unchanged. Using this method, fluorescent spots were tracked along the sequence until the spot was lost from view or coalesced with another spot (corresponding to the encountering of two vesicles). A very small fraction of the fluorescent spots appeared as if composed of a few vesicles. Such spots were not tracked.

As the intensity of the evanescent wave decreases exponentially with a known penetration depth in the direction orthogonal to the coverslip (the z -axis), displacements of a fluorescent vesicle along this axis can be obtained by measuring variations of its intensity (14-16). To evaluate the intensity of a vesicle in a given frame, its fluorescence profile was first plotted as a function of the distance from its center. Vesicle intensity (with the local background subtracted) was then defined by the area under a Gaussian fit to this profile. This was done using a method similar to that of Zenisek *et al.* (24). Concentric circles were drawn around the 2D vesicle position with radii, r , spaced in increments of 1 pixel unit. The intensity for $r = 0$ was the grey value of the pixel (16-bit images) which corresponded to the vesicle center. For $r \geq 1$, fluorescence at 100 equally spaced points on each circle was measured and averaged. Each of these averaged values corresponding to a given circle with a radius r contributed to the building of the vesicle fluorescence profile I_{fluo} . This procedure was continued for increasing r , until r reached a maximum value r_{max} for which the fluorescence intensity stopped decreasing. The intensity corresponding to r_{max} was taken as the local background intensity. The intensity profile was then fitted with a 1D Gaussian function:

$$I_{fit}(r) = I_0 e^{\left(\frac{-r}{\sigma}\right)^2} + I_{bg} , \quad (2)$$

with I_0 and σ the free parameters and $I_{bg} = I_{fluo}(r_{max})$ the local background intensity. Vesicle intensity corresponded to the area under the Gaussian fit given by $I_{ves} = I_0 \sigma$. Intensity variations along a trajectory, $I_{ves}(t)$, were obtained by repeating this procedure frame by frame. Vesicle coordinates orthogonal to the observation plane (relative to the initial position) were evaluated using the relation:

$$z(t) = -\delta \ln \left(\frac{I_{ves}(t)}{I_{ves}(0)} \right) , \quad (3)$$

where δ is the penetration depth of the evanescent wave.

To evaluate the precision of this approach, we first tracked fluorescent latex beads (200 nm diameter, labeled with fluorescein, Polysciences, Inc., Warrington, PA) immobilized on a coverslip. The laser intensity was adapted to get signal-to-noise ratios for the beads similar to those typical for vesicles, and an evanescence depth of 200 nm was used. An important question is whether there is anisotropy between the normal and lateral precision in position detection. Figure 2 shows the resolution anisotropy, $\Gamma = 2\sigma_z / (\sigma_x + \sigma_y)$, defined as the ratio of the root mean squared (rms) error in the normal (σ_z) to the lateral direction ($(\sigma_x + \sigma_y)/2$), as a function of the signal-to-noise ratio (S/N) measured following reference (23). For the S/N values averaged over the beads ($\langle S/N \rangle_{beads} \approx 14$), a rms error of 16 (15) nm with a standard deviation of 3 (3) nm in particle position for the x, y (z) directions was found. Similar values were obtained for the vesicles. That is, at this evanescence depth, the precision was similar for the detection of lateral and normal movements. This lack of asymmetry in the detection precision considerably facilitates analysis and interpretation of 3D trajectories.

To validate our 3D tracking algorithm, we applied it to follow the dynamics of fluorescent beads immersed in a medium of high viscosity to have diffusion coefficients as close as possible to those measured for the vesicles ($D \approx 2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ for diffusing vesicles, see Table 2). We used a glycerol-water mixture (75-80% of glycerol by volume) whose viscosity was about 50-80 cP. At higher concentrations of glycerol, it is difficult to obtain an evanescent profile with the minimum incidence angle we can use in our setup (73-74 degrees), since the refractive index of glycerol is close to that of BK7 glass ($n_{\text{glycerol}} = 1.48$). These viscosities were actually not high enough for vesicle-sized beads (200-300 nm diameter) to diffuse slowly enough. To obtain slower dynamics, we used larger beads (475 nm diameter) which still appeared as nearly diffraction-limited spots in the acquired images (these spots were slightly larger than those corresponding to the vesicles). The evanescent wave used to illuminate the beads had a penetration depth of 200 nm under these conditions. From the 3D trajectories, the diffusion coefficients of the beads were calculated (see below). We obtained $D_{xy} = (13 \pm 3) \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D_z = (5 \pm 2) \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$. These values are in good agreement with the hydrodynamic theory for a particle in the vicinity of a solid boundary (25-27). For the same bead diameter and medium viscosity and considering that the mean distance between the bead and the wall is comparable to the evanescence depth, the theoretical values for the diffusion coefficients are $D_{xy} = (8-13) \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ and $D_z = (5-7) \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, taking the viscosity of the medium to be 80 and 50 cP, respectively. We also used beads of 200 nm diameter, more closely matching the sizes of the vesicles in BON cells. For such small-sized beads, however, the hydrodynamic theory breaks down and the ratio D_{xy} / D_z becomes even larger for a particle undergoing Brownian dynamics. Thus, for 200 nm diameter beads $D_{xy} / D_z \approx 5-6$ was found in this work, while Banerjee *et al.* reported $D_{xy} / D_z \approx 3-4$ (27). The difference between the two measurements on these small, highly mobile beads may be explained by a stronger "sectioning effect" in our case, i.e. that in the z -direction one is biased to detecting slower moving beads, since they remain longer in the evanescent zone. For the detection of vesicles, however, the sectioning effect is rather small, since the mobility of most of them is much smaller than the mobility of the 200 nm beads used here.

3-Dimensional trajectory simulations

For 3D random walk simulations, a method derived from that previously described by Simson *et al.* (8) was used. Brownian trajectories of 5 to 600 frames with 10 frames/s were simulated for a range of diffusion coefficients D ($5.10^{-5}\mu\text{m}^2/\text{s} < D < 5.10^{-2}\mu\text{m}^2/\text{s}$). These characteristics matched the recording rates used for TIRFM time-lapse imaging and the diffusion coefficients measured for secretory vesicles. The number of frames matched the durations of the transient motion behaviors observed for the vesicles. To simulate 3D Brownian motion with a diffusion coefficient D , it was needed to generate trajectories composed of steps exhibiting a uniform probability distribution for step direction and a mean step length equal to $(6D\Delta t)^{1/2}$, where $\Delta t = 0.1\text{s}$ is the step period. To achieve these characteristics, each step composing the trajectory was obtained by the combination of 100 sub-steps. The size of each sub-step, l , was obtained for time $\delta t = 0.001\text{s}$ (such that $\Delta t = 100\delta t = 0.1\text{s}$), according to $l = (6D\delta t)^{1/2}$. For each sub-step, one direction among the six directions defined from Cartesian coordinates (x , $-x$, y , $-y$, z , $-z$) was randomly chosen based on the MatLab random number generator *rand*.

For constrained motion simulations, trajectories exhibiting a diffusion coefficient D were generated with the same procedure but the particle movements were restricted to a spherical cage with a radius R . The center of the cage underwent Brownian motion with a diffusion coefficient D_{cage} . To simulate directed motion with a velocity v , trajectories exhibiting a diffusion coefficient D were generated using the method described above and for each step a displacement of $V\delta t$ was added along the x coordinate. For the simulation of noisy trajectories, an isotropic Gaussian noise with a standard deviation of 16 nm, corresponding to the precision of the tracking algorithm, was added along the three Cartesian directions for each point of the trajectory.

It was verified that grid and sampling artifacts were negligible by comparing simulations run on a mesh to those run in continuous-space, using two approaches. In the first continuous method, each step in a simulated trajectory was generated as follows. The step length was chosen from a Gaussian distribution with variance $6D\Delta t$ where Δt was the step period and D the simulated diffusion coefficient. The azimuthal direction angle of the step θ was picked randomly from $[0, \pi]$ and the polar direction angle ψ was chosen from a probability distribution proportional to $\sin(\psi)$ with ψ between 0 and π . In the second continuous method, each step of a simulated trajectory was the composition of steps along each Cartesian coordinate whose lengths were chosen from a Gaussian distribution with a variance of $6D\Delta t$ where Δt was the step period and D the simulated diffusion coefficient. All methods gave nearly identical results, suggesting grid and sampling artifacts are negligible.

RESULTS

Principles of the transient motion analysis

To describe the different behaviors exhibited by a vesicle, four motion classes are considered (28): 1) stalled vesicles whose mobility is close to the detection limit; 2) diffusive class in which vesicles exhibit Brownian motion; 3) directed class corresponding to vesicles undergoing Brownian motion superimposed with displacement in a particular direction; 4) constrained class in which vesicles experience Brownian motion impeded by obstacles or restricted to a limited area which itself can diffuse (vesicles moving inside a ‘‘cage’’ or held by

a “leash”). Impeded and restricted diffusion are bracketed in the same class because they refer to quite similar motion characteristics.

The usual method to classify a given sub-trajectory into one of the four categories above is the analysis of the mean squared displacement (MSD). Let δt be the time between two consecutive vesicle positions and L the distance that a vesicle travels in the time interval $\Delta t = n\delta t$ where n is an integer (in our experiments, frames were acquired at 10 Hz so that $\delta t = 0.1$ s). The MSD is defined as:

$$\langle L^2(\Delta t) \rangle = \frac{1}{N-n} \sum_{j=1}^3 \sum_{k=1}^{N-n} \left\{ \left[x_j((k+n)\delta t) - x_j(k\delta t) \right]^2 \right\}, \quad (4)$$

where the vesicle position (x,y,z) is written as (x_j) with $j = 1, \dots, 3$ and N is the total number of vesicle positions. For Brownian motion, the MSD increases linearly with time interval Δt , while for constrained or directed motion, it is curved downward or upward, respectively (29). Consequently, the MSD curvature can be used to classify sub-trajectories. However, for experimental, finite-length trajectories, analysis of MSD curves is somewhat difficult. The accuracy of MSD values decreases with increasing time interval Δt , due to averaging over smaller number of positions. More precisely, for a particle experiencing random motion with a diffusion coefficient D , the variance of the MSD value for a given time lag $\Delta t = n\delta t$ is equal to (29):

$$V = (6Dn\delta t)^2 \frac{2n^2 + 1}{(3n(N-n+1))}, \quad (5)$$

where N is the total number of particle position measurements. Analyses of the MSD curves are thus valid only for small ratios n/N , i.e. for the initial portions of these curves. As a consequence, classification using the MSD analysis requires vesicle sub-trajectories of at least several tens of points. This condition is not restrictive to classify periods of immobilization, diffusive or constrained motion whose typical durations are longer (see Table 2). However, the use of MSD analysis is not appropriate to detect directed periods which, at least in our application, last typically less than 30 points. A particularity of these directed trajectories is that they are highly asymmetric due to the existence of a preferred direction for vesicle displacements. Consequently, we use the trajectory asymmetry rather than the MSD curvature to detect directed periods (see below).

In summary, then, three parameters are used to make the classification: the diffusion coefficient, D , the MSD curvature and the trajectory asymmetry. The first parameter is used to detect stalled periods. The second and third parameters are used in deciding whether a portion of a trajectory corresponds to constrained or directed motion, respectively. Because these parameters measure deviations from Brownian motion, parts of a trajectory that are classified into none of the three previously detected classes belong to the Brownian class. The definition of these three parameters will be presented first, in the following subsection.

In order to detect transient behavior, the three classification parameters are calculated along trajectories using a rolling analysis window. A challenge of the method was to choose the width of this rolling window. A width too long reduces the ability to detect brief specific motion due to averaging vesicle behavior whereas a width too short does not allow a reliable classification of the analyzed sub-trajectory. In addition, the duration of these temporary events is not known *a priori*. To overcome this problem, we use a rolling window whose width is optimized to fit the duration of the transient behavior under investigation. The method employed for the calculation of the three parameters along a trajectory using this variable width window will be presented in the subsection *Calculation of the classification*

parameters along trajectories. Another difficulty is the fact that pure Brownian motion can temporarily mimic directed or confined periods (30) which would result in MSD curves showing upward or downward curvature. In consequence, the parameter quantifying MSD curvature has to be thresholded to distinguish real non-Brownian behavior from statistical fluctuations of random motion. For the same reason, the asymmetry parameter has also to be thresholded. In the subsection *Optimizing detection sensitivity: setting thresholds and minimum crossing times*, we shall show how the detection sensitivity of the method is optimized by choosing appropriate thresholds for each parameter. Application of the method to the study of secretory vesicle trajectories in endocrine BON cells is described in the subsection *Transient motions of secretory vesicles*, while in the final subsection, *Critical evaluation of the motion analysis method*, a number of tests are presented, validating the algorithm.

Definition of the motion-type classification parameters

Diffusion coefficient to detect stalled vesicles

Some periods of vesicle trajectories exhibited very limited mobility (vesicles typically moved less than 1 pixel ≈ 100 nm during 10 seconds). These periods of immobilization or stalling of the vesicles are defined by a diffusion coefficient lower than a value D_{min} which is close to the detection limit of our single particle tracking method, evaluated by measuring diffusion coefficients of fluorescent latex beads (200 nm diameter, labeled with fluorescein) immobilized on a coverslip. The laser intensity in these measurements was adapted to get a signal-to-noise ratio for the beads similar to that typically obtained for vesicles. Under these conditions, the MSD fit (see below) yielded an average diffusion coefficient of $0.1 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$. D_{min} was set to 10 times this detection limit, i.e. $D_{min} = 1 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Thus, the diffusion coefficient, D , is calculated along a trajectory using a rolling analysis window, and periods for which D drops below D_{min} are classified as stalled periods. To evaluate the diffusion coefficient for a given trajectory window, a regression line is fitted through the first N_f points of the MSD curve with each point weighted by the reciprocal of its relative variance V_{rel} , obtained from Eq. 5:

$$V_{rel}(n) = \frac{n(2n^2 + 1)}{N - n + 1}, \quad (6)$$

where N is the total number of particle positions in the considered period of trajectory. The diffusion coefficient D is calculated as $D = s/6$ with s being the slope of the linear fit. The choice of the number of MSD points used for the linear fit N_f has to take into account two aspects: (i) a precise measure of the diffusion coefficient requires a large N_f value, (ii) as the choice of N_f is related to the length of the analyzed segment of trajectory ($N_f \ll N$, see *Principles of the transient motion analysis*), detection of brief immobilization periods requires a short N_f value. To satisfy these two opposite criteria, N_f was set to 5 (which corresponds to a linear fit for $\Delta t < 0.5$ s under the experimental conditions used). We will discuss later how this N_f value governs the length of the minimal period used to measure diffusion coefficients (see *Calculation of the classification parameters along trajectories*). As a comparison, previous works measured diffusion coefficients of tracked single particles by analyzing only the first point of the MSD (16) or fitting a straight line through the first 2 to 20 points of the MSD curve (31,32).

MSD curvature to detect constrained motion

A downward curvature of the MSD is indicative of constrained motion. However, even for a particle undergoing pure Brownian motion, the MSD versus Δt can deviate from linearity. A quantitative analysis of the MSD shape is then required to distinguish between true constrained motion and simple diffusion. To quantify the MSD curvature, the relative deviation of the MSD curve from a linear fit of its first points is calculated as follows. A regression line is fitted through the first N_{diff} points of the MSD curve with each point weighted by the reciprocal of its relative variance $V_{rel}(n)$ given by Eq. 6. This regression line $\langle L^2(\Delta t) \rangle_{diff}$ is the expected average MSD for a particle undergoing simple diffusion. We introduce a parameter, Dev , which quantifies the difference between the MSD curve and the linear fit $\langle L^2(\Delta t) \rangle_{diff}$, averaged over the first N_{dev} points in the MSD:

$$Dev = \frac{1}{N_{dev}} \sum_{n=1}^{n=N_{dev}} [\langle L^2(n\delta t) \rangle - \langle L^2(n\delta t) \rangle_{diff}] / \langle L^2(n\delta t) \rangle_{diff} . \quad (7)$$

Negative or positive values of Dev reveal downward or upward curvatures, respectively, for the MSD curve.

The choice of the number N_{diff} of MSD points used for the linear fit $\langle L^2(\Delta t) \rangle_{diff}$ is governed by the same constraints as for the choice of N_f (see *Diffusion coefficient to detect stalled vesicles*). Consequently, N_{diff} was also set to 5. The second parameter that had to be defined was the number of points N_{dev} employed to quantify the MSD deviation from a straight line. To obtain a precise evaluation of this deviation, the ratio N_{dev}/N_{diff} should be large. We set it to 10, i.e. $N_{dev} = 50$ (which corresponds to an averaging for $\Delta t < 5$ s under the experimental conditions used). Kusumi *et al.* (28) quantified the MSD curvature in a similar manner. However, in that work, the deviation of the MSD curve from a linear fit to its first points was only evaluated at a single point. For our parameter Dev , the deviation is averaged along N_{dev} points to minimize the effect of MSD fluctuations. As a consequence, we could use shorter MSD curves, yet quantify their curvatures satisfactorily.

An alternative approach to detect constrained motion entails plotting the MSD vs. Δt on a log-log plot. A power law, $MSD(\Delta t) \propto (\Delta t)^\alpha$, with $\alpha < 1$ is indicative of constrained motion (33). Thus, on a logarithmic plot, the y-intercept yields the diffusion coefficient regardless of the value of the scaling exponent α which is obtained from the slope of the fit. However, errors on particle position measurements artificially reduce the value of α measured with this method at short times and can thus lead to the detection of artifactual sub-diffusion (34). More specifically, the quantity $2\sigma^2/6D$, where σ is the mean error in particle position detection, determines the time scale below which noise leads to artificial subdiffusion (34). For us, $2\sigma^2/6D \approx 2(\sqrt{3} \times 0.016 \mu\text{m})^2 / (6 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}) \approx 0.26$ s, with σ calculated from beads immobilized on the coverslip (which provides only a lower bound on σ). Under these conditions, Brownian motion will appear sub-diffusive at least up to $\Delta t \approx 3$ s (34). Since only the initial portion of the MSD can be used for analysis (a few seconds in our case), the use of this approach is not appropriate here. Moreover, it is especially difficult to determine an accurate scaling exponent for short tracks of about 100 points (34).

To test whether the limited accuracy of the vesicle localization procedure could also be problematic in our approach, we evaluated the parameter Dev for simulated 3D Brownian

trajectories with or without added noise. For positioning errors and diffusion coefficients similar to those measured for the vesicles ($\sigma \approx \sqrt{3} \times 16 \text{ nm} \approx 28 \text{ nm}$, $D \approx 2 \times 10^{-2} - 2 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$), the Dev values were not significantly modified by the presence of noise (data not shown) indicating that the use of this parameter would not lead to detection of artificial sub-diffusion.

The determination of a threshold value for the parameter Dev to distinguish between constrained and Brownian motion is not trivial and is discussed in the section *Optimizing detection sensitivity: setting thresholds and minimum crossing times*.

Asymmetry to detect directed motion

As discussed above, the analysis of the MSD curve is not well adapted for detection of directed motion because the typical duration of this type of motion is too short. Evaluation of trajectory asymmetry is a more efficient way to detect this kind of movement which is highly asymmetric. However, even a pure Brownian trajectory is not perfectly symmetric (35). As a consequence, asymmetry must be properly quantified to allow discrimination between random walk and directed motion (as discussed similarly for the MSD curvature). For this, an asymmetry parameter, slightly different from that of Saxton (30), is introduced. First, the 3D radius of gyration tensor \mathbf{R}_g is calculated:

$$\mathbf{R}_g(i, j) = \langle x_i x_j \rangle - \langle x_i \rangle \langle x_j \rangle, \quad (8)$$

where x_i 's and x_j 's are the three Cartesian axes and the average values are defined over all n

steps of the analyzed sub-trajectory e.g. $\langle x_i \rangle = (1/n) \sum_{k=1}^n x_{i,k}$. The gyration radii R_1 , R_2 and R_3 ,

which are the square roots of \mathbf{R}_g 's eigenvalues, are obtained by diagonalizing this tensor. The asymmetry is then quantified by the parameter:

$$Asym = -\log \left(1 - \frac{(R_1^2 - R_2^2)^2 + (R_1^2 - R_3^2)^2 + (R_2^2 - R_3^2)^2}{2(R_1^2 + R_2^2 + R_3^2)^2} \right). \quad (9)$$

High values of $Asym$ indicate a greater tendency for a preferred direction. For example, for a perfectly symmetric trajectory, $Asym = 0$ whereas, for a straight line, $Asym \rightarrow +\infty$. For simulated 3D Brownian trajectories $Asym$ rapidly converges to ≈ 0.242 for large N . Higher transient $Asym$ values may reveal periods of directed motion, but this behavior has to be distinguished from non-symmetric Brownian motion using appropriate statistical considerations. This will be presented in the section *Optimizing detection sensitivity: setting thresholds and minimum crossing times*.

Calculation of the classification parameters along trajectories

Using the three parameters described above, it is possible to define the type of motion associated with a given part of a vesicle trajectory. In order to highlight the different kinds of movement experienced by a given vesicle, each of these three parameters is calculated along its trajectory using a rolling window. Let us consider the asymmetry parameter as an example. The analysis window is defined by its central point position, as shown in Fig. 3. For a given position of the window (i.e. a given point on the trajectory), the $Asym$ parameter is calculated for various window widths ranging from W_{min} to W_{Max} . For the sake of simplicity in the definition of the window center, only windows with an odd number of points are considered.

Among these window widths, only the one maximizing $Asym$ is retained, corresponding to the highest probability of non-diffusive motion. This procedure is repeated point by point along a trajectory to obtain an $Asym$ vs. time profile as the one shown in Fig. 4 B. The parameter Dev and the diffusion coefficient, D , are calculated in a similar manner and plotted against time as shown in Fig. 4, C and D, except that the retained window widths are those minimizing these parameters.

How does one choose the minimum and maximum window widths, W_{min} and W_{Max} ? In order to account for the specificities of each motion category, different values of W_{min} and W_{Max} , were chosen for each parameter. General considerations were as follows. The minimum width, W_{min} has to be long enough for a reasonably accurate estimation of the parameter in question. Parameter estimation improves with increasing number of points used in the analysis window. However, the minimum window width must remain narrower than the minimum duration of the specific motion one is trying to detect. Thus W_{min} is chosen to provide an acceptable worst case precision in parameter estimation. The requirement that W_{min} be shorter than the shortest specific motion under consideration can only be rigorously verified *a posteriori* to the analysis. However, for very characteristic motion such as some of the directed motions seen in Video 1, one can have a rough idea on their minimum durations by manual detection of these. The choice of the maximum width, W_{Max} , on the other hand, is rather trivial: it can be made equal to the mean vesicle trajectory length so that it can match the longest possible duration of specific motions. However, if a given type of motion has lifetime much shorter than the observation time, W_{Max} can be set shorter to save computation time (this turns out to be the case for directed motions - see below). Thus, in order to choose the optimal minimum and maximum analysis window widths, one has to have some knowledge about the system under study. The best procedure to follow in order to optimize these parameters is then an iterative one. One takes a small pool of vesicle trajectories, and sets initial values for W_{min} and W_{Max} . Upon analysis of this "test" pool, one checks whether W_{min} is short enough to capture short specific motion, and whether a shorter W_{Max} can be used to save computation time.

Let us first consider the detection of stalled periods. This requires measurement of small diffusion coefficients along vesicle trajectories. The estimated relative error for the measured diffusion coefficient is given by the relation (29):

$$\frac{\Delta D}{D} \approx \left(\frac{2N_f}{3(W - N_f)} \right)^{1/2}, \quad (10)$$

where W is the window width and N_f is the number of MSD points used to evaluate the diffusion coefficient (see *Diffusion coefficient to detect stalled vesicles*). To have a relative error less than 25% and with $N_f = 5$ chosen above, a minimal value of 51 points was obtained for W from Eq. 10, i.e. $W_{min}^{stall} = 51$ (recall that the analysis window contains odd number of points). We chose $W_{Max}^{stall} = 301$ to match the mean duration of vesicle trajectories.

Secondly, constrained motion is detected using the parameter Dev (Eq. 7), calculated by averaging the deviation of the MSD curve from a straight line over its first $N_{dev} = 50$ points (see *MSD curvature to detect constrained motion*). However, the variance of the points of the MSD curve increases with increasing time interval Δt , thus the minimum number of points W_{min}^{const} to be used in the calculation of Dev should be larger than N_{dev} . We consider that the fraction of the MSD curve on which the deviation from linearity is evaluated should not

exceed the first $2N/3$ points of this curve, that is $2W_{\min}^{const} / 3 = N_{dev}$, or $W_{\min}^{const} = 75$ points. For the maximum window width, W_{Max}^{const} , a value of 301 points was chosen, identical to that used for the detection of stalled periods. As a comparison, previous works restricted their analyses to the first $N/3$ (31) or $N/2$ (17) points of the MSD curve to detect constrained motion, where N is the number of vesicle positions in the considered sub-trajectory (these would correspond to $W_{\min}^{const} = 150$ and 100, respectively).

Finally, for the *Asym* parameter, we observed that simulated Brownian trajectories shorter than 10 points (see Fig. 6 C, section *Optimizing detection sensitivity: setting thresholds and minimum crossing times*) gave artificially large asymmetry values. Therefore, it is assumed that the asymmetry estimation becomes relevant for window widths longer than $W_{\min}^{dir} = 11$ points. As for the maximum window width, we noticed that a large majority of the directed periods lasted less than 7 s (i.e. 70 points with an acquisition rate of 10 Hz) and thus a maximum window width W_{Max}^{dir} of 71 points was chosen to save computation time. We checked *a posteriori* that the mean lifetime of directed periods, $\tau_{dir} \approx 2$ s (20 points), is much shorter than W_{Max}^{dir} , and sufficiently longer than W_{\min}^{dir} .

Using this procedure, asymmetry, MSD curvature and diffusion coefficient profiles are calculated along a given trajectory (Fig. 4). By thresholding these profiles, periods of a trajectory exhibiting different motion behaviors are highlighted. The choice of the thresholds is the subject of the next subsection.

Optimizing detection sensitivity: setting thresholds and minimum crossing times

Because random walks can temporarily mimic stalled, constrained or directed periods, the diffusion coefficient, MSD curvature and asymmetry profiles measured along a pure Brownian trajectory will exhibit peaks or troughs, as illustrated in Fig. 5. Amplitudes and durations of these fluctuations are usually smaller and shorter than the ones associated with real non-Brownian transient motion (cf. Fig. 4). In consequence, definition of a threshold value and a minimal duration above or below this threshold (i.e. a minimum crossing time) for each profile would suppress the detection of these apparent non-random behaviors without excluding real stalled, constrained or directed periods.

How does one choose the thresholds and the minimum crossing times? In general, the thresholds are chosen such that a purely Brownian trajectory would have negligible probability of crossing them for more than a few consecutive points. These probabilities, in turn, are obtained from analysis of a large number of computer-generated 3D Brownian trajectories. The only exception to this rule is the choice of a threshold, D_{min} , for detecting stalled periods, which is imposed by our detection limit. In fact, $D_{min} = 1 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ has already been set in the section *Definition of the motion-type classification parameters*. In addition, a minimum crossing time of 3 consecutive points (i.e. 0.3 s with a 10 Hz acquisition rate) was chosen for the detection of stalled vesicles. It was checked *a posteriori* that under these conditions, the probability of detecting a stalled period for a simulated Brownian trajectory with a diffusion coefficient equal to the mean diffusion coefficient of the vesicles in the diffusive class (i.e. $\approx 2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, Table 2, section *Transient motions of secretory vesicles*) is less than 1%.

Concerning constrained and directed periods, it was first verified whether a unique threshold for each is sufficient to distinguish real non-Brownian behaviors from fluctuations of diffusive motion. Indeed, as the windows defined to evaluate each parameter along a given trajectory have variable widths, the use of a unique threshold supposes that the statistical properties of the asymmetry ($Asym$) and the MSD curvature (Dev) parameters do not depend on trajectory lengths, N . It turns out that for $Asym$, the use of an N -independent threshold is justified, provided $N > 10$ points. Setting an N -independent threshold on the Dev parameter, however, was not possible and defining a new classification parameter was required.

To see the trajectory-length dependence of the thresholds set on Dev and $Asym$, a large number of 3D Brownian trajectories containing N points were simulated, and N was varied. Histograms of the number of simulated tracks versus $Asym$ and Dev were obtained for various N values. Fig. 6 A shows some sample histograms for the Dev parameter. For each histogram, we evaluated (at fixed N) the threshold, $Dev_{0.99}$, defined such that 99% of the simulated trajectories exhibited higher Dev values (Fig. 6 A). A similar threshold was defined for the $Asym$ parameter, $Asym_{0.99}$, for which 99% of the simulated trajectories had $Asym$ values lower than $Asym_{0.99}$. The N -dependence of these thresholds, obtained from histograms for different N , are shown in Fig. 6 B and C. We verified that the plots of $Asym_{0.99}$ and $Dev_{0.99}$ as a function of N did not depend on the diffusion coefficient used for simulated trajectories (data not shown). Fig. 6 B shows that $Dev_{0.99}$ increases as a function of N . This increase is well described by:

$$Dev_{0.99}(N) = -0.22(\log(N))^2 + 1.40\log(N) - 2.40 . \quad (11)$$

Actually, the increase of $Dev_{0.99}$ with increasing N could have been anticipated from Eq. 5. Consequently, $Dev_{0.99}$ cannot be used as a unique threshold to detect constrained motion from the Dev profile. Thus, rather than analyzing Dev variations, we use the residual deviation of the MSD from linearity, $Dev_r = Dev - Dev_{0.99}(W)$, with W the window width which minimizes Dev . By definition, statistical properties of Dev_r are independent of the window width and thus a unique threshold can be used to detect constrained periods on the Dev_r profile. Regarding the asymmetry parameter, $Asym_{0.99}$ drops rapidly to a plateau for trajectories lasting more than 10-15 points (Fig. 6 C). As a consequence, directed motion periods can be detected from $Asym$ profiles using a unique threshold, provided the analysis window is larger than about 10 points (c.f. the minimum analysis window width is 11 points for the $Asym$ -profile calculation, see the previous subsection).

In order to define thresholds and minimum crossing times, the motion analysis method was applied to simulated 3D Brownian trajectories. The effect of different thresholds and minimal durations on the detection of confined and directed behaviors for simulated random motion was examined (Fig. 7). To select the most appropriate thresholds and minimal durations, we also took into account the fact that transient constrained vesicular motions tend to be quite long (about 200 points i.e. 20 s with an acquisition rate of 10 Hz) whereas temporary directed motions are usually short (about 20 points). Under these conditions, the following settings were chosen:

(i) Concerning the MSD curvature parameter, Dev_r , we chose a threshold level of -0.01 and a minimal duration of 20 consecutive points (2 s) below this threshold. 7% of the simulated random walks exhibited at least one period of constrained motion with this set of limit values.

(ii) Regarding the asymmetry parameter $Asym$, we chose a threshold level of 1.00 and a minimal duration of 10 points (1 s) above this threshold. 1% of the simulated random walks displayed at least one period of directed motion with this set of limit values.

Let us now see how one detects transient motion periods applying the above thresholds to $Asym$, Dev_r , and D profiles. Taking the example of the asymmetry parameter, the position of a directed motion period is located in the following manner. The first and the last points P_i and P_f of a segment of the asymmetry profile larger than the threshold are first determined. As previously described, each of these points is associated with a window, Win_i and Win_f , respectively. The beginning of window Win_i and the end of window Win_f together define the position of the directed motion period. Applying the same procedure to Dev_r and diffusion coefficient profiles, periods of constrained motion and of immobilization are detected. Periods of trajectory which remain unclassified correspond to simple diffusion. A sample vesicle trajectory is analyzed this way in Fig. 8.

To validate the set of thresholds and minimum crossing times chosen, the motion analysis method was applied to trajectories of 475 nm diameter fluorescent beads immersed in a glycerol-water mixture (see MATERIALS AND METHODS). About 7% of the diffusive bead trajectories exhibited at least one constrained and about 7% at least one directed period, as detected using the settings above. The higher proportion of apparent directed motions in the case of bead trajectories as compared to simulated ones is probably due to the proximity of the glass coverslip which induces an intrinsic asymmetry as evidenced by the significant differences observed between the lateral (D_{xy}) and the normal (D_z) diffusion coefficients.

The thresholds and minimal durations defined above imply that the study of transient directed or constrained movements exhibited by the vesicles will be relevant only if the proportion of trajectories exhibiting these kinds of behaviors is significantly higher than the false-positive percentage of 7%.

Transient motions of secretory vesicles

The motion analysis method was applied to the study of secretory vesicle dynamics in the subplasmalemmal region of endocrine BON cells. Individual vesicles were clearly visualized by TIRF microscopy in cells expressing a NPY-GFP chimera in a stable manner. Due to the large size of these vesicles (diameters of about 250-300 nm have been deduced from electron micrographs by Parekh *et al.* (36)), TIRFM images exhibited a high signal to noise ratio under conditions minimizing photobleaching. Video 1 shows that vesicles experience different motion types such as directed movement or nearly complete immobilization. In addition, the behavior of a significant fraction of the vesicles appears complex, that is vesicles switch from one motion type to another.

Using the techniques described here, 3D trajectories of 358 vesicles from 4 cells were obtained and analyzed. Fig. 8 shows a sample trajectory which exhibited a directed motion period followed by a constrained motion one. The MSD curve calculated for the entire trajectory is almost linear, as shown in Figure 8B. As a consequence, this trajectory would have been considered as diffusive if it were analyzed globally. Complex trajectories were very common: about 50% of the trajectories contained at least one motion-type transition, justifying the investment in the development of tools to detect and analyze them. In addition, we found that 30% and 50% of the vesicle trajectories exhibited at least one period of constrained or directed movement, respectively. These proportions are significantly higher than the false-positive percentage of 7% obtained for fluorescent beads undergoing Brownian motion. Consequently, the characterization of detected non-random transient behaviors is

considered relevant. Table 1 shows the proportion of detected transient periods for each class. The proportions of time spent in each class are also displayed.

Once the detection and classification of transient periods of motion is achieved, obtaining the characteristics of each motion class is rather simple. For example, if a sub-trajectory is classified as diffusive, the associated diffusion coefficient D is derived from the linear fit of the MSD as described above. For directed motion, the MSD follows (33)

$$MSD(\Delta t) = v^2 \Delta t^2 + 6D_{ves}^{dir} \Delta t + c_1, \quad (12)$$

where v is a transport velocity, and c_1 is a numerical constant corresponding to the apparent displacement created by the limited accuracy of the vesicle localization procedure. Thus, fitting equation 12 to the MSD of a directed sub-trajectory, one obtains the transport velocity v and the diffusion coefficient D_{ves}^{dir} (however, due to our limited time resolution, diffusion coefficients obtained this way are not very accurate; $D_{ves}^{dir} = 60 \pm 55.10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$). Finally, constrained motion is analyzed considering diffusion restricted to a limited area which itself can diffuse. The MSD for this case obeys (14)

$$MSD(\Delta t) = R^2 (1 - a_1 \exp(-6a_2 D_{ves}^{const} \Delta t / R^2)) + 6D_{cage} \Delta t + c_2, \quad (13)$$

where $a_1 = 0.99$ and $a_2 = 0.85$, R is the “radius” of the cage (this radius corresponds either to the size of the space remaining between a vesicle and its cage or to the length of the “leash” holding the vesicle), D_{cage} and D_{ves}^{const} are the diffusion coefficients of the cage and of the vesicle inside the cage, respectively. The numerical constant c_2 is due to the limited accuracy of the tracking technique. These characteristics are summarized in Table 2 along with the average duration of each class.

From a biological point of view, perhaps the most important utility of our approach is that it allows the study of transitions from one motion type to another. Such transitions in normal cells at rest and how they are modified under stimulation of exocytosis and/or in the presence of drugs altering cytoskeletal organization is expected to reveal underlying mechanisms of vesicle motion. Here, we only report data on cells at rest. Nevertheless, the results are quite unexpected and with a few reasonable assumptions, suggest an interesting picture of the dynamic organization of the subplasmalemma. A full analysis of motion transitions under various conditions will be presented in a future article.

For the analysis of motion transitions, the stalled and the constrained periods were gathered in the same category. This was motivated by two related considerations. First, the mean cage diffusion coefficient for constrained motion, D_{cage} , nearly matched the limit value used to define the stalled periods, D_{min} . This suggests that a stalled period may actually correspond to constrained motion for which we can only measure the displacements of the cage and cannot resolve the motions of the vesicle inside. The “radii” of such cages should be smaller than the spatial resolution of our tracking technique i.e. smaller than $\sqrt{3} * 16 \approx 30 \text{ nm}$. Second, sometimes conflicts arose in the classification of constrained and stalled periods. This most often involved a stretch that could be classified either as stalled ($D < D_{min}$) or constrained ($Dev < Dev_{r,min}$) found in a constrained sub-trajectory. Actually, such conflicts are not surprising given that cages move with a diffusion coefficient that is close to our detection limit ($D_{cage} \approx D_{min}$). Such sub-trajectories were classified as constrained. Thus, given our resolution, keeping the two categories separate is not justified. In addition,

gathering the two classes into one simplifies the analysis. The proportion of time spent by vesicles in this combined class is 44% with mean duration 16 ± 2 s.

The first finding concerning the transitions was their reversibility. That is, the number of transitions from one class to another was similar in either direction. Secondly, we found that most of the transitions occurred between diffusive and directed periods (at a rate of $(32 \pm 11) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 53% of all transitions) or diffusive and constrained/stalled periods (rate = $(24 \pm 2) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 41% of all transitions). Transitions between directed and constrained/stalled periods were rare (rate = $(4 \pm 2) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 6% of all transitions).

Critical evaluation of the motion analysis method

In order to validate the motion analysis method for the detection and characterization of different motion types exhibited by the vesicles, a number of tests were run. First, the ability of the method to detect transitions occurring in simulated trajectories was tested. For this, the algorithm was applied to simulated 3D Brownian trajectories into which a transient non-diffusive period (directed, constrained, or stalled) was inserted at a random position. Such transitions (between diffusive and non-diffusive motion) account for more than 90% of all the observed transitions for the vesicles. The characteristics of the different motion types used in these simulations were the same as those obtained for the vesicles (Table 2). At each position of a simulated trajectory, typical noise was added. Using the analysis method, first the probability of detecting a given transition was evaluated. A transition from a diffusive to a non-diffusive period was detected for more than 98% of the simulated trajectories. The precision and accuracy in locating a transition (Table 3) and the motion characteristics before and after this transition were also calculated (Table 4). Overall, the precision in detecting transitions and characterizing the transient motion parameters is satisfactory. A negative detection lag indicates that there is a tendency to include a short stretch of diffusive motion in the non-diffusive transient periods.

Using simulated transitions, we also estimated the maximum cage “radius” R and the minimum velocity v for which the detection of constrained and directed motions, respectively, becomes less efficient. Thus, keeping the period duration and the diffusion coefficient inside the cage, D_{ves}^{const} , and that of the cage, D_{cage} , as fixed parameters (using the average values obtained for vesicles), and varying the cage radius, we have found that the probability of detecting a constrained period drops below 0.80 for $R > 145$ nm and below 0.50 for $R > 190$ nm. Similarly, the probability of detecting a directed period is below 0.80 for $v < 0.45$ $\mu\text{m/s}$ and below 0.50 for $v < 0.35$ $\mu\text{m/s}$ (keeping the period duration and D_{ves}^{dir} fixed). The mean cage radius ($R_{cage} = 69 \pm 10$ nm) and the transport velocity ($v = 0.64 \pm 0.18$ $\mu\text{m/s}$) measured for the vesicles are well below and above these detection limits, respectively (Table 2).

Another important question is the influence of the anisotropy inherent in the TIRFM detection on the results. For this, the resolution anisotropy, Γ , was studied as a function of S/N (see MATERIALS AND METHODS). Figure 2 shows that Γ decreases slightly for increasing S/N, from ~ 1.2 (for $S/N \approx 7$) to ~ 0.7 ($S/N \approx 19$). The effect of the resolution anisotropy is expected to be most critical in the detection of directed periods of motion, since this uses the *Asym* parameter. Thus, directed trajectories were simulated by taking into

account resolution anisotropy at its extreme values. The detection of directed periods flanked by diffusive stretches were not significantly affected for $\Gamma = 0.7, 1, \text{ or } 1.2$.

Also related to the TIRFM method, what is the effect of the 15% error in the determination of the evanescence depth, δ , on our measurements? To assess this, a pool of 30 vesicles chosen at random was analyzed using $\delta = 170, 200 \text{ and } 230 \text{ nm}$. The differences in the results in all cases were negligible compared to statistical variations measured at $\delta = 200 \text{ nm}$ (Table 2), the biggest variation being on the calculation of the diffusion coefficients of the constrained vesicles ($\pm 20\%$ at $\delta = 170 \text{ and } 230$, compared to $\delta = 200 \text{ nm}$).

Finally, let us mention some difficulties with the method. Although the optimization of the rolling window width leads to efficient detection of constrained and directed periods, often short adjacent stretches of other motion types (typically Brownian) are counted in these periods, as well. Thus, a manual verification and correction on the durations of directed and constrained periods is often required. Another minor difficulty concerns short artifactual diffusive periods generated by default whenever a stretch cannot be classified into one of the non-diffusive categories. Two processes contribute to this. Firstly, because window widths cannot be increased to W_{Max} , parameter optimization and, consequently, detection of non-diffusive behaviors is less efficient at the beginnings and the ends of trajectories. This implies that trajectory extremities (typically less than 5 points for each) are sometimes erroneously classified as diffusive. Secondly, since the worst precision in locating a motion-type transition is $\sim 1.5 \text{ s}$ (15 points, see Table 3), shorter periods may artifactually be classified as diffusive. To overcome both effects, diffusive periods lasting less than 1.5 s were discarded.

DISCUSSION

Efficient methods have been developed for the description of complex movements such as those of membrane proteins (8,9), sub-chromosomal foci (37) or cells during morphogenesis (38). However, these methods were designed to identify only a particular transient behavior such as confinement or directed motion. In order to analyze in an exhaustive way complex 3D trajectories, we have developed a method based on the determination of the profiles of three different classification parameters along these trajectories. Each parameter is used to distinguish a particular deviation from diffusive motion: the diffusion coefficient, the MSD curvature and the trajectory asymmetry allow one to identify stalled periods, constrained and directed motions, respectively. To detect efficiently transients of various durations, these three parameters are calculated along the trajectory using a rolling analysis window with a variable width. Finally, thresholding of the parameter profiles allows discrimination of true non-diffusive transient behaviors from statistical fluctuations of Brownian motion. Although this method has been developed for analysis of secretory vesicle trajectories, it is quite general and should be applicable to many other trajectories encountered in biology with minor modifications.

The motion analysis method presented here was applied to the study of secretory vesicle dynamics in the subplasmalemmal region of endocrine BON cells. Using TIRF microscopy, timelapse sequences of BON cells whose secretory vesicles were labeled by NPY-GFP were obtained. From these sequences, we determined 3D vesicle trajectories by combining single particle tracking to obtain displacements in the observation plane (x, y) and intensity measurements to quantify movements in the z -direction. Many recent works in the area of

vesicle dynamics restricted their analyses to lateral (x, y) vesicle displacements (39-42). However, several authors (15,16) showed that the characteristics of the movements changed when the vesicles approached the plasma membrane, probably due to the modification of the vesicle environment. Consequently, study of 3D trajectories should be important to understand the dynamic organization of the subplasmalemmal region.

Before discussing the results obtained for secretory vesicle dynamics in BON cells, let us first mention some of the limitations of our method for detecting and characterizing transient behavior. First, boundaries between the four considered classes of motion are not clear-cut and thus the classification of a vesicle sub-trajectory is based on statistical considerations. However, the chosen criteria are sufficiently stringent to efficiently discriminate non-Brownian behavior from diffusive motion. For example, a given sub-trajectory classified as constrained, has less than 1% probability to exhibit Brownian motion (derived from the histograms of the number of simulated random trajectories versus Dev). In addition, except for the constrained and stalled classes (see below), conflicts in the classification of motion periods were never observed. The fact that conflicting classifications do not arise between constrained and directed periods indicates that constrained vesicles explore space within cages of low asymmetry.

Another possible drawback of the method concerns the analysis of the diffusive motion class. Periods not classified as constrained, stalled or directed are classified as diffusive by default. The question arises then as to the efficiency of detecting constrained periods when the cage radius exceeds a critical size, or detecting directed periods when the velocity is below a critical value. Using simulated transitions, these critical values were obtained. The critical radius (~ 190 nm) is well above the mean experimental cage radius (69 ± 10 nm) and the critical velocity (~ 0.35 $\mu\text{m/s}$) is well below the mean velocity of vesicles in directed periods (0.64 ± 0.18 $\mu\text{m/s}$). These suggest that a large majority of the constrained and directed periods of vesicle trajectories can be detected efficiently with our method, in this system.

Finally, one must be careful in using the asymmetry of a trajectory in making a motion-type classification using TIRFM since the detection volume in this method is itself highly asymmetric. That is, for vesicles exploring a volume larger than this detection volume, only a “slice” of their trajectories would be detected. In this case, even an isotropic trajectory would appear asymmetrical. Fortunately however, the great majority ($\sim 85\%$) of the vesicles moved less than about their own diameter and remained within the detection volume. Most of the exceptions were the vesicles which moved in a directed manner, usually traveling several vesicle diameters. Such vesicles were successfully classified into the directed class. However, for these vesicles we typically observed different motion characteristics in the x - y plane vs. the z -axis (data not shown). This may be due to the fact that the TIRFM is biased to detecting vesicles moving in the x - y plane. However, it is not clear how much our results are influenced by this artifact, because the subplasmalemmal region itself is inherently asymmetric.

Bearing these qualifications in mind, analysis of 3D trajectories using our method provided a detailed overview of secretory vesicle dynamics in BON cells at rest. Complex trajectories with motion transitions were observed frequently: about half of the tracked vesicles exhibited such changes within their trajectories, typically lasting 20-30 s. This suggests that, at least in this cells line, secretory vesicles can switch from one local environment to another or modify the interactions they develop with their neighborhood quite frequently. If one could track vesicles over sufficiently long periods of time and with high

enough temporal resolution, it is expected that such changes in motion type should be observed for *any vesicle in any kind of cell*.

Another interesting novel finding is that the proportion of directed motions is clearly not negligible in this work (~50% of vesicle trajectories exhibited at least one period of directed motion), in contrast to many previous studies (14,16,31). Although this may be a specific feature of BON cells, directed periods generally tend to be short in other cell types, as well (a few seconds in chromaffin cells, (14,15)); hence short stretches of directed periods would easily be missed by global approaches characterizing vesicle dynamics over entire trajectories, or using slow acquisition rates.

Perhaps the main usefulness of our approach in terms of information one can extract about biological mechanisms underlying the dynamics of the subplasmalemma is contained in the transition probabilities from one motion type to another. Clearly, without a method to detect and characterize transient motion periods, one simply cannot access such information. For the analysis of transitions, we pooled the constrained and stalled periods together, since the cage diffusion coefficients that we could measure for the constrained class were close to our detection limit ($D_{cage} \approx D_{min}$), leading to some conflicts in the classification (a stalled period within a constrained sub-trajectory). It may very well be that the two classes are actually one and that due to the limits of our spatio-temporal resolution we detect periods of a vesicle moving in a small and slowly moving cage as stalled. Thus we have analyzed transitions between three classes of motion: Brownian (B), constrained or stalled (C), and directed (D). We have found that transitions between these classes are largely reversible, i.e. they occur at about the same rate in both directions between any two classes. Since we looked at cells at rest, it is expected that the number of vesicles in each category be roughly conserved, that is the cell is at some steady state. Obviously, reversible transitions can lead to a steady state. However, there are other ways a steady state can be sustained, for example involving only circular *irreversible* transitions (e.g. $B \rightarrow C$, $C \rightarrow D$, $D \rightarrow B$), thus reversibility was not *a priori* expected and it is an important finding on its own.

Another important, and perhaps more surprising finding is that transition probabilities between pairs of classes are quite different. Thus, we have found that most transitions involve the Brownian and the directed classes ($B \xleftrightarrow{C} D$, 53%), while transitions between the Brownian and the constrained/stalled class are also significant ($B \xleftrightarrow{C} C$, 41%). Most interestingly, transitions between the directed and the constrained/stalled class are virtually "prohibited" ($C \xleftrightarrow{D} D$, only 6%).

What is the usefulness of studying transitions between different transient motion periods? Combined with reasonable assumptions on the origin of the different motion types, the transition probabilities immediately suggest a dynamic picture of the subplasmalemmal region. Now, what are the mechanisms leading to the three different motion types? Let us first consider directed motions. Previous works using TIRFM suggest that directed motion periods reflect displacements driven by molecular motors along microtubule tracks (17,43). The average transport velocity we have measured for such movements (~0.6 $\mu\text{m/s}$) is consistent with this picture (17,43). As for constrained/stalled periods, direct observations of single vesicle dynamics in chromaffin cells at rest or under stimulation (44,45), and in BON cells in our laboratory (S. Tran, E. Karatekin, S. Huet, I. Fanget, S. Cribier and J.-P. Henry, unpublished results) showed that the mobility of a vesicle may drop significantly upon arrival

to the cell membrane, leading, in many cases, to nearly complete immobilization. Thus, the constrained/stalled periods of motion would correspond to vesicles that are tethered or docked onto the plasma membrane. Finally, the diffusive class may be associated with the highly dynamical actin network. It has been demonstrated that vesicles can physically link actin filaments (39), and that a dramatic decrease in vesicle mobility can be induced by blocking the actin cortex remodeling (31). Thus, we suggest that the vesicles exhibiting Brownian motion may correspond to vesicles physically linked to and following the dynamics of these filaments. Given these -certainly oversimplified- assumptions on the origin of the different motion types, the transition probabilities suggest the following picture. Vesicles can explore large distances over short periods of time near the cell membrane *via* transport over microtubule tracks. These vesicles can rather easily switch to the actin network and back onto the microtubules. However, they *cannot* tether/dock onto the cell membrane directly from microtubule tracks: transitions between microtubule-bound and cell membrane-bound vesicles must be mediated by the actin network. This picture is consistent with the classical model of cooperation between microtubule-dependent transport and actin-cortex-dependent capture of secretory vesicles (4,46). We are now in the process of testing the origins of the different motion classes to see if the above picture is correct. It would be very interesting to see how the transition probabilities are modified under stimulation of exocytosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to C.M. Townsend for providing the human carcinoid BON cell line and to W. Almers for providing the NPY-GFP construct. We thank B. O'Shaughnessy, B. Gasnier, N. Biais and F. Darchen for a critical reading of the manuscript. We also thank the referees and the editor for their useful comments on the original version of this manuscript.

S.H. was supported by the Direction Générale de l'Armement and V.S.T. was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et des Nouvelles Technologies. This work was supported by the CNRS, by the U. Paris 7 – D.-Diderot and by a grant from the Direction Générale de l'Armement.

REFERENCES

1. Croxall, J. P., J. R. Silk, R. A. Phillips, V. Afanasyev, and D. R. Briggs. 2005. Global circumnavigations: tracking year-round ranges of nonbreeding albatrosses. *Science* 307:249-250.
2. Wolf, H. and R. Wehner. 2000. Pinpointing food sources: olfactory and anemotactic orientation in desert ants, *Cataglyphis fortis*. *J. Exp. Biol.* 203:857-868.
3. O'Rourke, N. A., M. E. Dailey, S. J. Smith, and S. K. McConnell. 1992. Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258:299-302.
4. Wu, X., B. Bowers, K. Rao, Q. Wei, and J. A. r. Hammer. 1998. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function *In vivo*. *J. Cell Biol.* 143:1899-1918.
5. Choquet, D. and A. Triller. 2003. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat. Rev. Neurosci.* 4:251-265.
6. Shreiber, D. I., V. H. Barocas, and R. T. Tranquillo. 2003. Temporal variations in cell migration and traction during fibroblast-mediated gel compaction. *Biophys. J.* 84:4102-4114.
7. Zaliapin, I., I. Semenova, A. Kashina, and V. Rodionov. 2005. Multiscale trend analysis of microtubule transport in melanophores. *Biophys. J.* 88:4008-4016.
8. Simson, R., E. D. Sheets, and K. Jacobson. 1995. Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys. J.* 69:989-993.
9. Fujiwara, T., K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, and A. Kusumi. 2002. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J. Cell Biol.* 157:1071-1081.
10. Evers, B. M., C. M. Townsend, Jr., J. R. Upp, E. Allen, S. C. Hurlbut, S. W. Kim, S. Rajaraman, P. Singh, J. C. Reubi, and J. C. Thompson. 1991. Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology* 101:303-311.
11. Axelrod, D. 2001. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* 2:764-774.
12. Steyer, J. A. and W. Almers. 2001. A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:268-275.
13. Oheim, M., D. Loerke, W. Stuhmer, and R. H. Chow. 1998. The last few milliseconds in the life of a secretory granule. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Eur. Biophys. J.* 27:83-98.

14. Steyer, J. A. and W. Almers. 1999. Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 76:2262-2271.
15. Oheim, M. and W. Stuhmer. 2000. Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys. J.* 29:67-89.
16. Johns, L. M., E. S. Levitan, E. A. Shelden, R. W. Holz, and D. Axelrod. 2001. Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *J. Cell Biol.* 153:177-190.
17. Manneville, J. B., S. Etienne-Manneville, P. Skehel, T. Carter, D. Ogden, and M. Ferenczi. 2003. Interaction of the actin cytoskeleton with microtubules regulates secretory organelle movement near the plasma membrane in human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 116:3927-3938.
18. Nakata, T. and N. Hirokawa. 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.
19. Olveczky, B. P., N. Periasamy, and A. S. Verkman. 1997. Mapping fluorophore distributions in three dimensions by quantitative multiple angle-total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 73:2836-2847.
20. Bereiter-Hahn, J., C. H. Fox, and B. Thorell. 1979. Quantitative reflection contrast microscopy of living cells. *J. Cell Biol.* 82:767-779.
21. Lanni, F., A. S. Waggoner, and D. L. Taylor. 1985. Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 100:1091-1102.
22. Lang, T., I. Wacker, J. Steyer, C. Kaether, I. Wunderlich, T. Soldati, H. H. Gerdes, and W. Almers. 1997. Ca²⁺-triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy. *Neuron* 18:857-863.
23. Cheezum, M. K., W. F. Walker, and W. H. Guilford. 2001. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys. J.* 81:2378-2388.
24. Zenisek, D., J. A. Steyer, M. E. Feldman, and W. Almers. 2002. A membrane marker leaves synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells. *Neuron* 35:1085-1097.
25. Brenner, H. 1961. The slow motion of a sphere through a viscous fluid towards a plane surface. *Chem. Eng. Sci.* 16:242-251.
26. Goldman, A. J., R. G. Cox, and H. Brenner. 1967. Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall-1 Motion through a quiescent fluid. *Chem. Eng. Sci.* 22:637-651.

27. Banerjee, A. and K. D. Kihm. 2005. Experimental verification of near-wall hindered diffusion for the Brownian motion of nanoparticles using evanescent wave microscopy. *Physical Review E* 72. 042101
28. Kusumi, A., Y. Sako, and M. Yamamoto. 1993. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.* 65:2021-2040.
29. Qian, H., M. P. Sheetz, and E. L. Elson. 1991. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys. J.* 60:910-921.
30. Saxton, M. J. 1993. Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion. *Biophys. J.* 64:1766-1780.
31. Lang, T., I. Wacker, I. Wunderlich, A. Rohrbach, G. Giese, T. Soldati, and W. Almers. 2000. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys. J.* 78:2863-2877.
32. Dumas, F., N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean, and L. Salome. 2003. Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. *Biophys. J.* 84:356-366.
33. Saxton, M. J. and K. Jacobson. 1997. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:373-399.
34. Martin, D. S., M. B. Forstner, and J. A. Kas. 2002. Apparent subdiffusion inherent to single particle tracking. *Biophys. J.* 83:2109-2117.
35. Rudnick, J. and G. Gaspari. 1987. The shapes of random walks. *Science* 237:384-389.
36. Parekh, D., J. Ishizuka, C. M. Townsend, Jr., B. Haber, R. D. Beauchamp, G. Karp, S. W. Kim, S. Rajaraman, G. Greeley, Jr., and J. C. Thompson. 1994. Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas* 9:83-90.
37. Bornfleth, H., P. Edelmann, D. Zink, T. Cremer, and C. Cremer. 1999. Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy. *Biophys. J.* 77:2871-2886.
38. Doolittle, K. W., I. Reddy, and J. G. McNally. 1995. 3D analysis of cell movement during normal and myosin-II-null cell morphogenesis in dictyostelium. *Dev. Biol.* 167:118-129.
39. Desnos, C., J. S. Schonn, S. Huet, V. S. Tran, A. El-Amraoui, G. Raposo, I. Fanget, C. Chapuis, G. Menasche, G. De Saint Basile, C. Petit, S. Cribier, J. P. Henry, and F. Darchen. 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.

40. Duncan, R. R., J. Greaves, U. K. Wiegand, I. Matskevich, G. Bodammer, D. K. Apps, M. J. Shipston, and R. H. Chow. 2003. Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature* 422:176-180.
41. Tsuboi, T., G. DaSilva Xavier, I. Leclerc, and G. A. Rutter. 2003. 5' AMP-activated protein kinase controls insulin-containing secretory vesicle dynamics. *J. Biol. Chem.* 278:52042-52051
42. Ohara-Imaizumi, M., C. Nishiwaki, T. Kikuta, S. Nagai, Y. Nakamichi, and S. Nagamatsu. 2004. TIRF imaging of docking and fusion of single insulin granule motion in primary rat pancreatic beta-cells: different behaviour of granule motion between normal and Goto-Kakizaki diabetic rat beta-cells. *Biochem. J.* 381:13-18.
43. Varadi, A., E. K. Ainscow, V. J. Allan, and G. A. Rutter. 2002. Involvement of conventional kinesin in glucose-stimulated secretory granule movements and exocytosis in clonal pancreatic beta-cells. *J. Cell Sci.* 115:4177-4189.
44. Steyer, J. A., H. Horstmann, and W. Almers. 1997. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388:474-478.
45. Oheim, M. and W. Stuhmer. 2000. Interaction of secretory organelles with the membrane. *J. Membr. Biol.* 178:163-173.
46. Rudolf, R., T. Salm, A. Rustom, and H. H. Gerdes. 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.

Motion class	Proportion of periods	Proportion of time
Stalled	9 ± 5 %	8 ± 4 %
Constrained	16 ± 4 %	35 ± 8 %
Directed	35 ± 6 %	8 ± 2 %
Diffusive	40 ± 2 %	49 ± 9 %
Total	794 periods	7162 s

Table 1. Proportions of detected transient periods for each of the four motion classes and proportions of time spent in each class for the secretory vesicle trajectories. Values are given as mean ± SD.

Motion class	Characteristics	
Stalled	Mean duration	8.5 ± 0.3 s
Constrained	Mean duration	20 ± 2.1 s
	Cage 'radius' R	69 ± 10 nm
	Vesicular diffusion coefficient D_{ves}^{const}	$37 \pm 14 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$
	Cage diffusion coefficient D_{cage}	$2.3 \pm 0.8 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$
Directed	Mean duration	2 ± 0.2 s
	Transport velocity v	$0.64 \pm 0.18 \mu\text{m}/\text{s}$
Diffusive	Mean duration	10.3 ± 0.6 s
	Diffusion coefficient D	$22 \pm 8 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$

Table 2. Characteristics of the four motion classes exhibited by secretory vesicles. Values are given as mean \pm SD.

Transition type	Detection lag
Diffusive→ stalled	-0.5 ± 0.8 s
Diffusive→ constrained	-1.2 ± 1.7 s
Diffusive→ directed	-0.1 ± 0.2 s

Table 3. Time lags between actual (simulated) and detected transitions. A negative time lag indicates that detection preceded the actual transition. Values are given as mean \pm SD.

Motion class	Characteristics	Simulated value	Measured value
Stalled	Mean duration	9 s	10 ± 1 s
Constrained	Mean duration	20 s	23 ± 3 s
	Cage ‘radius’ R	70 nm	72 ± 9 nm
	Vesicular diffusion coefficient D_{ves}^{const}	$35 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$	$34 \pm 14 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$
	Cage diffusion coefficient D_{cage}	$2 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$	$1.9 \pm 1.1 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$
Directed	Mean duration	2 s	2.1 ± 0.3 s
	Transport velocity v	$0.65 \mu\text{m}/\text{s}$	$0.62 \pm 0.09 \mu\text{m}/\text{s}$
Diffusive	Diffusion coefficient D	$20 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$	$22 \pm 8 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$

Table 4. Comparison between actual characteristics of motion (fed as input to simulated trajectories) and those evaluated with the motion analysis method, after detection of a simulated motion-type transition (Table 3). Values are given as mean \pm SD.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic setup of the TIRF microscope. A translation of the mirror modifies the evanescence depth without changing the illuminated area at the glass/cell interface.

Figure 2. Resolution anisotropy, $\Gamma = 2\sigma_z / (\sigma_x + \sigma_y)$, versus S/N for fluorescent beads and vesicles (see text).

Figure 3. Measurement of the asymmetry parameter $Asym$ along a vesicle trajectory. To estimate $Asym$ for a given point of the trajectory (indicated by the arrow head), this parameter was calculated for various window widths (marked in bold) centered on the point of interest. Only the window width which maximized $Asym$ value was retained (boxed). The asymmetry profile was obtained by repeating this procedure point by point along the trajectory (see Fig. 4).

Figure 4. Profiles of the three motion classification parameters calculated for a sample vesicle trajectory. (A) Analyzed vesicle trajectory. The black dot indicates the beginning of the trajectory. (B) Profile of the $Asym$ parameter which quantifies the trajectory asymmetry. (C) Profile of the Dev parameter used to evaluate MSD curvature. (D) Profile of the diffusion coefficient D . (The tracked vesicle was from a BON cell expressing NPY-GFP, evanescence depth = 200 nm, acquisition rate = 10 Hz.)

Figure 5. Profiles of the three motion classification parameters calculated for a simulated noisy Brownian trajectory with a diffusion coefficient of $20 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$. (A) Analyzed trajectory. The black dot indicates the beginning of the trajectory. (B) Profile of the $Asym$

parameter which quantifies the trajectory asymmetry. (C) Profile of the Dev parameter used to evaluate the MSD curvature. (D) Profile of the diffusion coefficient D .

Figure 6. Statistical behavior of the parameters Dev and $Asym$ which quantify MSD curvature and trajectory asymmetry, respectively, for simulated 3D Brownian trajectories. (A) Histograms of the number of simulated 3D Brownian trajectories for Dev for different lengths of trajectories N . Thresholds $Dev_{0.99}$ chosen such that $Dev > Dev_{0.99}$ for 99% of the simulated tracks are indicated as vertical dotted lines. Values of $Dev_{0.99}$ are shown above each histogram. (B) $Dev_{0.99}$ plotted as a function of N on semi-logarithmic scale. (C) Thresholds $Asym_{0.99}$, chosen such that 99% of the simulated trajectories had $Asym < Asym_{0.99}$ (at fixed N) plotted as a function of N on semi-logarithmic scale.

Figure 7. Percentages of 3D simulated Brownian trajectories exhibiting constrained (Left) or directed (Right) periods for different thresholds and minimal durations. Left panel shows the influence of the minimal duration below threshold for different Dev_r thresholds (0.05, -0.01 and -0.05). 7% of the simulated random walks exhibit at least one period of constrained motion with the chosen threshold (-0.01, heavy line) and minimal duration (20 points), indicated by a filled circle. Right panel shows the influence of the minimal duration above threshold for different $Asym$ thresholds (0.95, 1.00 and 1.05). 1% of the simulated random walks exhibit at least one period of directed motion with the chosen threshold (1.00, heavy line) and minimal duration (10 points), indicated by a filled circle. The simulated random trajectories included 300 points, a value which matched the mean duration of experimental trajectories obtained from vesicle tracking.

Figure 8. Motion analysis of a vesicle trajectory. (A) Analyzed vesicle trajectory. The segment marked in purple corresponds to directed motion and the one in green to constrained motion, as detected by the algorithm. The black dot indicates the beginning of the trajectory. (B) MSD plot for $\Delta t < 5$ s calculated for the entire trajectory shown in (A). The dashed line corresponds to the weighted linear fit of the 5 initial MSD points (see text). (C) Profile of the *Asym* parameter which quantifies the trajectory asymmetry as a function of time, calculated for the trajectory shown in (A). The dashed line corresponds to the threshold used to distinguish directed and diffusive motions (*Asym* > 1.00). The purple bar indicates the position of the detected directed period. (D) Profile of the *Dev_r* parameter which evaluates the MSD curvature as a function of time, calculated for the same trajectory. The dashed line corresponds to the threshold used to discriminate between constrained and diffusive motion (*Dev_r* < -0.01). The green bar indicates the position of the detected constrained period. (Tracked vesicle from a BON cell expressing NPY-GFP, evanescence depth = 200 nm, acquisition rate = 10 Hz.)

ONLINE SUPPLEMENTAL MATERIAL

Video 1. Example of timelapse acquisition of a BON cell expressing NPY-GFP and illuminated by an evanescent field with a penetration depth of 200 nm. Frames were acquired for 60 seconds at 10 Hz and displayed at 30 Hz. Diameter of the cell is about 15 μ m. Bright spots correspond to labeled secretory vesicles.

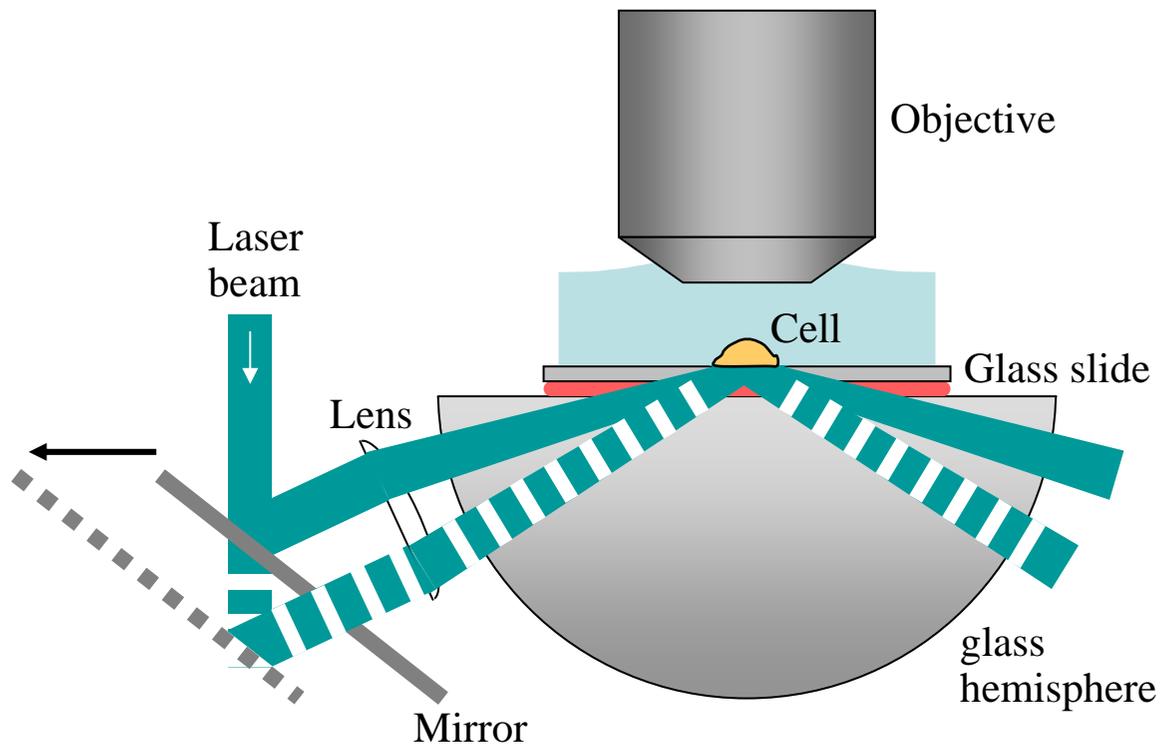


Figure 1

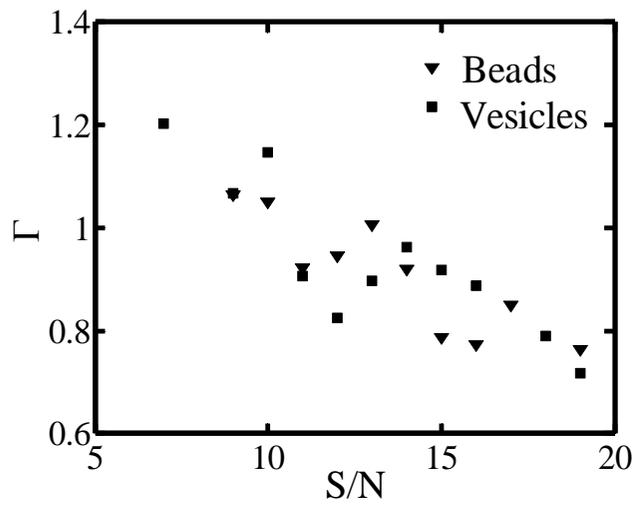


Figure 2

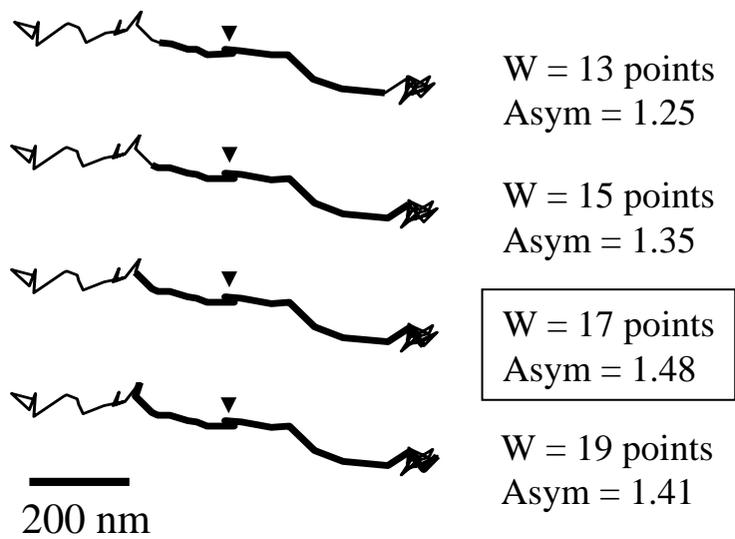


Figure 3

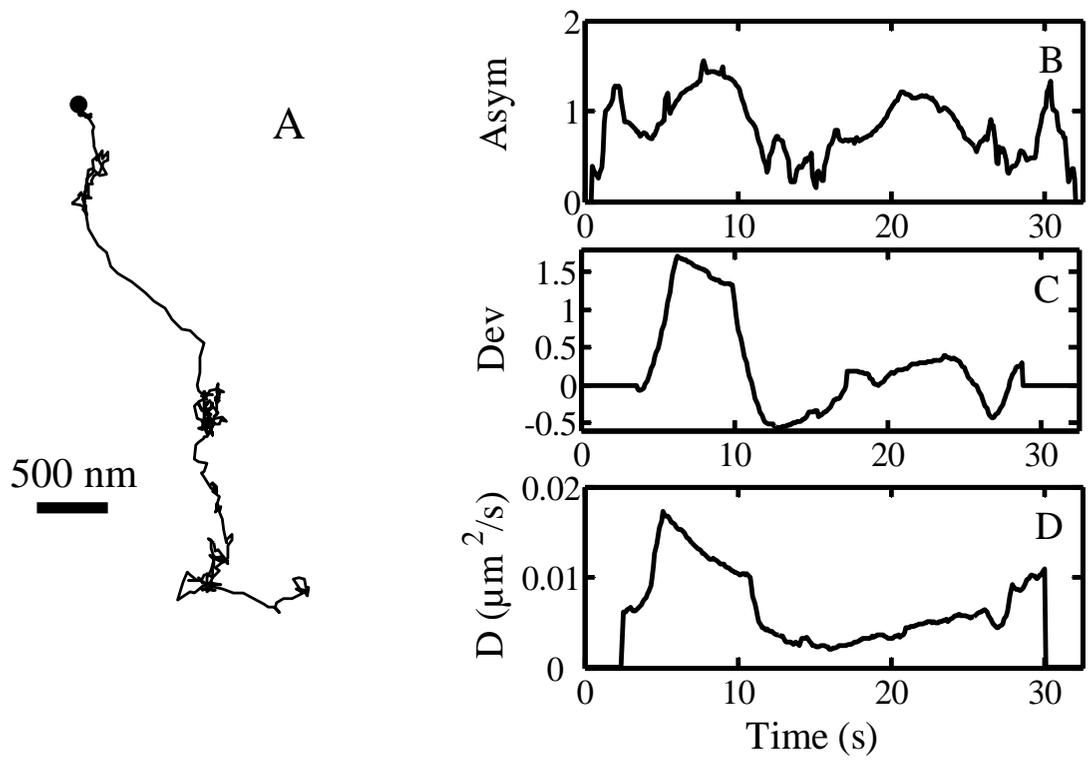


Figure 4

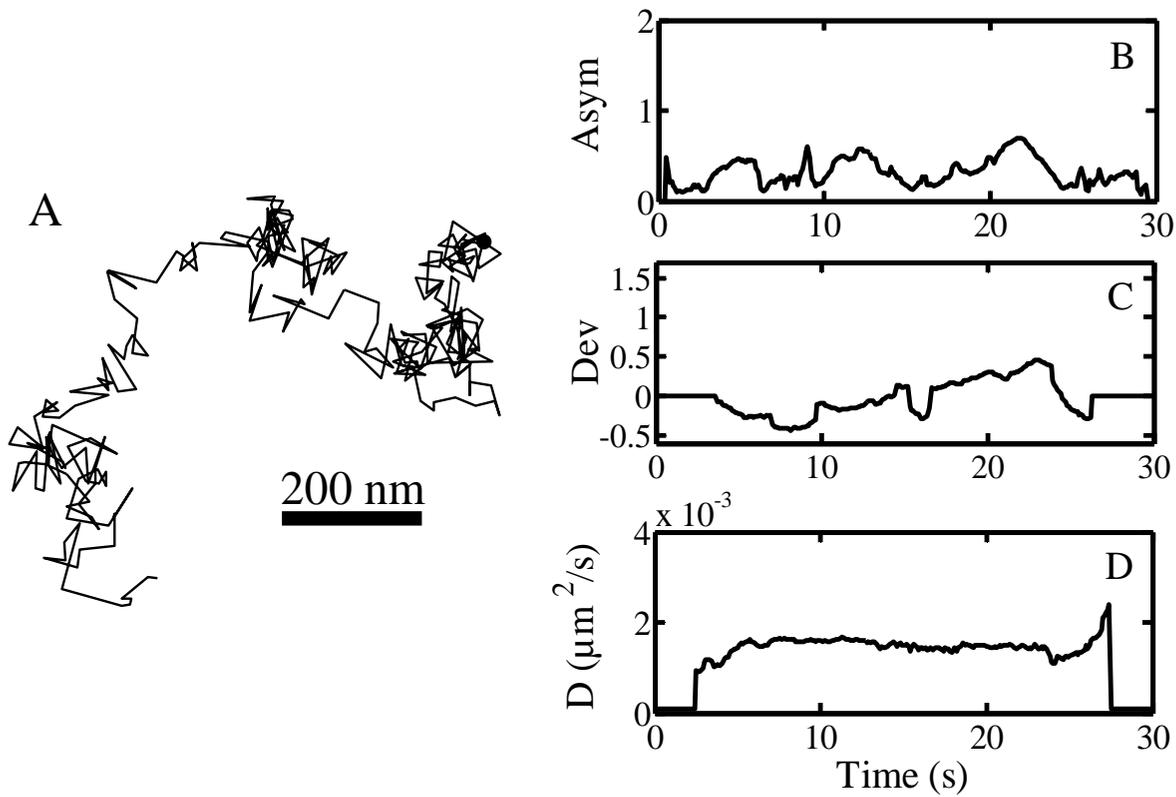


Figure 5

A

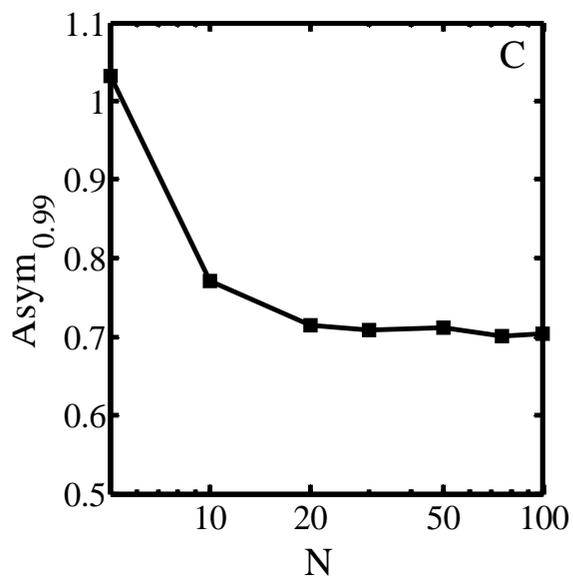
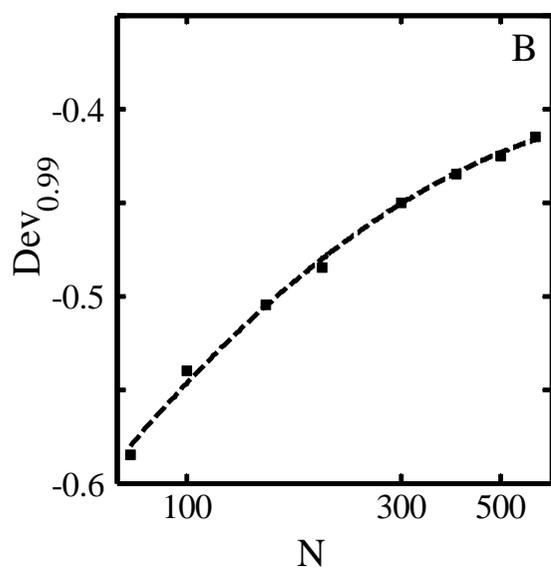
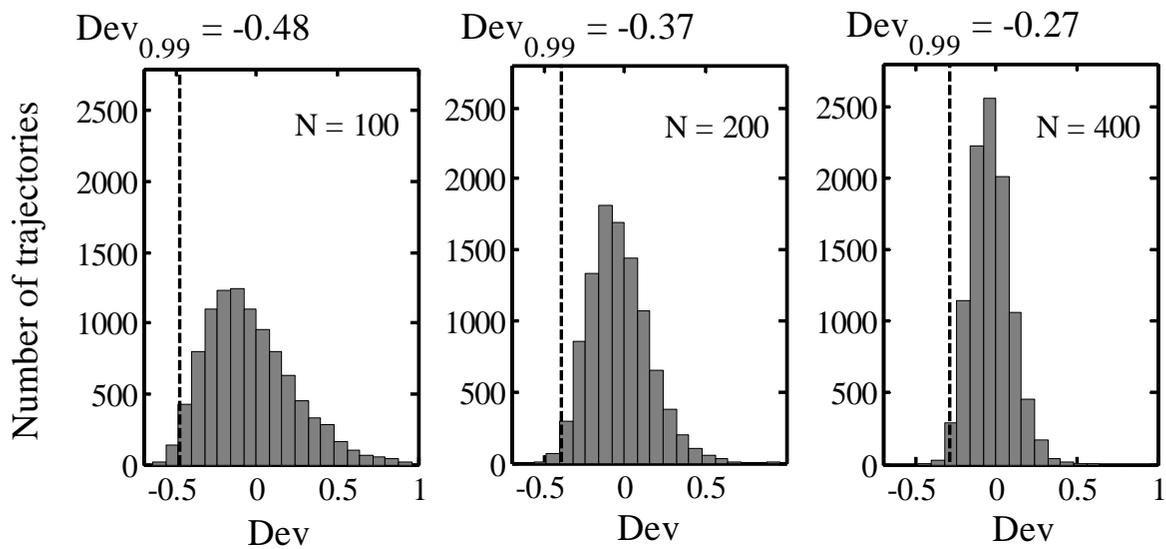


Figure 6

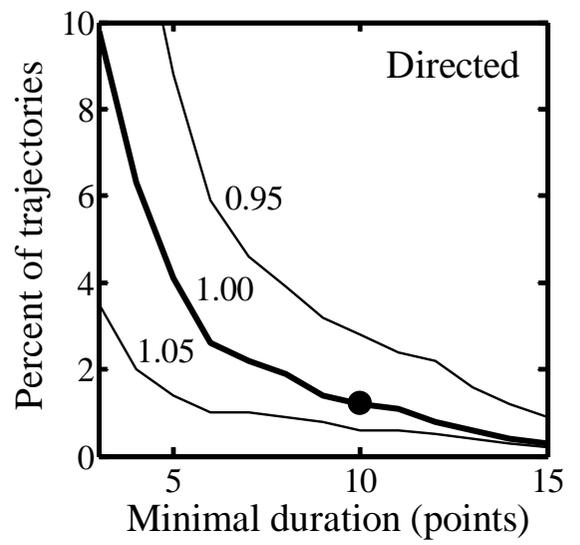
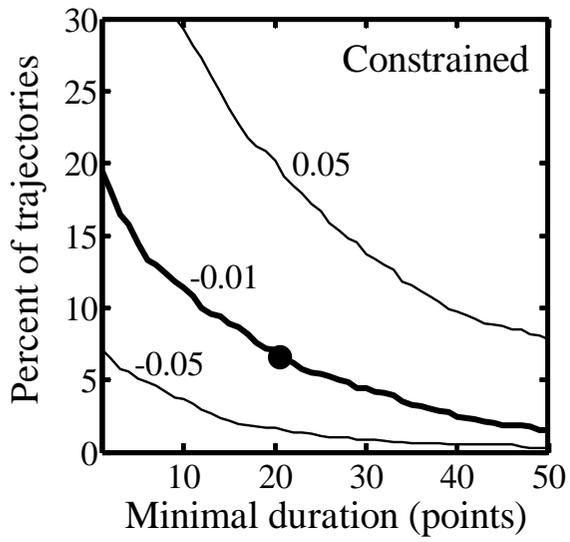


Figure 7

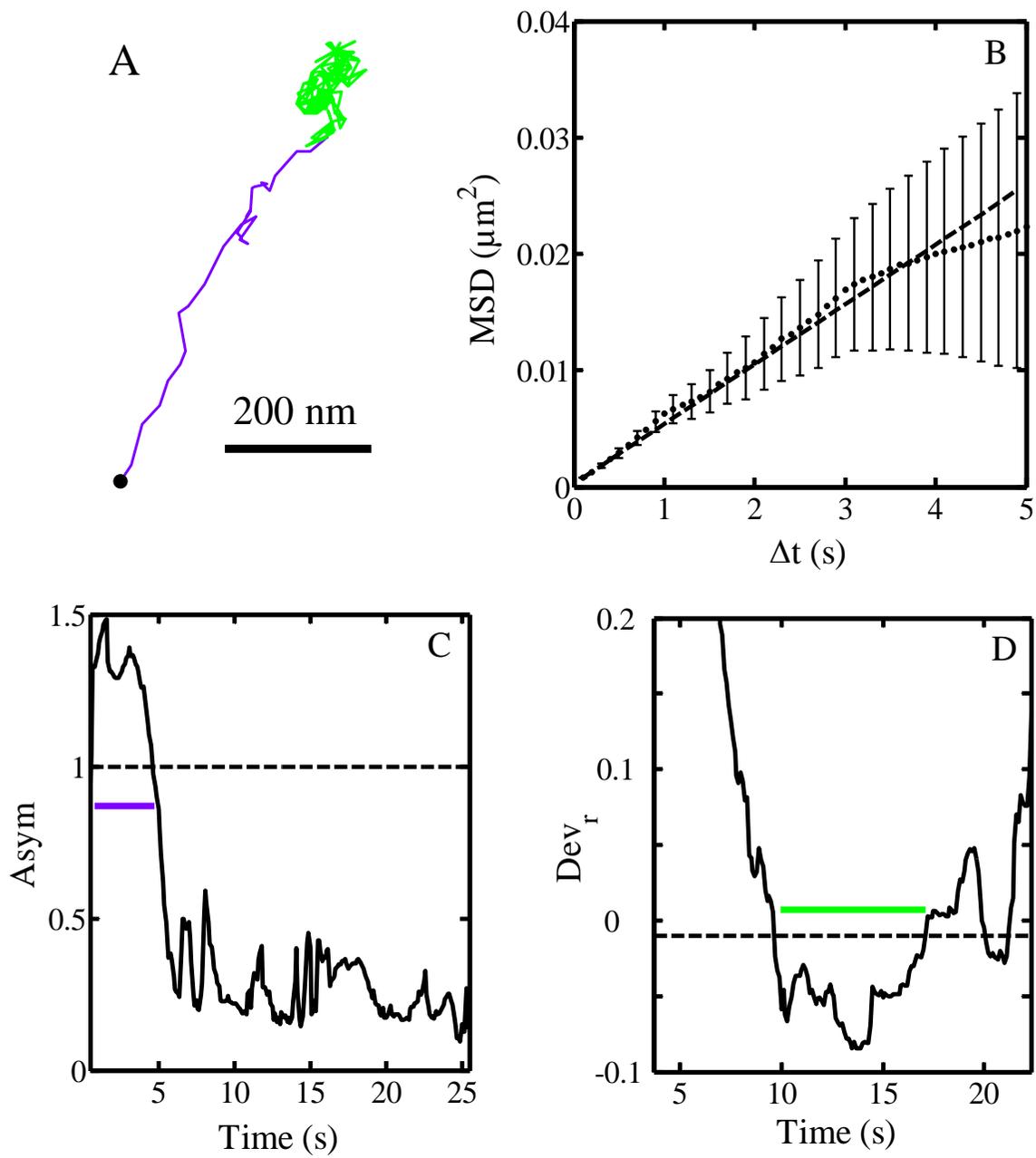


Figure 8

3. La dynamique des granules de sécrétion dans la région juxta-membranaire

3.1. Introduction

Afin de pouvoir libérer leur contenu à l'extérieur de la cellule par exocytose, les GS, qui sont formés au niveau du réseau *trans*-golgien, doivent parvenir jusqu'à la membrane plasmique. Cette migration des GS peut être décomposée en trois grandes étapes (Figure 19). Ces organites sont tout d'abord transportés sur de grandes distances depuis leur site de biogénèse jusqu'à la périphérie de la cellule grâce à un transport actif le long des microtubules (Rudolf, Salm et al., 2001). Ils passent alors dans le cytosquelette d'actine cortical dont le rôle semble être à la fois de les maintenir dans la région juxta-membranaire et de réguler leur accès à la membrane plasmique (Eitzen, 2003). Une fois parvenus au contact de cette membrane, les GS s'y accrochent par l'intermédiaire de complexes protéiques spécifiques (voir introduction générale). Au cours de cette introduction, nous allons décrire en détail ces différentes étapes du transport des GS jusqu'à la membrane plasmique.

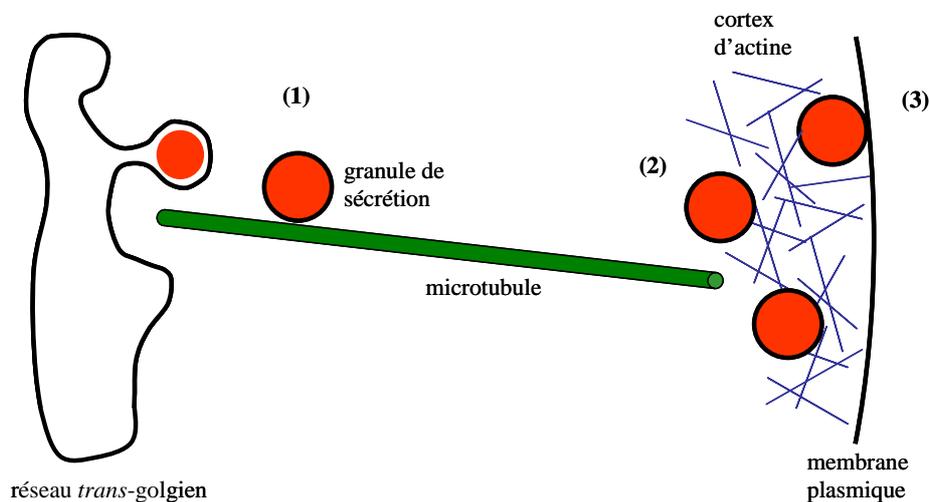


Figure 19 : Le transport des GS jusqu'à la membrane plasmique. (1) Déplacement des GS le long des microtubules depuis leur site de biogénèse, au niveau du réseau *trans*-golgien, jusqu'à la périphérie de la cellule. (2) Passage dans le réseau d'actine cortical. (3) Accrochage à la membrane plasmique.

3.1.1. Le transport à longue portée le long des microtubules

Au sein des cellules en interphase, le réseau de microtubules s'organise généralement suivant une structure particulière appelée aster (Alberts, Johnson et al., 2002). Les microtubules rayonnent ainsi depuis un centre organisateur, localisé au voisinage du noyau, jusqu'à la périphérie de la cellule. Ces polymères protéiques sont polarisés. Au sein d'un aster, ils présentent tous la même orientation : leur extrémité dite – se situe au niveau du centre organisateur tandis que leur extrémité + pointe en direction de la membrane plasmique. Outre les GS, de nombreuses organites utilisent ce réseau pour se déplacer sur de longues distances, en particulier jusqu'à la périphérie de la cellule (pour des revues, voir (Brown, 1999 ; Mallik and Gross, 2004)). L'exemple le plus frappant est sans doute celui du transport axonal pour lequel les VS se déplacent le long des microtubules sur des distances parfois supérieures au mètre.

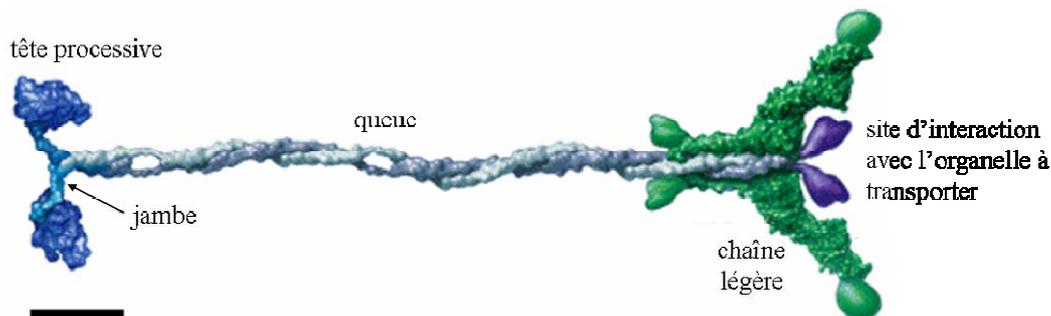


Figure 20 : Structure de la kinésine I. Les deux têtes processives interagissant avec les microtubules sont reliées à la zone de dimérisation (la "queue") par l'intermédiaire de deux "jambes". L'organelle à transporter se lie à ce moteur au niveau de l'extrémité de la queue opposée aux jambes. Les chaînes légères sont impliquées dans la régulation de l'activité du moteur et dans la reconnaissance de l'organelle à transporter. Barre d'échelle : 5 nm. D'après (Vale, 2003).

Le mouvement de ces organites le long des microtubules est assuré par des moteurs moléculaires spécifiques pouvant être regroupés en deux grandes familles : les kinésines, qui permettent un transport vers l'extrémité + des microtubules et les dynéines qui assurent les mouvements dans la direction opposée (pour des revues, voir (Hirokawa, 1998 ; Vale, 2003)). La majorité de ces moteurs sont des dimères. Ils sont généralement constitués de deux têtes processives reliées à la zone de dimérisation (appelée "queue") par l'intermédiaire de deux "jambes" (voir Figure 20, exemple de la kinésine I). A l'autre extrémité de la queue se situe le site d'interaction (directe ou indirecte) avec l'organelle à transporter. C'est alors l'hydrolyse d'ATP par les têtes processives liées au microtubule qui, en induisant une modification de la conformation de ces têtes, est à l'origine du mouvement de ces moteurs (voir Figure 21,

exemple de la kinésine I). Dans le cas des GS, il semble que ce soient la kinésine I (aussi appelée kinésine conventionnelle) et la dynéine cytoplasmique (Varadi, Ainscow et al., 2002 ; Varadi, Tsuboi et al., 2003) qui induisent les déplacements le long des microtubules.

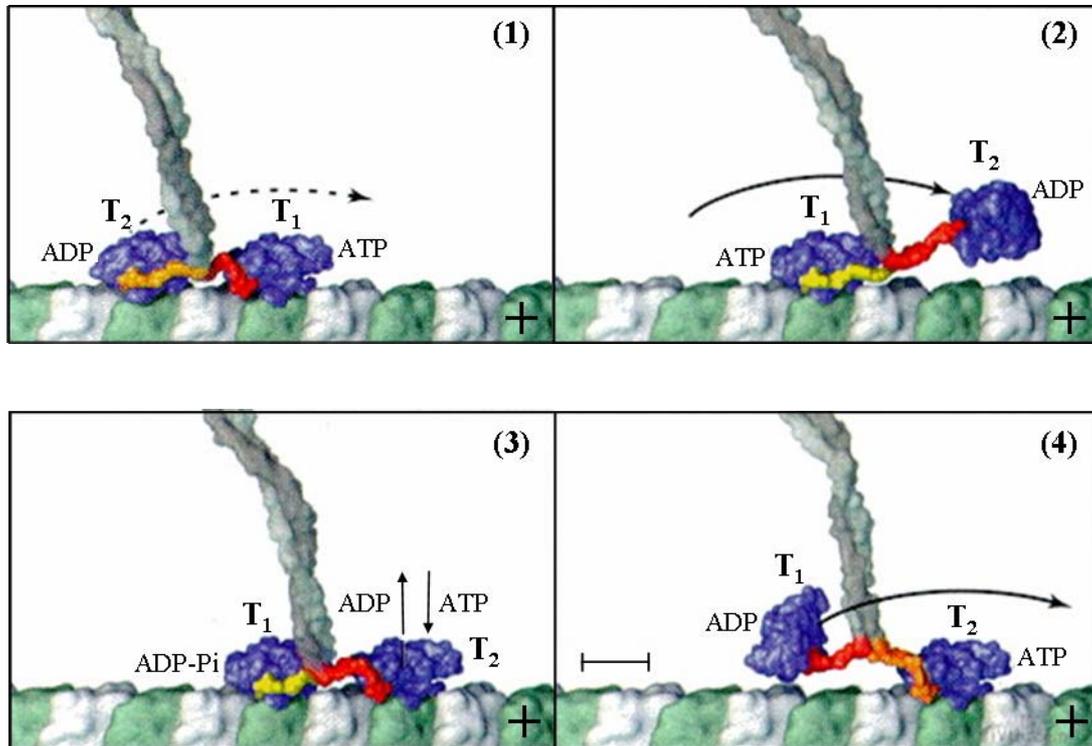


Figure 21 : Déplacement de la kinésine I le long d'un microtubule. (1) Les deux têtes processives (T_1 et T_2) sont au contact du microtubule. T_1 est liée à l'ATP ce qui permet son arrimage stable au microtubule tandis que T_2 , associée à l'ADP, est en interaction faible avec ce microtubule. (2) La présence de l'ATP induit ensuite une rotation de la jambe liée à T_1 entraînant le décrochement de T_2 et son basculement vers l'extrémité + du microtubule. (3) T_2 se lie au microtubule *via* la libération d'ADP et la fixation d'ATP. T_1 hydrolyse l'ATP en ADP-Pi. (4) La dissociation du phosphate déstabilise l'interaction entre T_1 et le microtubule. T_1 peut alors être projetée en avant par la rotation de la jambe liée à T_2 . D'après (Vale and Milligan, 2000).

Le problème de la régulation de ce type de mouvements est particulièrement complexe et a fait l'objet de nombreux travaux (pour des revues, voir (Mallik and Gross, 2004 ; Welte, 2004)). Il apparaît notamment que les déplacements des organites le long des microtubules ne sont généralement pas unidirectionnels mais se caractérisent par de fréquents allers et retours (voir (Wacker, Kaether et al., 1997 ; Manneville, Etienne-Manneville et al., 2003) dans le cas des vésicules de sécrétion). Plusieurs études ont montré que ce type de comportement était dû à la présence simultanée de moteurs de polarités opposées à la surface de ces organites (Rogers, Tint et al., 1997 ; Ma and Chisholm, 2002). Afin d'obtenir un transport effectif jusqu'à une région déterminée de la cellule, un mécanisme de régulation permettant de favoriser un déplacement suivant une direction particulière est donc nécessaire. Il semble ainsi qu'il existe une coordination entre moteurs de polarités opposées empêchant leur

fonctionnement simultané sur un même organite (Welte, 2004). L'origine d'une telle coordination reste cependant à définir.

3.1.2. La capture en périphérie de la cellule

Les cellules neuroendocrines possèdent un réseau d'actine cortical particulièrement dense dont l'épaisseur est évaluée à quelques centaines de nanomètres (Nakata and Hirokawa, 1992 ; Lang, Wacker et al., 2000). Il a été proposé que les GS arrivant en périphérie de la cellule *via* les microtubules puissent être capturés par ce cortex d'actine, permettant ainsi une rétention de ces organites au voisinage de la membrane plasmique (voir Figure 19).

Ce rôle de capture joué par le cytosquelette d'actine a été étudié en détail dans le cas des mélanosomes. Chez les mammifères, ces organites sont présents au sein de cellules spécialisées dans la synthèse de la mélanine (le pigment responsable de la coloration de la peau et des cheveux) : les mélanocytes. Leur rôle est notamment de transporter la mélanine jusqu'à la périphérie de la cellule où elle est transférée aux kératinocytes voisins (Marks and Seabra, 2001). Il a été montré que ces mélanosomes étaient retenus en périphérie des mélanocytes *via* leur interaction avec le cytosquelette d'actine cortical par l'intermédiaire d'un complexe protéique spécifique (Fukuda, Kuroda et al., 2002 ; Wu, Rao et al., 2002). Ce complexe est constitué de trois protéines (Figure 22) : Rab27a, présent à la membrane des mélanosomes, recrute la mélanophiline qui, elle-même, interagit avec la myosine Va, un moteur protéique capable de se déplacer le long des filaments d'actine (voir plus loin). Ces résultats sont confirmés par des études menées sur des patients atteints du syndrome de Griscelli de type 1. Ce syndrome, dû à des mutations sur le gène codant pour la myosine Va, se caractérise à la fois par un albinisme partiel ainsi que des troubles neurologiques et immunologiques sévères (Pastural, Barrat et al., 1997). Chez ces patients, les mélanosomes ne s'accumulent pas en périphérie des mélanocytes et ne peuvent donc pas être transférés aux kératinocytes ce qui induit un défaut de pigmentation de la peau et des cheveux. Un tel défaut de pigmentation est également observé dans le cas des syndromes de Griscelli de type 2 et 3 caractérisés respectivement par des mutations sur les gènes codant pour Rab27a et la mélanophiline (Menasche, Pastural et al., 2000 ; Menasche, Ho et al., 2003).

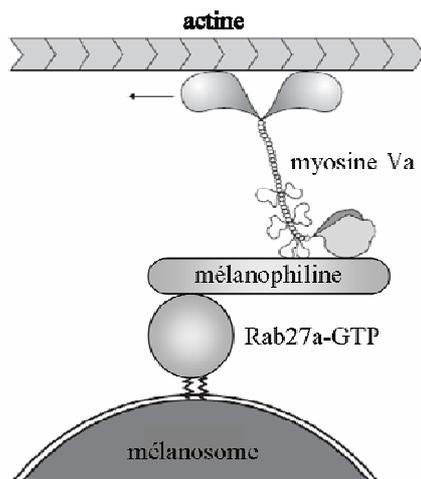


Figure 22 : Structure du complexe reliant les mélanosomes aux filaments d'actine. La protéine Rab27a est présente à la membrane des mélanosomes. Lorsqu'elle est liée au GTP, elle recrute la mélanophiline qui elle-même interagit avec la myosine Va. Cette dernière a la capacité de se déplacer sur les filaments d'actine. D'après (Wu, Rao et al., 2002).

L'existence d'un tel mécanisme de capture en périphérie de la cellule par l'intermédiaire du cortex d'actine a également été suggérée dans le cas des GS (Rudolf, Salm et al., 2001). Comme pour les mélanosomes, il semble impliquer la myosine Va (Rudolf, Kogel et al., 2003).

3.1.3. Le contrôle de l'accès à la membrane plasmique

3.1.3.1. Le cortex d'actine : une "barrière" bloquant l'accès des granules à la membrane plasmique

Les images du cytosquelette d'actine cortical prises en microscopie électronique (Nakata and Hirokawa, 1992) montrent que la taille caractéristique des mailles de ce réseau (50-100 nm) est nettement inférieure à celle des GS (200-300 nm de diamètre). Ceci suggère que le cortex d'actine pourrait jouer un rôle de barrière empêchant ces organites d'accéder à la membrane plasmique.

Ce rôle de barrière est confirmé par des travaux étudiant la dynamique du cytosquelette d'actine au moment de la stimulation de l'exocytose (pour une revue, voir (Trifaro, Rose et al., 2000)). Il a ainsi été montré que c'est le désassemblage partiel et transitoire du réseau de d'actine observé lors d'une telle stimulation (Vitale, Rodriguez Del Castillo et al., 1991 ; Tchakarov, Zhang et al., 1998) qui permet aux GS, restés jusque là piégés dans le cortex, d'accéder à la membrane plasmique pour fusionner avec elle (Nakata and Hirokawa, 1992 ; Vitale, Seward et al., 1995 ; Giner, Neco et al., 2005). Ce processus mettrait notamment en jeu des protéines capables de découper les filaments d'actine comme la scindérine (Trifaro,

Rose et al., 2000). Il apparaît de plus que la dépolymérisation partielle du cortex d'actine *via* différentes drogues spécifiques puisse induire une augmentation du nombre de GS fusionnant avec la membrane en cas de stimulation (Matter, Dreyer et al., 1989 ; Tsuboi, DaSilva Xavier et al., 2003 ; Ehre, Rossi et al., 2005). Enfin, il semble même qu'une telle dépolymérisation partielle du cytosquelette cortical puisse à elle seule stimuler l'exocytose (Muallem, Kwiatkowska et al., 1995).

Plusieurs études ont toutefois montré que des traitements pharmacologiques induisant un désassemblage massif du cortex d'actine avait un effet inhibiteur sur la sécrétion (Li, Rungger-Brandle et al., 1994 ; Muallem, Kwiatkowska et al., 1995 ; Gasman, Chasserot-Golaz et al., 2004). Ceci suggère que le cytosquelette cortical puisse jouer un rôle plus complexe que simplement celui d'une barrière passive empêchant l'accès des GS à la membrane plasmique.

3.1.3.2. Le cortex d'actine contrôle la mobilité des granules en périphérie de la cellule

L'observation directe de l'influence du cortex d'actine sur la mobilité des GS situés dans la région juxta-membranaire grâce en particulier à l'utilisation de la microscopie TIRF a permis de préciser le rôle exacte de ce cortex.

Il a ainsi été montré que la mobilité des GS présents en périphérie de la cellule est nettement inférieure à celle de GS éloignés de la membrane plasmique (Tsuboi, DaSilva Xavier et al., 2003 ; Li, Xiong et al., 2004). De plus, la caractérisation des trajectoires granulaires indique que la majorité des GS présents dans la région juxta-membranaire semblent être piégés à l'intérieur de cages dont le diamètre est à peine supérieur à celui de ces organites (Steyer and Almers, 1999 ; Oheim and Stuhmer, 2000 ; Johns, Levitan et al., 2001). Enfin, il apparaît que le blocage de la dynamique du cytosquelette cortical par des drogues stabilisant les filaments d'actine induit à la fois un arrêt quasiment total des mouvements des GS au voisinage de la membrane (Lang, Wacker et al., 2000 ; Oheim and Stuhmer, 2000 ; Ng, Lu et al., 2002 ; Tsuboi, DaSilva Xavier et al., 2003) et une inhibition de l'exocytose (Ng, Lu et al., 2002 ; Tsuboi, DaSilva Xavier et al., 2003). L'ensemble de ces résultats suggèrent que le cortex d'actine se comporte comme un véritable piège vis-à-vis des GS. Ainsi, seul le remodelage du cortex par polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actine permettrait aux GS de se "frayer un chemin" à travers ce réseau afin d'atteindre la membrane plasmique. Ceci confirme donc la vision selon laquelle le cytosquelette cortical peut être considéré comme une barrière limitant l'accès des GS à la membrane plasmique.

Certaines études indiquent cependant que ce modèle ne reflète que partiellement le rôle du cytosquelette dans la mobilité des GS en périphérie de la cellule. Ainsi, la dépolymérisation du cytosquelette d'actine par un traitement des cellules à la latrunculine induit une diminution de la mobilité des GS (Lang, Wacker et al., 2000 ; Oheim and Stuhmer, 2000 ; Tsuboi, DaSilva Xavier et al., 2003). D'après le modèle qui vient d'être présenté, une telle dépolymérisation devrait au contraire induire une augmentation des mouvements granulaires. Le cytosquelette cortical permettrait donc à la fois, de façon surprenante, de restreindre les mouvements des GS et de les promouvoir. Les filaments d'actine emprisonnant les GS pourraient ainsi également servir de rails pour un transport des GS par l'intermédiaire de moteurs moléculaires tels que la myosine V (voir paragraphe suivant). L'effet d'inhibition de la mobilité des GS induit par la dépolymérisation du réseau d'actine reste cependant controversé. Certaines équipes ont ainsi observé l'effet inverse (Johns, Levitan et al., 2001 ; Ng, Lu et al., 2002 ; Manneville, Etienne-Manneville et al., 2003).

3.1.3.3. La myosine V : un moyen de se déplacer le long des filaments d'actine

La présence de la myosine V à la surface des GS (Rose, Lejen et al., 2003 ; Rudolf, Kogel et al., 2003) suggère que ces organites puissent être transportés le long des filaments d'actine formant le cytosquelette cortical à l'aide de cette protéine.

La myosine V est en effet un moteur processif se déplaçant sur les filaments d'actine, en direction de leur extrémité barbée (pour des revues, voir (Reck-Peterson, Provance et al., 2000 ; Vale, 2003)). Ce type de moteur, dont il existe trois isoformes chez les mammifères (myosine Va, Vb et Vc), a été impliqué dans le transport de différents organites comme les mélanosomes (Wu, Bowers et al., 1998 ; Levi, Gelfand et al., 2006) ou les vésicules émanant du réticulum endoplasmique (Tabb, Molyneaux et al., 1998). Dans le cas de la levure, la Myo2p (l'un des deux homologues de la myosine V présents chez cet organisme) joue également un rôle essentiel dans le transport de vésicules de sécrétion depuis la cellule mère jusqu'au bourgeon (Pruyne, Schott et al., 1998).

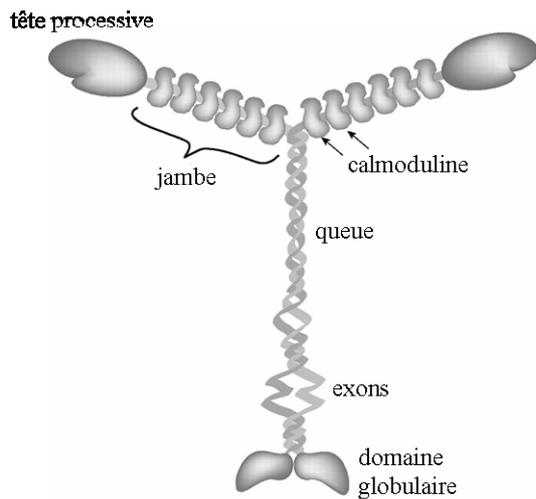


Figure 23 : Structure de la myosine V. Chaque "jambe" comporte six domaines IQ sur lesquels se lie la calmoduline. Le domaine globulaire, en association avec certains exons présents le long de la queue, permet l'accrochage de la myosine V sur l'organite à transporter. D'après (Krementsov, Kremntsova et al., 2004)

La myosine V est un dimère constitué de deux têtes processives reliées à la zone de dimérisation (appelée "queue") par l'intermédiaire de deux "jambes" (Figure 23). L'extrémité opposée de la queue comporte un domaine globulaire impliqué dans l'accrochage de ce moteur sur l'organite à transporter (Wu, Rao et al., 2002). Les nombreuses études menées au cours de ces dernières années sur la myosine V ont permis de déterminer précisément le mécanisme à l'origine du déplacement de ce moteur le long de l'actine (pour une revue, voir (Vale, 2003)). Ce mécanisme, qui implique l'hydrolyse d'ATP par les têtes processives, est présenté sur la (Figure 24). L'un des aspects essentiels du processus, à savoir l'origine de la nécessaire coordination entre les deux têtes lors de l'hydrolyse de l'ATP, reste cependant encore aujourd'hui mal défini (Baker, Kremntsova et al., 2004 ; Purcell, Sweeney et al., 2005).

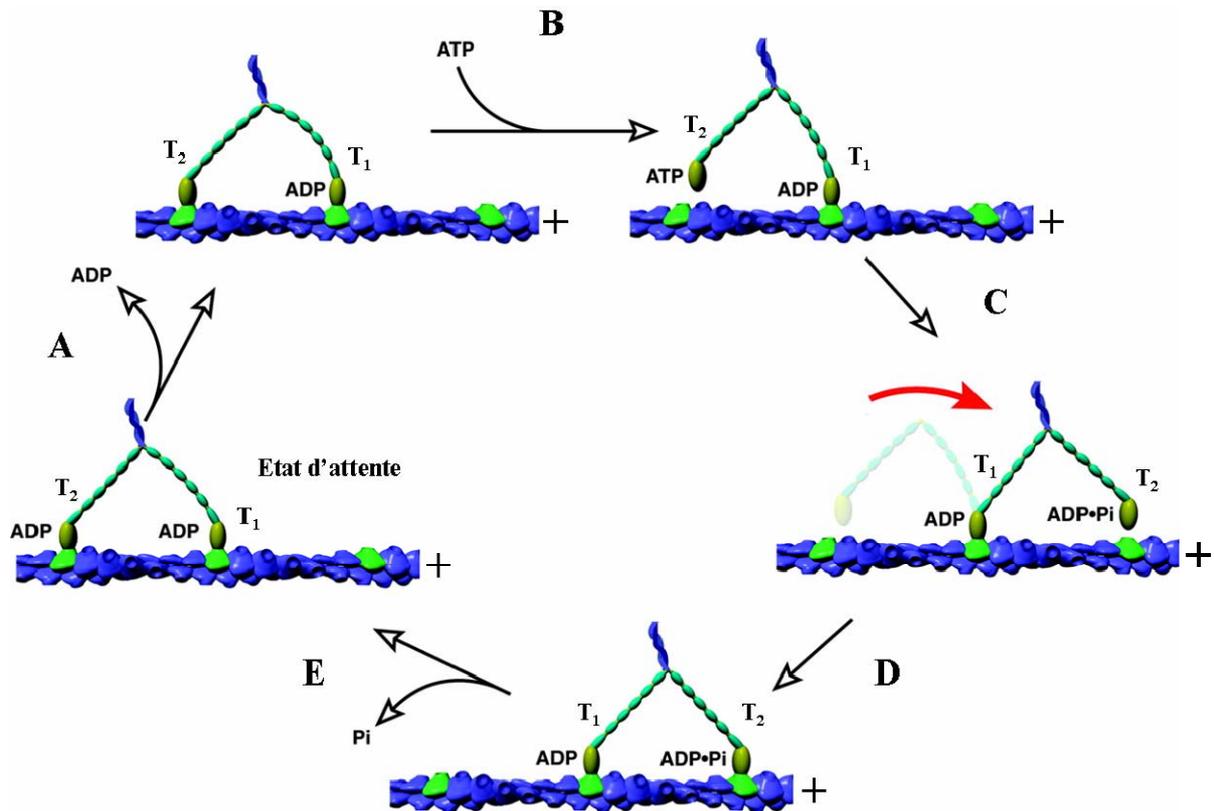


Figure 24 : Déplacement de la myosine V le long d'un filament d'actine. Entre chaque pas, la myosine est dans un état d'attente pour lequel les deux têtes (T_1 et T_2), associées à l'ADP, sont liées à l'actine. (A) La libération d'ADP par T_2 constitue l'étape limitante du cycle en terme cinétique. (B) En s'associant à l'ATP, T_2 se décroche du filament d'actine. (C) La rotation de la jambe liée à T_1 entraîne alors le basculement de T_2 vers l'extrémité barbée (identifiée par le signe +). De plus, l'ATP lié à T_2 est hydrolysé en ADP-Pi. (D) Après une recherche de son nouveau site de fixation par diffusion le long du filament, T_2 se lie à l'actine. (E) La libération du Pi par T_2 permet enfin de revenir à l'état d'attente. D'après Vale, 2003 #214.

Ce transport d'organites le long des filaments d'actine *via* la myosine V est un processus hautement contrôlé. Il existe ainsi au moins deux niveaux de régulation de l'activité de ce moteur. Tout d'abord, la myosine V semble pouvoir adopter deux états conformationnels : un état "fermé" pour lequel la protéine est repliée sur elle-même et un état "ouvert" pour lequel celle-ci est sous forme dépliée ((Krementsov, Kremntsova et al., 2004 ; Wang, Thirumurugan et al., 2004), voir Figure 25). L'ouverture de la myosine V pourrait alors être induite par une élévation de la concentration de Ca^{2+} ou par la liaison de ce moteur à l'organite à transporter. Le second niveau de régulation ferait intervenir la liaison de la calmoduline, une protéine souvent considérée comme un senseur calcique (Burgoyne and Clague, 2003), au niveau des motifs IQ présents sur les jambes de la myosine V (voir Figure 23). A faible concentration de calcium, la calmoduline serait fixée sur les domaines IQ, permettant à la myosine de se déplacer le long de l'actine. En revanche, en cas de montée du niveau de calcium, la dissociation de la calmoduline induirait un blocage des mouvements de cette protéine (Krementsov, Kremntsova et al., 2004).

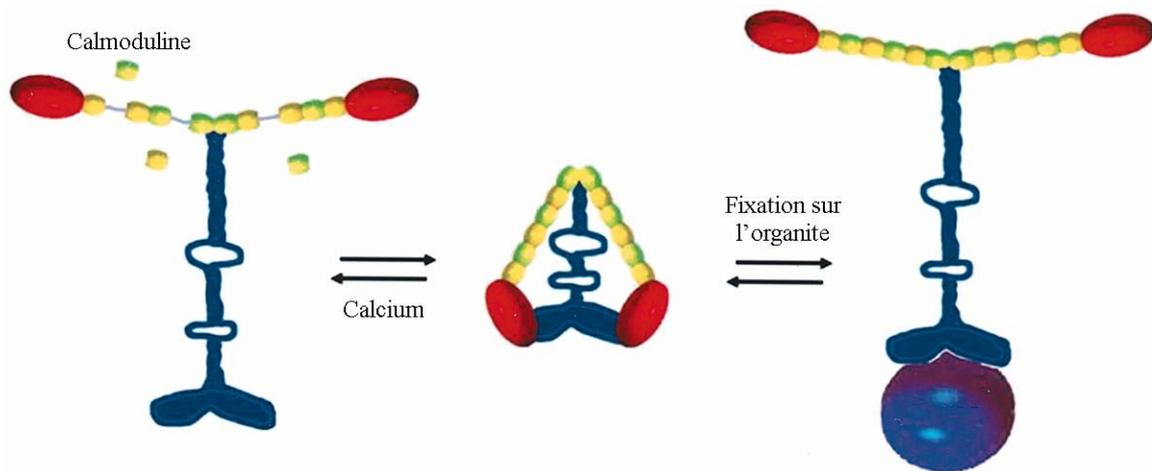


Figure 25 : La régulation de l'ouverture de la myosine V. Ce moteur passerait d'une conformation "fermée" à une conformation "ouverte" en cas d'élévation du niveau de calcium ou à la suite de sa fixation sur l'organite à transporter. En présence d'une concentration élevée de calcium, la calmoduline se dissocie des domaines IQ ce qui bloque les mouvements de la myosine V le long de l'actine. D'après (Wang, Thirumurugan et al., 2004).

Contrairement au cas des mélanosomes (Chabrilat, Wilhelm et al., 2005 ; Levi, Gelfand et al., 2006), l'existence d'un mouvement des GS le long des filaments d'actine par l'intermédiaire de la myosine V n'a, à ce jour, jamais été clairement mise en évidence. Plusieurs arguments suggèrent cependant que les GS puissent se déplacer au sein du cytosquelette cortical par l'intermédiaire de ce moteur. Ainsi, des travaux effectués dans le groupe de Gerdes (Rudolf, Kogel et al., 2003) ont montré que l'expression d'une construction de myosine V dépourvue de tête processive dans les cellules β -pancréatiques affectait la mobilité des GS et bloquait la dispersion de ces organites au sein du cortex d'actine. De plus, Lang et ses collaborateurs (Lang, Wacker et al., 2000) ont décrit quelques rares exemples de mouvements granulaires semblant se dérouler le long de filaments d'actine dans des cellules de la lignée PC-12.

3.1.4. L'accrochage à la membrane plasmique

Après avoir traversé le cortex d'actine, les GS se lient à la membrane plasmique. Il a été montré que cet accrochage à la membrane se traduisait par une diminution très nette des mouvements des GS (Steyer, Horstmann et al., 1997 ; Oheim and Stuhmer, 2000).

Le processus exact permettant d'aboutir à un tel accrochage reste encore aujourd'hui mal connu (voir la partie consacrée à cette étape dans l'introduction générale). Il est probable qu'il puisse être décomposé en deux étapes successives, l'accostage (*tethering*) puis l'arrimage (*docking*), faisant intervenir des assemblages protéiques distincts (Jahn, Lang et al., 2003). S'il

est à présent généralement admis que la mise en place du complexe SNARE joue un rôle central dans l'étape d'arrimage, les protéines impliquées dans la phase d'accostage n'ont en revanche toujours pas été clairement identifiées.

La question de l'existence de zones spécifiques d'accrochage des GS au niveau de la membrane plasmique a, quant à elle, été peu étudiée. Dans les neurones, la fusion des VS se localise spécifiquement au niveau de zones actives très structurées (pour une revue, voir (Garner, Kindler et al., 2000)). Si les cellules neuroendocrines ne présentent pas de telles zones actives, plusieurs arguments sont toutefois en faveur de l'existence de sites préférentiels d'exocytose. Tout d'abord, Allersma et ses collaborateurs (Allersma, Wang et al., 2004) ont mis en évidence que les événements de fusion ne se répartissaient pas de manière uniforme à la surface des cellules chromaffines d'origine bovine mais se produisaient préférentiellement au niveau de zones particulières d'environ 600 nm de diamètre. De plus, il semble qu'il existe une corrélation entre la répartition des événements de fusion et celle des canaux calciques au niveau desquels se produit l'entrée de calcium en cas de stimulation de la cellule (pour une revue, voir (Olivos Ore and Artalejo, 2004)). Enfin, certaines études ont montré que la syntaxine 1 et la SNAP25, deux protéines SNARE impliquées dans l'accrochage des GS à la membrane plasmique, avaient tendance à s'organiser en microdomaines à la surface des cellules (Lang, Bruns et al., 2001 ; Ohara-Imaizumi, Nishiwaki et al., 2004). Ces études ne permettent cependant pas de déterminer avec certitude si les t-SNARE se regroupent en microdomaines afin de constituer des sites préférentiels d'accrochage à la membrane plasmique où si c'est la fixation des GS au niveau de cette membrane qui induit le recrutement local de ces protéines.

3.2. Caractérisation des mouvements des granules de sécrétion dans la région juxta-membranaire

De manière générale, la caractérisation des mouvements d'un objet s'avère souvent être une méthode particulièrement efficace pour déterminer non seulement la nature des interactions que cet objet développe avec son environnement mais également la structure même de cet environnement. C'est ainsi en étudiant le mouvement de grains de pollen que Jean Perrin, prix Nobel de physique et surtout cofondateur de l'Institut de Biologie Physico-Chimique, a pu mettre en évidence expérimentalement la nature atomique de la matière.

Nous avons tenté, en toute modestie, d'appliquer ce même principe au cas des GS localisées au voisinage de la membrane plasmique. L'objectif poursuivi était ainsi de caractériser les mouvements décrits par ces organites puis de tenter d'associer une dynamique granulaire particulière à un environnement spécifique. Une telle analyse permettrait, en effet, de mieux comprendre la manière dont les GS, une fois parvenus à la périphérie de la cellule *via* les microtubules, sont transportés jusqu'à la membrane plasmique puis s'y arriment.

3.2.1. Justification du choix des cellules BON pour l'analyse des mouvements des granules de sécrétion

La caractérisation de la dynamique des GS a été réalisée sur des cellules entérochromaffines de la lignée BON. Cette lignée dérive d'une tumeur carcinoïde humaine issue du pancréas (Evers, Townsend et al., 1991). Les GS présents au sein de ces cellules, dont le diamètre est d'environ 200-300 nm, contiennent différents peptides (neurotensine, pancréastatine...) ainsi que de la sérotonine (Parekh, Ishizuka et al., 1994). Ces différentes molécules sont sécrétées de manière régulée en réponse, notamment, à une stimulation par l'acétylcholine (Parekh, Ishizuka et al., 1994 ; Tran, Marion-Audibert et al., 2004). Afin d'analyser la dynamique des GS au sein de ces cellules, ces organites ont été marqués à l'aide d'une protéine chimérique fluorescente : la NPY-GFP. Cette protéine correspond à la fusion entre le neuropeptide Y, un peptide présent à l'intérieur des GS des cellules chromaffines (Renshaw and Hinson, 2001), et la *Green Fluorescent Protein* (pour plus de détails au sujet de cette construction et de son expression au sein des cellules, voir Matériels et méthodes).

Les cellules de la lignée BON ont été préférées aux modèles cellulaires généralement utilisés pour l'étude de la sécrétion d'hormones telles que les cellules chromaffines de la glande médullo-surrénale de bœuf ou celles de la lignée PC-12 (issues d'un phéochromocytome de rat) pour trois raisons principales. Tout d'abord, les méthodes de transfection utilisées au laboratoire se sont révélées particulièrement efficaces dans le cas de cette lignée cellulaire. De plus, les cellules BON ont la propriété de pouvoir être cultivées sur verre "nu" ce qui se révèle intéressant dans le cas d'observations réalisées en microscopie TIRF. En effet, la présence d'un dépôt de collagène ou de polylysine, destiné à favoriser l'adhérence cellulaire, perturbe probablement l'onde évanescence utilisée pour l'excitation des fluorophores. Enfin, du fait de la taille relativement importante des GS au sein de cette lignée cellulaire (diamètre de 200-300 nm, voir (Parekh, Ishizuka et al., 1994)), les images de ces organites obtenues par

microscopie TIRF présentent un rapport signal à bruit élevé dans des conditions d'excitation minimisant le photoblanchiment des fluorophores.

3.2.2. Analyse globale des trajectoires des granules de sécrétion en périphérie de la cellule

Afin de caractériser la dynamique des GS en périphérie de la cellule, des cellules BON exprimant de manière stable la protéine chimérique NPY-GFP (clone BC6, voir Matériels et méthodes) ont été observées par microscopie TIRF. La profondeur de pénétration de l'onde évanescente utilisée (δ) était de 200 nm. Les séquences d'images obtenues (acquisition à 10 Hz durant 1 min, pour un exemple, voir Vidéo 1) mettent en évidence la grande variété de dynamiques présentées par les GS. Certains de ces organites sont quasiment immobiles durant toute la séquence tandis que d'autres se déplacent sur plusieurs microns en quelques secondes. Il apparaît également que de nombreux GS semblent changer de comportement au cours de leur déplacement au sein de la zone juxta-membranaire, passant par exemple d'une phase d'arrêt à une phase de mouvement rapide.

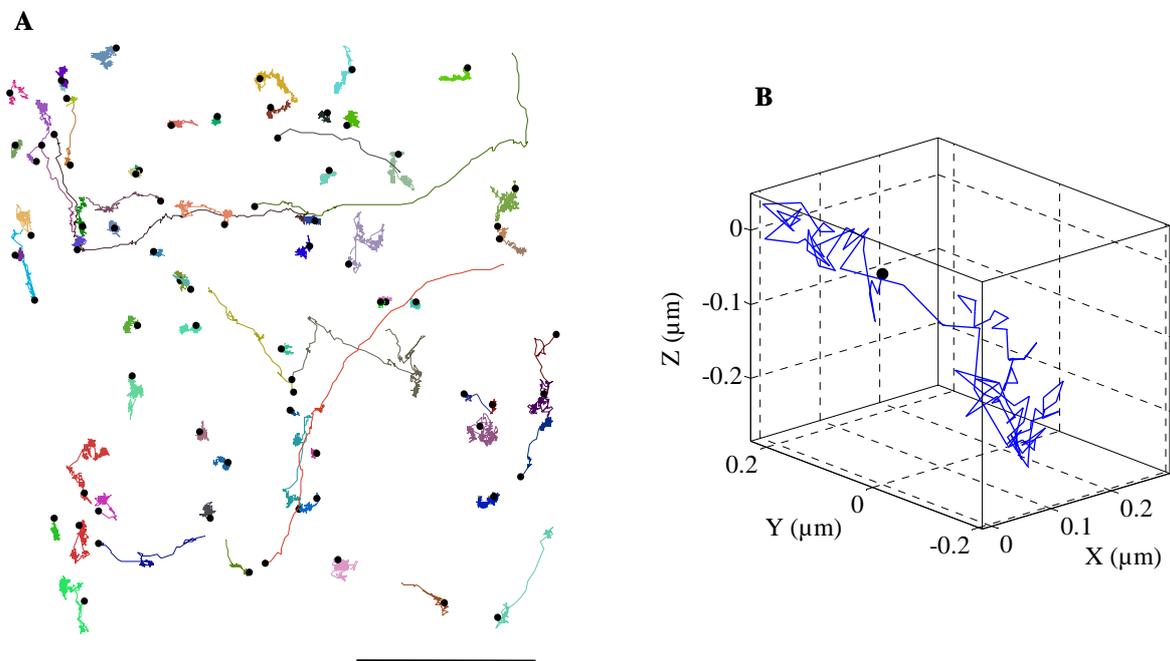


Figure 26 : Obtention des trajectoires tridimensionnelles. (A) Détermination des trajectoires des GS dans le plan de focalisation du microscope (x,y) par suivi de particule. Les points noirs marquent le début des trajectoires. Barre d'échelle : 2 μm . (B) Les mouvements selon l'axe orthogonal au plan de focalisation (z) sont déduits de la mesure des variations d'intensité des GS. Il est ainsi possible d'obtenir les trajectoires tridimensionnelles des GS.

Les trajectoires des GS dans le plan de focalisation du microscope (x,y) ont alors été déterminées par une méthode semi-automatique de suivi de particule à l'aide du logiciel Metamorph² (Figure 26A, voir Matériels et méthodes). A partir de la mesure des variations d'intensité de ces organites, leurs déplacements suivant l'axe orthogonal au plan de focalisation (z) ont ensuite été calculés (voir Matériels et méthodes). Les trajectoires tridimensionnelles ainsi obtenues (pour un exemple, voir Figure 26B) ont été analysées grâce à la méthode décrite dans la partie 2. intitulée "Méthode d'analyse des trajectoires complexes". Cette analyse, effectuée sur 528 GS issus de 6 cellules, montre tout d'abord qu'environ la moitié des trajectoires, dont la durée est en moyenne d'une vingtaine de secondes, présentent des changements de comportement. Ce résultat justifie donc le recours à une méthode de caractérisation des mouvements capable de mettre en évidence de tels comportements transitoires. Il indique également que, au moins dans le cas des cellules BON, les GS peuvent passer d'un environnement à un autre ou modifier les interactions qu'ils développent avec cet environnement, relativement fréquemment. Théoriquement, pour des durées de suivi des GS plus longues et avec une résolution temporelle suffisante, de tels changements de comportement devraient pouvoir être observés pour tous les GS et dans tous les types cellulaires.

L'analyse des trajectoires réalisée a aussi permis de déterminer, d'une part, la proportion de temps passé par les GS dans chacune des quatre catégories de mouvements (voir Figure 16) définies pour caractériser leur comportement (Tableau 1) et, d'autre part, les différentes caractéristiques de chacune de ces catégories (Tableau 2).

Catégorie	Proportion de temps
Arrêt	9 ± 2 %
Contraint	38 ± 3 %
Dirigé	7 ± 1 %
Diffusif	46 ± 3 %

Tableau 1: Proportion de temps passé par les GS dans chacune des quatre catégories de mouvement. L'incertitude sur chaque valeur correspond à l'erreur standard.

² Sauf mention contraire, c'est toujours cette méthode qui a été utilisée pour l'obtention des trajectoires des GS lors des analyses présentées dans ce manuscrit de thèse.

Catégorie	Caractéristique	
Arrêt	Durée moyenne	10 ± 1 s
Contraint	Durée moyenne	21 ± 1 s
	"Rayon" de la cage ³ , R	65 ± 4 nm
	Coefficient de diffusion du GS, D_{GS}	$33 \pm 5 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$
	Coefficient de diffusion de la cage, D_{cage}	$2 \pm 1 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$
Dirigé	Durée moyenne	$2,0 \pm 0,1$ s
	Vitesse de transport, v	$0.6 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{s}$
Diffusif	Durée moyenne	$10,4 \pm 0,6$ s
	Coefficient de diffusion, D	$24 \pm 3 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$

Tableau 2: Caractéristiques des différentes catégories de mouvement. L'incertitude sur chaque valeur correspond à l'erreur standard.

Cette caractérisation des trajectoires des GS met en évidence différents aspects intéressants de la dynamique de ces organites en périphérie des cellules BON.

i) Tout d'abord, contrairement aux études réalisées précédemment sur des cellules chromaffines d'origine bovine (Oheim and Stuhmer, 2000) ou sur celles de la lignée PC-12 (Steyer and Almers, 1999), les déplacements de nature dirigée sont ici loin d'être négligeables. Ainsi, même si la proportion de temps passé par les GS dans cette catégorie est faible, environ 37 % des trajectoires présentent au moins une période de mouvement dirigé.

ii) Au sujet des périodes d'arrêt, deux arguments indiquent que cette catégorie peut sans doute être englobée dans celle regroupant les mouvements de nature contrainte. D'une part, le coefficient de diffusion de la cage dans le cas des mouvements contraints ($D_{cage} = 2 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$) est proche de celui utilisé pour définir les périodes d'arrêt ($D_{min} = 1 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, voir la partie consacrée à la méthode d'analyse des trajectoires). Ceci suggère que ces périodes d'arrêt correspondent en fait à un mouvement restreint à l'intérieur d'une cage dont la taille est inférieure à la résolution spatiale de la méthode de suivi de particule utilisée. Dans ce cas, en effet, seuls les déplacements de la cage sont détectables. Sachant que l'incertitude sur la position des GS est d'environ 16 nm (quasi identique suivant x,

³Le rayon de la cage correspond à l'espace disponible autour du GS piégé dans cette cage ou à la longueur du lien retenant cet organite.

y ou z, voir Matériels et méthodes), le "rayon" de ces cages serait inférieur à $\sqrt{3} * 16 \approx 30$ nm. D'autre part, l'analyse des trajectoires des GS a mis en évidence l'existence de périodes fixes au sein de zones classées comme contraintes (ces zones ont alors été considérées comme globalement contraintes). Une telle observation, qui n'est pas surprenante étant donnée la faible différence entre D_{cage} et D_{min} , renforce l'idée selon laquelle les catégories associées aux périodes d'arrêt et aux mouvements contraints peuvent être regroupées.

La proportion de temps passé par les GS dans des cages dont la taille est proche de celle de ces organites est alors égale à $9 + 38 = 47\%$. Les mouvements des GS dans la zone juxta-membranaire sont donc en général très restreints ce qui est en accord avec les études réalisées précédemment sur d'autres modèles cellulaires (Steyer and Almers, 1999 ; Johns, Levitan et al., 2001 ; Manneville, Etienne-Manneville et al., 2003). Il est de plus intéressant de noter que la taille des cages mesurée dans le cas des cellules BON est proche de celles obtenues à partir de l'analyse des trajectoires décrites par les GS dans des cellules chromaffines d'origine bovine (Steyer and Almers, 1999 ; Johns, Levitan et al., 2001).

La région juxta-membranaire possède une architecture "anisotrope". Ainsi, alors que cette architecture évolue très rapidement suivant la direction z (passage du réseau de microtubules au cortex d'actine puis à la membrane plasmique en quelques centaines de nanomètres), elle est relativement homogène dans le plan (x,y). Il apparaissait donc intéressant d'analyser si une telle anisotropie avait des répercussions sur les mouvements des GS. Nous avons pour cela comparé les coefficients de diffusion moyens des GS (*i.e.* calculés pour les trajectoires entières, voir Matériels et méthodes) selon l'axe z (D_z) et dans le plan (x,y) (D_{xy}).

En moyenne, $D_{xy}/D_z = 6,4 \pm 1,2$ (528 GS issus de 6 cellules). Il semble donc que les GS soient nettement plus mobiles dans le plan (x,y) que suivant l'axe z. Une analyse plus détaillée montre cependant que ce sont essentiellement les GS présentant des périodes de mouvement dirigé sur de grandes distances qui sont caractérisés par un rapport D_{xy}/D_z élevé. Ceci suggère qu'au voisinage de la membrane, les mouvements de nature dirigée se déroulent préférentiellement dans le plan (x,y). L'interprétation de ce résultat est cependant délicate. En effet, les GS se déplaçant rapidement suivant l'axe z sont difficilement détectables par microscopie TIRF car ils passent des temps très courts au sein du champ d'évanescence. Il est donc possible que l'anisotropie observée pour les mouvements dirigés soit due au biais induit par les observations en TIRF.

Pour les GS ne décrivant pas de périodes dirigées, $D_{xy}/D_z = 2,5 \pm 0,2$. Par conséquent, une certaine anisotropie entre les mouvements dans le plan (x,y) et suivant l'axe z est toujours observable. Les GS considérés ici présentant des mouvements faibles (généralement inférieurs à un diamètre de GS, *i.e.* 200-250 nm), cette anisotropie n'est probablement pas un artéfact associé aux observations par microscopie TIRF. A titre de comparaison, pour une bille de 200 nm plongée dans un milieu homogène et localisée à environ 100 nm d'une interface plane, $D_{xy}/D_z \approx 3$ (Banerjee and Kihm, 2005). Il est donc possible que la mobilité plus importante des GS dans le plan (x,y) par rapport à celle mesurée suivant l'axe z soit simplement le reflet de leur proximité avec la membrane plasmique. Cette anisotropie des mouvements décrits par ces GS pourrait aussi être la conséquence de l'accrochage à la membrane plasmique d'une partie d'entre eux. En effet, si cet accrochage implique un blocage des mouvements des GS suivant l'axe z, en revanche, ces organites peuvent continuer à se déplacer dans le plan (x,y) dans le cas où le lien qui les fixe à la membrane peut diffuser au sein de cette membrane.

3.2.3. Les mouvements des granules liés à la membrane plasmique

3.2.3.1. La distance séparant les granules de la membrane plasmique ne peut pas être déterminée de manière simple

Afin d'analyser les mouvements de GS interagissant avec la membrane plasmique, il est nécessaire de sélectionner parmi l'ensemble des organites visibles en TIRF ceux étant effectivement au contact de cette membrane. Le moyen le plus direct de réaliser une telle sélection est sans doute de déterminer la distance séparant les GS observés de la membrane plasmique ("altitude" des GS).

Pour déterminer une telle altitude, il faut pouvoir comparer les positions des GS suivant l'axe z au sein d'une cellule, les GS les plus bas (axe z orienté vers le cytoplasme) étant alors vraisemblablement au contact de la membrane plasmique. Théoriquement, sur le même principe que celui utilisé pour évaluer les déplacements des GS suivant l'axe z (voir Matériels et méthodes), la comparaison des intensités de deux GS permet de définir la différence d'altitude entre ces organites (Figure 27). Cette approche suppose toutefois qu'à niveau d'excitation égal, deux GS différents présentent la même intensité intrinsèque. Il a été montré qu'une telle hypothèse n'était pas vérifiée du fait, probablement, des différences de nombre de molécules fluorescentes présentes au sein des GS (Johns, Levitan et al., 2001).

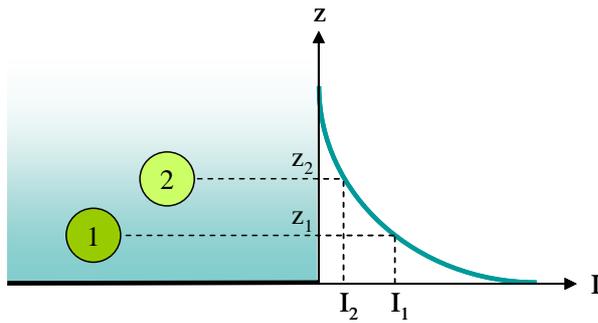


Figure 27 : Mesure de la différence d'altitude entre deux GS marqués. A partir de la mesure de I_1 et I_2 , la différence d'altitude est obtenue grâce à la relation $z_2 - z_1 = \delta \cdot \ln(I_1/I_2)$ où δ correspond à la profondeur de pénétration de l'onde évanescente d'excitation.

Les méthodes alternatives les plus efficaces utilisées afin de déterminer la distance entre un objet marqué en fluorescence et l'interface au niveau de laquelle se réfléchit le faisceau laser d'excitation ont recours à des mesures d'intensités pour différentes épaisseurs d'évanescence (Olveczky, Periasamy et al., 1997 ; Loerke, Preitz et al., 2000 ; Rohrbach, 2000). De telles méthodes sont cependant généralement assez complexes à mettre en place.

L'approche envisagée initialement consistant à évaluer l'altitude des GS afin d'analyser spécifiquement le mouvement de ceux interagissant avec la membrane plasmique apparaît donc relativement difficile à appliquer.

3.2.3.2. Analyse des mouvements des granules "résidants"

Il est toutefois possible de déterminer l'altitude des GS dans le cas particulier où ceux-ci fusionnent avec la membrane plasmique. Ainsi, en prenant comme référence ($z = 0$) la position en z de ces GS immédiatement avant l'exocytose, leur altitude peut être évaluée tout au long de leur trajectoire grâce à la mesure de leur intensité (voir Matériel et méthodes). Nous avons donc analysé spécifiquement des trajectoires se terminant par la fusion du GS suivi avec la membrane plasmique afin, en particulier, de caractériser les mouvements de ces GS lorsque ceux-ci sont au contact de la membrane cellulaire.

La stimulation de l'exocytose a été induite par photolibération de calcium (voir Matériels et méthodes) dans des cellules BON exprimant la protéine NPY-GFP de manière transitoire (clone N13, transfection par électroporation). Lors des acquisitions en microscopie TIRF, la fusion d'un GS avec la membrane plasmique se traduit par une élévation brutale de l'intensité du GS et l'apparition d'un halo fluorescent correspondant à la diffusion de la NPY-GFP dans le milieu extracellulaire (Figure 28 et Vidéo 2). Cette diffusion du marqueur vers l'extérieur du GS induit ensuite la disparition rapide de la fluorescence. Une telle signature

caractéristique des événements d'exocytose est similaire à celle observée dans d'autres modèles cellulaires (Steyer and Almers, 2001 ; Ohara-Imaizumi, Nakamichi et al., 2002). Deux phénomènes sont généralement évoqués pour expliquer l'augmentation initiale de fluorescence observée au moment de la fusion (Taraska, Perrais et al., 2003). D'une part, lors de leur libération dans le milieu extracellulaire, les marqueurs fluorescents se rapprochent de l'interface au niveau de laquelle est générée l'onde évanescente, ce qui conduit à une augmentation de leur intensité. D'autre part, l'ouverture du pore de fusion s'accompagne d'une neutralisation rapide du pH intragranulaire (avant la fusion ce pH est voisin de 5) du fait des échanges ioniques entre l'intérieur du GS et le milieu extracellulaire. Ceci induit une augmentation de la fluorescence de la GFP.

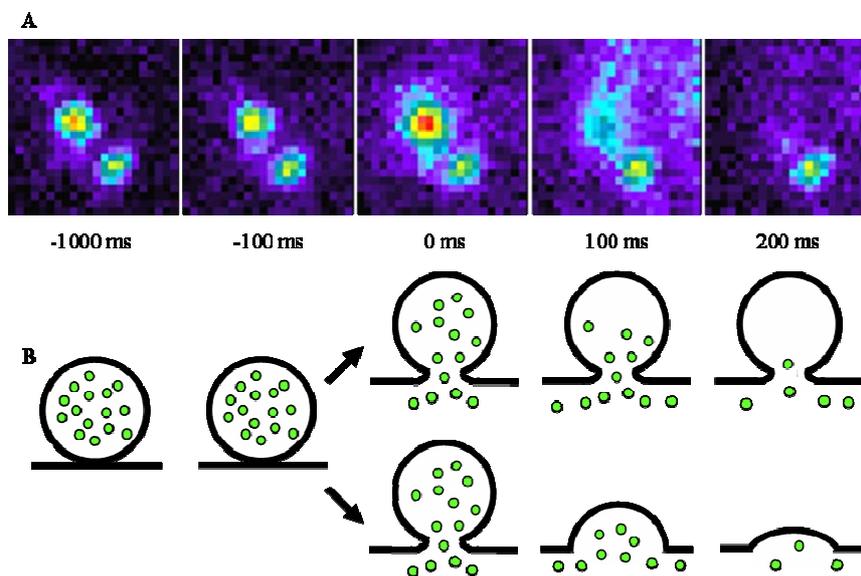


Figure 28 : Signature d'un événement d'exocytose. (A) Séquence d'images en pseudo-couleurs montrant l'augmentation d'intensité et l'apparition d'un halo fluorescent associées à la fusion d'un GS avec la membrane plasmique. La fluorescence disparaît ensuite rapidement du fait de la diffusion du marqueur dans le milieu extracellulaire (marquage NPY-GFP, $\delta = 100$ nm). (B) Description schématique du processus de fusion. Lors de l'ouverture du pore de fusion, les marqueurs fluorescents sont libérés puis diffusent dans le milieu extracellulaire. Cette libération des protéines intragranulaires peut se dérouler avec ou sans expansion progressive du pore de fusion

Après avoir détecté les événements d'exocytose au cours des acquisitions en microscopie TIRF grâce à leur signature caractéristique, nous avons déterminé les trajectoires tridimensionnelles de ces GS avant leur fusion avec la membrane plasmique. L'analyse de ces trajectoires a permis la mise en évidence de deux types de comportement. La majorité des GS (~80 %) subissant une exocytose sont déjà très proches de la membrane plasmique au début de l'acquisition et restent au niveau de cette membrane jusqu'au moment de la fusion. Ces GS, dont l'altitude n'excède jamais 50 nm ($z < 50$ nm), sont dits "résidants" (Figure 29A). La seconde catégorie de GS concerne ceux explorant des altitudes supérieures à 50 nm avant de

fusionner avec la membrane, ce sont les "arrivants" (~20 % des événements, voir Figure 29B pour un exemple).

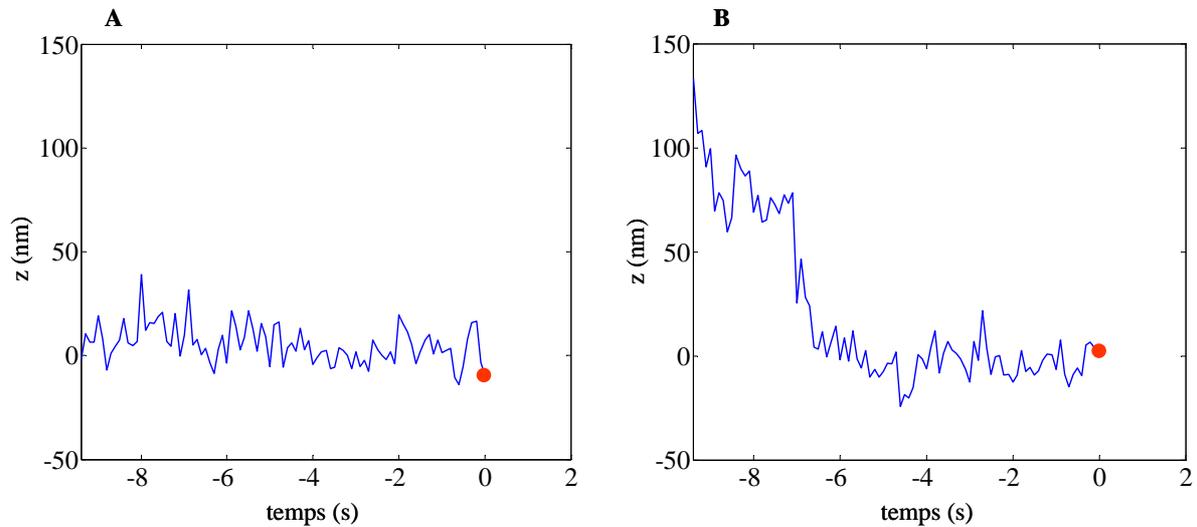


Figure 29: Les deux types de comportements décrits par les GS avant leur fusion avec la membrane plasmique. Exemples d'un GS résidant (A) et d'un GS arrivant (B). L'origine des temps coïncide avec l'instant de la fusion (marquée par le point rouge). L'altitude de référence ($z = 0$) correspond à l'altitude moyenne des GS au cours de la dernière seconde précédant l'exocytose. Acquisitions à 10 Hz, $\delta = 100$ nm.

Ces deux catégories de GS ont été étudiées en détail par Samuel Tran au cours de sa thèse effectuée au sein du laboratoire. Nous nous sommes ici restreints à la caractérisation des mouvements décrits par les GS résidants grâce à la méthode d'analyse des trajectoires décrite plus haut. La proportion de temps passé par les GS résidants dans chacune des quatre catégories de mouvement a ainsi été calculée (Tableau 3, 65 GS, issus de 23 cellules, acquisitions à 10 Hz, $\delta = 100$ nm).

Catégorie	Proportion de temps
Arrêt	31 ± 8 %
Contraint	54 ± 6 %
Dirigé	1 ± 1 %
Diffusif	15 ± 6 %

Tableau 3: Proportion de temps passé par les GS résidants dans chacune des quatre catégories de mouvement. L'incertitude sur chaque valeur correspond à l'erreur standard.

Cette analyse montre que les GS résidants présentent essentiellement des mouvements très restreints. Ainsi, la proportion de temps passé par ces organites dans les classes correspondant à ce type de déplacement (périodes d'arrêt et mouvement contraint) est égale à 85 %. En comparaison, cette proportion n'était que de 47 % lors de l'analyse des mouvements de l'ensemble des vésicules visibles dans le champ d'évanescence (voir plus haut). D'après la définition donnée précédemment des GS résidants, il est vraisemblable que ces GS soient liés à la membrane plasmique bien que l'on ne puisse pas exclure des décrochements ponctuels. Par conséquent, l'accrochage à cette membrane se traduirait par une restriction forte des mouvements des GS.

Cette analyse suggère également que les catégories correspondant aux périodes d'arrêt et aux mouvements contraints sont toutes deux associées à des GS liés à la membrane plasmique. Une telle observation, associée aux remarques précédentes au sujet de ces deux catégories (voir la partie 3.2.2. intitulée "Analyse globale des trajectoires des granules de sécrétion en périphérie de la cellule"), justifie le regroupement de ces deux catégories au cours des prochaines analyses de la dynamique des GS.

Nous avons également déterminé les caractéristiques des périodes d'arrêt et de mouvements contraints (Tableau 4). Il apparaît en particulier que le rayon des cages ainsi que le coefficient de diffusion des GS au sein de ces cages sont nettement plus faibles pour les GS résidants, considérés comme liés à la membrane plasmique, que pour les GS se déplaçant dans des cellules au repos (voir Tableau 2). De plus, les durées moyennes des périodes d'arrêt et de mouvements contraints sont plus élevées dans le cas des GS résidants.

Catégorie	Caractéristique	
Arrêt	Durée moyenne	15 ± 2 s
Contraint	Durée moyenne	26 ± 3 s
	"Rayon" de la cage, R	38 ± 2 nm
	Coefficient de diffusion du GS, D_{GS}	$8 \pm 2 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$
	Coefficient de diffusion de la cage, D_{cage}	$0,7 \pm 0,2 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$

Tableau 4: Caractéristiques des périodes d'arrêt et de mouvement contraint pour les GS résidants.
L'incertitude sur chaque valeur correspond à l'erreur standard.

Ces différences peuvent être interprétées de deux manières. D'une part, elles peuvent refléter le fait que les GS à la membrane ne représentent qu'une partie de ceux présentant des mouvements de nature contrainte. Ainsi, des GS localisés au sein du cortex d'actine pourraient décrire des mouvements contraints dans des cages plus grandes que celles correspondant aux GS liés à la membrane. D'autre part, il est aussi possible que l'élévation de calcium lors de la stimulation induise une modification des caractéristiques des mouvements des GS, et notamment de celles des mouvements contraints. En particulier, il pourrait exister deux états d'accrochage des GS à la membrane plasmique correspondant aux phases d'accostage et d'arrimage définies précédemment (voir Figure 6). Dans les cellules au repos, les GS seraient liés à la membrane de manière relativement lâche par l'intermédiaire de facteurs d'accostage tandis que dans les cellules stimulées, la mise en place du complexe SNARE permettrait d'établir un lien plus étroit entre ces GS et la membrane plasmique. Cette interprétation est confortée par les observations réalisées par Samuel Tran au cours de sa thèse. Samuel a en effet observé que certains GS situés à une altitude de 20-40 nm passaient brutalement à une altitude nulle environ deux secondes avant l'exocytose (Figure 30). Un tel rapprochement rapide en direction de la membrane plasmique a également observé pour les vésicules synaptiques dans des neurones bipolaires (Zenisek, Steyer et al., 2000). Ce phénomène pourrait correspondre à la transition entre la phase d'accostage et celle d'arrimage.

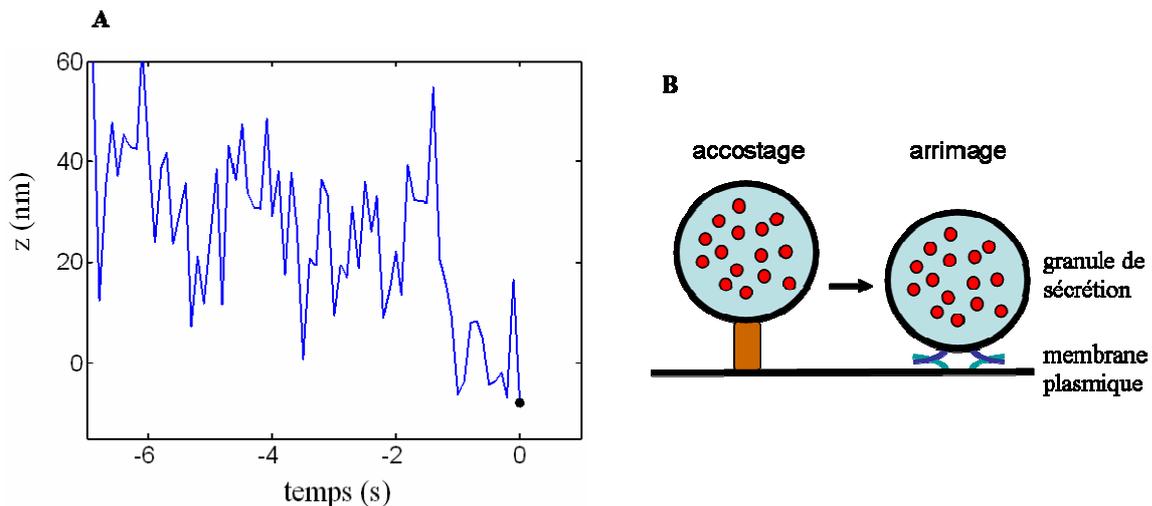


Figure 30 : Certains granules passent brutalement d'une altitude de 20-40 nm à une altitude nulle environ 2 secondes avant la fusion. (A) Variations d'altitude d'un GS au cours des secondes précédant l'exocytose (marquée par un point noir). Initialement à une altitude d'environ 30 nm, ce GS se rapproche rapidement de la membrane environ 1 seconde avant la fusion. (B) Interprétation possible du rapprochement décrit par les GS : lors du passage de la phase d'accostage à la phase d'arrimage, les GS se rapprochent de la membrane plasmique.

3.2.3.3. Analyse des mouvements dans les cellules "décalottées"

Afin de tenter de confirmer la corrélation entre mouvement restreint (GS arrêté ou présentant un mouvement contraint) et accrochage à la membrane plasmique, nous avons étudié la dynamique des GS dans le cas de cellules dites "décalottées" (Figure 31). Le principe de cette approche consiste à appliquer une contrainte mécanique (sonication, flux de cisaillement...) sur des cellules adhérentes afin d'induire leur arrachement de la lamelle sur laquelle elles sont cultivées. Au cours d'un tel arrachement, la portion de membrane adhérent au substrat peut, dans certains cas, rester fixée sur celui-ci (Figure 31). De plus, certains des GS accrochés sur cette portion de membrane avant l'application de la contrainte mécanique restent en place lorsque les cellules sont ainsi décalottées. Cette méthode, décrite pour la première fois il y a plus de trente ans (Mazia, Schatten et al., 1975 ; Vacquier, 1975), a été mise en œuvre afin d'étudier différents mécanismes comme la formation des "puits" recouverts de clathrine (Moore, Mahaffey et al., 1987) ou la fusion des GS avec la membrane plasmique (Avery, Ellis et al., 2000 ; Lang, Bruns et al., 2001). Elle permet un accès direct à la face interne de la membrane plasmique. De plus, au même titre que les cellules perméabilisées, ces cellules décalottées constituent un système ouvert dans lequel la composition du milieu mimant le cytosol est contrôlée précisément. En ce qui nous concerne, l'utilisation des cellules décalottées présente l'avantage de pouvoir étudier spécifiquement des GS accrochés à la membrane plasmique.

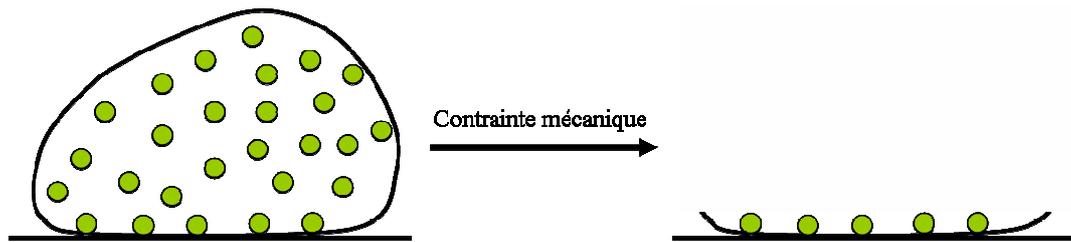


Figure 31: Obtention des cellules décalottées. L'application d'une contrainte mécanique sur les cellules provoque leur arrachement, la membrane adhérente au substrat restant fixée sur celui-ci. Ces morceaux de membrane, sur lesquels restent fixés certains GS, correspondent aux cellules dites décalottées.

Les différentes équipes travaillant sur des cellules décalottées ont développé différentes méthodes afin d'obtenir de telles portions de membrane adhérentes au substrat (pour une revue, voir (Heuser, 2000)). Celle mise au point au laboratoire se déroule en deux étapes. Les cellules sont tout d'abord traitées par la latrunculine B, une drogue induisant la dépolymérisation du réseau d'actine (Spector, Shochet et al., 1983). Elles sont ensuite soumises à un flux de cisaillement par ajout et aspiration successifs de milieu (pour plus de détails, voir Matériels et méthodes). Le rendement de cette méthode est très variable et généralement assez faible.

Nous avons contrôlé l'état physiologique des cellules décalottées de deux manières différentes. D'une part, nous avons vérifié par immunomarquage que la protéine SNAP25 était présente au niveau de ces portions de membrane adhérentes (Figure 32B). D'autre part, lors de l'ajout de calcium à une concentration de 30 μM dans le milieu baignant les cellules, nous avons observé quelques rares événements d'exocytose. Ces deux contrôles indiquent que ces portions de membrane adhérentes conservent au moins partiellement leurs propriétés physiologiques. De plus, grâce à un marquage à la rhodamine-phalloïdine, nous avons vérifié que les cellules décalottées ne présentaient plus de réseau d'actine juxta-membranaire. Ceci indique que la majeure partie des GS visibles dans ces cellules décalottées sont bien accrochés sur la membrane plasmique.

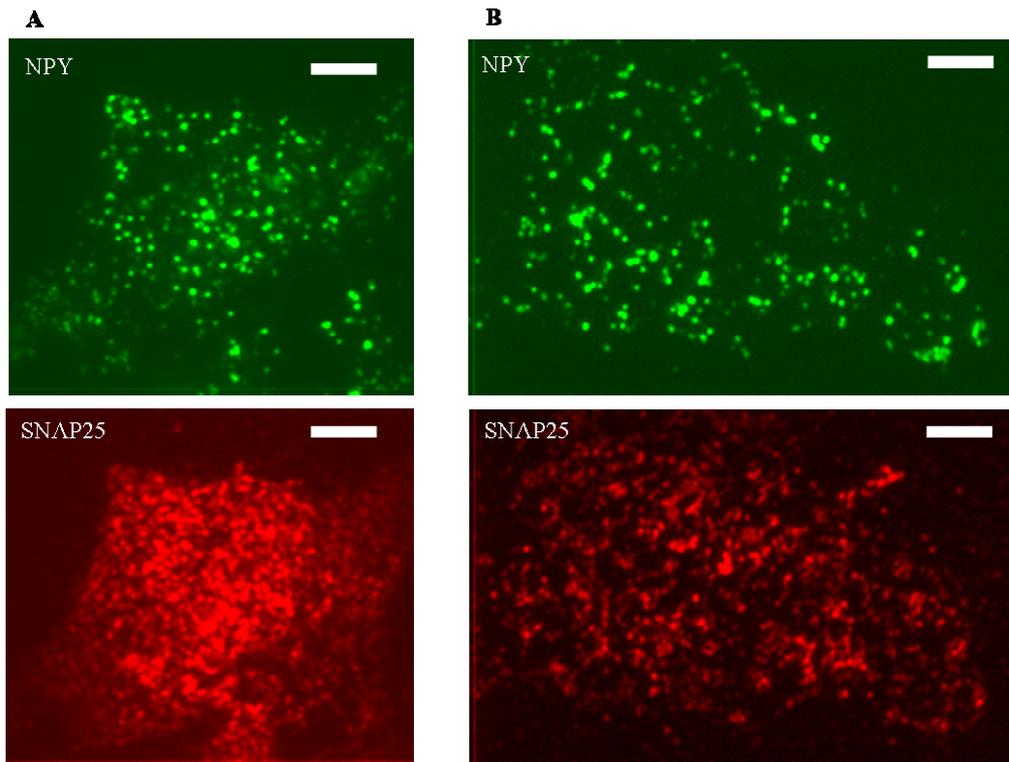


Figure 32: Comparaison des cellules entières et décalottées. Cellules BON entière (A) ou décalottée (B) exprimant de manière stable la protéine NPY-GFP (canal vert) et marquée par un anticorps anti-SNAP25 (canal rouge). Observations réalisées en microscopie TIRF ($\delta = 100$ nm). Barre d'échelle: 4 μ m

Nous avons tout d'abord comparé la densité de GS observables sur cellules décalottées à celle obtenue pour des cellules "entières" observées par microscopie TIRF avec une épaisseur d'évanescence de 200 nm. La densité de GS est égale à 32 ± 9 GS / $100 \mu\text{m}^2$ (clone BC6, 332 GS issus de 6 cellules) pour les cellules décalottées et à 78 ± 6 GS / $100 \mu\text{m}^2$ pour les cellules entières (clone BC6, 863 GS issus de 6 cellules). Ceci suggère que lors des observations en microscopie TIRF avec une épaisseur d'évanescence de 200 nm, au moins 40 % des GS (rapport des densités de GS entre cellules décalottées et entières) sont au contact de la membrane plasmique.

De plus, nous avons analysé les trajectoires des GS dans ces cellules décalottées⁴. Ces GS présentent quasi exclusivement des mouvements très restreints. La proportion de temps passé dans la catégorie regroupant les périodes d'arrêt et les mouvements contraints est ainsi égale à 96 ± 2 % (clone BC6, 21 GS issus de 4 cellules, acquisitions à 10 Hz). Ce résultat confirme donc l'idée selon laquelle les GS liés à la membrane présentent des mouvements très limités.

⁴ Le milieu baignant ces cellules (voir Matériels et méthodes) est dépourvu de protéines et de calcium libre. En revanche, il contient de l'ATP (2 mM) et du GTP (0,3 mM).

3.2.4. Les mouvements des granules liés au cortex d'actine

3.2.4.1. Les observations en double marquage

Le recours à un marquage simultané de l'actine et des GS *via* deux marqueurs fluorescents de "couleurs" différentes nous a permis de visualiser directement les interactions entre ces organites et le cytosquelette cortical d'actine. Ainsi, des cellules BON exprimant à la fois les protéines chimériques actine-GFP et NPY-mRFP (cellules BON non clonées, transfection par électroporation) ont été observées par microscopie TIRF ($\delta = 100$ nm). Les séquences d'images obtenues mettent en évidence l'existence d'un cytosquelette d'actine dense et dynamique dans la région juxta-membranaire (Vidéo 3). Il apparaît de plus que certains GS semblent suivre les mouvements du réseau d'actine (Figure 33 et Vidéo 4), suggérant que ces organites sont piégés au sein de ce réseau ou liés aux filaments d'actine. En revanche, nous n'observons que très rarement des déplacements de GS le long de ces filaments d'actine.

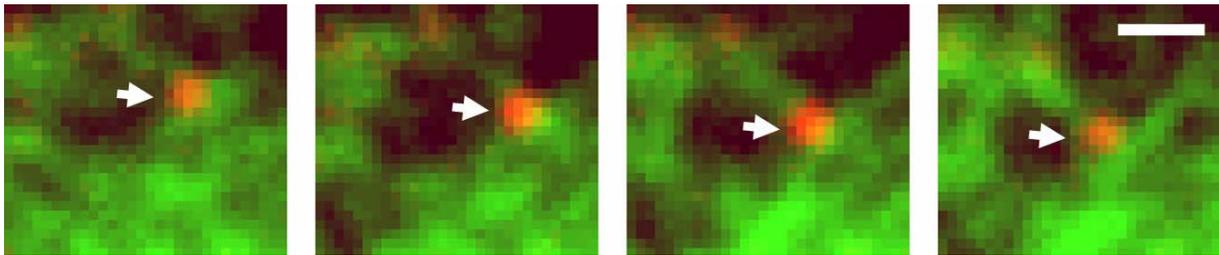


Figure 33: Exemple d'un GS suivant les mouvements du réseau d'actine. Détail d'une cellule BON exprimant l'actine-GFP et la NPY-mRFP. Observations réalisées en microscopie TIRF ($\delta = 100$ nm). Acquisition alternée dans les canaux vert et rouge à une cadence de 1 Hz puis superposition des images (voir Matériels et méthodes). Barre d'échelle: 1 μ m.

Afin de confirmer ces observations, nous avons cherché à comparer les mouvements du cortex d'actine aux trajectoires décrites par les GS. L'analyse de la dynamique du cytosquelette cortical a été effectuée en collaboration avec l'équipe dirigée par Paul Wiseman au sein de l'Université McGill (Montréal, Canada). Nous avons ainsi appliqué la méthode de corrélation d'images (voir Matériels et méthodes ainsi que (Hebert, Costantino et al., 2005)) développée par cette équipe aux séquences obtenues par microscopie TIRF afin d'obtenir la "carte des vitesses de déplacement" du réseau d'actine dans le plan de focalisation du microscope (Figure 34). Cette carte donne accès à la direction et à l'amplitude des vitesses de déplacement du cytosquelette moyennées sur toute la séquence d'images. Nous avons donc étudié spécifiquement des régions pour lesquelles le réseau d'actine présentait un mouvement relativement uniforme pendant la durée de l'acquisition. La superposition des trajectoires

décrites par les GS à la carte des vitesses de déplacement du cytosquelette cortical au niveau de ces régions (5 régions issues de 5 cellules différentes) montre qu'il existe une corrélation entre les mouvements de ces organites et ceux du réseau d'actine (Figure 33). Certaines trajectoires présentent en effet une composante "guidée" s'alignant avec les mouvements du cytosquelette. De plus, la vitesse de transport des GS suivant cette direction privilégiée (25 ± 4 nm/s, 80 GS) est similaire à celle mesurée localement pour l'actine (23 ± 3 nm/s).

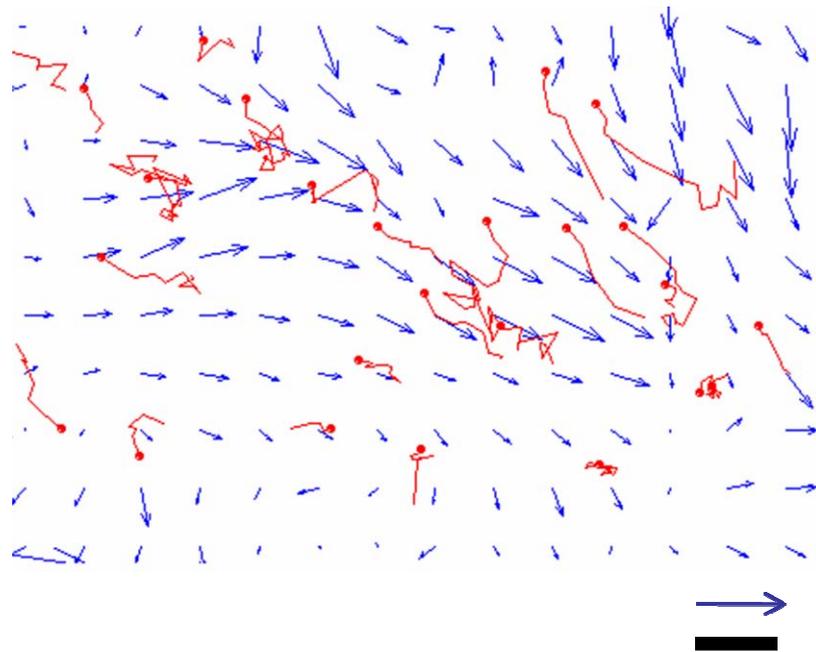


Figure 34: Corrélation entre les mouvements des GS et ceux du réseau d'actine. Les trajectoires décrites par les GS (représentées en rouge, le point marquant le début de la trajectoire) ont été superposées à la carte des vitesses de déplacement du cortex d'actine (flèches bleues indiquant la direction et l'amplitude moyenne des vitesses de déplacement). Certains GS semblent suivre les mouvements de l'actine. Flèche d'échelle : 50 nm/s. Barre d'échelle : 500 nm.

Nous avons ensuite vérifié qu'une telle corrélation entre les mouvements des GS et ceux de l'actine n'était pas spécifique aux régions sélectionnées lors de l'analyse précédente. Pour cela, nous avons déterminé *via* la méthode de corrélation d'images la carte des vitesses de déplacements des GS pour des cellules entières. Cette carte a été superposée à celle obtenue pour l'actine et nous avons mesuré l'angle θ entre les vecteurs vitesse associés aux GS et ceux correspondant à l'actine (Figure 35). L'histogramme de la distribution de ces angles met en évidence qu'une proportion non négligeable de GS suit les déplacements du réseau d'actine (Figure 35).

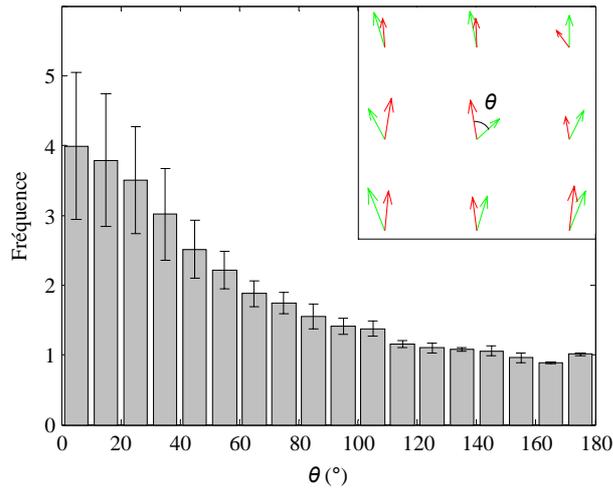


Figure 35 : Histogramme de la distribution des angles θ entre les vecteurs vitesse associés au GS et ceux correspondant aux mouvements de l'actine. L'encart représente la manière dont l'angle θ est mesuré, les flèches rouges et vertes correspondant respectivement aux vitesses de déplacement des GS et du réseau d'actine. La fréquence obtenue pour des angles $\theta < 45^\circ$ est nettement supérieure à celle associée à des angles $\theta > 90^\circ$. Ceci met en évidence la corrélation existant entre les mouvements des GS et ceux du réseau d'actine.

Etant donnée la faible cadence de prise d'images (acquisitions alternées dans les canaux vert et rouge à une cadence comprise entre 0,5 Hz et 4 Hz) utilisée lors des acquisitions en double marquage, nous n'avons pas pu caractériser les mouvements des GS semblant liés au cortex d'actine *via* notre méthode d'analyse des trajectoires. Ces mouvements, mis en évidence grâce à la superposition des trajectoires des GS à la carte des vitesses de déplacements du réseau d'actine, semblent cependant présenter une composante dirigée. Toutefois, ceci est sans doute dû au fait que cette analyse a été réalisée spécifiquement dans des zones pour lesquelles le cytosquelette d'actine possédait des déplacements uniformes dans une direction particulière. En restreignant notre analyse à de telles zones, nous avons mis en évidence une population particulière de GS liés à l'actine, à savoir ceux présentant une tendance au mouvement dirigé. L'observation des acquisitions en double marquage montrant que seules certaines régions particulières du cytosquelette d'actine se caractérisent par des déplacements suivant une direction privilégiée, il est probable que la majorité des GS liés à l'actine ne présentent pas une telle tendance au mouvement dirigé. De plus, la vitesse de transport mesurée pour ces organites (~ 20 nm/s) est très inférieure à celle déterminée précédemment pour la classe dirigée (~ 600 $\mu\text{m/s}$, voir Tableau 2). Il semble donc peu vraisemblable que cette classe de mouvement puisse être associée aux GS se déplaçant avec le réseau d'actine.

Le coefficient de diffusion moyen D_{act} calculé à partir des trajectoires tridimensionnelles des GS semblant fixés au cortex d'actine est égal à $15 \pm 4 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Du fait de la faible cadence de prise d'images utilisée lors de ces acquisitions, D_{act} caractérise la composante lente des mouvements des GS (temps caractéristique de quelques secondes). Afin de déterminer si ces mouvements décrits par les GS se déplaçant avec le réseau d'actine peuvent correspondre à ceux appartenant à la classe contrainte, il faut par conséquent comparer D_{act} au coefficient de

diffusion de la cage (D_{cage}) et non pas à celui des GS à l'intérieur de ces cages (D_{GS}). Il apparaît alors que D_{act} est nettement supérieur à D_{cage} (voir Tableau 2), suggérant que les GS interagissant avec l'actine ne correspondent pas à la classe contrainte. En revanche, D_{act} est proche du coefficient de diffusion caractérisant la catégorie diffusive. Cette dernière catégorie pourrait donc être associée aux GS fixés au cytosquelette cortical.

3.2.4.2. Analyse de l'effet de la jasplakinolide

Afin de tenter de valider les résultats obtenus en double marquage, nous avons analysé l'impact sur la dynamique des GS d'un traitement des cellules par la jasplakinolide, une drogue stabilisant les filaments d'actine (Bubb, Senderowicz et al., 1994). Nous avons tout d'abord contrôlé l'effet d'un tel traitement sur le cytosquelette cortical dans des cellules exprimant simultanément l'actine-GFP et la NPY-mRFP. Les séquences d'images réalisées en microscopie TIRF (Vidéos 5 et 6) montrent que si en présence de cette drogue (traitement pendant 5 minutes, à une concentration de 2 μ M), l'architecture du réseau d'actine semble peu modifiée, en revanche sa dynamique est presque totalement bloquée. Ces observations indiquent également que le traitement des cellules à la jasplakinolide semble inhiber les mouvements des GS.

L'analyse précise de l'effet de la jasplakinolide sur la dynamique des GS en périphérie de la cellule a ensuite été réalisée (clone BC6, traitement à 2 μ M pendant 5 min). Le traitement des cellules par l'intermédiaire de cet agent pharmacologique se traduit tout d'abord par une faible diminution de la densité de GS visibles par microscopie TIRF (-15 ± 11 %, analyse sur 7 cellules, 863 GS avant traitement et 667 GS après, $\delta = 200$ nm). Nous avons également comparé les mouvements décrits par les GS avant et après le blocage de la dynamique du réseau d'actine par la jasplakinolide. La proportion de temps passé par ces organites dans chacune des différentes catégories de mouvement a ainsi été calculée (Tableau 5, analyse sur 3 cellules, 253 GS avant traitement et 151 GS après, acquisitions à 10 Hz, $\delta = 200$ nm).

Catégorie	Proportion de temps avant traitement	Proportion de temps après traitement	Variation relative ⁵
Arrêt ou contraint	52 ± 7 %	76 ± 3 %	+ 50 ± 15 %
Dirigé ⁶	3 ± 2 %	2 ± 1 %	- 43 ± 9 %
Diffusif	44 ± 5 %	22 ± 2 %	- 53 ± 2 %

Tableau 5: Proportion de temps passé par les GS dans chaque catégorie de mouvement avant et après un traitement à la jasplakinolide (2 µM, 5 min). L'incertitude sur chaque valeur correspond à l'erreur standard.

L'inhibition de la dynamique du réseau d'actine grâce à un traitement des cellules par la jasplakinolide provoque principalement un blocage des mouvements diffusifs, suggérant que cette catégorie diffusive correspond aux GS liés au cortex d'actine. En conditions témoins, ces GS suivent les déplacements du cytosquelette d'actine tandis qu'en présence de jasplakinolide, ils sont bloqués au sein d'un réseau figé.

Le traitement des cellules par la jasplakinolide se traduit également par une diminution du temps passé par les GS dans la catégorie dirigée. Il apparaît donc qu'en périphérie de la cellule, le déplacement des GS sur de grandes distances le long de rails correspondant probablement aux microtubules (voir plus loin) nécessite que le cortex d'actine soit dynamique. Ce résultat, au même titre que le blocage des mouvements diffusifs observés en présence de jasplakinolide, indique que c'est la réorganisation continue du réseau cortical d'actine qui permet aux GS de pénétrer au sein de ce réseau et ainsi sans doute d'atteindre la membrane plasmique. Ceci est en accord avec les études réalisées sur d'autres types de cellules neuroendocrines montrant que le traitement des cellules par des drogues stabilisant les filaments d'actine induit à la fois une inhibition de la mobilité des GS et de l'exocytose (Ng, Lu et al., 2002 ; Tsuboi, DaSilva Xavier et al., 2003).

⁵ Ces valeurs correspondent à la variation relative, moyennée sur les différentes cellules analysées, entre la proportion de temps passé par les GS dans chaque catégorie de mouvement avant et après le traitement par la jasplakinolide.

⁶ Pour cette étude, les trajectoires des GS dans le plan (x,y) ont été déterminées *via* un algorithme de suivi automatique de particules (voir Matériels et méthodes). Les mouvements de nature dirigée sont cependant détectés moins efficacement par cet algorithme que par la méthode semi-automatique utilisée généralement. Ceci explique la faible proportion de temps passé par les GS dans la catégorie dirigée obtenue lors de cette analyse.

3.2.4.3. Analyse de l'effet de la latrunculine B

Nous avons également étudié l'effet de la latrunculine B, un agent pharmacologique induisant la dépolymérisation des filaments d'actine, sur les mouvements décrits par les GS. Après 5 minutes de traitement par cette drogue, utilisée à une concentration de 25 μM , le réseau cortical d'actine, visualisé en microscopie TIRF après un marquage par la rhodamine-phalloïdine, apparaît massivement dépolymérisé (Figure 36).

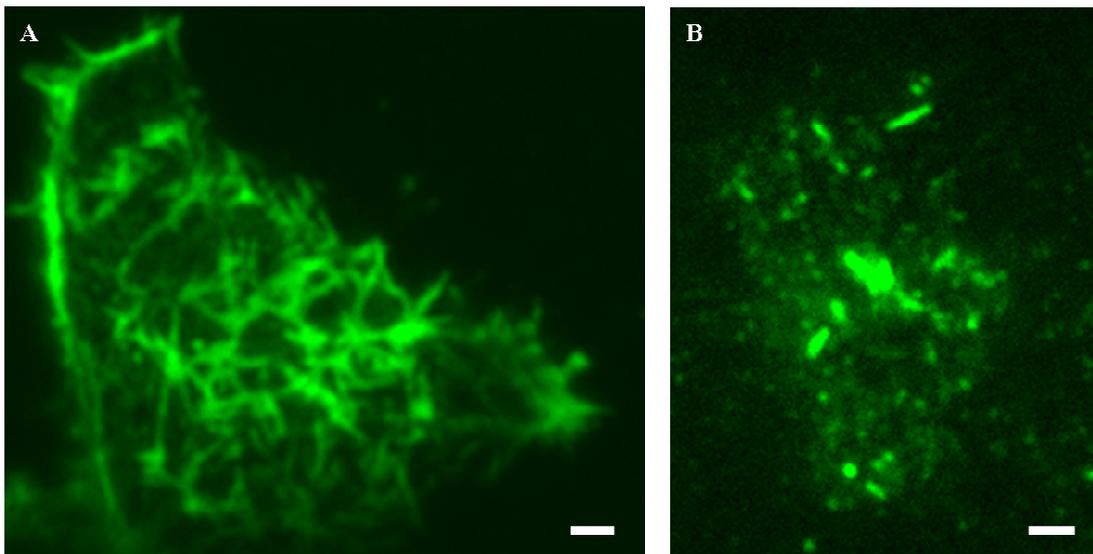


Figure 36: Effet d'un traitement des cellules à la latrunculine B sur le cortex d'actine. Cytosquelette d'actine marqué par la rhodamine-phalloïdine dans des cellules BON en conditions témoins (A) ou après 5 minutes de traitement par la latrunculine B utilisée à une concentration de 25 μM (B). Observations réalisées en microscopie TIRF ($\delta = 200 \text{ nm}$). Barre d'échelle: 2 μm .

Le traitement des cellules (clone BC6, traitement à 25 μM pendant 5 min) par la latrunculine B se traduit tout d'abord par une diminution de $23 \pm 3 \%$ de la densité de GS visibles dans le champ d'évanescence (analyse sur 4 cellules, 340 GS avant traitement et 241 GS après, $\delta = 200 \text{ nm}$). De plus, ce traitement ne modifie pas la proportion de temps passé par les GS dans chacune des différentes catégories de mouvement (Tableau 6, analyse sur 3 cellules, 269 GS avant traitement et 195 GS après, acquisitions à 10 Hz, $\delta = 200 \text{ nm}$).

Catégorie	Proportion de temps avant traitement	Proportion de temps après traitement	Variation relative
Arrêt ou contraint	41 ± 7 %	37 ± 9 %	- 9 ± 5 %
Dirigé	8 ± 1 %	7 ± 1 %	- 6 ± 11 %
Diffusif	52 ± 6 %	56 ± 8 %	+ 7 ± 6 %

Tableau 6: Proportion de temps passé par les GS dans chaque catégorie de mouvement avant et après un traitement à la latrunculine B (25 µM, 5 min). L'incertitude sur chaque valeur correspond à l'erreur standard.

L'analyse des caractéristiques de chacune de ces catégories montre enfin que seul le coefficient de diffusion associé aux périodes diffusives est modifié par la dépolymérisation du réseau d'actine. Ce coefficient de diffusion passe ainsi $19 \pm 2 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ en conditions témoins, à $28 \pm 7 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($p < 0,01$) en présence de latrunculine B.

La dépolymérisation du réseau d'actine semble donc avoir un impact relativement modeste sur les mouvements des GS en périphérie de la cellule. Il est toutefois intéressant de noter que l'effet le plus marquant de ce traitement concerne spécifiquement la catégorie diffusive, renforçant ainsi l'idée selon laquelle cette classe de mouvement est associée aux GS interagissant avec le réseau d'actine.

3.2.5. Les mouvements des granules liés aux microtubules

3.2.5.1. Les observations en double marquage

Afin de visualiser directement les interactions entre les GS et le cytosquelette de microtubules en périphérie de la cellule, des cellules BON exprimant à la fois les protéines chimériques tubuline-GFP et NPY-mRFP (cellules BON non clonées, transfection par électroporation) ont ainsi été observées par microscopie TIRF ($\delta = 200 \text{ nm}$). Les séquences d'images (Vidéo 7) obtenues mettent tout d'abord en évidence la densité relativement importante de microtubules en périphérie de la cellule. Contrairement à l'image classique de la zone juxta-membranaire dans laquelle les microtubules ne pénètrent pas au sein du cortex d'actine (voir Figure 19), il semble ici que l'extrémité de ces microtubules puisse atteindre la membrane plasmique. Nous avons vérifié que ce résultat n'était pas dû à la surexpression de la tubuline-GFP au sein des

cellules. En effet, le marquage des microtubules dans des cellules non transfectées grâce à un anticorps anti-tubuline donne le même type d'images (voir Figure 38A).

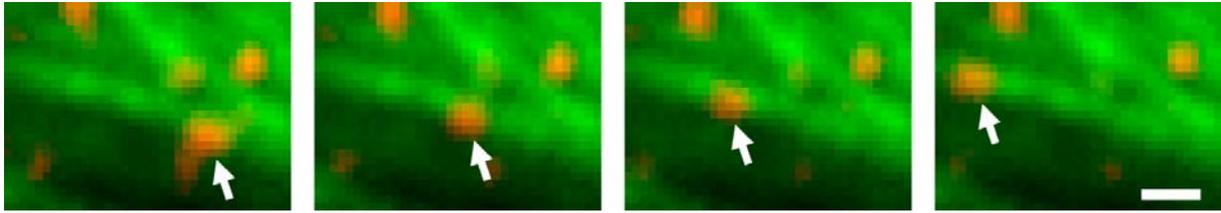


Figure 37: Exemple d'un GS se déplaçant le long d'un microtubule. Détail d'une cellule BON exprimant la tubuline-GFP et la NPY-mRFP. Observations réalisées en microscopie TIRF ($\delta = 200$ nm). Acquisition alternée dans les canaux vert et rouge à une cadence de 4 Hz. La première image obtenue dans le canal vert a ensuite été superposée à la séquence d'images dans le canal rouge. Barre d'échelle: 1 μ m.

Les acquisitions en double marquage montrent de plus que la grande majorité des GS présentant une mobilité importante se déplacent le long du réseau de microtubules (Figure 37 et Vidéos 7 et 8). Ces mouvements sur de grandes distances semblent être de nature dirigée. Toutefois, la cadence de prise d'image relativement faible (acquisitions alternées dans les canaux vert et rouge à une cadence de 4 Hz) utilisée lors de ces acquisitions ne permet pas de caractériser ces trajectoires grâce à la méthode d'analyse décrite précédemment.

Afin d'effectuer une telle caractérisation, nous avons modifié le protocole d'acquisition. Utilisant le fait que le réseau de microtubules est relativement stable dans le temps (voir Vidéo 7), nous avons réalisé des acquisitions constituées d'une première observation dans le canal vert (microtubules) suivie par une séquence d'images dans le canal rouge (GS, cadence de 10 Hz durant 30 s). La superposition de l'image du réseau de microtubules à la séquence correspondant aux GS a permis de sélectionner les organites se déplaçant le long de ce réseau. L'analyse des trajectoires décrites par ces organites montre alors qu'environ 90 % d'entre elles sont de nature dirigée (45 GS issus de 8 cellules).

La vitesse de déplacement associée à ces mouvements le long des microtubules a également été mesurée. Elle est égale à $0,64 \pm 0,06$ μ m/s (141 GS issus de 37 cellules), ce qui est très proche de la vitesse de transport associée aux mouvements dirigés déterminée lors de l'analyse globale de la dynamique des GS présents en périphérie de la cellule (voir Tableau 2). L'ensemble de ces observations suggère que la majorité des mouvements de nature dirigée décrits par les GS dans la région juxta-membranaire correspondent à des déplacements le long des microtubules.

3.2.5.2. Analyse de l'effet du nocodazole

Afin de confirmer les résultats obtenus en double marquage, nous avons étudié l'effet du nocodazole, un agent pharmacologique induisant la dépolymérisation des microtubules (Samson, Donoso et al., 1979), sur les mouvements décrits par les GS. Le traitement des cellules BON par cette drogue, utilisée à une concentration de 30 μM , pendant 10 minutes permet un désassemblage important du réseau de microtubules (Figure 38). Il convient toutefois de noter que ce désassemblage n'est pas total. Des traitements sur de plus longues durées permettent une dépolymérisation quasi complète des microtubules mais induisent également un décollement des cellules.

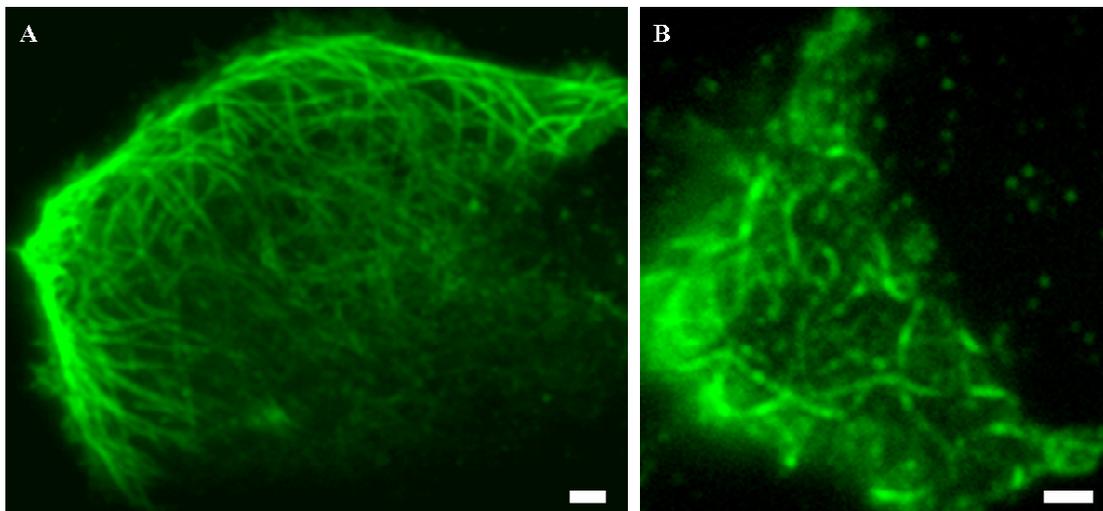


Figure 38: Effet d'un traitement au nocodazole sur le réseau cortical de microtubules. Réseau de microtubules marqué par un anticorps anti-tubuline dans des cellules BON en conditions témoins (A) ou après 10 minutes de traitement par le nocodazole utilisé à une concentration de 30 μM (B). Observations réalisées en microscopie TIRF ($\delta = 200 \text{ nm}$). Barre d'échelle: 2 μm .

L'effet du traitement des cellules au nocodazole (clone BC6, traitement à 30 μM pendant 10 min) sur la densité de GS observables en microscopie TIRF ($\delta = 200 \text{ nm}$) a tout d'abord été déterminé. Il apparaît ainsi qu'un tel traitement induit une diminution de $23 \pm 5 \%$ de cette densité (analyse sur 5 cellules, 495 GS avant traitement et 389 GS après). Nous avons ensuite comparé les mouvements décrits par les GS dans ces mêmes cellules avant et après dépolymérisation des microtubules. La proportion de temps passé par ces organites dans chacune des différentes catégories de mouvement a ainsi été calculée (Tableau 7, analyse sur 3 cellules, 251 GS avant traitement et 191 GS après, acquisitions à 10 Hz).

Catégorie	Proportion de temps avant traitement	Proportion de temps après traitement	Variation relative
Arrêt ou contraint	53 ± 3 %	70 ± 4 %	+ 32 ± 6 %
Dirigé	5 ± 1%	2 ± 1 %	- 53 ± 4 %
Diffusif	42 ± 2 %	28 ± 4 %	- 33 ± 8 %

Tableau 7: Proportion de temps passé par les GS dans chaque catégorie de mouvement avant et après un traitement au nocodazole (25 μ M, 10 min). L'incertitude sur chaque valeur correspond à l'erreur standard.

Cette analyse montre donc que la dépolymérisation des microtubules induit non seulement la perte d'une proportion importante des mouvements de nature dirigée mais également d'une partie des mouvements diffusifs. Cette diminution de la proportion de temps passé par les GS dans la catégorie dirigée est en accord avec les résultats obtenus en double marquage montrant que cette catégorie correspond essentiellement à des déplacements le long des microtubules. L'impact du nocodazole sur la classe diffuse, qui semble correspondre principalement à des GS interagissant avec le cortex d'actine, peut être interprété de la façon suivante : en conditions témoins, l'arrivée de GS en périphérie de la cellule par l'intermédiaire des microtubules compense le fait que certains de ces organites se décrochent des filaments d'actine et quittent alors la zone corticale ; en revanche, en présence de nocodazole, cette diminution du nombre de GS piégés dans l'actine ne peut plus être compensée.

3.2.6. Les transitions entre catégories de mouvements

La caractérisation des trajectoires des GS dans la région juxta-membranaire a montré que ces organites changeaient fréquemment de comportement au cours de leurs déplacements dans cette zone de la cellule (voir la partie 3.2.2. intitulée "Analyse globale des trajectoires des granules de sécrétion en périphérie de la cellule"). Nous avons alors étudié les transitions entre les trois catégories de mouvement (arrêté ou contraint, diffusif et dirigé) utilisées pour définir le comportement des GS. Cette analyse, effectuée sur des cellules BON (clone BC6) observées en microscopie TIRF (acquisitions à 10 Hz, $\delta = 200$ nm), a permis d'obtenir deux résultats intéressants. Tout d'abord, il apparaît que ces transitions sont réversibles. Pour les différentes classes de mouvement, il y a en effet autant de transitions de X vers Y que de Y vers X. De plus, une telle analyse a mis en évidence le fait que ces passages d'une catégorie de mouvement à une autre ne sont pas équiprobables (Figure 39). Ainsi, les transitions entre un

mouvement dirigé et une période d'arrêt ou de déplacement contraint sont des événements rares en comparaison des autres types de transitions.

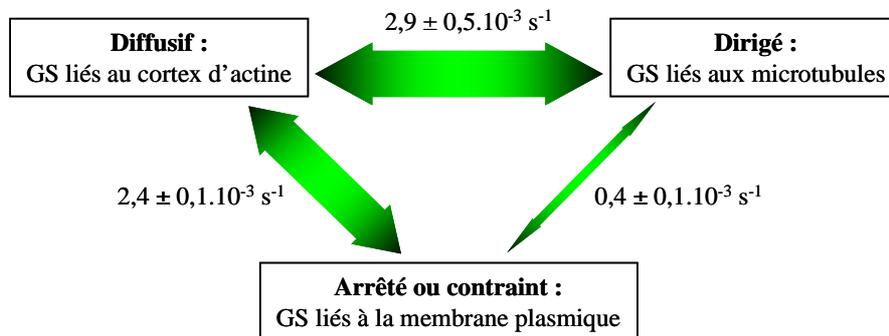


Figure 39: Evaluation des taux de transitions entre les différentes catégories de mouvement. Ces taux de transitions correspondent aux nombres de transitions par cellule et par seconde (528 GS issus de 6 cellules). L'incertitude sur chaque valeur correspond à l'erreur standard. Grâce aux résultats obtenus précédemment, chaque catégorie de mouvement peut être associée à un environnement granulaire spécifique.

Les résultats décrits précédemment suggèrent que chaque catégorie de mouvement corresponde à des GS interagissant avec un environnement particulier. Ainsi, la catégorie regroupant les périodes d'arrêt et les mouvements contraints correspondrait aux GS à la membrane plasmique, les organites liés au cortex d'actine présenteraient des déplacements de type diffusif et enfin la catégorie dirigée serait associée aux déplacements le long des microtubules. L'application de ce modèle aux différentes transitions observées (Figure 39) indique que, bien qu'il semble que l'extrémité des microtubules puisse atteindre la membrane plasmique, l'arrivée des GS au niveau de cette membrane ne se fait pas directement par l'intermédiaire des microtubules mais implique un passage transitoire de ces organites au sein du cortex d'actine.

3.3. Le rôle de Rab27A et MyRIP dans l'accrochage des granules de sécrétion au cortex d'actine

Dans le modèle classique décrivant la migration des GS depuis leur site de biogénèse jusqu'à la membrane plasmique, le cortex d'actine joue un rôle essentiel (voir l'introduction de cette partie). Ce cortex permettrait ainsi, non seulement de retenir ces organites en périphérie de la cellule, mais également de contrôler leur accès à la membrane plasmique.

Lorsque j'ai débuté ma thèse au sein du laboratoire au cours de l'année 2002, les protéines à l'origine des interactions entre les GS et le cytosquelette d'actine restaient à découvrir. Dans le

cas des mélanocytes, il avait été montré que la liaison des mélanosomes aux filaments d'actine faisait intervenir un complexe composé de trois protéines : Rab27A, la mélanophiline et la myosine Va (voir l'introduction de cette partie). D'autre part, les travaux effectués en collaboration entre l'équipe de François Darchen au sein du laboratoire, et celle de Christine Petit à l'Institut Pasteur, avaient permis la mise en évidence d'un autre complexe protéique permettant l'accrochage des mélanosomes aux filaments d'actine dans les cellules pigmentaires de la rétine (El-Amraoui, Schon et al., 2002). Ce complexe était également formé de trois protéines : Rab27A (forme liée au GTP), MyRIP (myosin VIIa and Rab interacting protein, une protéine homologue de la mélanophiline) et la myosine VIIa. La présence de la protéine MyRIP dans la région synaptique des cellules photoréceptrices de la rétine et des cellules ciliées de l'oreille interne suggérait que cette protéine puisse jouer un rôle dans la liaison à l'actine d'autres organites que les mélanosomes, comme par exemple les VS. Cette hypothèse était confortée par l'observation selon laquelle MyRIP, exprimée dans des cellules de la lignée PC-12, se localisait aux extrémités des neurites c'est-à-dire dans les régions enrichies en GS.

Ces résultats nous ont amenés à étudier le rôle des protéines Rab27A et MyRIP dans l'accrochage des GS au cortex d'actine au sein des cellules neuroendocrines. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *The Journal of Cell Biology* en 2003 (article joint à la fin de cette partie). Ma contribution à cette étude concerne spécifiquement les observations réalisées en microscopie TIRF afin d'analyser la mobilité des GS dans la région juxta-membranaire. Dans ce qui suit, nous donnerons uniquement un bref aperçu des résultats obtenus, ceux-ci étant décrits en détails dans l'article joint à la fin de cette partie.

Ces travaux nous ont tout d'abord permis de montrer que les protéines MyRIP et Rab27A sont exprimées de manière endogène à la fois dans les cellules chromaffines d'origine bovine et dans celles de la lignée PC-12. Des observations réalisées en microscopie confocale ont ensuite mis en évidence la colocalisation entre ces deux protéines et différents marqueurs des GS comme la chromogranine B ou le neuropeptide Y, dans ces deux modèles cellulaires. La présence de Rab27A à la surface des GS a de plus été confirmée par microscopie électronique et par fractionnement subcellulaire.

La protéine MyRIP avait initialement été décrite comme étant un partenaire de la myosine VIIa, l'interaction entre ces deux protéines permettant la liaison des mélanosomes aux filaments d'actine. Cependant, nous avons observé que ce type de myosine est absent des cellules PC-12. En revanche, il avait été montré que la myosine Va était présente à la surface

des GS dans ces cellules (Rose, Lejen et al., 2003 ; Rudolf, Kogel et al., 2003). De plus, une étude réalisée par Fukuda et Kuroda indiquait non seulement que MyRIP interagissait avec la myosine Va mais également que cette protéine pouvait se lier directement à l'actine par l'intermédiaire de son domaine C-terminal (Fukuda and Kuroda, 2002). Nous avons confirmé l'existence de telles interactions.

L'ensemble de ces résultats montre donc que les GS se lient aux filaments d'actine par l'intermédiaire d'un complexe formé de trois protéines : Rab27A-GTP, MyRIP et la myosine Va (Figure 40). L'interaction avec l'actine semble pouvoir se faire soit *via* la myosine Va, soit directement par l'intermédiaire du domaine C-terminal de MyRIP.

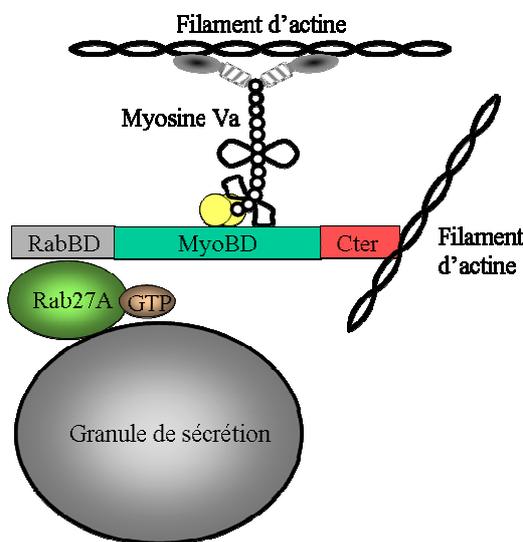


Figure 40: Structure du complexe tripartite impliqué dans la liaison des GS aux filaments d'actine. La protéine Rab27A, liée aux GS, recrute la protéine MyRIP. Cette protéine peut se lier à l'actine soit par l'intermédiaire de la myosine Va, soit directement via son domaine C-terminal.

Afin de comprendre le rôle joué par le complexe protéique Rab27A/MyRIP/myosine Va dans le processus de sécrétion régulée, nous avons appliqué une stratégie dite par "dominant négatif". Nous avons ainsi exprimé au sein des cellules différents mutants des protéines Rab27A et MyRIP. Ces mutants vont se substituer aux formes endogènes de Rab27A et MyRIP car leur niveau d'expression est nettement supérieur à celui des protéines endogènes. Nous avons alors étudié la manière dont ces différents mutants affectaient les niveaux de sécrétion et la mobilité des GS en périphérie de la cellule.

Nous avons ainsi montré que l'expression d'un mutant de Rab27A constitutivement actif car dénué d'activité GTPasique (Rab27AQ78L) induit une inhibition de la sécrétion régulée dans les cellules chromaffines d'origine bovine et celles de la lignée PC-12. Une telle inhibition de la sécrétion est également observée en cas de surexpression de la protéine MyRIP. Ces effets

sont dépendants de l'état du cytosquelette d'actine dans la mesure où ils sont modulés par des drogues modifiant le degré de réticulation de celui-ci (jasplakinolide, latrunculine B, l'effet de ces drogues sur le réseau d'actine a été décrit dans la partie 3.2.4 portant sur l'étude des mouvements des granules liés au cortex d'actine).

Les observations réalisées en microscopie TIRF ont quant à elles mis en évidence que l'expression de Rab27aQ78L et la surexpression de MyRIP (forme entière) se traduit par une réduction de la mobilité des GS en périphérie de la cellule⁷. Dans le cas de la surexpression de MyRIP, cet effet d'inhibition des mouvements des GS disparaît en cas de dépolymérisation du cortex d'actine par la latrunculine B. Enfin, l'expression de formes tronquées de MyRIP correspondant à la région de la protéine se liant à Rab27A (MyRIP-RBD) ou ne possédant pas le domaine impliqué dans la liaison à l'actine (MyRIP- Δ Cter), induisent toutes deux une augmentation de la mobilité des GS.

Ces résultats suggèrent donc que les protéines Rab27A-GTP et MyRIP, en servant de lien entre les GS et les filaments d'actine, jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la mobilité de ces organites au sein du cytosquelette cortical. Ce contrôle de la mobilité des GS permettrait alors de réguler l'accès de ces organites aux sites d'exocytose.

⁷ Suite à une erreur lors de la détermination de la taille des pixels du capteur de la caméra utilisée pour les observations en microscopie TIRF, les valeurs des coefficients de diffusion publiées dans *The Journal of Cell Biology* sont erronées. Ces valeurs doivent être multipliées par un facteur 1,84 pour obtenir les coefficients de diffusion réels.

Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites

Claire Desnos,¹ Jean-Sébastien Schonn,¹ Sébastien Huet,¹ Viet Samuel Tran,¹ Aziz El-Amraoui,² Graça Raposo,³ Isabelle Fanget,¹ Catherine Chapuis,¹ Gaël Ménasché,⁴ Geneviève de Saint Basile,⁴ Christine Petit,² Sophie Cribier,⁵ Jean-Pierre Henry,¹ and François Darchen¹

¹Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UPR 1929, Institut de Biologie Physico-Chimique, 75005 Paris, France

²CNRS URA 1968, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France

³UMR 144 Curie/CNRS, Institut Curie, 75248 Paris cedex 05, France

⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U429, Hôpital Necker, 75743 Paris cedex 15, France

⁵CNRS UMR 7099, Institut de Biologie Physico-Chimique, 75005 Paris, France

The GTPase Rab27A interacts with myosin-VIIa and myosin-Va via MyRIP or melanophilin and mediates melanosome binding to actin. Here we show that Rab27A and MyRIP are associated with secretory granules (SGs) in adrenal chromaffin cells and PC12 cells. Overexpression of Rab27A, GTPase-deficient Rab27A-Q78L, or MyRIP reduced secretory responses of PC12 cells. Amperometric recordings of single adrenal chromaffin cells revealed that Rab27A-Q78L and MyRIP reduced the sustained component of release. Moreover, these effects on secretion were partly

suppressed by the actin-depolymerizing drug latrunculin but strengthened by jasplakinolide, which stabilizes the actin cortex. Finally, MyRIP and Rab27A-Q78L restricted the motion of SGs in the subplasmalemmal region of PC12 cells, as measured by evanescent-wave fluorescence microscopy. In contrast, the Rab27A-binding domain of MyRIP and a MyRIP construct that interacts with myosin-Va but not with actin increased the mobility of SGs. We propose that Rab27A and MyRIP link SGs to F-actin and control their motion toward release sites through the actin cortex.

Introduction

Hormones and neuropeptides are stored in secretory granules (SGs) and released by exocytosis in response to cytosolic calcium elevation. SGs are formed at the TGN as short-lived vesicular intermediates, termed immature SGs, and transported along microtubules to the cell periphery. Immature SGs are then restricted to the cell periphery within the actin cortex, a dense network of actin filaments, where they mature completely (Rudolf et al., 2001). Thus, outward microtubule-dependent transport and F-actin-dependent capture mediate the cortical localization of SGs. However, if the actin cortex may favor peripheral localization of SGs, it may also hinder the access of vesicles to the plasma membrane. Indeed, the actin network has a mesh smaller than a granule diameter (Nakata and Hirokawa, 1992), and it would completely prevent exocytosis to occur if it were not dynamically remodeled or

severed, in particular upon calcium influx. In adrenal chromaffin cells, exocytosis occurs preferentially at sites where the actin cortex has gaps, suggesting that cortical F-actin acts as a barrier that hampers fusion (Trifaro et al., 2000). Finally, actin filaments or actin bundles can also provide tracks on which SGs move in an energy-dependent manner (Lang et al., 2000; Oheim and Stuhmer, 2000). Whether F-actin promotes or restricts the mobility of SGs and their access to the plasma membrane will finally depend on the dynamics of microfilaments and on the physical interaction of SGs with F-actin.

A similar actin-dependent capture of the pigment-producing organelles, termed melanosomes, has been described in skin melanocytes (Wu et al., 1998), and a detailed molecular mechanism has been recently provided. The GTP-binding protein Rab27A, which is associated with the membrane of melanosomes, recruits melanophilin, the product of *MLPH*, which in turn recruits myosin-VA (Fukuda et al., 2002b;

C. Desnos and J.-S. Schonn contributed equally to this work.

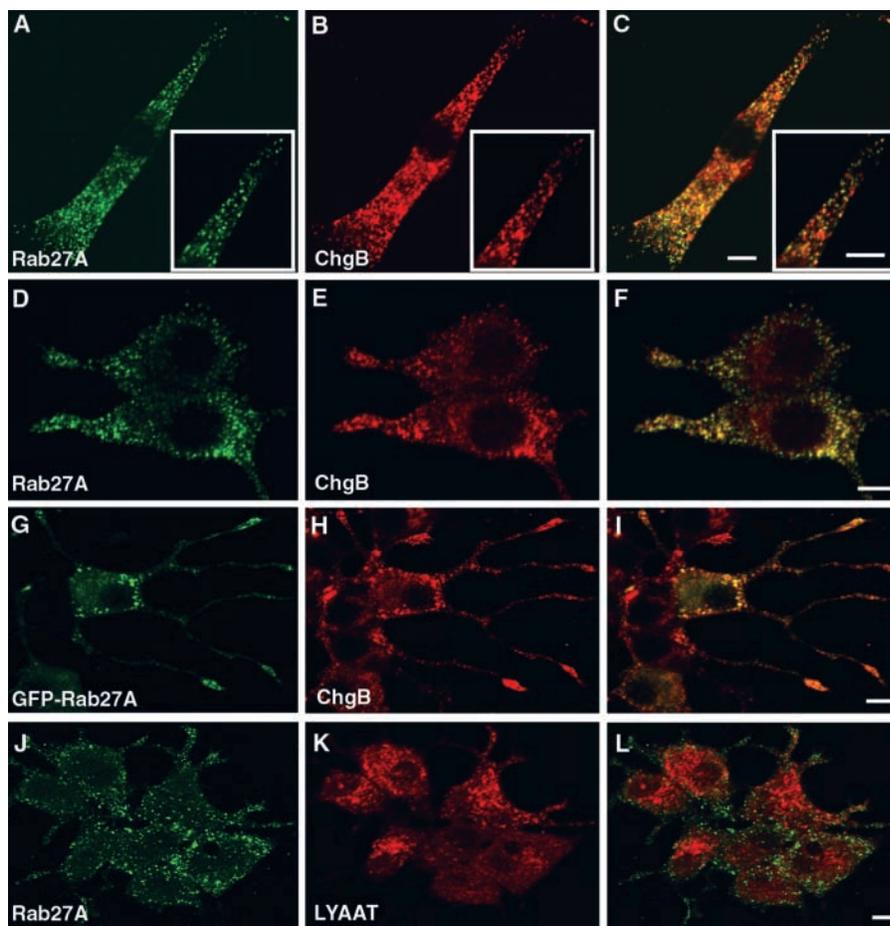
The online version of this article includes supplemental material.

Address correspondence to François Darchen, Institut de Biologie Physico-Chimique, CNRS UPR 1929, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France. Tel.: 33-1-58-41-50-85. Fax: 33-1-58-41-50-23. email: Francois.Darchen@ibpc.fr

Key words: Rab27A; MyRIP; exocytosis; actin; neuroendocrine cell

Abbreviations used in this paper: 5-HT, 5-hydroxytryptamine; CTL, cytotoxic T lymphocyte; EW-FM, evanescent wave fluorescence microscopy; hGH, human growth hormone; MSD, mean square displacement; NPY, neuropeptide Y; SERT, serotonin transporter; SG, secretory granule.

Figure 1. Localization of Rab27A on SGs by confocal immunofluorescence. Chromaffin cells (A–C) were double imaged for endogenous Rab27A (A) and chromogranin A/B (B). Discrete punctate structures were observed in A and B; most of them precisely coincided. See the overlaid image (C) and the detail shown at higher magnification (inset). Anti-Rab27A (D) and anti-chromogranin A/B (E) also stained discrete structures that coincided (F, overlay) in PC12 cells. GFP-Rab27A (G) transiently expressed in NGF-treated PC12 cells also colocalized with chromogranin B–positive structures (H) (I, overlaid image). Note the enrichment of Rab27A and chromogranin B at the tip of neurites. In contrast, Rab27A (J) did not colocalize with LYAAT, a lysosomal marker (K and L). Bars, 5 μ m.



Hume et al., 2002; Strom et al., 2002; Wu et al., 2002). In humans, mutations in *RAB27A* cause Griscelli syndrome, an autosomal recessive disorder characterized by partial albinism and uncontrolled T lymphocyte and macrophage activation (hemophagocytic syndrome) (Ménasché et al., 2000). In melanocytes isolated from these patients or from *ashen* mice bearing loss-of-function mutations in Rab27A, melanosomes are concentrated in the perinuclear region and cannot accumulate at the distal ends of the dendritic extensions (Wilson et al., 2000; Bahadoran et al., 2001; Hume et al., 2001; Wu et al., 2001). Consequently, melanin cannot be transferred to keratinocytes. Similar impairment of melanosome transport is observed in *leaden* and *dilute* mice bearing mutations in *MLPH* (Matesic et al., 2001) and in *MYO5a* (Strobel et al., 1990; Provance et al., 1996), respectively. These observations indicate that Rab27A, melanophilin, and myosin-VA mediate the physical link between melanosomes and F-actin.

In retinal pigment epithelial cells, another melanosome-associated complex made of Rab27A, MyRIP, and myosin-VIIA was described recently (El-Amraoui et al., 2002). MyRIP was found to have a broad tissular distribution (Fukuda and Kuroda, 2002), suggesting that its function may not be restricted to melanosome trafficking. In particular, MyRIP is expressed in the retinal synaptic region and, upon expression in pheochromocytoma PC12 cells, was targeted to the tip of neurites that were enriched in SGs. These observations suggested that Rab27A and MyRIP could have a role in secretory vesicle trafficking. Consistently, the activity of Griscelli and *ashen* cy-

tototoxic T lymphocytes (CTLs) is reduced due to a defect in lytic granule secretion (Ménasché et al., 2000; Haddad et al., 2001; Stinchcombe et al., 2001). Moreover, Rab27A is associated with insulin-containing granules (Yi et al., 2002).

Here we report that Rab27A and MyRIP are associated with large dense core granules in adrenal chromaffin cells and pheochromocytoma PC12 cells and control the secretory activity in a manner that depends on the state of the actin cortex. Moreover, they reduce the mobility of SGs beneath the plasma membrane. The results are consistent with Rab27A and MyRIP bridging vesicles to F-actin and regulating the movement of vesicles within the actin cortex.

Results

Association of Rab27A and MyRIP with SGs

Upon overexpression in PC12 cells, MyRIP was previously found to be targeted to the tip of neurites where SGs accumulate (El Amraoui et al., 2002). These observations suggested that Rab27A might be responsible for the recruitment of MyRIP not only on melanosomes but also on SGs. Therefore, the expression and subcellular localization of Rab27A and MyRIP were investigated. The monoclonal anti-Rab27A antibody used in this study did not react with purified recombinant Rab3A, B, C, and D, or with Rab4, Rab11, or GFP-Rab27B transiently expressed in COS-7 cells (unpublished data). Using this antibody, we detected Rab27A in bovine adrenal chromaffin cells and in PC12 cells.

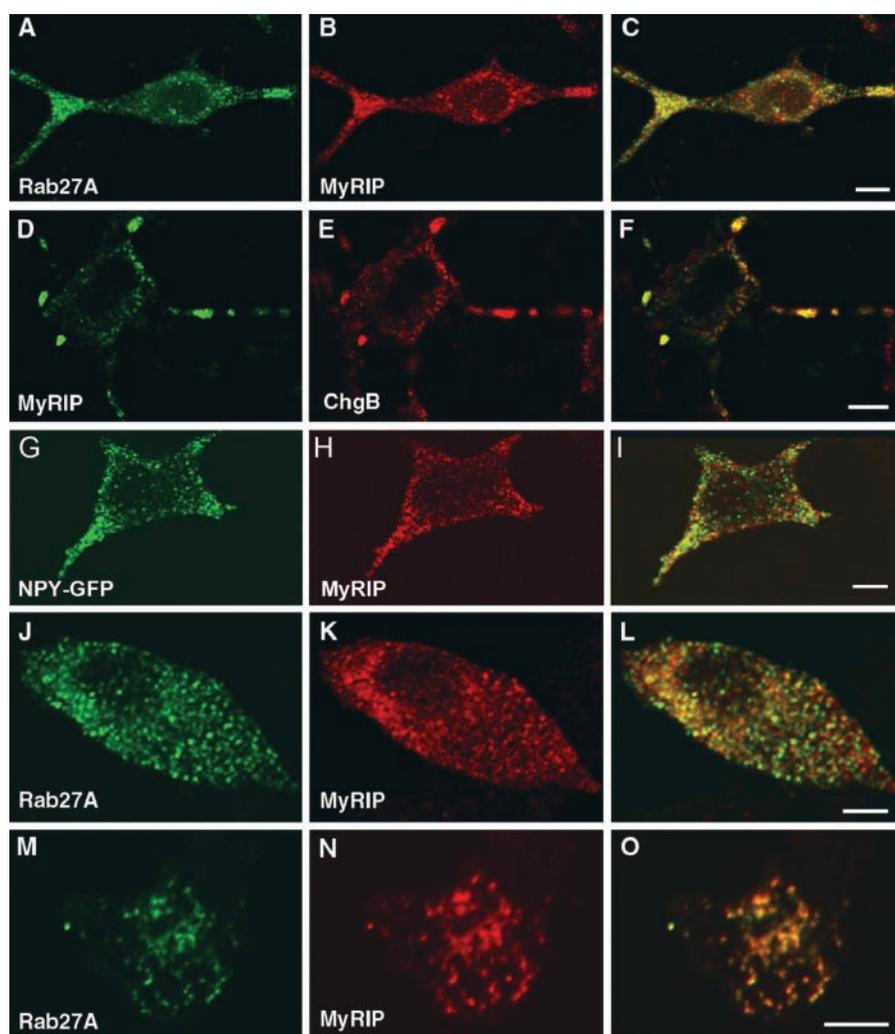


Figure 2. Confocal immunofluorescence localization of MyRIP on SGs. PC12 cells (A–I) were double imaged for endogenous Rab27A (A) and MyRIP (B) showing discrete punctate structures; most of these structures coincided (C, overlaid image), especially in the neurites. PC12 cells were transfected with pCMV-MyRIP and double imaged for MyRIP (D and H) and chromogranin B (E) or NPY-GFP (G); overlaid images indicate that MyRIP colocalized partly with chromogranin B (F) and NPY-GFP (I). Chromaffin cells (J–O) were imaged for endogenous Rab27A (J and M) and MyRIP (K and N). Many structures were double labeled, as indicated by the overlaid image of a cell sectioned close to the apex (O). Bars, 5 μ m.

The subcellular localization of Rab27A was investigated by cell fractionation of chromaffin cells. The protein was hardly detectable in the cytosol. A crude membrane fraction was separated on a sucrose gradient. Rab27A, the vesicular monoamine transporter VMAT2 and the v-SNARE protein VAMP2 were enriched in the same dense fractions of the gradient, consistent with an association of Rab27A with SGs (Fig. S1, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). In contrast, the distribution of Rab27A was not similar to that of lysosomal β -glucuronidase. MyRIP was detected in chromaffin and PC12 cell extracts as a single band (\sim 96 kD) but was not detected in gradient fractions, presumably because its membrane association is rather labile. Next, the localization of Rab27A and MyRIP was studied by confocal fluorescence microscopy. Chromaffin cells labeled with anti-Rab27A antibodies displayed a punctated labeling distributed throughout the cytoplasm. Moreover, most of the Rab27A-positive structures were also decorated by an antiserum raised against chromogranin A/B, a component of SG matrix (Fig. 1, A–C), and by an anti-dopamine β -hydroxylase, a marker of SG membrane (not depicted). The distribution of Rab27A was also analyzed in NGF-differentiated PC12 cells. As illustrated in Fig. 1 (D–F), the overall distribution of Rab27A was very similar to that of SGs (stained by an anti-chromogranin A/B antiserum), with a marked enrichment at the tip of neurites. Also,

GFP-tagged Rab27A was expressed in PC12 cells, and its localization was very similar to that of chromogranin B, stained with a monoclonal antibody (Fig. 1, G–I). In contrast, LYAAT, an amino acid lysosomal transporter (Sagné et al., 2001), displayed a very different intracellular distribution (Fig. 1, J–L). Together these results indicate that Rab27A is associated with SGs.

Next, we investigated the localization of the Rab27A effector MyRIP by confocal fluorescence microscopy. In NGF-differentiated PC12 cells, endogenous MyRIP displayed a punctate distribution very similar to that of Rab27A (Fig. 2, A–C). In addition, overexpressed MyRIP was targeted to SGs, as indicated by colocalization of MyRIP with chromogranin B (Fig. 2, D–F) and neuropeptide Y (NPY)-GFP (Fig. 2, G–I). In contrast, no significant overlap was observed between MyRIP and synaptophysin, a marker of early endosomes and synaptic-like microvesicles (not depicted). In chromaffin cells, endogenous MyRIP also displayed a punctated distribution evenly distributed throughout the cytoplasm. When the cells were double imaged for MyRIP and Rab27A, many structures contained both markers (Fig. 2, J–L). This is even more evident in Fig. 2 (M–O), which shows an apical section of a chromaffin cell. Fewer structures could be seen, and almost all of them contain both MyRIP and Rab27A. The complete overlap of the two markers in this

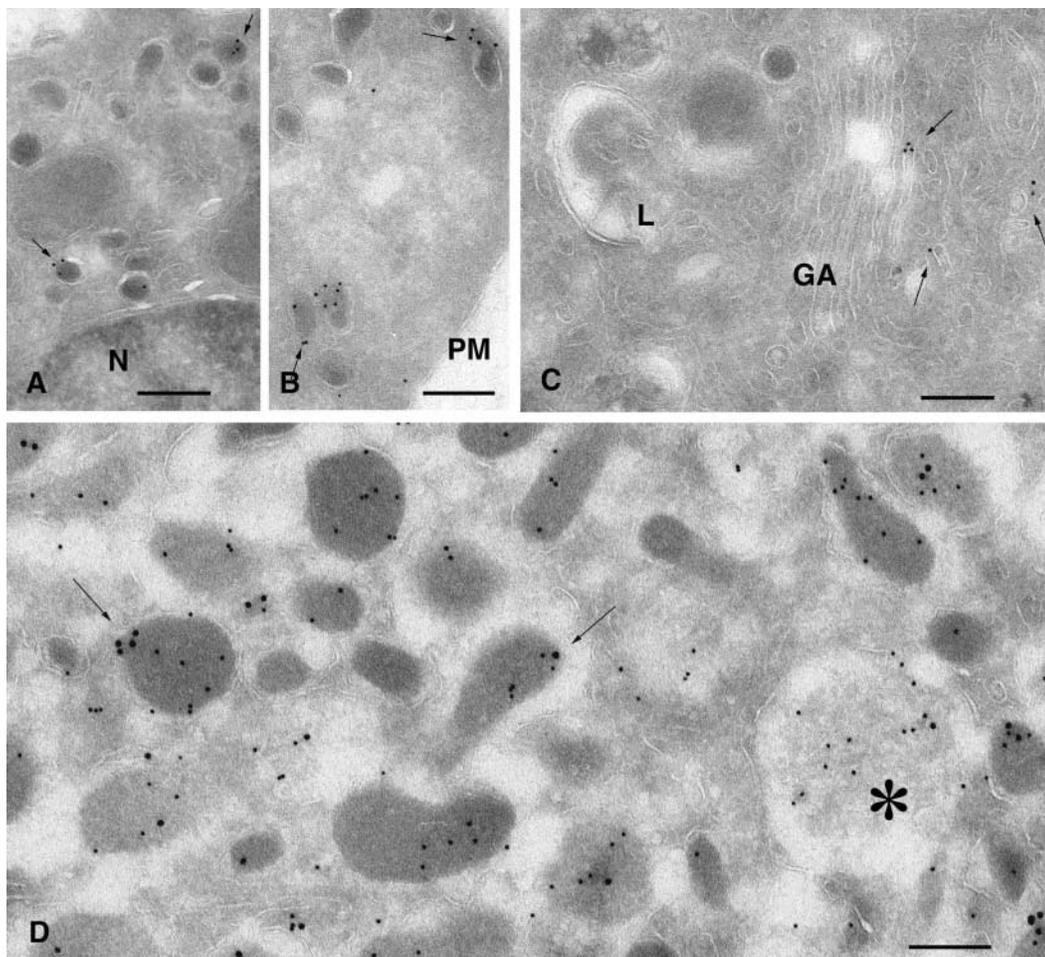


Figure 3. Ultrastructural localization of Rab27A in PC12 and chromaffin cells. Ultrathin cryosections of PC12 (A–C) and chromaffin cells (D) were single or double immunogold labeled for Rab27A (10-nm gold particles, A–C) or Rab27A (15-nm gold particles, D) and chromogranin A/B (10-nm gold particles, D). (A and B) Specific labeling of dense core granules of PC12 cells with anti-Rab27A antibodies. A restricted number of dense granules show high density of labeling for Rab27A (arrows), whereas others are negative. (C) Rab27A-positive tubulo-vesicular structures (arrows) are often observed in the Golgi region. (D) In chromaffin cells, Rab27A localizes to chromogranin-positive SGs (arrows) and to immature granules (star). N, nucleus; PM, plasma membrane; GA, Golgi apparatus. Bars, 200 nm.

section might suggest that the colocalization of MyRIP and Rab27A is better at the cell periphery. This is consistent with results obtained in PC12 cells, where MyRIP was also found on somatic structures that were not stained with anti-chromogranin or anti-Rab27A antibodies.

Finally, the localization of Rab27A was analyzed at the ultrastructural level on ultrathin cryosections of PC12 and chromaffin cells. Endogenous MyRIP could not be detected by immunoelectron microscopy with our antibodies. In PC12 cells, the majority of Rab27A-bound gold particles was associated with SGs, identified according to their electron-dense matrix and their size (Fig. 3, A and B). Rab27A labeling was also found in tubulo-vesicular structures close to the Golgi apparatus, as illustrated in Fig. 3 C. These observations suggest that Rab27A may have a role at different sites in the secretory pathway. Quantitative analysis of several sections of PC12 cells revealed that $\sim 92\%$ of Rab27A-associated gold particles were found on SGs and 8% on vesicles or tubulo-vesicular profiles located in the vicinity of the Golgi apparatus; 15% of SGs were depicted with greater than four gold particles. Double labeling of sections of chromaffin cells with anti-Rab27A

(15-nm gold particles) and anti-chromogranin (10-nm gold particles) antibodies revealed a specific association of Rab27A with SGs (Fig. 3 D). In addition, some immature granules were labeled (Fig. 3 D, asterisk). Some Rab27A-associated gold particles seemed to be located within SGs. This was observed also with another anti-Rab27A monoclonal antibody and in melanosomes (not depicted), suggesting that this observation is physiologically relevant. Previous reports showed within SGs the presence of vesicles, reminiscent of exosomes (Denzer et al., 2000), that are released in the external milieu during exocytosis (Ornberg et al., 1986).

Interaction of MyRIP with myosin-Va and actin

MyRIP was initially identified as a ligand of myosin-VIIa. However, myosin-VIIa was not detected in chromaffin and PC12 cells (unpublished data). In contrast, myosin-Va is expressed in chromaffin and PC12 cells, and its association with SGs was recently demonstrated (Rosé et al., 2003; Rudolf et al., 2003). Moreover, Fukuda and Kuroda (2002) found an interaction between full-length MyRIP and myosin-Va. We confirmed this observation using purified GST-tagged

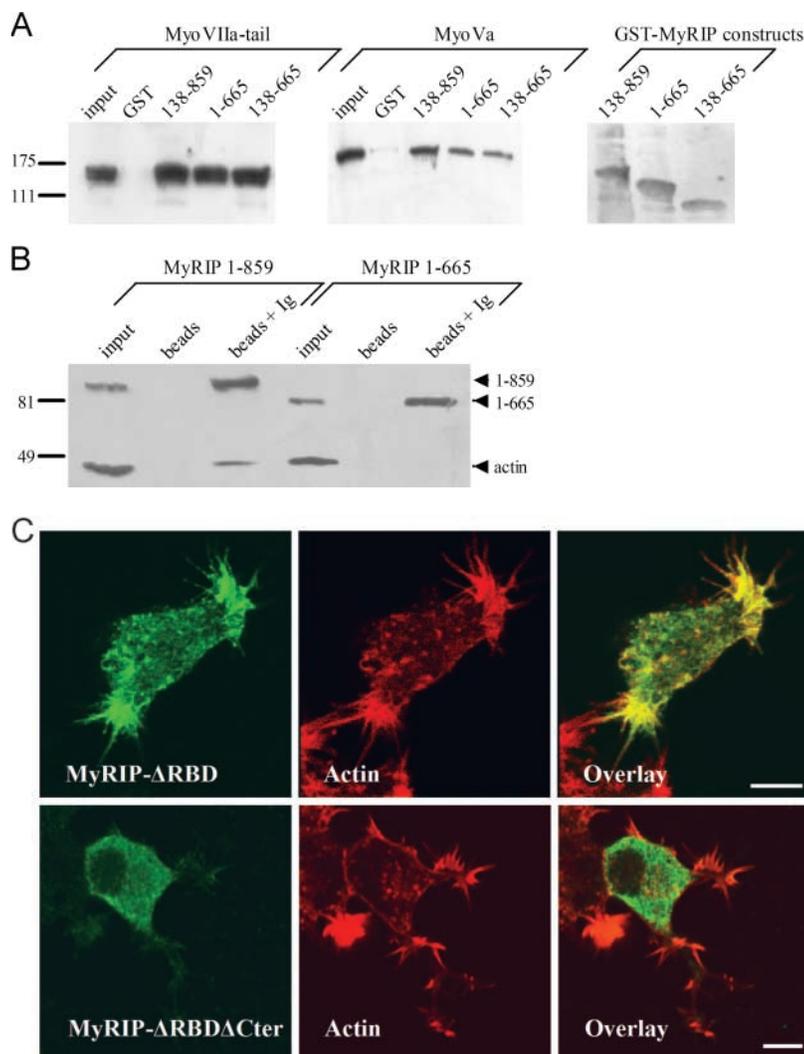


Figure 4. Interaction of MyRIP with myosin-Va and actin. (A) Binding of myosin-VIIa tail (left) or myosin-Va (middle) to purified GST or GST–MyRIP constructs immobilized on glutathione–Sepharose beads. Transfected COS-7 cells and nontransfected PC12 cells were used as a source of myosin-VIIa and myosin-Va, respectively. Cellular levels of myosin-VIIa and myosin-Va are shown in the first lane of each panel (input, 10% of the volume used in the experiment). The position of molecular weight markers is shown on the left side ($\times 10^{-3}$). The same blots were stripped and reprobed with an anti-GST monoclonal antibody to reveal the MyRIP constructs bound to the beads (right). Note that deletion of the COOH-terminal region of MyRIP had little effect on the interaction with myosins. Similar results were obtained in another experiment. (B) The COOH-terminal region of MyRIP is required for actin binding. COS-7 cells were transfected with vectors encoding full-length MyRIP (1–859) or a deletion mutant (1–665). The proteins expressed were immunoprecipitated with anti-MyRIP antibody–conjugated protein A–Sepharose (beads + Ig). Coimmunoprecipitated actin was revealed with a monoclonal antibody. Beads without antibody were used as control (beads). The amount of expressed MyRIP proteins used in the immunoprecipitation is shown on the left (input, 1/8 of the volume used). Similar results were obtained in another experiment. (C) Importance of the COOH-terminal region of MyRIP for its colocalization with F-actin. PC12 cells were transfected with MyRIP- Δ RBD (138–859) (top) or MyRIP- Δ RBD- Δ Cter (138–665) (bottom). 3 d later, cells were stained with anti-myc tag antibodies (left) or rhodamine-phalloidin (middle) and imaged by confocal immunofluorescence. The overlaid images (right) show that MyRIP- Δ RBD, but not MyRIP- Δ RBD- Δ Cter, colocalizes with F-actin.

MyRIP constructs. GST–MyRIP- Δ Cter (1–665) and Δ RBD- Δ Cter (138–665) interacted with the tail of myosin-VIIa and with myosin-Va (Fig. 4 A). However, the myosin-VIIa- and myosin-Va-binding domains of MyRIP do not overlap completely, as MyRIP (1–577) bound to myosin-VIIa (El Amraoui et al., 2002) but poorly to myosin-Va (not depicted). Fukuda and Kuroda (2002) also found an interaction between MyRIP and actin by coimmunoprecipitation. Deletion of residues 666–859 had little effect on myosin-Va binding (Fig. 4 A) but completely abolished the interaction with actin (Fig. 4 B). The importance of this COOH-terminal region for actin binding was also demonstrated by immunocytochemistry (Fig. 4 C). A deletion mutant of MyRIP lacking the Rab27a-binding domain (MyRIP- Δ RBD) colocalized with actin, whereas MyRIP- Δ RBD- Δ Cter (138–665), lacking also the COOH-terminal region required for *in vitro* actin binding, gave a diffuse cytosolic staining. This region has significant sequence similarity with melanophilin, which was shown to bind actin directly (Fukuda and Kuroda, 2002).

A role for Rab27A and MyRIP in SG exocytosis

Overexpressed Rab27A and MyRIP inhibited secretory responses of PC12 cells. Then, we investigated whether Rab27a and MyRIP may control the secretory activity of

PC12 cells. The effect of various constructs was analyzed at the cell population level by means of two secretion assays based on cotransfection of vectors encoding either a serotonin transporter (SERT) or human growth hormone (hGH). Due to the very high increase in tritiated 5-hydroxytryptamine ($[^3\text{H}]5\text{-HT}$) uptake induced by SERT, the subpopulation of transfected cells can be specifically labeled and its secretory activity determined by measuring release of $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ (Schonn et al., 2003). hGH is properly targeted to SGs and released in response to Ca^{2+} elevation (Wick et al., 1993).

Rab GTPases switch between active GTP-bound and inactive GDP-bound conformations. To investigate the function of Rab27A in regulated secretion, wild-type Rab27A or mutants defective in GTP binding (T23N) or in GTPase activity (Q78L) were transiently expressed in PC12 cells. Rab27A-T23N was supposed to interfere with the function of endogenous protein by competing for a guanine nucleotide exchange factor that catalyzes the exchange of GTP for GDP. Rab27A-Q78L was used to increase levels of active GTP-bound Rab27A. Overexpressed Rab27A and Rab27A-Q78L displayed a punctated distribution very similar to that of endogenous Rab27A (Fig. 1, G–I; Fig. S2, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). In contrast, Rab27A-T23N gave a diffuse staining of the cytosol (Fig.

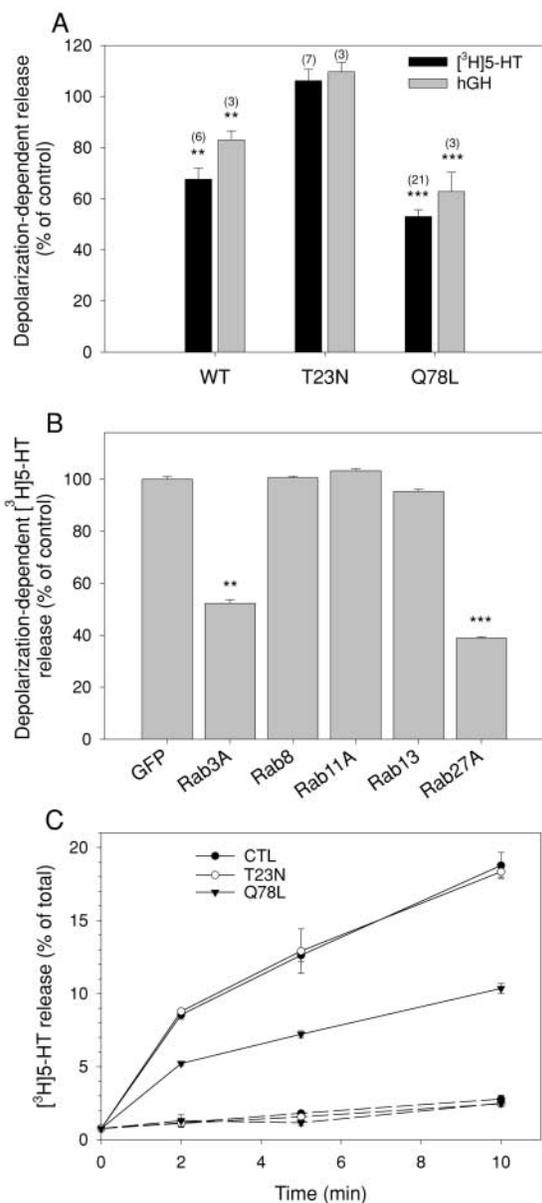


Figure 5. Rab27A controls the magnitude of secretory responses. (A) SERT-transfected (black bars) or hGH-transfected PC12 cells (gray bars) were cotransfected with vectors encoding untagged Rab27A wild type, Rab27A-T23N, or Rab27A-Q78L, as indicated. Cells were incubated for 10 min in normal or high K⁺ saline. Release in normal saline medium (2–5% of cellular [³H]5-HT) was subtracted. Results are shown as percentage of the responses of mock-transfected cells. Numbers in brackets refer to the number of independent experiments. The stimulus-dependent release of control cells ranged from 15 to 30% of cellular [³H]5-HT (mean ≈ 20%). (B) Effect of GTPase-deficient Rab3A, Rab8, Rab11, and Rab13 on secretory responses measured as in A. Rab8, Rab11, Rab13, and Rab27A were fused to GFP. Transfection of GFP was used as a control. Results are shown as percentage of the depolarization-dependent [³H]5-HT release from control cells (mean ± SEM, *n* = 3 independent experiments). Whereas Rab3A-Q81L and GFP-Rab27A-Q78L inhibit PC12 cell stimulated exocytosis, no effect was observed upon overexpression of GFP-tagged GTPase-deficient Rab8, Rab11, or Rab13. (C) [³H]5-HT release as a function of time from control cells (●) or from cells expressing Rab27A-T23N (○) or Rab27A-Q78L (▼). Cells were incubated in normal (dotted line) or high K⁺ saline (plain line). Results are expressed in percentage (mean ± SEM, *n* = 3) of total [³H]5-HT present in the cells before stimulation. Similar results were obtained in two other independent experiments.

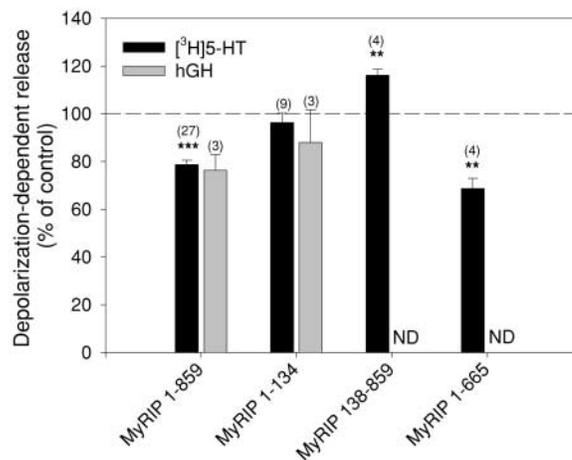


Figure 6. MyRIP controls the magnitude of secretory responses. SERT-transfected (black bars) or hGH-transfected PC12 cells (gray bars) were cotransfected with vectors encoding wild-type MyRIP (MyRIP 1–859), the Rab27A binding domain of MyRIP (MyRIP 1–134), a construct lacking the RBD (138–859), or MyRIP-ΔCter (1–665). Cells were incubated for 10 min in normal or high K⁺ saline. Release in normal saline medium was subtracted. Results are shown as percentage of the response of mock-transfected cells (mean ± SEM). The number of experiments performed is shown above the bars.

S2). Rab27A-T23N did not induce any significant change of secretory activity. In contrast, GTPase-deficient Rab27A-Q78L and, to a less extent, wild-type Rab27A have a pronounced inhibitory effect on secretion (Fig. 5 A). Similar effects of Rab27A proteins were observed in cells permeabilized with α-toxin or streptolysin-O (Rab27A WT: $-24 \pm 6.5\%$, mean ± SEM, *n* = 5 experiments; Rab27A-Q78L: $-57 \pm 4.6\%$, mean ± SEM, *n* = 3 experiments). As these pore-forming toxins bypass voltage-dependent calcium channels, the inhibitory effect of Rab27A was not due to reduced Ca²⁺ influx. Rab27A-Q78L inhibited secretory responses over a wide range of free calcium concentrations without apparent shift in the calcium sensitivity of the secretory apparatus (unpublished data). The effect of Rab27A-Q78L was compared with that of other GTPase-deficient Rab proteins. Rab3A-Q81L inhibited secretion as previously reported (Johannes et al., 1994; Schon et al., 2003), but GFP-tagged Rab8, Rab11, and Rab13 did not interfere with the secretory activity of PC12 cells (Fig. 5 B), although they were properly expressed (Fig. S3, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). Thus, the effect of Rab27A on exocytosis is specific.

Next, we investigated the effect of MyRIP on secretory responses. Overexpression of full-length MyRIP or of MyRIP-ΔCter (1–665) induced moderate but reproducible reduction of the secretory activity of PC12 cells (Fig. 6). In contrast, overexpression of MyRIP-ΔRBD (138–859) slightly increased secretory responses, while MyRIP-RBD (1–134) had no significant effect (Fig. 6).

Kinetics of secretory responses. To investigate the site of action of Rab27A-Q78L, the time course of its effect was investigated. As illustrated in Fig. 5 C, Rab27A-Q78L had similar inhibitory effects at various time points (2, 5, and 10 min of stimulation). Similar results were obtained for MyRIP (not depicted). The kinetics of secretory responses was determined

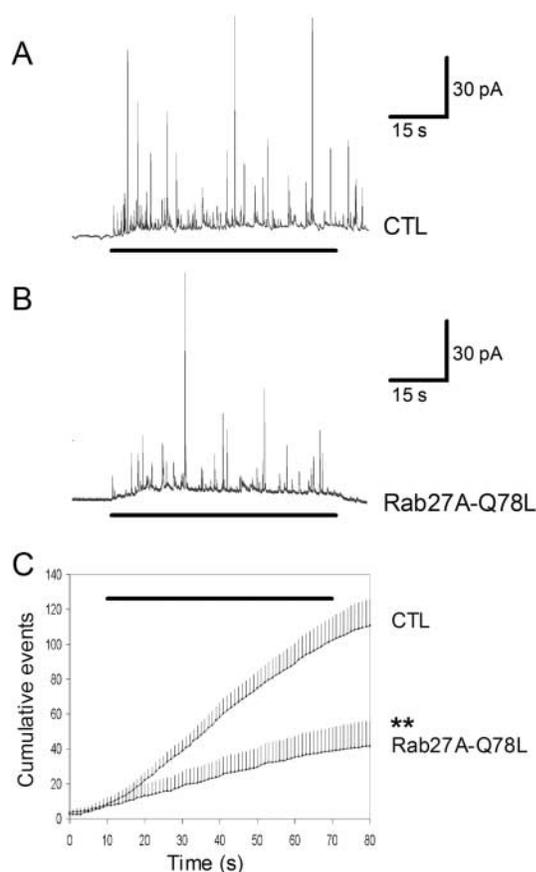


Figure 7. Rab27A-Q78L reduces the frequency of amperometric spikes in chromaffin cells. Secretory responses of single adrenal chromaffin cells were monitored by carbon fiber amperometry. (A) Amperometric trace recorded from a GFP-transfected (CTL) chromaffin cell stimulated by local application of 10 μ M nicotine (indicated by the bar below the trace). (B) Secretory response of a Rab27A-Q78L-expressing cell. (C) The cumulative number of spikes is plotted against time. Shown are the mean values (+SEM) from 17 cells (CTL) and 6 cells (Rab27A-Q78L). The bar above the traces indicates the presence of nicotine. The significance of difference was calculated with Mann-Whitney test.

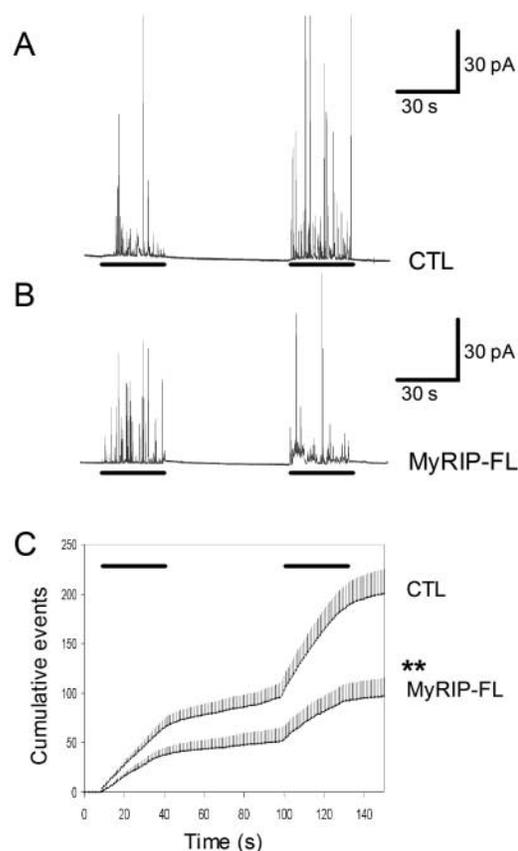


Figure 8. Overexpression of MyRIP reduces the frequency of amperometric spikes in chromaffin cells. Secretory responses of single adrenal chromaffin cells were monitored by carbon fiber amperometry. (A) Amperometric trace recorded from a GFP-transfected (CTL) chromaffin cell stimulated by local application of high K^+ (55 mM) saline (indicated by bars below the trace). (B) Secretory responses of a wild-type MyRIP (MyRIP-FL)-transfected cell. (C) The cumulative number of spikes is plotted against time. Shown are the mean values (+SEM) from 18 cells (CTL) and 16 cells (MyRIP-FL). The bars indicate the application of high K^+ . The significance of difference was calculated with Mann-Whitney test.

more accurately by means of carbon fiber amperometry on single chromaffin cells. Exocytosis is resolved by this technique as a series of current spikes, each spike being produced by the oxidation of the content of a single vesicle (Wightman et al., 1991). Chromaffin cells were cotransfected with Rab27A-Q78L or MyRIP and GFP (the latter being used to identify transfected cells). Cells expressing GFP only were used as controls. Overexpression of Rab27A-Q78L (Fig. 7) or MyRIP (Fig. 8) induced a significant reduction in spike frequency consistent with a reduction of the sustained phase of the release process. Rab27A and MyRIP might be implicated in the motion of vesicles toward the plasma membrane, the docking step, or the priming reaction, which makes vesicles ready to fuse.

Rab27A and MyRIP did not affect spontaneous release.

We did not detect any increase in the spontaneous release of [3 H]5-HT in Rab27A- or MyRIP-transfected cells compared with control cells during 10-min (Fig. 5 C) or 1-h (not depicted) incubations. However, as serotonin is not stably entrapped within SGs (Schonn et al., 2003), spontaneous release of [3 H]5-HT during long periods of time

could not be used as a nonambiguous index of constitutive exocytosis. Released hGH was thus measured in the cell culture media 3 d after transfection. Compared with control cells, levels of hGH released from Rab27A WT- or Q78L-expressing cells were not significantly modified (not depicted). Furthermore, amperometric recordings did not detect any increase in spike frequency in the absence of stimulus (Figs. 7 and 8). These results suggest that the inhibitory effect of Rab27A and Rab27A-Q78L on secretory responses did not result from an increased release activity in resting conditions.

Secretory effects of Rab27A and MyRIP depend on the state of actin cortex

Biochemical data are consistent with a role for Rab27A and MyRIP in linking vesicles to F-actin. Entrapment of SGs within the actin cortex might thus be responsible for their inhibitory effect on secretory responses. To test this hypothesis, the effect of Rab27A and MyRIP on secretory responses was measured in cells treated with drugs that interfere with

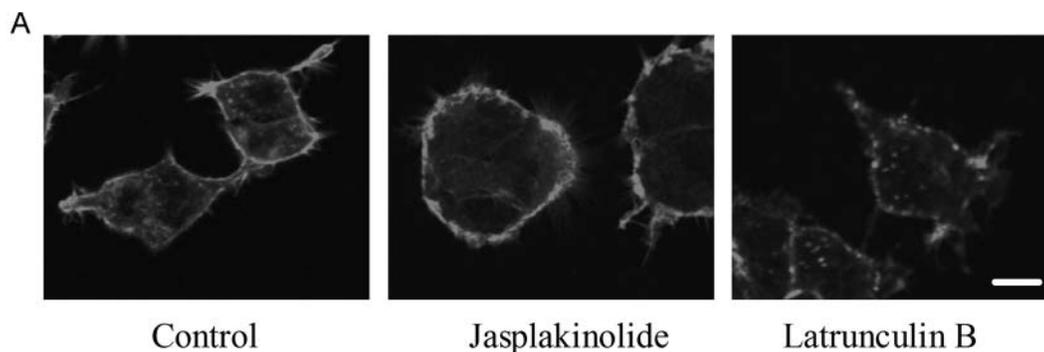
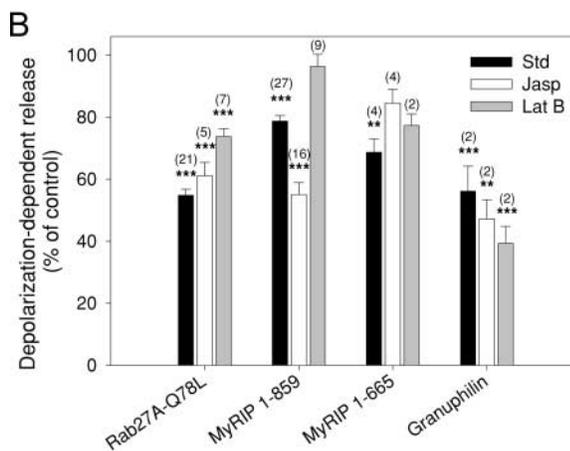


Figure 9. The effects of Rab27A-Q78L and MyRIP on secretion depend on the state of the actin cortex.

(A) Rhodamine-phalloidin staining of the actin cortex of PC12 cells. Compared with control conditions (left), the thickness of actin is reduced upon latrunculin B treatment (middle) and increased by jasplakinolide (right). (B) The secretory activity of PC12 cells transfected with vectors encoding GFP (as control), Rab27A-Q78L, wild-type MyRIP (MyRIP 1–859), MyRIP- Δ Cter (1–665), or granuphilin was measured as in Fig. 5 by means of the [3 H]5-HT release assay. Cells were incubated without addition of drug (Std, black bars) or in the presence of 1 μ M jasplakinolide (Jasp, open bars) or 5 μ M latrunculin B (Lat B, gray bars) for 20 min before and during stimulation of secretion. The effect of the different proteins on secretion was expressed, after subtracting the basal release of [3 H]5-HT in normal saline, as percentage of the stimulus-dependent secretory response of GFP-transfected cells measured under the same conditions (i.e., in the absence of drug, in the presence of jasp, or in the presence of lat B). Shown are the results (mean \pm SEM) of several independent experiments (the number of experiments is shown above the bars). Latrunculin B significantly reduced ($P < 0.001$) the inhibitory effects of Rab27A-Q78L and MyRIP on secretion, whereas jasplakinolide increased that of MyRIP ($P < 0.001$). The net release of GFP-transfected cells was $19 \pm 2\%$ of cellular [3 H]5-HT in the absence of drug, $20 \pm 2.2\%$ in the presence of jasplakinolide, and $31 \pm 3\%$ in the presence of latrunculin B.



actin polymerization. Latrunculins favor actin depolymerization (Spector et al., 1983; Lang et al., 2000), whereas jasplakinolide promotes actin polymerization (Fig. 9 A). Under the conditions used, latrunculin B increased the secretory activity, while jasplakinolide had no significant effect on secretion. In latrunculin B-treated cells, the inhibitory effect of Rab27A-Q78L was significantly reduced compared with the one observed in the absence of drug (Fig. 9 B). Latrunculin B also reduced the effect of MyRIP. On the other hand, the inhibition of secretion induced by MyRIP overexpression was much stronger after jasplakinolide treatment than in standard conditions (Fig. 9 B). This effect is probably mediated by direct interaction of MyRIP with F-actin because it was not observed with MyRIP- Δ Cter. The effect of granuphilin, another putative effector of Rab27A, was not increased by jasplakinolide (Fig. 9 B). In contrast to drugs that act on the actin cortex, microtubule depolymerization by nocodazole did not modify the effect of Rab27A and MyRIP (not depicted). The inhibitory effect of Rab27A and MyRIP, which does not by itself modify the actin cortex (not depicted), is thus partly dependent on the integrity and dynamics of the cytoskeleton.

Rab27A and MyRIP restrict granule motion

Evanescent wave fluorescence microscopy (EW-FM) allows observation of fluorescent markers in a thin optical section

near a glass–water interface. PC12 cells cultured on the glass interface were transfected with a NPY–GFP construct to label SGs and imaged with this technique. Under these conditions, the fluorescent SGs close to the plasma membrane were easily observed (Fig. 10 A), and their individual behavior was recorded with a CCD camera (Fig. 10 B). The intensity of the evanescent wave decreased exponentially with the distance from the interface with a decay constant in the cell adjusted to 200 nm. According to previous studies in PC12 cells (Lang et al., 2000), most of SGs imaged by this technique are located in the actin cortex.

The mobility of SGs in unstimulated cells was analyzed in 1-min sequences of 120 frames (Video 1, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). Most of the vesicles had limited movements (Fig. 10 B, arrowhead), but some moved on longer distances (Fig. 10 B, arrow). The x,y trajectories were monitored using a single particle tracking software (Fig. 10, C and D), and the mean x,y diffusion coefficients ($D_{x,y}$) were derived from mean square displacement (MSD) analysis.

Rab27A-Q78L or various MyRIP constructs were transiently expressed in PC12 cells together with NPY–GFP (see Videos 1–5 for representative examples, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). All SGs that could be followed for >15 s were tracked (150–700 SGs from 15–60 cells per group). Expression of

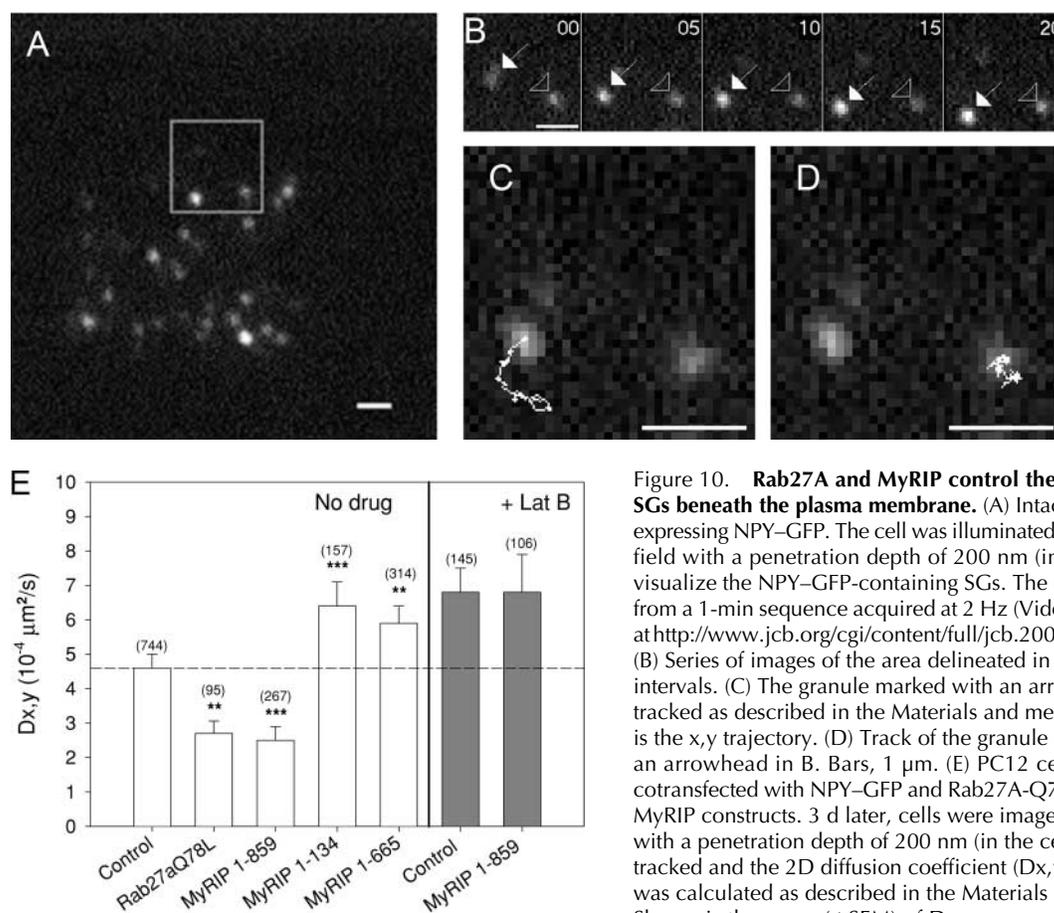


Figure 10. Rab27A and MyRIP control the motion of SGs beneath the plasma membrane. (A) Intact PC12 cell expressing NPY-GFP. The cell was illuminated by evanescent field with a penetration depth of 200 nm (in the cell) to visualize the NPY-GFP-containing SGs. The image is taken from a 1-min sequence acquired at 2 Hz (Video 5, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). (B) Series of images of the area delineated in A taken at 5-s intervals. (C) The granule marked with an arrow in B was tracked as described in the Materials and methods. Shown is the x,y trajectory. (D) Track of the granule marked with an arrowhead in B. Bars, 1 μm . (E) PC12 cells were cotransfected with NPY-GFP and Rab27A-Q78L or different MyRIP constructs. 3 d later, cells were imaged by EW-FM with a penetration depth of 200 nm (in the cell). SGs were tracked and the 2D diffusion coefficient ($D_{x,y}$) of each SG was calculated as described in the Materials and methods. Shown is the mean (\pm SEM) of $D_{x,y}$ measured in mock-transfected (Control) and Rab27A-Q78L, MyRIP (1-859), MyRIP-RBD (1-134), and MyRIP- Δ Cter (1-665) transfected cells. Latrunculin B (Lat B, right) increased the mean $D_{x,y}$ of control cells. Moreover, under these conditions, the mobility of SGs from MyRIP-expressing cells was not different from that of mock-transfected cells. The number of tracked SGs is indicated above the bars. The significance of the differences was measured with Mann-Whitney U test.

Rab27A-Q78L or MyRIP clearly shifted the distribution of $D_{x,y}$ toward lower values (not depicted) and lowered the mean diffusion coefficient (Fig. 10 E), indicating reduced mobility of SGs. In contrast, expression of MyRIP-RBD and MyRIP- Δ Cter increased the mean diffusion coefficient. None of these proteins affected the mean number of SGs per area unit (unpublished data). In latrunculin-treated cells, SG mobility was enhanced but was insensitive to MyRIP overexpression (Fig. 10 E, right).

Discussion

The data presented here suggest that Rab27A and MyRIP provide a link between SGs and F-actin, and control short-range movements of SGs beneath the plasma membrane and their access to exocytotic sites. Our results indicate that MyRIP and Rab27A are associated with SGs. This conclusion is supported by different approaches. First, Rab27A cofractionates with VMAT2 and VAMP2 in sucrose gradients of chromaffin cell extracts. Second, Rab27A and MyRIP colocalize with chromogranins in confocal sections of PC12 and chromaffin cells. Third, Rab27A colocalizes with SGs by immunoelectron microscopy. Interestingly, in several cases, Rab27A-associated gold particles were found in

small clusters, suggesting that Rab27A may define microdomains on SGs, as was proposed for Rab5 on endosomes (Sönnichsen et al., 2000). The association of Rab27A with SGs is consistent with recent findings obtained by Fukuda et al. (2002a). Rab27A and Rab27B have also been found on insulin-containing granules (Yi et al., 2002; Zhao et al., 2002) or platelet-dense or α granules (Barral et al., 2002). Moreover, Rab27A is involved in the regulation of CTL exocytosis at the immunological synapse (Ménasché et al., 2000; Haddad et al., 2001; Stinchcombe et al., 2001). Therefore, Rab27A and maybe Rab27B are associated with a broad range of secretory vesicles, and not only with typical lysosome-related organelles.

In agreement with the localization of Rab27A on SGs, the Rab27A-binding protein MyRIP colocalized with Rab27A and SG markers. The granular localization of MyRIP depends on its NH₂-terminal Rab27A-binding domain because truncated constructs lacking this domain are mislocalized (El-Amraoui et al., 2002; Fig. 4 C).

Studies on Griscelli syndrome or *ashen* CTLs lacking Rab27A revealed a defect in lytic granule exocytosis, suggesting that Rab27A is an essential component of the secretory machinery. During completion of this study, Fukuda et al. (2002a) reported that overexpression of wild-type Rab27A

increased the secretory activity of PC12 cells. Similar effects of Rab27A on insulin secretion were also reported recently (Yi et al., 2002). In chromaffin and PC12 cells, we found by several approaches that Rab27A and, more especially, GTPase-deficient Rab27A (that is properly targeted to SGs; Fig. S2) reduced the magnitude of the secretory response (Figs. 5–9). Rab27A-Q78L reduced not only the amount of released secretory products but also the frequency of release events, as measured by carbon fiber amperometry. This apparent discrepancy might result from differences in assays used to measure secretion, from the relative importance of various Rab27A effectors in different cells, or from a rate-limiting effect of GTP hydrolysis by Rab27A. An increased probability of spontaneous fusion does not seem to account for the observed inhibition of stimulus-dependent release by Rab27A and Rab27A-Q78L, as was proposed recently by Schlüter et al. (2002) for Rab3A, another GTPase associated with SGs. Indeed, we did not detect any significant increase in release activity in the resting state.

Our observations suggest that MyRIP mediates, at least partly, the effect of Rab27A on secretion and provides a physical link between SGs and actin. Indeed, both proteins reduced the “sustained” component of release that involves recruitment of vesicles from the “reserve” pool. Moreover, both Rab27A- and MyRIP-induced effects on secretion were modulated by drugs that affect the actin cortex. Latrunculin B, which reduces the thickness of the actin cortex, also reduced the inhibitory effects of Rab27A-Q78L and MyRIP, while the actin-stabilizing drug jasplakinolide strongly strengthened the effect of MyRIP (Fig. 9). Finally, both MyRIP and Rab27A-Q78L restrict the motion of SGs in the actin-rich region of the cell imaged by EW-FM, whereas MyRIP-RBD and MyRIP- Δ Cter, which are supposed to reduce the association of endogenous MyRIP with Rab27A, enhanced the mobility of SGs (Fig. 10 E). Latrunculin was found to increase SG mobility in mock-transfected cells, in agreement with F-actin acting as a barrier, and to prevent the effect of MyRIP on SG motion, in agreement with MyRIP tethering SGs to F-actin.

Previous studies revealed that SGs are captured at the cell periphery by a process involving both microfilaments and microtubules (Rudolf et al., 2001). MyRIP and Rab27A may play a role in SG capture similar to that of Rab27A/melanophilin/myosin-Va in the actin-dependent retention of melanosomes. However, if actin filaments may favor the retention of SGs at the cell periphery, they also hamper the diffusion of SGs toward the plasma membrane, as indicated by the increase in SG mobility and release induced by latrunculin. MyRIP may link SGs to actin via myosin-Va, which was recently shown to favor the dispersion of immature SGs within the actin cortex (Rudolf et al., 2003) and to be involved in secretion (Rosé et al. 2003). Recruitment of a molecular motor might indeed promote the motion of SGs within the actin cortex. MyRIP may also link SGs to actin filaments via a myosin-independent mechanism involving the COOH-terminal region of MyRIP (Fig. 4; Fig. S4, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>). This region displays significant sequence similarity with the actin-binding domain of melanophilin, suggesting that MyRIP may also bind F-actin directly. Our data indicate that this myosin-independent binding of MyRIP to actin is responsible for the

restricted mobility of SGs. Indeed, SG motion was reduced by MyRIP but increased by MyRIP- Δ Cter, which binds to myosin-Va but not to actin (Fig. 4). The motion of SGs within the actin cortex thus depends on the dynamics of actin remodeling and of Rab27/MyRIP/actin interaction.

The inhibition of secretion observed upon expression of Rab27A or MyRIP is apparently correlated with the restricted motion of SGs within the actin cortex. In the case of MyRIP, both effects display the same dependence on actin organization. Clearly, increasing the degree of actin polymerization (by jasplakinolide) and the interaction of SGs with actin (by MyRIP) is detrimental to the secretory process, most likely by preventing the access of SGs to release sites. However, MyRIP- Δ Cter, which increased SG mobility, also reduced the magnitude of the secretory response. In this case, the effect on secretion was not strengthened by jasplakinolide. This result suggests that MyRIP may interfere with the secretory process via another mechanism. This hypothesis deserves further study. It will also be interesting to investigate the putative function of MyRIP in other secretory cells such as CTLs and neurons.

Materials and methods

Materials

The rabbit anti-MyRIP antibody and the anti-myosin-VIIa antibody were described previously (El Amraoui et al., 2002). Anti-LYAAT and anti-VMAT2 rabbit antisera were provided by B. Gasnier and C. Sagné (CNRS, Institut de Biologie Physico-Chimique); the anti-chromogranin B monoclonal antibody was a gift of W. Huttner (Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany); the anti-myosin-Va was provided by R. Cheney (University of North Carolina, Chapel Hill, NC). Anti-Rab27A monoclonal antibody was from Transduction Laboratories; anti-chromogranin A/B polyclonal antibody was from Abcam; anti-VAMP2 was from Synaptic Systems; anti-actin was from Sigma-Aldrich; and the myc tag 9B11 antibody was from Cell Signaling Technology.

Plasmid encoding rat SERT (pcDNA3-SERT) and NPY-GFP were provided by R. Blakely (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN) and W. Almers (Oregon Health Sciences University, Portland, OR), respectively. pcDNA3-granuphilin was a gift of R. Regazzi (University of Lausanne, Lausanne, Switzerland). pEGFP-C1 was from BD Biosciences Clontech. Other plasmids encoding MyRIP and Rab27A constructs were described previously (El-Amraoui et al., 2002; Ménasché et al., 2003). Streptolysin-O and α -toxin were obtained from S. Bhakdi (Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany) (Bhakdi et al., 1993). Latrunculin B and jasplakinolide were from Calbiochem. Other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

Cell culture and transfection

Primary dissociated chromaffin cells from bovine adrenal medulla were prepared by retrograde collagenase perfusion and cultured as previously described (Darchen et al., 1990). PC12 cells were cultured and transfected as described previously (Schonn et al., 2003). Where indicated, NGF (50 μ g/ml) was added to the culture medium. COS-7 cells were cultured in DME supplemented with 10% FBS at 37°C under 5% CO₂. Chromaffin and COS-7 cells were transfected by electroporation using Optimix electroporation kit (Equibio). In brief, freshly prepared cells were suspended in Optimix buffer A and collected by centrifugation (800 *g*, 10 min). Cells (1.5 \times 10⁶) were resuspended in 55 μ l Optimix buffer B containing vector DNAs (5 μ g). A single electric shock (PC12: 650 V/cm, 24 ms; COS: 625 V/cm, 8 \times 3 ms) was applied using a PS10 electropulsator (Jouan). Electroporated cells were immediately recovered in warm culture medium and plated onto polylysine-coated glass coverslips. Experiments were generally performed 3 d after transfection.

Immunoelectron microscopy

PC12 and chromaffin cells were fixed with 2% paraformaldehyde in 0.2 M phosphate buffer, pH 7.4, for 1 h at room temperature. Cells were embedded in 10% gelatin, infused in 2.3 M sucrose, and frozen in liquid nitrogen

as described in detail previously (Raposo et al., 1997). Ultrathin cryosections were prepared with a Leica FCS ultracryomicrotome (Leica) and single and double immunogold labeled with a mouse monoclonal anti-Rab27A antibody and a rabbit polyclonal anti-chromogranin A/B according to Slot et al. (1991). A rabbit anti-mouse IgG was used after the first incubation with the monoclonal anti-Rab27A antibody. Protein A-gold conjugates (PAG 10 and PAG 15) were purchased from the Department of Cell Biology, Utrecht University, Utrecht, Netherlands. Relative quantitation of the immunogold labeling for Rab27A was performed directly under the electron microscope by counting 650 gold particles associated with the different subcellular compartments of PC12 cells. 560 granules were analyzed for the presence of Rab27A.

Interaction assays

GST and GST-MyRIP constructs were expressed in *E. coli* BL21 cells and purified by affinity chromatography onto glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences) using standard procedures.

Pull Down. Myosin-VIIa tail (El Amraoui et al. 2002) was expressed in COS-7 cells. Transfected COS-7 cells or PC12 cells were scrapped, sonicated, and solubilized at 4°C for 30 min in a buffer containing 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 2 mM ATP, and a cocktail of proteases inhibitors. After centrifugation (12,000 *g*, 15 min), supernatants (0.5–1 mg protein) were incubated for 1 h at 4°C under agitation with 1 nmol of purified GST or GST-MyRIP constructs prebound to 150 μ l glutathione-Sepharose beads. The beads were washed three times in 150 mM NaCl, 25 mM Tris-Cl, pH 7.5, and eluted in Laemmli sample buffer. Starting material and eluates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting for the presence of myosin-Va or -VIIa.

Coimmunoprecipitation. COS-7 cells were transfected 2 d before the experiment with vectors encoding myc-tagged MyRIP or MyRIP- Δ Cter (1–665). Cells were lysed as described above. Extracts were incubated with protein A-Sepharose beads (100 μ l wet volume; Amersham Biosciences) conjugated with or without affinity-purified anti-MyRIP antibody. After three washes, the eluates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting for the presence of MyRIP (with an anti-c-myc tag antibody) or actin.

Secretion assays

The [³H]5-HT release assay has been described previously (Schonn et al., 2003). In brief, PC12 cells were transfected with the serotonin transporter SERT, loaded with [³H]5-HT (5–20 Ci/mmol; Amersham Biosciences). Basal release was measured in Locke's solution containing (in mM) NaCl 154, KCl 5.5, glucose 5.6, NaHCO₃ 3.5, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, Hepes 15, and 0.2% BSA, pH 7.4, adjusted with NaOH supplemented with 1 μ M clomipramine. Secretion was measured at 37°C in high K⁺ Locke's solution (55 mM K⁺ with Na⁺ reduced to 104.5 mM) in the presence of 1 μ M clomipramine. After 2–10 min, the radioactivity released in the medium and remaining in the cells was measured. Alternatively, cells were rinsed twice with Ca²⁺-free Locke's solution and permeabilized for 4 min at 37°C with 20 μ M digitonin or 22 U streptolysin-O in (in mM) potassium glutamate 139, Pipes 20, HEDTA 2, EGTA 2, free Mg²⁺ 1, ATP 2, plus 0.3% BSA and pH adjusted to 7 using KOH. Secretion was then elicited in the same medium supplemented with 30 μ M free Ca²⁺, for 5 min at 37°C. Free Ca²⁺ concentrations were calculated according to Föhr et al. (1993) using calcv.22 software. Where indicated, cells were treated with 1 μ M jaspilkinolide or 5 μ M latrunculin B for 20 min before being stimulated to secrete (in the continuing presence of the drug). The hGH release assay and amperometric recordings were performed as described previously (Schonn et al., 2003).

EW-FM

An upright microscope (Olympus BX50WI) has been adapted to EW-FM by the prism approach (Axelrod, 1981). To excite fluorescence, light from an argon laser set at 488 nm (Spectra Physics 177-G02) entered radially a hemispheric BK7 glass prism and struck its planar face at a supercritical angle. The angle was adjustable by means of telecentric optics to be described elsewhere, and the evanescent field decay length was calculated assuming a refractive index of 1.37 for the cellular medium (experimentally determined). NPY-GFP-transfected PC12 cells cultured on polylysine-coated glass coverslips were observed in Locke's solution. Coverslips were optically coupled to the planar face of the prism with immersion oil (Carl Zeiss Microimaging, Inc.). The laser intensity was attenuated to \sim 1 mW, and illumination was restricted to image acquisition by a shutter coupled to the camera. The cells were observed through a water immersion objective 60X 0.9 NA (Olympus), and the images were captured with a CDD camera (Photometrics CoolSnap HQ; Roper Scientific). In the present work, frames were acquired at 2 Hz in stacks of 120 images. Exposure

times were of 100–300 ms, depending upon the signal to noise ratio, and under these conditions, <5% photobleaching occurred.

Analysis of SG motion

The positions of SGs in an x,y plane parallel to the membrane glass interface were determined using software modules provided by Metamorph (Universal Imaging). Occasionally, the image stacks were processed by a long pass filter (Steyer and Almers, 1999) before tracking the vesicles. For tracking, SGs that did not collide with neighboring granules and that stay bright for at least 30 images (15 s) were selected. A threshold brightness was then chosen, resulting in binary stacks where SGs appeared as single continuous regions of bright pixels. The position of the tracked SGs was determined as the mass center of these contiguous bright pixels. The trajectories were derived from the SG positions on each frame. For each SG trajectory, the MSD in the x,y plane was calculated according to Steyer and Almers (1999). Plots of MSD as a function of Δt were linear for $\Delta t < 5$ s, and a two-dimension diffusion constant $D_{x,y}$ was derived from the slope of the curve.

Statistical analyses

Significance of differences was calculated with *t* test or Mann-Whitney U test; *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001.

Online supplemental material

The supplemental material (Figs. S1–S4, Videos 1–5, and supplemental Materials and methods) is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200302157/DC1>. Fig. S1 shows the presence of Rab27A in subcellular fractions enriched in SGs. Fig. S2 shows the distribution of Rab27A constructs in PC12 cells. Fig. S3 illustrates the cellular expression of the different constructs used in this study. Fig. S4 depicts how Rab27A and MyRIP may bridge SGs to actin. The videos illustrate the effect of Rab27A and MyRIP on SG motion. Plasmid constructions and protocols used for immunocytochemistry and subcellular fractionation are described in the supplemental Materials and methods.

We thank R.E. Cheney and E. Coudrier for helpful discussion, M.C. Seabra for anti-Rab27a antibodies used in some experiments, and A. Schmidt for critical reading of the manuscript.

J.-S. Schonn was supported by a fellowship from the Fondation de la Recherche Médicale, and S. Huet was supported by the Direction Générale de l'Armement. This work was supported by a grant from the Ministère de la Recherche (DRAB).

Submitted: 25 February 2003

Accepted: 4 September 2003

References

- Axelrod, D. 1981. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J. Cell Biol.* 89:141–145.
- Bahadoran, P., E. Aberdam, F. Mantoux, R. Busca, K. Bille, N. Yalman, G. de Saint-Basile, R. Casaroli-Marano, J.P. Ortonne, and R. Ballotti. 2001. Rab27a: a key to melanosome transport in human melanocytes. *J. Cell Biol.* 152:843–850.
- Barral, D.C., J.S. Ramalho, R. Anders, A.N. Hume, H.J. Knapton, T. Tolmachova, L.M. Collinson, D. Goulding, K.S. Authi, and M.C. Seabra. 2002. Functional redundancy of Rab27 proteins and the pathogenesis of Griscelli syndrome. *J. Clin. Invest.* 110:247–257.
- Bhakdi, S., U. Weller, I. Walev, E. Martin, D. Jonas, and M. Palmer. 1993. A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 182:167–175.
- Darchen, F., A. Zahraoui, F. Hammel, M.P. Monteils, A. Tavitian, and D. Scherman. 1990. Association of the GTP-binding protein Rab3A with bovine adrenal chromaffin granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:5692–5696.
- Denzer, K., M.J. Kleijmeier, H.F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H.J. Geuze. 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J. Cell Sci.* 113(Pt 19):3365–3374.
- El-Amraoui, A., J.S. Schonn, P. Kussel-Andermann, S. Blanchard, C. Desnos, J.P. Henry, U. Wolftrum, F. Darchen, and C. Petit. 2002. MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes. *EMBO Rep.* 3:463–470.
- Föhr, K.J., W. Warchol, and M. Gratzl. 1993. Calculation and control of free divalent cations in solutions used for membrane fusion studies. *Methods Enzymol.* 221:149–157.
- Fukuda, M., and T.S. Kuroda. 2002. Slac2-c (synaptotagmin-like protein homo-

- logue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin. *J. Biol. Chem.* 277:43096–43103.
- Fukuda, M., E. Kanno, C. Saegusa, Y. Ogata, and T.S. Kuroda. 2002a. Slp4-a/granuphilin-a regulates dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 277:39673–39678.
- Fukuda, M., T.S. Kuroda, and K. Mikoshiba. 2002b. Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J. Biol. Chem.* 277:12432–12436.
- Haddad, E.K., X. Wu, J.A. Hammer III, and P.A. Henkart. 2001. Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *J. Cell Biol.* 152:835–842.
- Hume, A.N., L.M. Collinson, A. Rapak, A.Q. Gomes, C.R. Hopkins, and M.C. Seabra. 2001. Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J. Cell Biol.* 152:795–808.
- Hume, A.N., L.M. Collinson, C.R. Hopkins, M. Strom, D.C. Barral, G. Bossi, G.M. Griffiths, and M.C. Seabra. 2002. The leaden gene product is required with Rab27a to recruit myosin Va to melanosomes in melanocytes. *Traffic.* 3:193–202.
- Johannes, L., P.M. Lledo, M. Roa, J.D. Vincent, J.P. Henry, and F. Darchen. 1994. The GTPase Rab3a negatively controls calcium-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. *EMBO J.* 13:2029–2037.
- Lang, T., I. Wacker, I. Wunderlich, A. Rohrbach, G. Giese, T. Soldati, and W. Almers. 2000. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys. J.* 78:2863–2877.
- Matesic, L.E., R. Yip, A.E. Reuss, D.A. Swing, T.N. O'Sullivan, C.F. Fletcher, N.G. Copeland, and N.A. Jenkins. 2001. Mutations in Mlph, encoding a member of the Rab effector family, cause the melanosome transport defects observed in leaden mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:10238–10243.
- Ménasché, G., E. Pastural, J. Feldmann, S. Certain, F. Ersoy, S. Dupuis, N. Wulfraat, D. Bianchi, A. Fischer, F. Le Deist, and G. de Saint Basile. 2000. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* 25:173–176.
- Ménasché, G., J. Feldmann, A. Houdusse, C. Desaynard, A. Fischer, B. Goud, and G. de Saint Basile. 2003. Biochemical and functional characterization of Rab27a mutations occurring in Griscelli syndrome patients. *Blood.* 101:2736–2742.
- Nakata, T., and N. Hirokawa. 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.
- Oheim, M., and W. Stuhmer. 2000. Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys. J.* 29:67–89.
- Ornberg, R.L., L.T. Duong, and H.B. Pollard. 1986. Intragranular vesicles: new organelles in the secretory granules of adrenal chromaffin cells. *Cell Tissue Res.* 245:547–553.
- Provance, D.W., Jr., M. Wei, V. Ipe, and J.A. Mercer. 1996. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:14554–14558.
- Raposo, G., M.J. Kleijmeer, G. Posthuma, J.W. Slot, and H.J. Geuze. 1997. Immunogold labeling of ultrathin cryosections: application in immunology. In *Handbook of Experimental Immunology*. 5th ed. Vol. 4. L.A. Herzenberg, D. Weir, C. Blackwell, editors. Blackwell Science, Cambridge, MA. 1–11.
- Rosé, S.D., T. Lejen, L. Casaletti, R.E. Larson, T.D. Pene, and J.M. Trifaro. 2003. Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J. Neurochem.* 85:287–298.
- Rudolf, R., T. Salm, A. Rustom, and H.H. Gerdes. 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.
- Rudolf, R., T. Kogel, S.A. Kuznetsov, T. Salm, O. Schlicker, A. Hellwig, J.A. Hammer III, and H.H. Gerdes. 2003. Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. *J. Cell Sci.* 116:1339–1348.
- Sagné, C., C. Agulhon, P. Ravassard, M. Darmon, M. Hamon, S. El Mestikawy, B. Gasnier, and B. Giros. 2001. Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:7206–7211.
- Schlüter, O.M., M. Khvotchev, R. Jahn, and T.C. Sudhof. 2002. Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J. Biol. Chem.* 277:40919–40929.
- Schonn, J.S., C. Desnos, J.P. Henry, and F. Darchen. 2003. Transmitter uptake and release in PC12 cells overexpressing plasma membrane monoamine transporters. *J. Neurochem.* 84:669–677.
- Slot, J.W., H.J. Geuze, S. Gigengack, G.E. Lienhard, and D. James. 1991. Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J. Cell Biol.* 113:123–135.
- Sönnichsen, B., S. De Renzi, E. Nielsen, J. Rietdorf, and M. Zerial. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* 149:901–914.
- Spector, I., N.R. Shochet, Y. Kashman, and A. Groweiss. 1983. Latrunculin: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science.* 219:493–495.
- Steyer, J.A., and W. Almers. 1999. Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 76:2262–2271.
- Stinchcombe, J.C., D.C. Barral, E.H. Mules, S. Booth, A.N. Hume, L.M. Machesky, M.C. Seabra, and G.M. Griffiths. 2001. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J. Cell Biol.* 152:825–834.
- Strobel, M.C., P.K. Seperack, N.G. Copeland, and N.A. Jenkins. 1990. Molecular analysis of two mouse dilute locus deletion mutations: spontaneous dilute lethal20J and radiation-induced dilute prenatal lethal Aa2 alleles. *Mol. Cell Biol.* 10:501–509.
- Strom, M., A.N. Hume, A.K. Tarafder, E. Barkagianni, and M.C. Seabra. 2002. A family of Rab27-binding proteins: melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport. *J. Biol. Chem.* 277:25423–25430.
- Trifaro, J., S.D. Rose, T. Lejen, and A. Elzagallaai. 2000. Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie.* 82:339–352.
- Wick, P.F., R.A. Senter, L.A. Parsels, M.D. Uhler, and R.W. Holz. 1993. Transient transfection studies of secretion in bovine chromaffin cells and PC12 cells. Generation of kainate-sensitive chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 268:10983–10989.
- Wightman, R.M., J.A. Jankowski, R.T. Kennedy, K.T. Kawagoe, T.J. Schroeder, D.J. Leszczyszyn, J.A. Near, E.J. Diliberto, Jr., and O.H. Viveros. 1991. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10754–10758.
- Wilson, S.M., R. Yip, D.A. Swing, T.N. O'Sullivan, Y. Zhang, E.K. Novak, R.T. Swank, L.B. Russell, N.G. Copeland, and N.A. Jenkins. 2000. A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:7933–7938.
- Wu, X., B. Kocher, Q. Wei, and J.A. Hammer III. 1998. Myosin Va associates with microtubule-rich domains in both interphase and dividing cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 40:286–303.
- Wu, X., K. Rao, M.B. Bowers, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and J.A. Hammer III. 2001. Rab27a enables myosin Va-dependent melanosome capture by recruiting the myosin to the organelle. *J. Cell Sci.* 114:1091–1100.
- Wu, X.S., K. Rao, H. Zhang, F. Wang, J.R. Sellers, L.E. Matesic, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and J.A. Hammer III. 2002. Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat. Cell Biol.* 4:271–278.
- Yi, Z., H. Yokota, S. Torii, T. Aoki, M. Hosaka, S. Zhao, K. Takata, T. Takeuchi, and T. Izumi. 2002. The Rab27a/granuphilin complex regulates the exocytosis of insulin-containing dense-core granules. *Mol. Cell Biol.* 22:1858–1867.
- Zhao, S., S. Torii, H. Yokota-Hashimoto, T. Takeuchi, and T. Izumi. 2002. Involvement of Rab27b in the regulated secretion of pituitary hormones. *Endocrinology.* 143:1817–1824.

3.4. Le rôle de la myosine Va dans la capture des granules de sécrétion en périphérie de la cellule et leur accrochage à la membrane plasmique

Les travaux décrits dans le paragraphe précédent ont permis de déterminer le rôle des protéines Rab27A et MyRIP au cours du processus de sécrétion régulée. Celui de la myosine Va, qui constitue le troisième partenaire du complexe impliqué dans les interactions entre les GS et le cytosquelette d'actine, restait en revanche à préciser. En effet, lors des observations en microscopie TIRF, il apparaissait que c'était la liaison des GS à l'actine *via* le domaine C-terminal de MyRIP, et non pas *via* la myosine Va, qui contrôlait les mouvements des GS dans la région juxta-membranaire. Ainsi, la mobilité de ces organites dans des cellules exprimant la construction MyRIP-RBD était identique à celle obtenue dans des cellules exprimant MyRIP- Δ Cter.

Plusieurs études montrent cependant que la myosine Va semble jouer un rôle important non seulement dans la dispersion des GS au sein du réseau d'actine mais également dans le processus d'exocytose (Rudolf, Kogel et al., 2003 ; Varadi, Tsuboi et al., 2005). En collaboration avec l'équipe de François Darchen au sein du laboratoire, nous avons donc cherché à déterminer la fonction exacte de ce moteur moléculaire lors du recrutement des GS en périphérie de la cellule. Ma contribution à ce travail concerne spécifiquement les observations effectuées en microscopie TIRF. J'ai ainsi analysé les différents effets sur les GS localisées en périphérie de la cellule d'une inhibition de la fonction de la myosine Va. Les résultats de ce travail ont été soumis à *The Journal of Cell Biology* (manuscrit joint à la fin de cette partie).

3.4.1. La distribution des granules de sécrétion au sein de la cellule dépend de MyRIP et de la myosine Va

La myosine Va est présente de manière endogène au sein des cellules de la lignée BON (voir Figure 48). Afin de déterminer la fonction de ce moteur moléculaire, nous avons appliqué deux stratégies différentes. D'une part, nous avons exprimé au sein des cellules différents mutants de la myosine Va incapables de se lier aux filaments d'actine. Ce type de mutants, en entrant en compétition avec la myosine Va endogène, est connu pour inhiber la fonction de cette protéine (Wu, Bowers et al., 1998 ; Rudolf, Kogel et al., 2003). Trois constructions ont

ainsi été étudiées (Figure 41) : la première correspond à l'extrémité globulaire de la myosine Va (MyoVa GT), la seconde comporte le domaine globulaire ainsi que les exons A, C, E et F (MyoVa tail) et enfin la troisième inclut également la zone de dimérisation entre les deux monomères formant la myosine Va (MyoVa long tail). Ces différentes constructions sont fusionnées à différents marqueurs⁸ (GFP, mRFP ou étiquettes myc ou FLAG ; pour plus de détails sur la composition de ces étiquettes, voir Matériels et méthodes). D'autre part, la fonction de la myosine Va a également été étudiée grâce au blocage de l'expression de cette protéine dans les cellules BON par la méthode d'interférence à l'ARN.

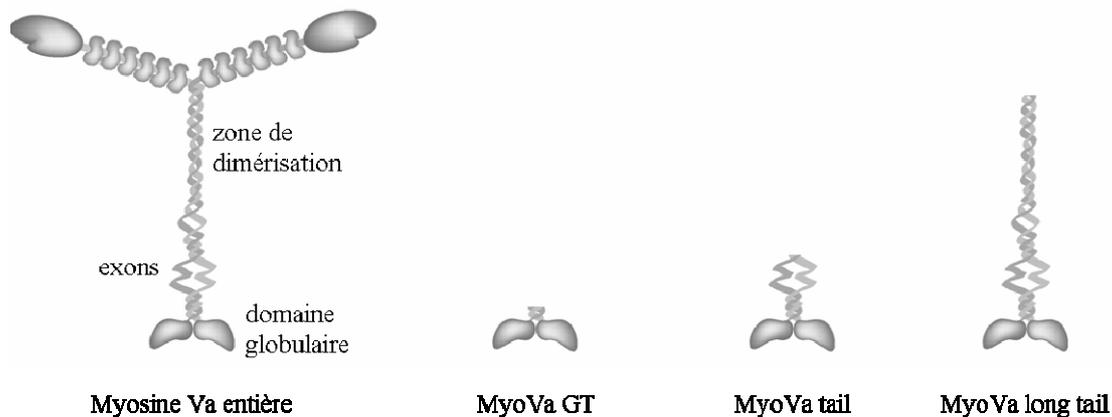


Figure 41 : Les différentes formes tronquées de la myosine Va exprimées au sein des cellules BON. Ces différentes constructions sont incapables de se lier à l'actine. En entrant en compétition avec la myosine Va endogène, elles sont censées inhiber la fonction de ce moteur moléculaire.

3.4.1.1. La MyoVa tail se localise à la surface des granules de sécrétion

La localisation des différentes formes tronquées de la myosine Va au sein des cellules BON a tout d'abord été observée par microscopie à épifluorescence après fixation de ces cellules. La MyoVa GT se répartit ainsi de manière uniforme au sein du cytoplasme (Figure 42C). Après 24 heures d'expression au sein des cellules BON, la MyoVa tail et la MyoVa long tail présentent quant à elles une distribution ponctuée (voir (Figure 42E) dans le cas de la MyoVa tail). Pour des temps d'expression plus longs, ces deux constructions ont tendance à former des agrégats (voir plus loin). Nous avons également observé que la MyoVa tail était colocalisée avec des marqueurs des GS tels que la NPY-mRFP (Figure 42, E et F). Afin de confirmer la présence de cette construction à la surface des GS, des cellules BON exprimant simultanément la MyoVa tail ainsi que la NPY-mRFP ont été observées par microscopie

⁸ Lorsque le marqueur utilisé n'est pas mentionné explicitement, les termes MyoVa GT, tail et long tail désignent les constructions fusionnées à la GFP.

TIRF (Figure 42, G-J). Environ 80 % des structures marquées par la MyoVa tail correspondent à des GS (400 structures issues de 10 cellules). Il apparaît également que ces structures marquées par la MyoVa tail suivent des trajectoires identiques à celles décrites par les GS (Figure 42, I et J ainsi que Vidéo 9).

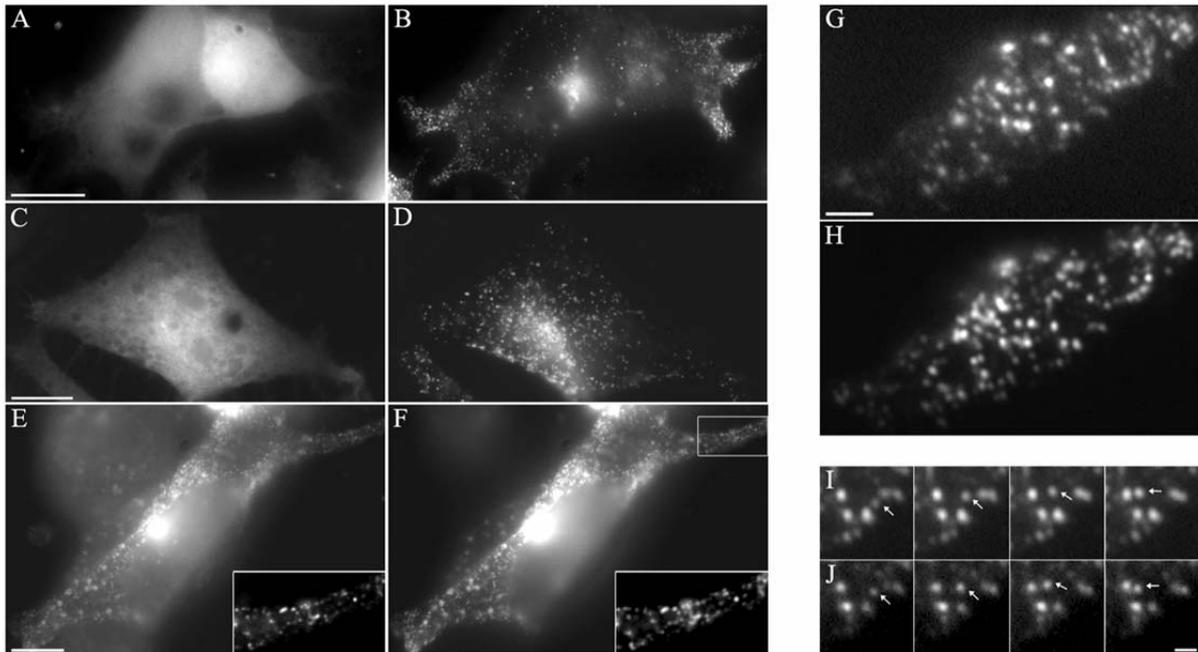


Figure 42 : Localisation intracellulaire des différentes constructions tronquées de la myosine Va. (A-F) Images en microscopie à épifluorescence de cellules exprimant à la fois la NPY-mRFP (B, D et F) et soit la GFP (A), la GFP-MyoVa (C) ou la GFP-MyoVa tail (E). A la différence de la GFP-MyoVa GT, qui se répartit de manière uniforme au sein du cytoplasme (C), la GFP-MyoVa tail présente une distribution ponctuelle, colocalisée avec la NPY-mRFP (E et F). L'encart présent sur les images E et F correspond à un agrandissement de la région encadrée en F. Barres d'échelle (pour A-E) : 10 μm . (G-J) Images en microscopie TIRF ($\delta = 150 \text{ nm}$) de cellules exprimant simultanément la NPY-mRFP et la GFP-MyoVa tail (G-J). La plupart des structures marquées par la GFP-MyoVa tail (G) sont colocalisées avec les GS marquées par la NPY-mRFP (H). Barre d'échelle en G : 2,5 μm . Les séquences d'images réalisées en double marquage (acquisition à 4Hz) montrent que les structures marquées par la GFP-MyoVa tail (J) suivent des trajectoires identiques à celles décrites par les GS (I). Barre d'échelle en J : 1 μm .

Ces résultats montrent donc que la MyoVa tail est localisée à la surface des GS dans les cellules BON. Ils indiquent également que la fixation de cette construction sur les GS fait intervenir non seulement son extrémité globulaire, mais également la zone comprenant les exons. Ceci est en accord avec de précédentes études montrant que l'exon F participe à la liaison de la myosine Va sur la mélanophiline (Wu, Rao et al., 2002 ; Fukuda and Kuroda, 2004).

Par opposition à cette localisation très majoritairement granulaire de la MyoVa tail, l'étude de la répartition de la myosine Va endogène, reconnue grâce à un anticorps dirigé contre son

extrémité globulaire, montre que seule une faible proportion de cette protéine est localisée au niveau des GS. Afin d'exclure la possibilité d'un défaut de reconnaissance de l'anticorps utilisé, nous avons vérifié que celui-ci se liait bien à la MyoVa tail. Plusieurs études précédentes décrivent également une telle colocalisation partielle entre la myosine Va et des marqueurs des GS (Rose, Lejen et al., 2003 ; Rudolf, Kogel et al., 2003 ; Ivarsson, Jing et al., 2005)

Cette différence de localisation suggère que, contrairement au cas de la MyoVa tail, l'accrochage de la myosine Va non tronquée à la surface des GS puisse être un processus régulé. Ainsi, il a été montré que cette protéine pouvait adopter deux états conformationnels : un état "fermé" et un état "ouvert" (voir l'introduction de cette partie). Seules les protéines dans l'état ouvert seraient alors susceptibles de se lier aux GS. La MyoVa tail, ne pouvant adopter la conformation fermée (qui correspondrait au repliement des têtes processives sur l'extrémité globulaire), serait quant à elle toujours fixée sur les GS.

3.4.1.2. La MyoVa tail provoque l'agrégation des granules de sécrétion

Comme cela avait précédemment observé dans le cas des cellules PC-12 (Rudolf, Kogel et al., 2003), l'expression de la MyoVa long tail dans les cellules BON induit une agrégation massive des GS. Un tel effet d'agrégation pourrait être dû aux propriétés de dimérisation de cette forme tronquée de la myosine Va. Ainsi, l'association de monomères de la MyoVa long tail présents à la surface des GS permettrait de lier ces organites entre eux. Afin d'exclure cette possibilité, nous avons étudié l'effet sur la répartition des GS au sein des cellules BON de constructions ne possédant pas le domaine de dimérisation. La MyoVa GT ne provoque pas la formation d'agrégats de GS, ce qui est en accord avec son incapacité à s'associer à ces organites (Figure 42C). En revanche, la MyoVa tail induit une agrégation importante des GS (Figure 43, B et E). Le nombre et la taille des agrégats augmentent avec la durée d'expression de cette construction au sein des cellules (72 heures après la transfection, on ne trouve quasiment plus de GS non agrégés). Ce phénomène d'agrégation progressive de GS initialement individualisés indique que la présence des amas n'est pas due à un défaut de bourgeonnement au niveau du réseau *trans*-golgien lors de la biogénèse de ces organites. Une observation attentive des images obtenues montre de plus que des GS individuels sont discernables au sein de ces amas (Figure 43B), suggérant que le processus d'agrégation ne s'accompagne pas d'une fusion massive des GS. Nous avons également observé un tel effet

d'agrégation dans le cas où la MyoVa tail est marquée par la mRFP ou par une étiquette FLAG. Ceci indique que cet effet n'est pas dû au marquage de la MyoVa tail par la GFP.

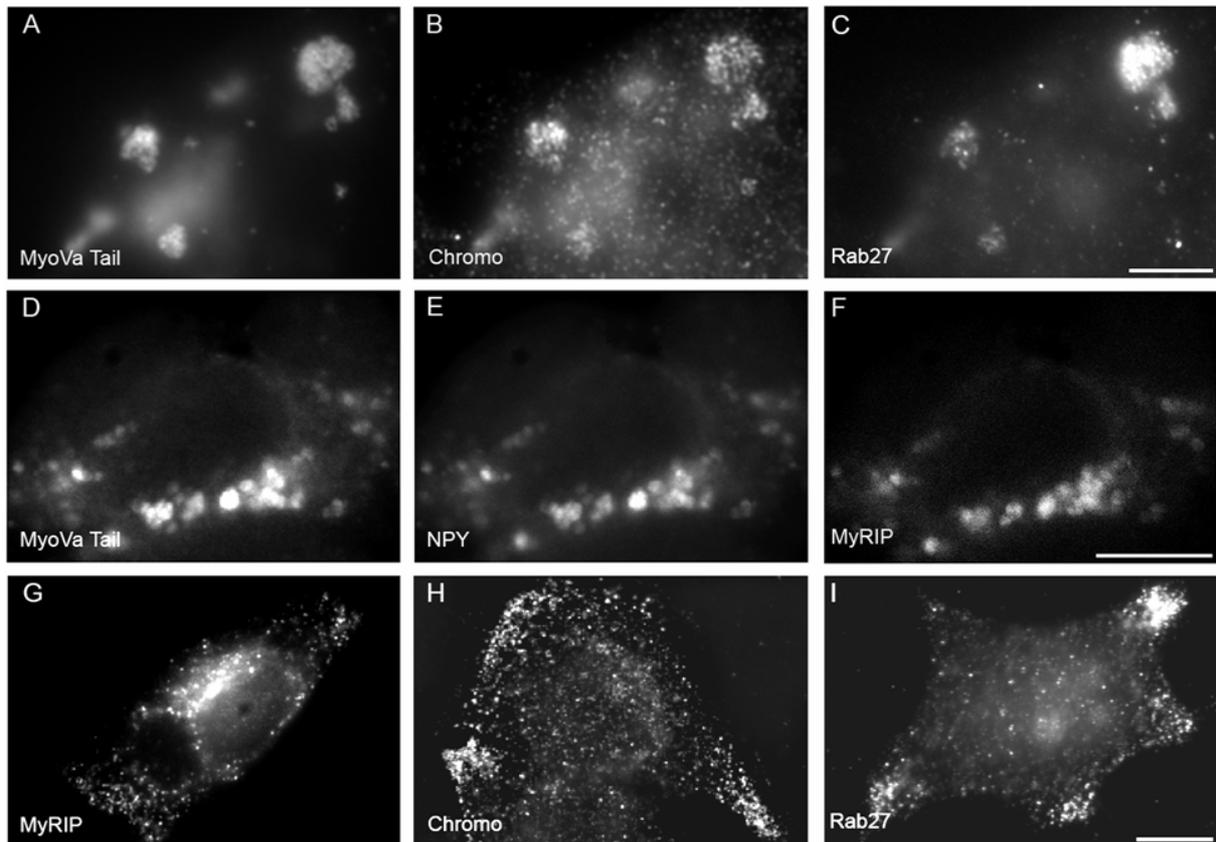


Figure 43 : L'expression de la MyoVa tail induit la formation d'agrégats de GS. La distribution des GS, marquées par un anticorps anti-chromogranine (B, H) ou par la NPY-mRFP (E), a été étudiée dans des cellules témoins (G-I) ou exprimant la GFP-MyoVa tail (A-F). En conditions témoins, les GS apparaissent comme des points fluorescents individualisés (H). En revanche, dans les cellules exprimant la GFP-MyoVa tail, ces organites forment des agrégats (B, E). MyRIP et Rab27A sont localisées au niveau des agrégats dans les cellules exprimant la GFP-MyoVa tail (C, F) alors qu'elles présentent une distribution semblable à celle observée pour les GS dans les cellules témoins (G, I). Barres d'échelle : 10 μ m

Afin de vérifier que ce phénomène d'agrégation est spécifique des GS, nous avons analysé l'impact de la MyoVa tail sur la distribution de marqueurs de différents organites : les endosomes précoces, les lysosomes, le réticulum endoplasmique, les réseaux *cis* et *trans*-golgiens et les mitochondries. Aucun de ces compartiments ne semble affecté par l'expression de la MyoVa tail (Figure 44). Toutefois, la protéine Rab11b, qui n'est pas colocalisée avec les GS dans les cellules témoins, semble être présente au sein des agrégats (voir Figure 47). Cette protéine étant un marqueur des endosomes de recyclage, ce résultat suggère que la MyoVa tail pourrait interagir avec certains compartiments de la voie d'endocytose.

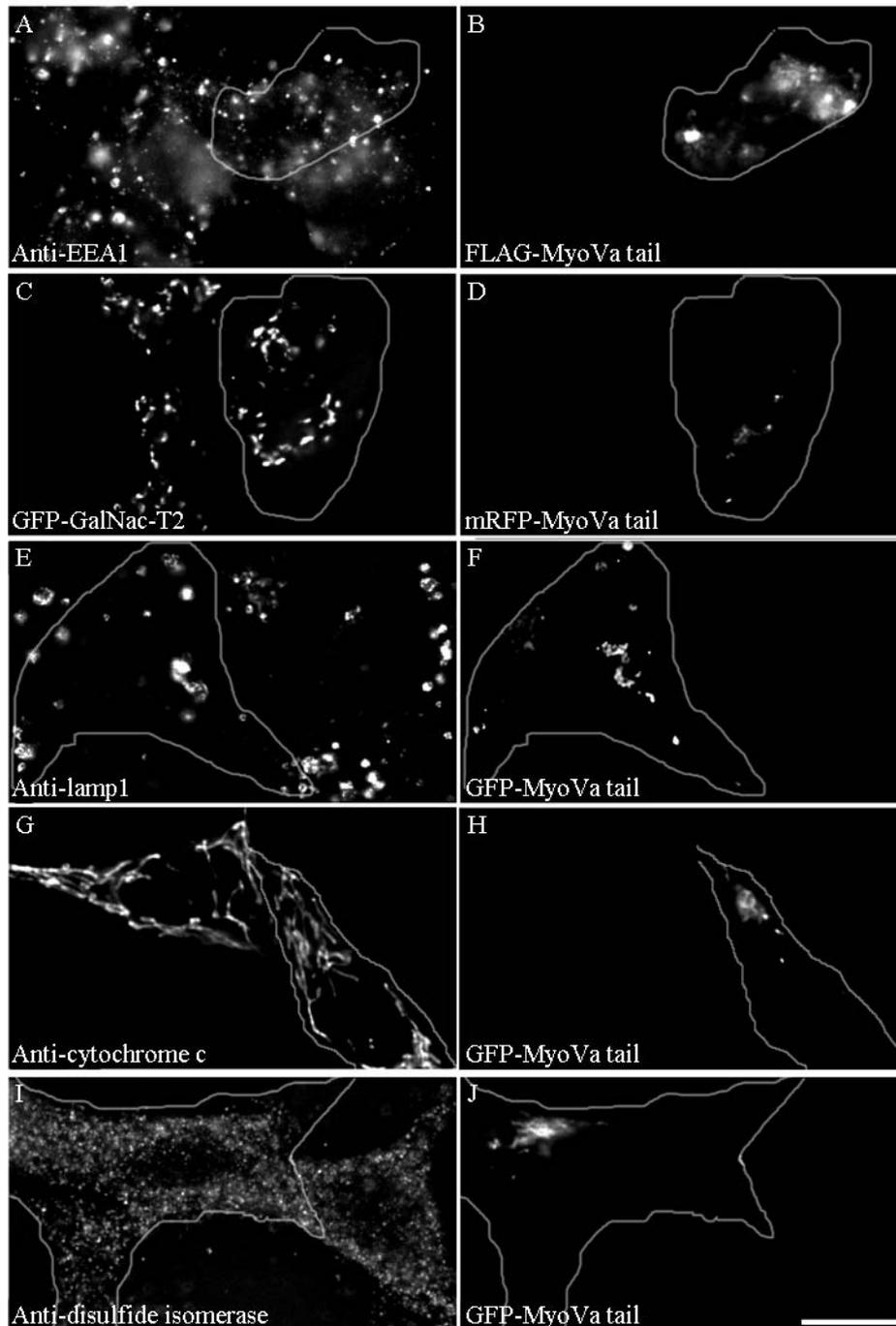


Figure 44 : La MyoVa tail affecte spécifiquement la distribution des GS. Cellules BON transfectées par la MyoVa tail fusionnée à une étiquette FLAG (A, B), à la mRFP (C, D) ou à la GFP (E-J) et marquées par immunofluorescence deux jours après transfection. Les images B, D, F, H et J représentent la distribution de la MyoVa tail au sein des cellules. Les cellules dont le contour a été tracé correspondent à celles exprimant la MyoVa tail. (A, B) Cellules marquées par un anticorps anti-EEA1 (A), permettant de visualiser les endosomes précoces, et par un anticorps anti-myosine Va (B). (C) Cellules co-transfectées par la GFP-GalNAC-T2 afin de marquer le réseau *trans*-golgien. (E) Marquage des lysosomes par un anticorps anti-lamp1. (G) Marquage des mitochondries par un anticorps anti-cytochrome c. (I) Marquage du réticulum endoplasmique par un anticorps anti-disulfide isomerase. Aucun des différents compartiments étudiés ne semble affecté par la présence de la MyoVa tail. Les images C à J ont été déconvoluées. Barre d'échelle : 10 μ m

Nous avons enfin observé que les cytosquelettes d'actine et de microtubules n'étaient pas affectés par l'expression de la MyoVa tail. Il apparaît également que les agrégats de GS ne sont pas associés à des régions particulièrement denses du réseau d'actine. De plus, la dépolymérisation de ce réseau par la latrunculine B n'induit pas la dissociation de ces agrégats. Ces résultats suggèrent que le cytosquelette d'actine ne soit pas impliqué dans la formation des amas de GS au sein des cellules exprimant la MyoVa tail.

Les agrégats de GS présents dans des cellules exprimant à la fois la MyoVa tail et la NPY-mRFP ne sont généralement pas visibles par microscopie TIRF ($\delta = 150$ nm), indiquant que ces structures ne sont pas localisées au voisinage immédiat de la membrane plasmique. En revanche, ces observations mettent en évidence l'existence de tubules marqués par la NPY-mRFP dans environ 30 % des cellules (Figure 45 et Vidéo 10). De tels tubules sont extrêmement rares dans le cas de cellules n'exprimant pas la MyoVa tail. Les séquences d'images obtenues montrent que certains de ces tubules sont quasiment immobiles tandis que d'autres décrivent des mouvements très rapides, probablement de nature dirigée. La vitesse de ces tubules mobiles ($1,13 \pm 0,08$ $\mu\text{m/s}$, 19 tubules issus de 6 cellules, mesure de la vitesse de déplacement du barycentre de ces tubes) est nettement supérieure à celle mesurée pour des GS se déplaçant le long des microtubules ($0,5-0,6$ $\mu\text{m/s}$, voir plus loin dans cette partie ainsi que le paragraphe consacré à cette catégorie de mouvements dans la partie 3.2. intitulée "Caractérisation des mouvements des granules de sécrétion dans la région juxta-membranaire"). Une observation attentive des séquences d'acquisition suggère de plus que ces tubules se forment à partir de structures relativement immobiles marquées par la NPY-mRFP (Vidéo 11). Il semble ainsi que ces structures subissent des forces de traction induisant leur déformation et l'apparition de tubules.

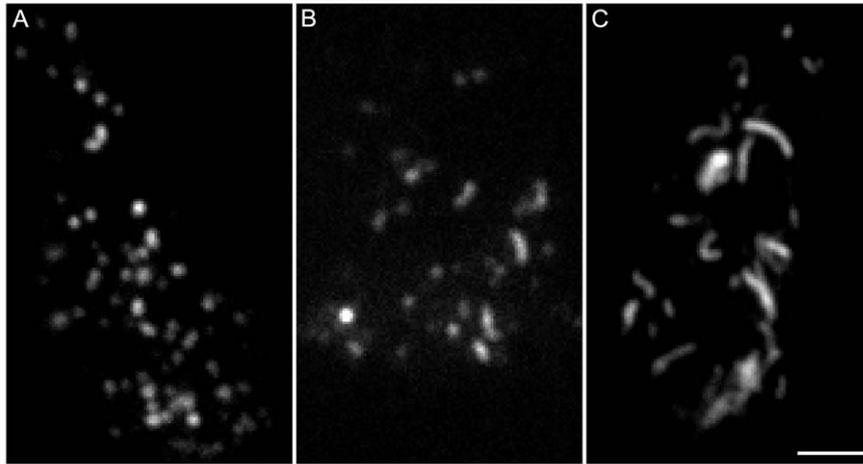


Figure 45 : La MyoVa tail induit l'apparition de tubules. GS marquées par la NPY-mRFP et observées par microscopie TIRF ($\delta = 150$ nm) dans des cellules témoins (A) ou exprimant la GFP-MyoVa tail (B, C). La présence de la MyoVa tail provoque l'apparition de tubules marqués par la NPY-mRFP. Des images similaires ont été obtenues dans des cellules exprimant la NPY-GFP et la mRFP-MyoVa tail. Barre d'échelle : 2,5 μ m.

Des études *in-vitro* ont mis en évidence la possibilité de générer des tubes de membrane en "tirant" sur des liposomes *via* des moteurs moléculaires se déplaçant le long des microtubules (Leduc, Campas et al., 2004). Il est possible qu'un processus similaire soit à l'origine de la formation des structures tubulaires observées. En effet, l'expression de la MyoVa tail au sein des cellules perturbe probablement l'équilibre entre les moteurs moléculaires ce qui pourrait notamment favoriser la coopération entre plusieurs kinésines ou dynéines. Une telle coopération pourrait être à l'origine non seulement de la formation des tubules mais également des déplacements très rapides caractérisant ces structures. Alternativement, il a été montré récemment que la myosine 1b et l'actine contrôlaient la morphologie des endosomes tardifs (Salas-Cortes, Ye et al., 2005). Ainsi, la surexpression de la myosine 1b ou la perturbation de la dynamique du réseau d'actine grâce à un traitement des cellules par la cytochalasine D induit la formation d'extensions tubulaires à la surface de ces endosomes. Par analogie avec ces observations, il est donc possible que la myosine Va soit impliquée directement dans le contrôle de la morphologie des GS.

3.4.1.3. L'agrégation des granules de sécrétion requiert l'accrochage de la MyoVa tail à la surface de ces organites par l'intermédiaire de la protéine MyRIP

Les travaux réalisés sur les protéines Rab27A et MyRIP dans les cellules PC-12 ont montré que ces deux protéines étaient localisées à la surface des GS et que MyRIP interagissait avec la myosine Va (voir la partie 3.3. intitulée "Le rôle de Rab27A et MyRIP dans l'accrochage

des granules de sécrétion au cortex d'actine"). Nous avons vérifié que ces résultats étaient également valables dans le cas des cellules BON (Figure 46). De telles observations suggèrent que le recrutement de ce moteur moléculaire à la surface des GS passe par l'intermédiaire du complexe Rab27A/MyRIP.

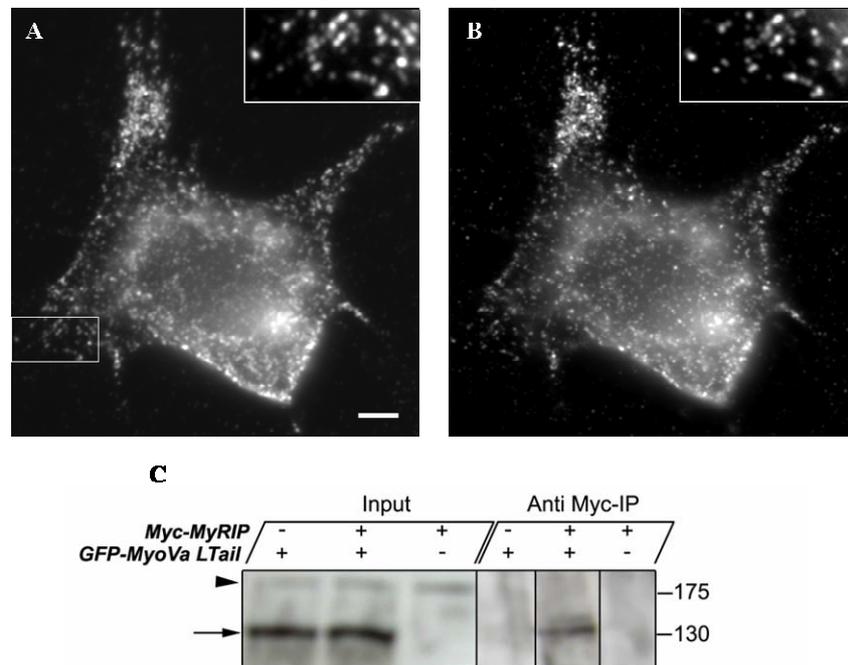


Figure 46 : La protéine MyRIP est présente à la surface des GS dans les cellules BON et interagit avec la MyoVa long tail. (A, B) Cellule marquée par un anticorps anti-chromogranine A/B (A) et un anticorps anti-MyRIP (B). L'encart présent sur les images A et B correspond à un agrandissement de la région encadrée en A. Barres d'échelle (pour A et B) : 3 μ m. (C) Co-immunoprécipitation de la GFP-MyoVa long tail avec la protéine MyRIP fusionnée à une étiquette myc à partir d'extraits de cellules BON. Ces cellules ont été transfectées trois jours avant la co-immunoprécipitation par la GFP-MyoVa long tail, la protéine MyRIP fusionnée à une étiquette myc ou les deux protéines. L'immunoprécipitation a été réalisée *via* un anticorps anti-myc puis l'immunomarquage a été effectué *via* un anticorps anti-myosine Va. La position de la myosine Va endogène et de la MyoVa long tail sont indiquées respectivement par une tête de flèche et une flèche.

En accord avec cette hypothèse, il apparaît que Rab27A et MyRIP sont localisés au niveau des agrégats de GS dans les cellules exprimant la MyoVa tail (voir Figure 43). Nous avons de plus cherché à déterminer si la formation de ces agrégats dépendait de MyRIP. Pour cela nous avons co-transfecté des cellules BON avec la MyoVa tail et soit Rab11b (cellules témoins), MyRIP (forme entière) ou MyRIP-RBD. Cette dernière construction est sensée bloquer le recrutement de la protéine MyRIP endogène par Rab27A. Trois jours après la double transfection, les cellules témoins présentent des agrégats de GS (Figure 47, A-C). Dans les cellules surexprimant MyRIP, cet effet d'agrégation semble plus marqué (Figure 47, G-I et J). En revanche, l'expression de MyRIP-RBD bloque l'apparition de ces amas de GS (Figure 47, D-F et J). De plus, la localisation de la MyoVa tail dans ces cellules semble plus diffuse que

celle observée dans des cellules témoins (Figure 47D). Ces différentes observations suggèrent donc que le complexe Rab27A/MyRIP constitue le récepteur de la MyoVa tail à la surface des GS.

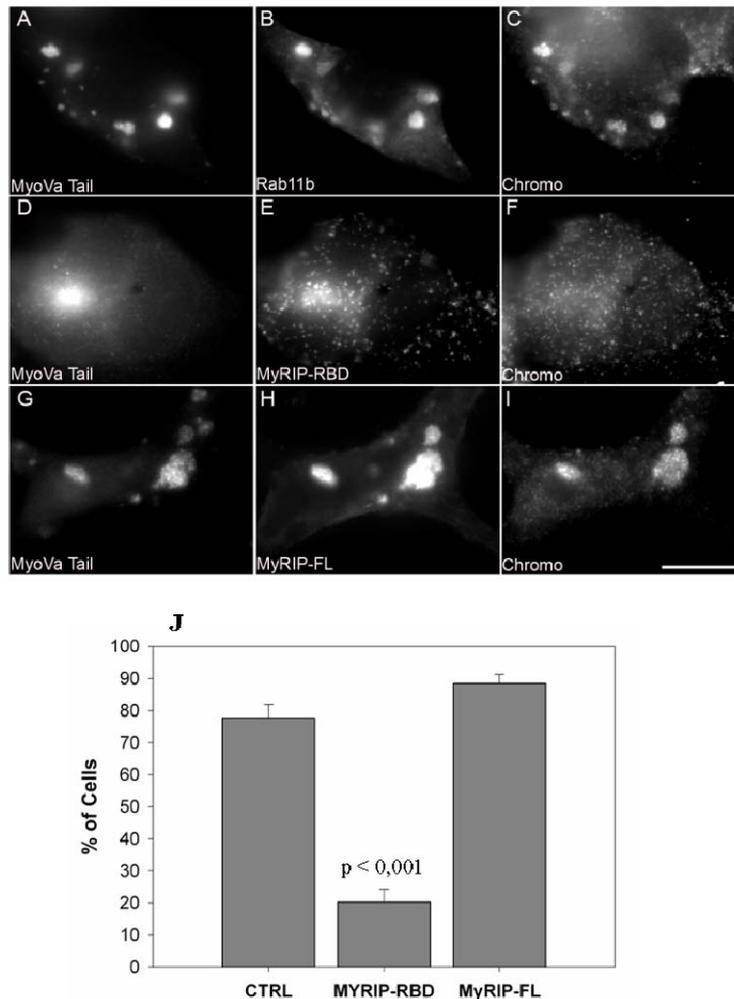


Figure 47 : L'agrégation des GS requiert l'accrochage de la MyoVa tail à la surface de ces organites par l'intermédiaire de la protéine MyRIP. (A-I) Cellules BON co-transfectées par la GFP-MyoVa tail et Rab11b fusionnée à une étiquette myc (cellules témoins, A-C), MyRIP-RBD fusionnée à une étiquette myc (D-F) ou la protéine MyRIP entière (MyRIP-FL) fusionnée à une étiquette myc (G-I). Trois jours après la transfection, la distribution des GS (marqués par un anticorps anti chromogranine A/B : C, F et I) est analysée dans les cellules exprimant les protéines transfectées (détectées par un anticorps anti-myc : B, E et H). Barre d'échelle : 10 μ m. (J) Pourcentage de cellules présentant des agrégats de GS dans des cellules co-exprimant la GFP-MyoVa tail et Rab11b (CTRL), MyRIP-RBD ou MyRIP-FL. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne (\pm l'erreur standard) des pourcentages calculés pour trois expériences indépendantes (240-280 cellules par condition).

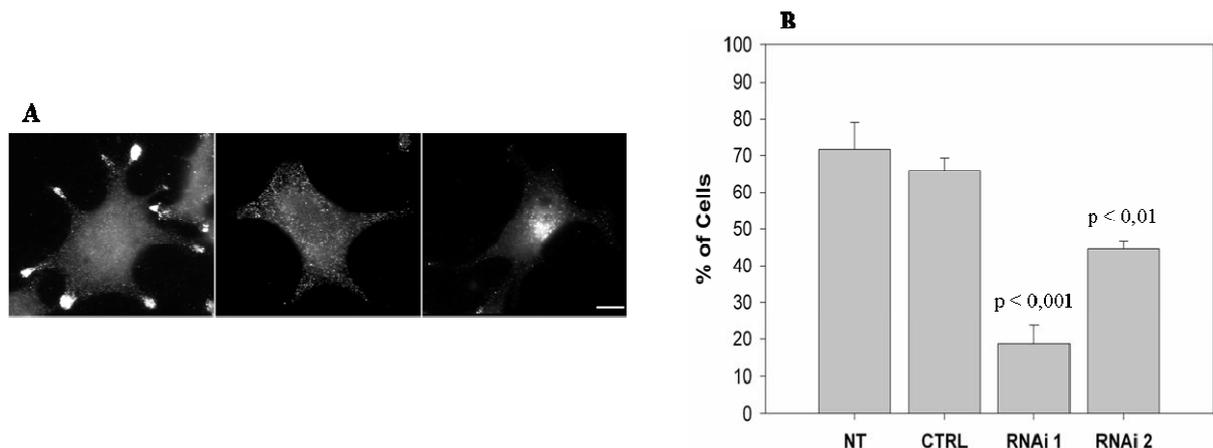


Figure 49 : L'inhibition de l'expression de la myosine Va perturbe la distribution des GS au sein des cellules. (A) Différents types de distribution des GS (marqués par un anticorps anti-Rab27A) au sein des cellules. Ces organites peuvent s'accumuler en périphérie de la cellule (panneau de gauche), être uniformément répartis (panneau central) ou présenter une localisation périnucléaire (panneau de droite). Alors qu'en conditions témoins, les GS s'accumulent en périphérie de la cellule, après un traitement par le RNAi 1 ou le RNAi 2, ces organites ont tendance à se regrouper dans la zone périnucléaire. Barre d'échelle : 10 μ m. (B) Quantification de l'effet du traitement par RNAi sur la distribution des GS. Les cellules ont été traitées par RNAi puis les GS ont été marqués par un anticorps anti-Rab27A ou anti-chromogranine A/B. Chaque cellule observée a ensuite été classée dans l'une des trois catégories définie en (A). L'histogramme présenté correspond au pourcentage moyen de cellules dans lesquelles les GS s'accumulent en périphérie pour des cellules non transfectées (NT, n = 3, 652 cellules), transfectées avec un RNAi témoin (CTRL, n = 4, 777 cellules) ou transfectées avec un RNAi dirigé contre la myosine Va (RNAi 1, n = 4, 843 cellules et RNAi 2, n = 3, 380 cellules).

Nous avons également observé que l'expression de la construction MyRIP-RBD au sein des cellules BON n'induit pas la formation d'agrégats de GS. En revanche, elle provoque le même type de modification de la répartition des GS que celle observée dans les cellules traitées par RNAi (Figure 50). L'ensemble de ces résultats suggère que, tout comme dans le cas des mélanosomes, la myosine Va soit impliquée dans la rétention des GS en périphérie de la cellule. Il semble de plus que cette fonction de rétention nécessite l'accrochage de cette protéine à la surface des GS par l'intermédiaire de MyRIP.

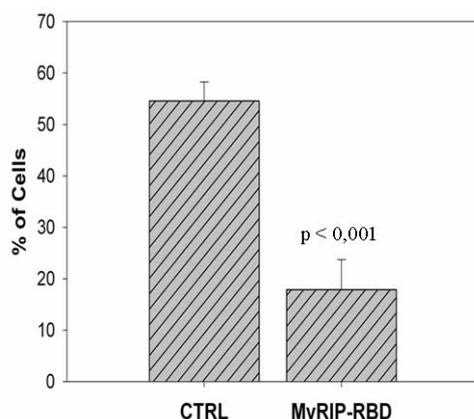


Figure 50 : MyRIP-RBD perturbe la distribution des GS au sein des cellules. Des cellules BON ont été co-transfectées par la NPY-GFP et un vecteur vide (CTRL) ou la construction MyRIP-RBD fusionnée à une étiquette myc. L'histogramme présenté correspond au pourcentage moyen de cellules dans lesquelles les GS s'accumulent en périphérie pour des cellules témoins ou exprimant MyRIP-RBD trois jours après la transfection (n = 5, 197 cellules témoins et 132 cellules exprimant MyRIP-RBD).

Dans les études précédentes montrant que l'expression de formes tronquées de la myosine Va induisait l'agrégation des GS, cet effet avait été considéré comme étant la conséquence directe de l'inhibition de l'activité motrice de ce moteur moléculaire (Rudolf, Kogel et al., 2003 ; Varadi, Tsuboi et al., 2005). Cependant, le fait que ni la réduction du niveau de myosine Va endogène par RNAi, ni l'expression de MyRIP-RBD ne provoquent la formation d'agrégats semble en contradiction avec une telle interprétation. Il est possible que la MyoVa tail, présente à la surface des GS, puisse recruter un partenaire permettant de lier ces organites entre eux, favorisant ainsi leur agrégation. Un tel partenaire reste toutefois à identifier.

3.4.2. La Myosine Va contrôle le recrutement et la mobilité des granules de sécrétion dans la région juxta-membranaire

Les résultats obtenus jusqu'ici indiquent que la myosine Va, qui semble se lier aux GS par l'intermédiaire du complexe Rab27A/MyRIP, participe au contrôle de la distribution de ces organites au sein de la cellule. Les observations réalisées sur des cellules traitées par RNAi ou exprimant MyRIP-RBD suggèrent en particulier que ce moteur moléculaire puisse être impliqué dans la rétention des GS à proximité de la membrane plasmique. Afin de préciser le rôle exact de la myosine Va dans ce processus de rétention périphérique, nous avons analysé par microscopie TIRF l'effet d'une inhibition de la fonction de cette protéine (par expression de la MyoVa tail ou traitement par RNAi) sur la densité et la mobilité des GS dans la région juxta-membranaire.

3.4.2.1. La myosine Va participe au recrutement des granules en périphérie de la cellule

La densité de GS visibles par microscopie TIRF ($\delta = 150$ nm) dans des cellules exprimant simultanément la MyoVa tail et la NPY-mRFP est nettement réduite par rapport aux cellules témoins. Cette diminution de densité est particulièrement marquée deux ou trois jours après la transfection. Cependant, pour de telles durées d'expression de la MyoVa tail, les cellules présentent des agrégats de GS et par conséquent, l'effet observé sur la densité de ces organites en périphérie de la cellule peut s'expliquer simplement par leur regroupement au sein de ces agrégats. Il apparaît toutefois que la MyoVa tail provoque une réduction de la densité de GS de l'ordre de 33 % dans des cellules exprimant cette construction depuis moins de 24 heures et ne présentant alors pas d'amas de GS (Figure 51). Ces observations sont donc en accord avec l'idée selon laquelle la myosine Va participe à la rétention des GS au sein du cortex d'actine.

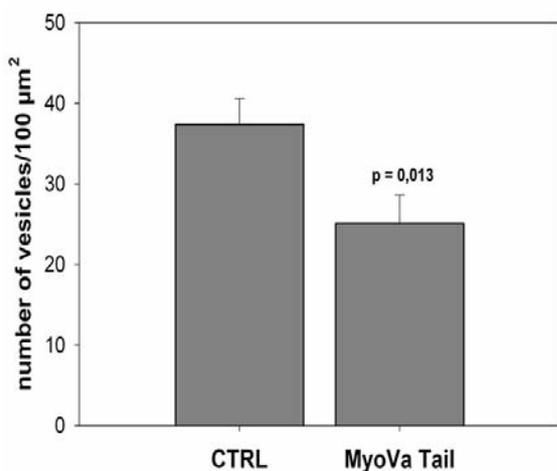


Figure 51 : La MyoVa tail provoque une diminution de la densité de GS en périphérie de la cellule. Des cellules BON ont été co-transfectées par la NPY-mRFP et un vecteur vide (CTRL) ou la GFP-MyoVa tail puis observées par microscopie TIRF ($\delta = 150$ nm), 24 heures après la transfection. Pour chaque cellule, la densité de GS a été déterminée en divisant le nombre de GS visibles par la surface de l'empreinte de la cellule ($n = 2$, 37 cellules témoins et 41 cellules exprimant la GFP-MyoVa tail).

Afin de valider le fait que la diminution de la densité de GS visibles en périphérie de la cellule observée en cas d'expression de la MyoVa tail est bien due à une inhibition de la fonction de la myosine Va endogène, nous avons étudié les conséquences d'un traitement des cellules par RNAi. Ces cellules ont été observées par microscopie TIRF à deux épaisseurs d'évanescence différentes. Comme cela était prévisible, le nombre de GS visibles pour $\delta = 150$ nm est supérieur à celui obtenu pour $\delta = 80$ nm (Figure 52). Dans les cellules traitées par RNAi, nous observons une diminution de la densité de ces organites de ~50 % pour une épaisseur d'évanescence de 150 nm et de ~75 % si cette épaisseur d'évanescence est réduite à 80 nm (Figure 52). Le fait que la réduction de densité soit plus marquée à $\delta = 80$ nm qu'à $\delta = 150$ nm suggère que la myosine Va joue un rôle non seulement dans la capture des GS en périphérie de la cellule mais également dans le transport de ces organites jusqu'à la membrane plasmique ou leur accrochage au niveau de cette membrane.

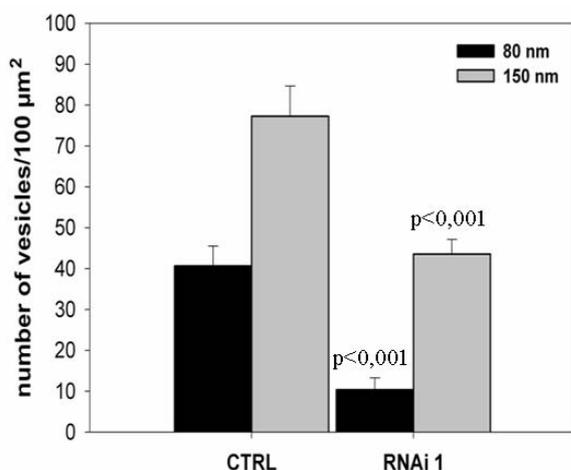


Figure 52 : L'inhibition de l'expression de la myosine Va par RNAi provoque une diminution de la densité de GS en périphérie de la cellule. Des cellules BON ont été transfectées une fois par jour durant trois jours avec un RNAi témoin (CTRL) ou le RNAi 1 dirigé contre la myosine Va. Le deuxième jour, les cellules ont été co-transfectées avec la NPY-GFP. La densité de GS visibles en microscopie TIRF a été mesurée pour des épaisseurs d'évanescence de 80 nm et 150 nm. L'histogramme présenté correspond à la densité moyenne mesurée pour 37 cellules témoins et 41 cellules traitées par le RNAi 1.

La diminution de densité observée dans le cas des cellules traitées par RNAi pourrait être un artéfact dû à un défaut d'adhérence de ces cellules induisant une augmentation de la distance séparant la membrane plasmique et la lamelle de verre au niveau de laquelle est générée l'onde évanescente. Afin d'exclure une telle possibilité, nous avons marqué le milieu baignant les cellules par un dextrane fluorescent (masse moléculaire égale à 150 kD). Dans le cas des cellules témoins, ce marqueur diffuse très peu entre la membrane plasmique et la lamelle de verre. Lors des acquisitions en microscopie TIRF, on observe alors une image "en négatif" de la cellule (Figure 53A). Dans le cas des cellules traitées par RNAi, les images obtenues sont similaires (Figure 53B). De plus l'intensité de fluorescence moyenne au niveau de la zone adhérente n'est pas modifiée dans les cellules traitées par RNAi par rapport aux cellules témoins. Ces observations montrent donc que l'inhibition de l'expression de la myosine Va par RNAi ne modifie pas l'adhérence des cellules. Par conséquent, les différences de densités de GS observées par microscopie TIRF entre les cellules témoins et celles traitées par RNAi sont bien le reflet d'une diminution du nombre de GS dans la zone juxta-membranaire en cas d'inhibition de l'expression de la myosine Va.

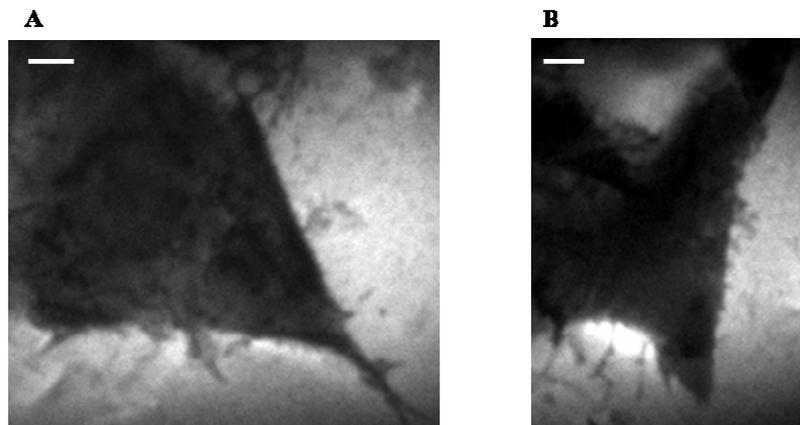


Figure 53 : L'inhibition de l'expression de la myosine Va par RNAi ne modifie pas l'adhérence des cellules. Des cellules BON ont été transfectées une fois par jour durant trois jours avec un RNAi témoin (A) ou le RNAi 1 dirigé contre la myosine Va (B). Lors des observations en microscopie TIRF ($\delta = 150$ nm), le milieu baignant les cellules a été marqué par un dextrane couplé à la fluorescéine (masse moléculaire de 150 kD, dilué à une concentration de 10 μ M). La région sombre correspond alors à la surface de contact entre la cellule et la lamelle de verre sur laquelle elle est cultivée. Barres d'échelle : 2 μ m.

Une observation attentive des images obtenues par microscopie TIRF montre que le traitement des cellules par RNAi induit non seulement une diminution de la densité de GS en périphérie de la cellule mais également une modification de la répartition de ces organites au sein de cette zone. En conditions témoins, cette répartition n'est pas homogène. Ainsi, 59 ± 2 % des cellules présentent des zones enrichies en GS généralement localisées en

bordure de ces cellules (Figure 54). En revanche, seules 10 ± 3 % des cellules traitées par RNAi présentent de telles zones enrichies. Ces observations peuvent être interprétées de deux manières différentes. D'une part, il est possible que ce moteur moléculaire, qui semble impliqué dans la rétention des GS au niveau de la région corticale, puisse favoriser une telle rétention dans certaines zones privilégiées de la périphérie de la cellule. D'autre part, la myosine Va pourrait participer au transport des GS jusqu'à certaines régions particulières du cytosquelette d'actine cortical ou de la membrane plasmique.

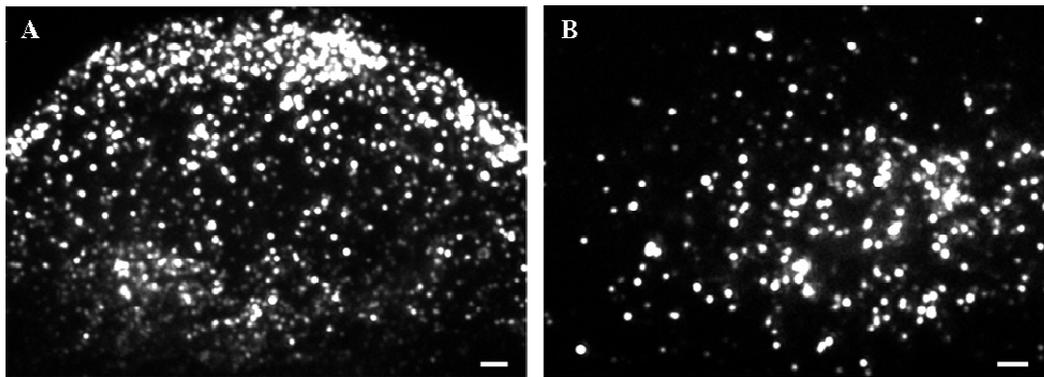


Figure 54 : L'inhibition de l'expression de la myosine Va par RNAi modifie la distribution des GS en périphérie de la cellule. Des cellules BON ont été transfectées une fois par jour durant trois jours avec un RNAi témoin (A) ou le RNAi 1 dirigé contre la myosine Va (B). Le deuxième jour, les cellules ont été co-transfectées avec la NPY-GFP. Les GS marqués par la NPY-GFP sont observés par microscopie TIRF ($\delta = 150$ nm). La densité de GS est plus faible dans les cellules traitées par le RNAi 1. De plus, la distribution des GS est plus homogène que dans les cellules témoins. Barres d'échelle : $2 \mu\text{m}$

Nous avons également cherché à déterminer si MyRIP jouait un rôle dans le recrutement des GS au niveau de la région juxta-membranaire. Dans les cellules surexprimant cette protéine, la densité de GS visibles par microscopie TIRF est augmentée par rapport aux cellules témoins. En revanche, l'expression de la construction MyRIP-RBD tend à diminuer cette densité (Figure 55). Ces observations renforcent donc l'idée selon laquelle MyRIP constitue le récepteur de la myosine Va à la surface des GS.

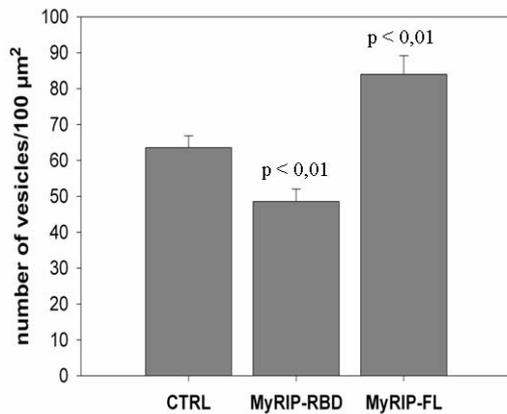


Figure 55 : La surexpression de MyRIP-RBD ou de la protéine MyRIP entière modifie la densité de GS en périphérie de la cellule. La densité moyenne de GS visibles en microscopie TIRF ($\delta = 150$ nm) a été mesurée dans des cellules co-transfectées par la NPY-mRFP et Rab11b fusionnée à une étiquette myc (CTRL, 39 cellules), MyRIP-RBD fusionnée à une étiquette myc (40 cellules) ou la protéine MyRIP entière fusionnée à une étiquette myc (MyRIP-FL, 38 cellules). Les observations ont été réalisées deux jours après la transfection.

3.4.2.2. La MyoVa tail modifie la mobilité des granules en périphérie de la cellule

Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'inhibition de la fonction de la myosine Va avait un effet sur la dynamique des GS en périphérie de la cellule. Pour cette analyse, nous n'avons pas utilisé la méthode de caractérisation des trajectoires décrite précédemment. L'étude des mouvements décrits par les GS grâce à cette méthode est en effet relativement longue à réaliser. Nous avons alors simplement caractérisé la mobilité des GS par l'intermédiaire de leurs coefficients de diffusion. A partir des séquences d'images obtenues par microscopie TIRF (acquisitions à 4 Hz, durant 75 s), les trajectoires de ces organites dans le plan (x,y) ont été déterminées *via* un algorithme de suivi automatique de particules développé par Victor Racine et Jean-Baptiste Sibarita à l'Institut Curie (voir Matériels et méthodes). La mobilité de chaque GS a ensuite été caractérisée grâce au calcul du coefficient de diffusion moyen (D_{xy}) calculé sur l'ensemble de la trajectoire décrite par cet organite (voir Matériels et méthodes).

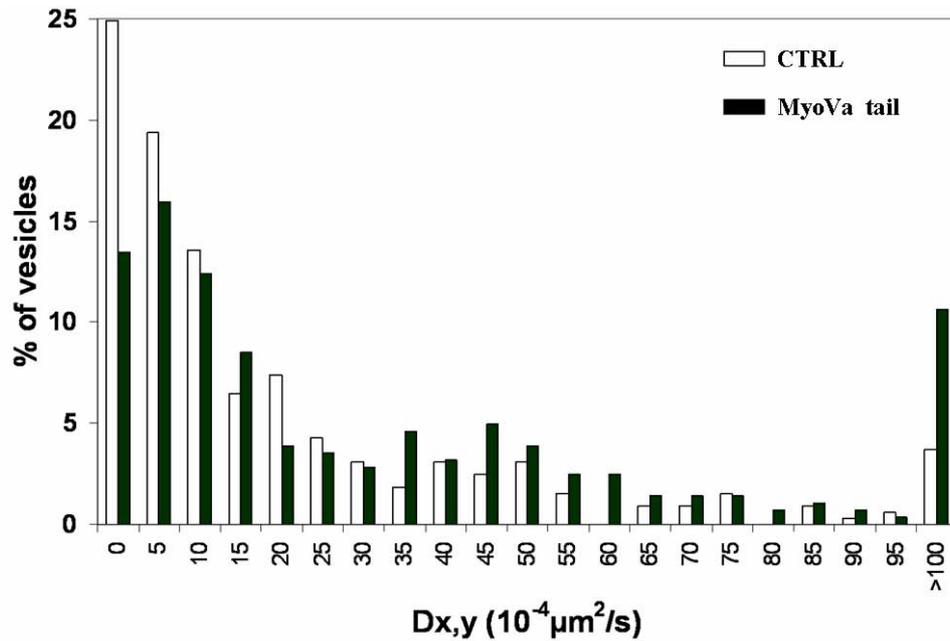


Figure 56 : La MyoVa tail modifie la mobilité des GS en périphérie de la cellule. Les mouvements des GS dans des cellules exprimant la NPY-mRFP seule (CTRL) ou la NPY-mRFP et la GFP-MyoVa tail ont été observés par microscopie TIRF ($\delta = 150$ nm, acquisitions à 4 Hz pendant 75 s). Les trajectoires des GS dans le plan de focalisation du microscope ont été obtenues *via* un algorithme de suivi automatique de particules. La mobilité de chaque GS a alors été caractérisée par l'intermédiaire du coefficient de diffusion moyen (D_{xy}) calculé sur l'ensemble de la trajectoire décrite par cet organelle. L'histogramme présenté correspond à la distribution des valeurs de D_{xy} mesurées (CTRL, 326 GS issus de 5 cellules; MyoVa tail, 280 GS issus de 5 cellules).

En moyennant l'ensemble des D_{xy} mesurés, nous observons que la mobilité des GS est plus importante dans les cellules exprimant la MyoVa tail ($\langle D_{xy} \rangle = 40 \pm 3.10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, 280 GS issus de 5 cellules) que dans les cellules témoins ($\langle D_{xy} \rangle = 24 \pm 2.10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, 326 GS issus de 5 cellules, $p < 0,001$). Les distributions des valeurs de D_{xy} obtenues dans les cellules témoins et dans celles exprimant la MyoVa tail sont représentées sur la (Figure 56). La comparaison de ces distributions indique tout d'abord que la présence de la forme tronquée de la myosine Va induit une diminution de la proportion de GS peu mobiles ($D_{xy} < 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$), correspondant vraisemblablement aux organites liés à la membrane plasmique (voir plus loin). De plus, l'expression de la MyoVa tail se traduit par une augmentation de la proportion de GS caractérisés par un coefficient de diffusion élevé ($D_{xy} > 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$). L'analyse réalisée précédemment en termes de catégories de mouvements (voir la partie 3.2. intitulée "Caractérisation des mouvements des granules de sécrétion dans la région juxta-membranaire") suggère que ces GS présentant une mobilité élevée correspondent majoritairement à des organites se déplaçant le long des microtubules.

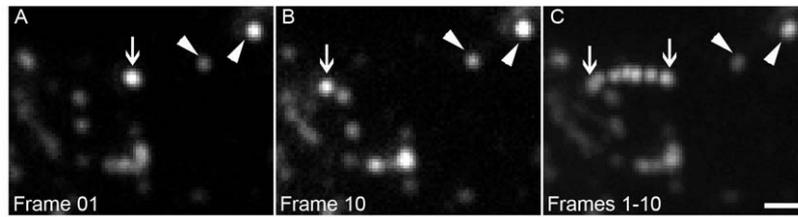


Figure 57 : Méthode de détection des mouvements dirigés rapides. Pour chaque séquence d'images obtenue par microscopie TIRF ($\delta = 150$ nm, acquisitions à 4 Hz, marquage des GS par la NPY-mRFP), les plans n à $n+10$ ont été superposés (avec $n = 10 \times k + 1$, k étant un entier). Un GS se déplaçant rapidement de manière dirigée apparaît alors sur les séquences obtenues comme une "ligne pointillée" (flèche) tandis qu'un spot fluorescent correspond à un GS peu mobile (tête de flèche). Barre d'échelle : 1 μ m.

Nous avons alors analysé spécifiquement l'impact de la MyoVa tail sur les mouvements rapides de nature dirigée. Afin de mettre en évidence ce type de comportement, la méthode suivante a été mise en œuvre : pour chaque séquence d'images, les plans n à $n + 9$ ont été superposés (avec $n = 10 \times k + 1$, k étant un entier) ; un GS se déplaçant rapidement de manière dirigée apparaît alors sur les séquences obtenues comme une "ligne pointillée" tandis qu'un spot fluorescent traduit la présence d'un GS peu mobile (Figure 57). Les organites à mobilité élevée mis en évidence par cette méthode représentent environ 6 % des GS en conditions témoins. En cas de traitement des cellules par le nocodazole (30 μ M pendant 10 minutes), le nombre de GS présentant ce type de comportement diminue de plus de 60 %, montrant que ces mouvements rapides correspondent principalement à des déplacements le long des microtubules. La proportion de GS à mobilité élevée dans les cellules exprimant la MyoVa tail (11 ± 1 %, 46 cellules) est supérieure à celle déterminée pour les cellules témoins (6 ± 1 %, 38 cellules, $p < 0,01$). Cette observation est en accord avec les résultats obtenus lors de l'analyse des coefficients de diffusion des GS (voir Figure 56). La présence de la MyoVa tail se traduit de plus par une augmentation des vitesses associées à ces mouvements rapides (Figure 58). Une telle accélération des déplacements le long des microtubules en cas d'inhibition de la fonction de la myosine Va a également été observée dans le cas des mélanosomes (Wu, Bowers et al., 1998 ; Gross, Tuma et al., 2002). Cet effet suggère que l'interaction des GS avec l'actine par l'intermédiaire de la myosine Va pourrait induire un freinage des mouvements se déroulant le long des microtubules. Il est aussi possible que la myosine Va puisse réguler directement l'activité des kinésines ou des dynéines, contrôlant ainsi la vitesse des GS le long des microtubules. En effet, il a été montré que, chez la souris, la myosine Va interagissait directement avec la kinésine dite conventionnelle (Huang, Brady et al., 1999).

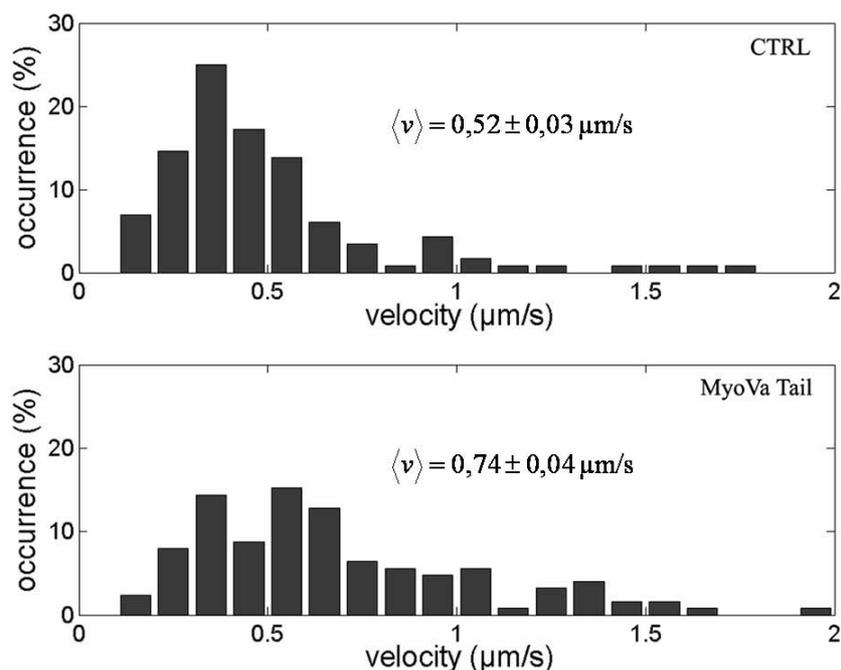


Figure 58 : La MyoVa tail provoque une accélération des mouvements dirigés rapides. Les GS présentant des mouvements dirigés rapides ont été détectés grâce à la méthode décrite sur la figure 56 dans des cellules exprimant la NPY-mRFP seule (CTRL) ou la NPY-mRFP et la GFP-MyoVa tail. Les observations ont été réalisées par microscopie TIRF ($\delta = 150$ nm, acquisitions à 4 Hz). Les histogrammes présentés correspondent aux distributions des vitesses de ces GS pour les cellules témoins (CTRL, 112 GS issus de 7 cellules) et celles exprimant la MyoVa tail (126 GS issus de 9 cellules).

3.4.3. L'inhibition de la sécrétion provoquée par la MyoVa tail est principalement due à un défaut d'accrochage des GS à la membrane plasmique

Nous avons enfin analysé l'effet de la MyoVa tail sur l'activité sécrétrice des cellules BON par microscopie TIRF (acquisitions à 10 Hz, pendant 90 secondes). La stimulation de l'exocytose a été induite par photolibération de calcium (voir Matériels et méthodes) dans des cellules exprimant la protéine NPY-mRFP. Nous avons alors détecté les événements d'exocytose grâce à leur signature caractéristique (voir Figure 28) comme cela a été décrit dans la partie 3.2.3.2 consacré à l'étude des mouvements des GS résidants. La présence de la forme tronquée de la myosine Va au sein des cellules est associée à une diminution importante du nombre de GS fusionnant avec la membrane plasmique. Toutefois, une telle inhibition de l'exocytose n'est pas simplement due à la réduction de la densité de GS dans la zone corticale observée dans les cellules exprimant cette construction (voir Figure 51). En effet, la proportion de GS visibles dans le champ d'évanescence ($\delta = 150$ nm) qui fusionnent avec la membrane est réduite d'environ 60 % dans les cellules exprimant la MyoVa tail par rapport aux cellules témoins (voir Figure 60A).

La mesure des densités de GS pour deux épaisseurs d'évanescence δ différentes montrait que l'inhibition de l'expression de la myosine Va par RNAi induisait une réduction de la densité de ces organites plus marquée à $\delta = 80$ nm qu'à $\delta = 150$ nm, suggérant que la myosine Va soit impliquée dans le transport des GS jusqu'à la membrane plasmique ou dans leur accrochage à cette membrane. Nous avons par conséquent cherché à déterminer si l'inhibition de l'exocytose observée dans les cellules exprimant la MyoVa tail pouvait s'expliquer par un défaut d'accrochage des GS à la membrane plasmique dans ces cellules.

Pour cela, nous avons tout d'abord évalué le coefficient de diffusion D_{xy} de GS liés à la membrane plasmique. Les GS résidants étudiés dans la partie 3.2.3.2, qui sont vraisemblablement fixés sur cette membrane, présentent un D_{xy} moyen égal à $5 \pm 1.10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (65 GS, issus de 23 cellules). De plus, ~ 90 % de ces GS résidants possèdent un $D_{xy} < 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Si ce résultat indique que les GS liés à la membrane plasmique sont caractérisés par un coefficient de diffusion inférieur à $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, il reste toutefois à démontrer la proposition inverse, à savoir que tout GS présentant un D_{xy} inférieur à cette valeur est bien à la membrane. Pour cela, nous avons analysé les trajectoires des GS subissant une exocytose dans les cellules témoins utilisées précédemment pour déterminer l'effet de la présence de la myosine Va sur l'activité sécrétrice des cellules BON. Nous avons ainsi mesuré les variations de D_{xy} au cours de ces trajectoires (voir Matériel et méthodes). La majorité des GS (~ 75 %) présentent une mobilité très réduite au cours des 10 secondes précédents leur fusion avec la membrane plasmique (Figure 59A). Ces organites correspondent sans doute aux GS résidants étudiés précédemment. Les GS décrivant initialement des mouvements rapides s'immobilisent quant à eux brutalement au moins deux secondes avant l'exocytose du fait, probablement, de leur accrochage à la membrane plasmique (Figure 59B). Sur la courbe représentant l'évolution moyenne du D_{xy} au cours des trajectoires (Figure 59C), ceci se traduit par un resserrement important de l'erreur standard avant la fusion. Le D_{xy} moyen durant les deux secondes précédant l'exocytose est égal à $4 \pm 1.10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et plus de 95 % des GS possèdent un $D_{xy} < 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ au cours de cette période. Ces observations, qui sont en accord avec des résultats obtenus sur des cellules chromaffines d'origine bovine (Steyer, Horstmann et al., 1997 ; Oheim and Stuhmer, 2000), suggèrent donc que l'accrochage des GS à la membrane induit une diminution importante de la mobilité de ces organites. Bien que nous ne puissions pas exclure que certains GS peu mobiles puissent être localisés ailleurs qu'au contact de la membrane plasmique, l'ensemble de ces résultats semble toutefois indiquer que la majorité des GS présentant un $D_{xy} < 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ sont liés à cette membrane.

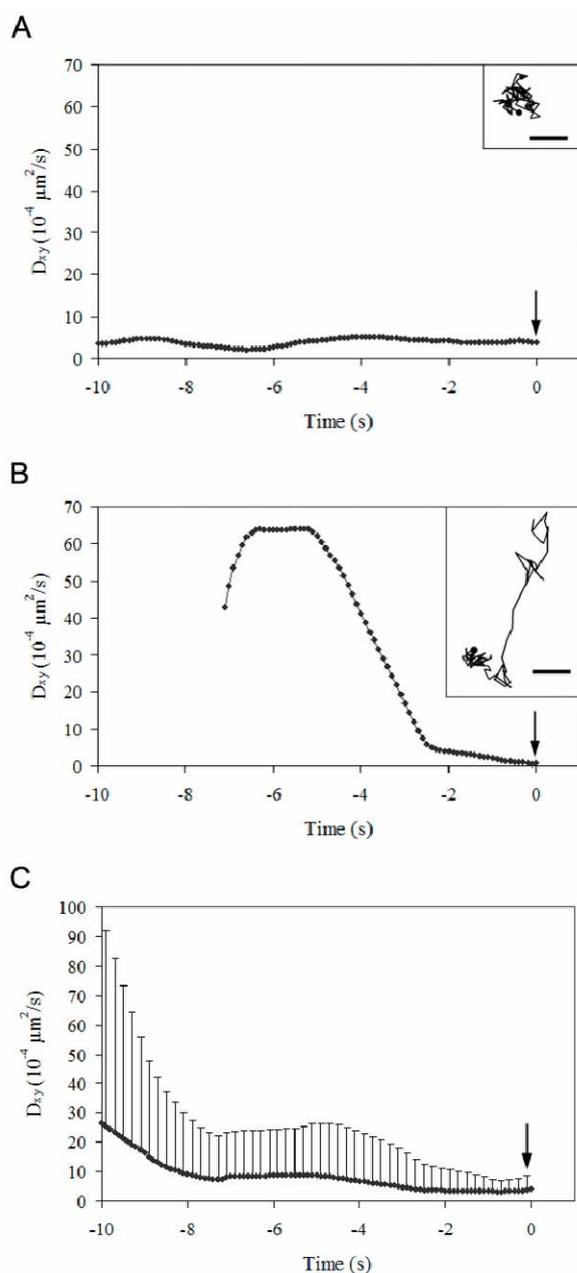


Figure 59 : Comportement des GS avant l'exocytose. Des cellules BON ont été co-transfectées par la NPY-mRFP et un vecteur vide puis observées par microscopie TIRF ($\delta = 150 \text{ nm}$, acquisitions à 10 Hz). L'exocytose a été stimulée par photolibération de calcium. Les trajectoires des GS fusionnant avec la membrane plasmique ont été obtenues par suivi de particule puis les variations de D_{xy} au cours de ces trajectoires ont été mesurées. (A) Exemple de GS présentant une mobilité très réduite ($D_{xy} < 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$) au cours des 10 secondes précédents l'exocytose (flèche). En encart est représentée la trajectoire décrite par ce GS. (B) Exemple d'un GS initialement mobile puis s'arrêtant brusquement environ 2 secondes avant de fusionner avec la membrane plasmique. En encart est représentée la trajectoire décrite par ce GS. (C) Variations moyennes du D_{xy} avant la fusion. L'immobilisation des GS avant la fusion se traduit par un resserrement de la distribution des D_{xy} environ 2 secondes avant la fusion (diminution importante de l'erreur standard).

Nous avons ensuite comparé la mobilité des GS dans les cellules témoins par rapport à celles exprimant la MyoVa tail grâce à la mesure des coefficients de diffusion moyens de ces organites. Les distributions des valeurs de D_{xy} dans ces cellules stimulées sont très proches de celles obtenues sur les cellules au repos (voir Figure 56). L'expression de la MyoVa tail se traduit notamment de nouveau par une diminution importante de la proportion de GS possédant un $D_{xy} < 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Ainsi, alors qu'environ 55 % des GS visibles par microscopie TIRF peuvent être considérés comme accrochés à la membrane dans les cellules témoins, cette proportion n'est plus que de 35 % (-40 %) dans les cellules exprimant la MyoVa tail

(Figure 60B). L'inhibition de l'exocytose induite par la présence de cette construction, exprimée en proportion du nombre de GS visibles par microscopie TIRF, était quant à elle de 60 % (Figure 60A). Il semble donc que l'effet inhibiteur de la MyoVa tail sur la sécrétion soit principalement dû à un défaut d'accrochage des GS à la membrane plasmique.

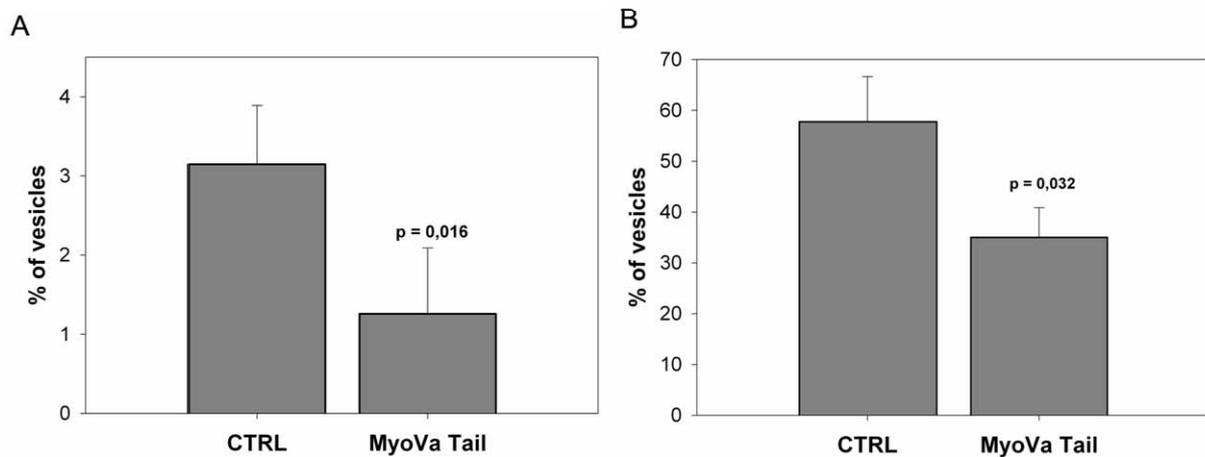


Figure 60 : La MyoVa tail inhibe l'exocytose et l'accrochage des GS à la membrane plasmique. Des cellules BON ont été co-transfectées par la NPY-mRFP et un vecteur vide (CTRL) ou la GFP-MyoVa tail puis observées par microscopie TIRF ($\delta = 150$ nm, acquisitions à 10 Hz). L'exocytose a été stimulée par photolibération de calcium. (A) Pourcentage moyen de GS visibles dans le champ d'évanescence fusionnant avec la membrane plasmique pendant les séquences d'acquisition de 90 secondes (CTRL, 2854 GS issus de 22 cellules ; MyoVa tail, 1346 GS issus de 18 cellules). (B) Les coefficients de diffusion caractérisant la mobilité des GS ont été calculés pour les mêmes cellules que celles étudiées en (A). L'histogramme présenté correspond au pourcentage moyen de GS visibles en TIRF caractérisés par un coefficient de diffusion inférieur à $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et, par conséquent, pouvant être considérés comme liés à la membrane plasmique (CTRL, 407 GS issus de 6 cellules ; MyoVa tail, 322 GS issus de 6 cellules).

Myosin Va controls the recruitment of secretory granules to release sites

Claire Desnos*¹, Sébastien Huet*¹, Isabelle Fanget¹, Catherine Chapuis¹, Caroline Böttiger¹, Richard E. Cheney², Victor Racine³, Jean-Baptiste Sibarita³, Jean-Pierre Henry¹ and François Darchen^{1#}

* These authors contributed equally to this work

¹ Institut de Biologie Physico-Chimique, Centre National de la Recherche Scientifique, UPR 1929, Université Paris 7 Denis Diderot, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

² Department of Cell and Molecular Physiology, Medical Science Research Building, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC 27599-7545, USA

³ Institut Curie, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 144, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

Correspondence should be addressed to :

Dr François Darchen

Institut de Biologie Physico-Chimique

CNRS UPR 1929

13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

Tel : +33 1 58 41 50 85 Fax : +33 1 58 41 50 23

e-mail : Francois.Darchen@ibpc.fr

Number of characters : 44 445

Keywords : Myosin V, MyRIP, actin, membrane traffic, exocytosis, secretory vesicle

Running title: Myosin Va recruits granules to docking sites

Abstract

The function of myosin Va (MyoVa) in secretory granule (SG) trafficking in neuroendocrine cells was investigated using wide field and total internal reflection fluorescence microscopy. A MyoVa construct lacking the motor domain (MyoVa tail) was used to block MyoVa function. It was addressed to SG, induced SG clustering, reduced the density of SG at the cell periphery, and further prevented the docking and fusion of these peripheral granules. The effect on docking was mainly responsible for the effect on exocytosis. Lowering MyoVa levels by RNA interference also severely reduced the density of SG in the actin-rich cortex and prevented the formation of SG-rich areas. MyRIP, which is associated with SG and interacts with MyoVa, was found to control SG recruitment at the cell periphery and thus probably serves as a receptor for MyoVa. These data suggest that MyRIP and MyoVa mediate the peripheral capture of SG and their transport through the actin-rich cortex toward docking sites, thereby controlling secretion.

Introduction

Hormones and neuropeptides are stored in secretory granules (SG) and released by exocytosis in response to cytosolic calcium elevation. How vesicles are docked and fuse with the plasma membrane has been the focus of many studies (Jahn et al., 2003). Less is known about the transport of SG toward the cell periphery and their recruitment at release sites. SG are transported along microtubules from the *trans*-Golgi network (TGN) to the cell periphery where they accumulate in the F-actin-rich cortex (Rudolf et al., 2003). While kinesin I and cytoplasmic dynein have been implicated in microtubule-based transport of SG (Varadi et al., 2003), class V myosins are prime candidate for controlling short range transport along actin filaments and positioning of organelles. In particular, myosin Va (MyoVa) functions *in vitro* and *in vivo* as a processive actin-based motor able to transport vesicles (Wu et al., 1998; Mehta et al., 1999; Gross et al., 2002; Vale, 2003; Levi et al., 2006a; Sellers and Veigel, 2006).

Mutations in *MYO5A* are found in *dilute* mice and cause Griscelli syndrome (GS) type 1 in humans (Pastural et al., 1997), which combines partial albinism and severe neurological impairment. Neurological defects may be due to the absence of smooth endoplasmic reticulum in dendritic spines of Purkinje neurons (Takagishi et al., 1996), while albinism results from the mislocalisation of melanosomes, which cannot be transferred to keratinocytes. Similar pigmentary dilution is observed in GS type 2 and *ashen* mice, which are caused by defects in the GTPase Rab27a and also in GS type 3 (Ménasché et al., 2003) and *leaden* mice, that are due to mutations in the gene encoding melanophilin (reviewed in Hammer and Wu, 2002; Seabra and Coudrier, 2004). The similarities in these phenotypes are due to the fact that these proteins physically interact: Rab27a is bound to melanosomes and recruits

melanophilin, which serves as a MyoVa receptor (Hammer and Wu, 2002; Seabra and Coudrier, 2004).

MyoVa has been identified on SG (Rose et al., 2003; Rudolf et al., 2003; Varadi et al., 2005). We and others reported previously that Rab27a is also associated with SG and can recruit MyRIP, a protein with strong similarity to melanophilin (Fukuda and Kuroda, 2002; Desnos et al., 2003; Waselle et al., 2003). Both proteins control the mobility of SG within the F-actin rich cortex and their capacity to undergo exocytosis (Desnos et al., 2003). MyRIP, which was originally described as a myosin VIIa partner (El-Amraoui et al., 2002), is able to interact with MyoVa *via* a binding site that does not precisely coincide with the myosin VIIa binding site and with actin, *via* its C-terminal region (Fukuda and Kuroda, 2002; Desnos et al., 2003; Kuroda and Fukuda, 2005). These findings suggested that Rab27a, MyRIP and MyoVa could cooperate to control the short-range transport of SG at the cell periphery and their access to release sites. In agreement with this hypothesis, previous studies indicated that MyoVa was controlling the distribution of SG in the F-actin-rich cortex and secretion (Rose et al., 2003; Rudolf et al., 2003; Varadi et al., 2005).

In this study, we have investigated the role of MyoVa, by means of dominant negative constructs or RNA interference, in the recruitment of SG at the cell periphery. We demonstrate that MyoVa, together with MyRIP, controls the density of SG in the actin-rich cortex, the formation of areas enriched in SG at the cell periphery, SG docking to the plasma membrane and thereby the efficacy of the release process. Importantly, inhibiting MyoVa had an higher effect on SG docking than on SG density in the actin cortex suggesting a specific role for MyoVa in SG recruitment to release sites.

Results

Intracellular distribution of secretory granules depends on MyRIP and Myosin Va

Truncated myosin Va constructs lacking the actin-binding domain are known to act as potent inhibitors of MyoVa function (Wu et al., 1998; Rudolf et al., 2003). Therefore, the globular tail of human myosin Va (MyoVa GT), a construct that comprised also the exons A, C, E and F (MyoVa tail) and a construct that included the dimerization domain (MyoVa long tail) were fused to GFP and expressed in BON cells derived from a carcinoid tumor (Evers et al., 1991). These enterochromaffin cells from the gastrointestinal tract store various peptides in SG and release them in response to external stimuli (Li et al., 2005). In these cells that express MyoVa, MyoVa GT had a diffused cytosolic pattern (Fig. 1C). In contrast, GFP-MyoVa tail (Fig. 1E) and GFP-MyoVa long tail (not shown) have a punctate distribution. This is in agreement with studies showing that the globular tail and the exon F of MyoVa are both involved in the binding to the MyRIP-related protein melanophilin (Wu et al., 2002; Fukuda and Kuroda, 2004). Since MyoVa tail constructs induce the formation of clusters (see below), their distribution was analyzed after a 24-hour expression period. GFP-MyoVa tail was primarily colocalized with SG markers (Fig. 1, E-F). To confirm this observation, the distribution of GFP-MyoVa tail and of SG labeled with mRFP-tagged neuropeptide Y (NPY-mRFP) was investigated by time lapse videomicroscopy upon total internal reflection (TIRF) illumination (Fig. 1, G-H). This method allows selective imaging of a thin region of the cell adjacent to the glass interface on which cells are grown (Steyer et al., 1997; Oheim et al., 1998). Approximately 80% of the structures decorated by GFP-MyoVa tail corresponded to SG (400 structures from 10 cells). Many GFP-MyoVa tail structures followed the same trajectories as NPY-mRFP positive SG, strongly suggesting that GFP-MyoVa tail was bound to SG (Fig 1, I-J and Fig1video1.mov).

As observed previously in PC12 cells (Rudolf et al., 2003), the expression of MyoVa long tail induced a pronounced clustering of SG (not shown). In order to exclude the possibility that the clustering effect of MyoVa long tail resulted from its dimerization properties, we investigated the effect of shorter MyoVa constructs on the distribution of SG identified by means of anti-chromogranin A/B or anti-Rab27A antibodies or by expression of NPY-mRFP. MyoVa GT did not induce SG clustering, in agreement with its inability to stably associate with SG (Fig. 1, C-D). In contrast, MyoVa tail, which cannot dimerize (our unpublished data), had a strong clustering activity (Fig. 2, A-F). The number and size of SG clusters increased steadily with time after transfection. Nevertheless, individual SG remained detectable within these clusters (Fig. 2, B-C), indicating that clustering was not accompanied by massive fusion of SG nor was the consequence of impaired budding from the TGN. The clustering effect of MyoVa tail was also observed with mRFP- and FLAG-tagged constructs, indicating that it was not linked to the GFP moiety. The specificity of this effect was determined by investigating the effect of MyoVa tail on the distribution of markers of early endosomes, lysosomes, endoplasmic reticulum, cis-Golgi, TGN and mitochondria. None of these markers was affected (supplemental Fig. 1). However, myc-tagged Rab11b, that did not co-distribute with SG in control cells, was found to accumulate in these aggregates suggesting that MyoVa may also interact with some endocytic compartments (Fig. 3B). F-actin and microtubules were not apparently affected by MyoVa tail expression. In addition, F-actin was not enriched in SG clusters and its depolymerization by latrunculin did not modify pre-assembled SG clusters (data not shown).

The GTPase Rab27a and its binding partner MyRIP are associated with SG and may constitute a receptor for MyoVa on SG since MyRIP interacts with MyoVa (Desnos et al., 2003; Waselle et al., 2003). In agreement with this possibility, Rab27a and MyRIP co-

distributed with SG clusters in cells expressing GFP-MyoVa tail (Fig. 2 C, F and Fig. 3 G-I). We asked whether the clustering effect of MyoVa tail on SG was dependent on MyRIP. BON cells were cotransfected with GFP-MyoVa tail and myc-tagged Rab11b (as a control), myc-tagged MyRIP or myc-tagged MyRIP-Rab binding domain (MyRIP-RBD). MyRIP-RBD was used to interfere with the recruitment of endogenous MyRIP on Rab27. Three days after transfection, the distribution of chromogranin A/B, a marker of SG, was analyzed in double transfected cells. As mentioned above, GFP-MyoVa tail induced SG clustering in control cells. Overexpression of MyRIP had a tendency to increase this effect (Fig. 3 G-I), as indicated by an increased fluorescence of SG clusters (not shown). In contrast, MyRIP-RBD almost completely abolished the clustering effect of MyoVa tail (Fig. 3 D-F, J). In addition, GFP-MyoVa tail displayed a more diffuse pattern in MyRIP-RBD expressing cells, as compared to controls (Fig. 3D), further suggesting that Rab27 and MyRIP constitute a receptor for MyoVa on SG. The fact that MyoVa tail could be co-immunoprecipitated with MyRIP from BON cells also argues for this notion (Fig. 3K).

Overexpression of GFP-MyoVa tail in BON cells led also to the appearance of membrane tubules containing NPY-mRFP in ~30 % of cells (Supplemental Fig. 2 and video2.mov) with a wide distribution of the number of tubes per cell. Such tubules were very rare in control cells. Some tubules were immobile but others displayed rapid and directed motion. The velocity of moving tubules ($1.13 \pm 0.08 \mu\text{m/s}$, 19 tubules from 6 cells) was consistent with a movement driven by microtubule-based motors. These tubes may thus be formed by the action of these motors pulling on membrane structures. This view was supported by time-lapse videomicroscopy showing the outgrowth of relatively straight tubules from NPY-mRFP positive structures (video2.mov).

The function of MyoVa was also investigated by means of silencing RNA duplexes (siRNAs). The amount of MyoVa was reduced by ~75 % after a 3-day treatment with siRNAs, as compared to non transfected cells or to cells transfected with a non-targeting siRNA duplex (Fig. 4A). A marked reduction in MyoVa levels was also seen by immunocytochemistry (data not shown). MyoVa silencing did not induce SG clustering as observed upon expression of MyoVa tail but had profound effects on SG distribution. In the majority of control cells, the distribution of SG was not homogeneous. Granules accumulated in cell extensions or in specialized areas of the cell periphery (Fig. 1B, 2 G-I, 4B). In contrast, they were excluded from the cell periphery (Fig. 4B) in most of the cells treated with MyoVa siRNAs (see Fig. 4C for a quantification of the effect) and were frequently (in ~35 % of cells compared with 1% in control cells) concentrated in the perinuclear region. This effect is very similar to that observed for melanosomes in MyoVa-deficient cells (Wu et al., 1998), suggesting that MyoVa is involved in the capture of SG at the cell periphery and in specialized regions of the cell. Next, we examined whether MyRIP was also controlling SG distribution. As illustrated in Fig. 4D, the accumulation of SG at the cell periphery was also severely reduced by overexpression of MyRIP-RBD, giving further support to the notion that MyoVa activity is MyRIP-dependent. Noteworthy, MyRIP-RBD overexpression did not induce SG clustering.

Myosin Va controls the recruitment and mobility of secretory vesicles in the subplasmalemmal region

The effect of MyoVa silencing and of MyRIP-RBD on SG distribution suggested that MyoVa and MyRIP were involved in the capture of SG in the actin-rich cortex. In order to measure the density of SG and their mobility in the subplasmalemmal region, BON cells were

co-transfected with GFP-MyoVa tail and NPY-mRFP and imaged by TIRFM. In most of the experiments, the penetration depth δ (the distance along the z axis over which fluorescence declines *e*-fold) of the evanescent field used to excite fluorescence was set at 150 nm (see Methods). Under these conditions, most of the observed SG are localized within the actin-rich cortex (Lang et al., 2000) and our unpublished data). Within the evanescent field, SG displayed different behaviors. Some granules moved rapidly with a directed motion but the majority of SG was immobile or displayed slow diffusive movements.

In control cells, the density of NPY-mRFP positive SG in the evanescent field was found to be relatively constant from experiment to experiment (~ 40 SG/100 μm^2 one day after transfection and ~ 70 SG/100 μm^2 two days after transfection, Fig. 5). Compared with control cells, SG density was reduced in cells expressing GFP-MyoVa tail. The effect was very pronounced two or three days after transfection (not shown) and was accompanied by massive SG clustering. To avoid misinterpretation of the data, SG density was quantitated 20-24 hours after transfection, when cells displayed little SG clustering. As shown in Fig. 5A, GFP-MyoVa tail reduced the SG density by ~ 33 %. These data are consistent with the idea that MyoVa promotes the retention of SG within the actin-rich cortex.

In order to determine if the effect of GFP-MyoVa tail on the density of SG near the plasma membrane was indeed due to an inhibition of MyoVa activity, we also analyzed the effect of MyoVa silencing. SG were imaged by TIRFM at two different angles of the incident beam to vary the penetration depth δ from 80 to 150 nm. As expected, at $\delta = 80$ nm, the number of SG present in the evanescent field was lower than at $\delta = 150$ nm (Fig. 5B). Inhibition of MyoVa expression by RNA interference reduced the density of SG at the cell periphery (Fig. 6). Interestingly, the reduction observed at $\delta = 80$ nm ($\sim 75\%$) was higher than at 150 nm (~ 50 %) (Fig. 5B), suggesting that MyoVa may contribute to the transport of SG within the actin cortex towards the cell surface. In order to exclude the possibility that MyoVa

silencing reduced the apparent SG density by increasing the distance between the cell membrane and the glass interface, cells were incubated with fluorescent dextran and imaged by TIRFM. Dextran molecules diffused slowly below the cells but there was no significant change in the mean fluorescence intensity of the footprint of siRNA treated cells as compared with control ones (not shown). As observed in wide field images, the distribution of SG observed in the evanescent field was not homogenous. Areas enriched in SG were observed in 59 ± 2 % of control cells, generally near the border of the cells (Fig. 6). In contrast, upon MyoVa silencing, such enriched areas were seen in only 10 ± 3 % of the cells.

The effect of MyRIP on SG density in the cell cortex was also investigated. Overexpression of MyRIP-RBD diminished the number of SG present in the evanescent field, whereas MyRIP overexpression had an opposite effect (Fig. 5C), further suggesting that MyRIP and MyoVa act in concert.

To analyze the mobility of SG, unstimulated BON cells were imaged by TIRFM for 75 sec at 4 Hz. The x,y trajectories were monitored using a single particle tracking software and the mean diffusion coefficient (D_{xy}) was derived from mean square displacement analysis (see Methods). The mean D_{xy} was increased in GFP-MyoVa tail expressing cells ($39.9 \pm 3.1 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; 280 SG from 5 cells), as compared to control cells ($24.2 \pm 1.9 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; 326 SG from 5 cells; $p < 0.001$). The distribution of D_{xy} values is shown in Fig. 7A and indicates two major changes in MyoVa tail expressing cells compared to control ones: i) a reduced percentage of SG with a very low ($< 10 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) D_{xy} possibly corresponding to SG tethered or docked (hereafter referred to as docked SG) at the plasma membrane (see below), and ii) an increased proportion of SG with a very high ($> 100 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) D_{xy} . The velocity of granules moving in a directed manner was further analyzed. Were selected for this analysis the SG that appeared as a string of aligned vesicles when ten successive frames were

superimposed (Supplemental Fig. 3). The number of highly mobile vesicles, that represented ~10% of the whole population of SG in control conditions, was reduced by 60% by a 10-min treatment with 30 μM nocodazole indicating that these SG were moving along microtubules. Their mean density was not changed but their mean velocity was increased in MyoVa tail expressing cells ($0.74 \pm 0.04 \mu\text{m/s}$) as compared to control ones ($0.52 \pm 0.03 \mu\text{m/s}$, $p < 0.001$). As illustrated in Fig. 7B, the distribution of velocities was shifted towards higher values. A simple explanation of this finding would be that SG, freed from actin interaction by MyoVa tail, can move faster along microtubules.

The inhibition of secretory granules exocytosis by Myosin Va tail correlates with its inhibitory effect on docking

Next, we investigated the effect of MyoVa tail on the secretory activity of BON cells. Exocytosis of NPY-mRFP labeled SG was elicited by UV flash photolysis of caged calcium. Fusion events have a characteristic signature on TIRF images: the abrupt disappearance of a SG is preceded by a transient increase in its fluorescence and then by a transient cloud of fluorescence corresponding to the diffusion of the fluorophore in the external medium (Steyer et al., 1997). The number of fusion events detected in GFP-MyoVa tail expressing cells was severely reduced, compared to control cells. This was not the mere consequence of the lower SG density in the subplasmalemmal region. Indeed, when the number of fusion events was plotted against the number of SG detected in the evanescent field, a ~60 % inhibition of the secretory response was still observed in GFP-MyoVa tail expressing cells, compared to control ones (Fig. 8A).

In order to determine if MyoVa tail was interfering with SG docking we first tried to estimate the D_{xy} of docked SG. Previous studies in chromaffin cells (Steyer et al., 1997; Oheim and Stühmer 2000) showed a strong reduction in the lateral mobility of SG before

fusion, most presumably due to SG docking at the plasma membrane. SG that underwent fusion were tracked and their D_{xy} was measured as a function of time. Some SG remained almost immobile for at least 15 sec before fusion (Fig. 9A). Interestingly, SG that were initially mobile suddenly stopped moving and remained confined for at least 2 sec before exocytosis (Fig. 9B). Consequently, the distribution of D_{xy} values displayed a marked tendency to narrow before fusion (Fig. 9C). This behavior is likely to reflect SG anchoring at the plasma membrane. During the last 2 sec before exocytosis, the mean value of D_{xy} was $3.5 \pm 0.8 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, in good agreement with values found in chromaffin cells (Steyer et al., 1997; Oheim and Stühmer, 2000) and more than 95 % of SG have a $D_{xy} < 10 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. We thus considered SG with D_{xy} below this value as docked. According to this criterion, ~55% of the SG detected in the evanescent field were docked.

Then, the mobility of SG present in the evanescent field in MyoVa tail expressing cells was analyzed under stimulating conditions and compared to that of control cells. The distribution of D_{xy} values was very similar to that found in resting cells (not shown). Again, overexpression of GFP-MyoVa tail induced an increase in the proportion of very mobile SG and a marked decrease (~40 %, Fig. 8B) in the percentage of SG with $D_{xy} < 10 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Noteworthy, the proportion of SG with $D_{xy} < 5 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ was even more affected by MyoVa tail (-47 %). Therefore, most of the inhibitory effect of MyoVa on secretory responses can be accounted for by its effect on docking.

Discussion

Actin-based and microtubule-based motors can exert mechanical forces on membrane-bound organelles. The mechanisms that ensure coordination between these forces are not resolved yet. Microtubule-based motors are responsible for long-range transport of organelles (Wu et al., 2005; Levi et al., 2006b), while myosins are thought to control short-range motion of vesicles in actin-rich regions (Wu et al., 1998; Gross et al., 2002; Langford, 2002). In this study, we report that changes in MyRIP and Myosin Va activity have profound effects on the intracellular distribution of SG. Furthermore, MyoVa mediates the capture of SG in the actin cortex and also promotes their transport through the actin meshwork toward docking sites.

Rab27 and MyRIP constitute a receptor for MyoVa on secretory granules

MyoVa has been detected on melanosomes (Nascimento et al., 1997; Wu et al., 1998), on brain vesicles (Prekeris and Terrian, 1997), and on SG in endocrine cells (Rose et al., 2003; Rudolf et al., 2003; Varadi et al., 2005). Our data further confirm that MyoVa can associate with SG. Rab27 and MyRIP proteins are also associated with SG in neuroendocrine cells. Since MyRIP interacts with MyoVa (Fukuda and Kuroda, 2002; Desnos et al., 2003 and this study), we propose that Rab27 and MyRIP constitute a receptor for MyoVa on SG. These data complement accumulating evidence that Rab GTPases and molecular motors cooperate to control organelle trafficking (Seabra and Coudrier, 2004). In agreement with this notion, we made the following observations that indicate that MyRIP and MyoVa act together to control the distribution of SG: i) MyRIP-RBD prevented the formation of SG clusters induced by MyoVa tail and changed the intracellular distribution of GFP-MyoVa tail; ii) MyRIP-RBD, MyoVa tail and MyoVa silencing induced a diminution in SG density at the cell periphery, while overexpression of MyRIP had an opposite effect; iii) MyRIP-RBD and

MyoVa silencing induced similar redistribution of SG from the cell periphery to the cell center. Therefore, it is likely that the Rab27/MyRIP/MyoVa complex mediates the capture of SG in peripheral actin-rich regions as does Rab27/melanophilin/MyoVa in the case of melanosomes (Hammer and Wu, 2002; Seabra and Coudrier, 2004). Recently, Ivarsson et al. (2005) reported that silencing of MyRIP and MyoVa had similar effects on the secretory responses from pancreatic β cells, providing further support to the notion that MyRIP and MyoVa act in concert.

It should be noted that endogenous MyoVa was hardly detected on SG by means of antibodies directed against the globular tail of MyoVa (data not shown) although these antibodies readily bind to MyoVa tail. Other studies also found that the distribution of MyoVa only partially overlapped with that of SG markers (Rose et al., 2003; Rudolf et al., 2003; Ivarsson et al., 2005; Varadi et al., 2005). This is in sharp contrast with the fact that GFP-MyoVa tail was primarily addressed to SG. These observations suggest the existence of a regulatory mechanism, present in MyoVa but not in MyoVa tail, that controls the association MyoVa with SG. Interestingly, MyoVa was found to oscillate between a ‘closed’, compact fold and an ‘open’, extended conformation (Krementsov et al., 2004; Wang et al., 2004). In contrast to MyoVa tail, only the subset of MyoVa molecules that is in the ‘open’ state might be able to associate with SG. It will be interesting to further define how the conformational switch of MyoVa is regulated.

MyRIP and MyoVa mediate the capture of secretory granules in the actin-rich cortex

SG density in the subplasmalemmal region was strongly reduced by MyoVa tail expression and by MyoVa silencing. It was also reduced by MyRIP-RBD. These observations indicate that MyRIP and MyoVa are responsible for the retention of SG in the actin-rich

cortex. In addition, the velocity of SG moving along microtubules was increased by MyoVa tail, as observed for other organelles (Wu et al., 1998; Bridgman, 1999), suggesting that MyoVa normally exerts a force that counteracts the one produced by microtubule-based motors. Without such a force, able to dissociate and to move SG away from microtubules, SG redistribute according to the balance of plus-end and minus-end directed microtubule-based motors, leading to loss of cortical restriction or to perinuclear accumulation of SG. The distribution of melanosomes follows the same general mechanism (Wu et al., 1998; Gross et al., 2002; Wu et al., 2002). Coupling actin- and microtubule-based transport machineries may facilitate the transfer of melanosomes from microtubules to actin. Interestingly, melanophilin was shown to interact with EB1 and may thus promote the recruitment of MyoVa at microtubule plus ends (Wu et al., 2005).

The balance between MyoVa and microtubule-based motors probably controls other aspects of SG dynamics. As an example, we observed the appearance of numerous tubules labeled with SG markers upon MyoVa tail expression. Microtubule-based motors, which are able to pull membrane tubes *in vitro* from artificial membranes (Roux et al., 2002) probably provide the pulling force. Interestingly, the morphology of late endosomes and the sorting of Pmel17 in this compartment were controlled by Myosin Ib and actin (Salas-Cortes et al., 2005). Future work is needed to determine if MyoVa contributes to the sorting of SG proteins.

Movement of secretory granule within the actin-rich cortex and toward release sites

Beneath the plasma membrane, actin is organized as a dense meshwork that restrict the mobility of SG (Nakata and Hirokawa, 1992; Lang et al., 2000; Oheim and Stühmer, 2000), supporting the notion that actin acts as barrier hindering the movement of SG toward the cell surface (reviewed in Trifaro et al., 2000). Actin-stabilizing drugs such as jasplakinolide completely immobilize SG (Oheim and Stühmer, 2000; Lang et al., 2000 and our unpublished

data) indicating that SG could not move within the actin cortex without continuous actin remodeling. SG are also tethered to F-actin further reducing their mobility, as indicated by the fact that the diffusion coefficient of SG was decreased by MyRIP but increased by truncated MyRIP constructs unable to bind to actin in PC12 (Desnos et al., 2003) and in BON cells (our unpublished data). MyoVa is a processive motor (Mehta et al., 1999; Vale, 2003; Sellers and Veigel, 2006) and its activity might serve to promote the dispersal of SG within the meshwork of actin filaments as suggested by previous studies (Rudolf et al., 2003). However, MyoVa inhibition did not induce changes in the distribution of D_{xy} values that could be accounted for by a loss of actin-based directed movements. This suggests that MyoVa drives transient short-range motions that were not detected by our analysis of D_{xy} calculated on entire trajectories.

The clustering of SG induced by MyoVa tail was proposed to result from the inhibition of MyoVa motor activity (Rudolf et al., 2003; Varadi et al., 2005). However, neither overexpressed MyRIP-RBD nor MyoVa silencing induced SG clustering. An alternative possibility would be that MyoVa tail, *via* its interaction with SG and with unidentified components, bridge SG and directly promote the assembly of SG aggregates.

In the present study we show that MyoVa not only recruits SG to the actin-rich cortex but also promotes their docking at the plasma membrane. The effect of MyoVa silencing on SG density was inversely correlated with the distance of these SG from the cell membrane. Furthermore, MyoVa tail reduced the percentage of granules present in the evanescent field that were docked, suggesting that MyoVa actively transports SG within the actin cortex toward the cell surface. This interpretation implies that actin filaments plus ends are not homogeneously distributed but display a tendency to point toward the cell surface as in lamellipodia (Pantaloni et al., 2001). Such anisotropic organization of the actin cortex could result from the fact that actin nucleation takes place at the cell membrane; it may also contribute to the formation of specialized areas enriched in docked SG.

Another possibility that could account for the effect of MyoVa tail on SG docking is that MyoVa is directly involved in the physical association of SG with the plasma membrane. In support to this hypothesis, a physical interaction between the neck region of MyoVa and syntaxin 1, a SNARE protein involved in the exocytotic process has been recently reported (Watanabe et al., 2005).

The role of MyoVa on secretion

Our data provide further support to the notion that MyoVa has an important role in SG secretion (Rose et al., 2003; Ivarsson et al., 2005; Varadi et al., 2005; Watanabe et al., 2005). As mentioned above, the capture of SG in the actin-rich cortex, and thus the size of the reserve pool of vesicles that can be used for secretion, depends on Rab27/MyRIP/MyoVa. We also show that MyoVa has a role downstream of SG capture to promote SG docking at the plasma membrane. Therefore, actin cannot be considered only as a barrier but also as an essential actor of SG recruitment. In a recent study (Varadi et al., 2005), the percentage of ‘docked’ SG that underwent exocytosis was strongly reduced by MyoVa tail expression. Ivarsson et al. (2005) also studied the dynamics of SG upon stimulation of insulin secretion by TIRFM. In contrast to the robust effect of MyoVa silencing on exocytosis, the replenishment of the pool of ‘docked’ SG was only slightly reduced. These data could suggest a role for MyoVa in a post-docking step. Although we cannot exclude this possibility, our data indicate that the inhibitory effect of MyoVa tail on exocytosis is mainly accounted for by a reduction in docking. We propose that this discrepancy is due to the criterion used to define SG docking. In the above-mentioned studies (Ivarsson et al., 2005; Varadi et al., 2005), were considered as docked all the granules that were present in the evanescent field. In contrast, our data (see also Oheim et al., 1998; Lang et al., 2000; Oheim and Stühmer, 2000) indicate that only a subset of granules imaged by TIRFM can be considered as docked.

Physiological stimuli trigger the opening of voltage-gated Ca^{2+} channels and local elevation of Ca^{2+} concentration. Due to Ca^{2+} -dependent actin-severing proteins calcium influx is likely to affect granule motion. In addition, Ca^{2+} may regulate the motor activity of MyoVa (Krementsov et al., 2004). Interestingly, Becherer et al. (2003) observed that a depolarizing stimulus reduced the mean distance between SG and Ca^{2+} microdomains and provided some evidence for a stimulus-dependent recruitment of SG toward release site. Another recent report also shows a Ca^{2+} -dependent increase in granule motion immediately prior to fusion (Allersma et al., 2006). Despite the lack of important effect of Ca^{2+} elevation on the distribution of mean D_{xy} values, it will thus be interesting to investigate whether MyoVa is involved in these events.

Materials and Methods

Materials

Rabbit anti-MyRIP antibody (El Amraoui et al., 2002) and anti-myosin Va (Espreafico et al., 1992) were described previously. Anti-Rab27A, anti-EEA1, anti-GM130 and anti-cytochrome c (6H2B4) monoclonal antibodies were from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA); polyclonal anti-chromogranin A/B from Abcam (Cambridge, UK), anti-actin (AC-74) monoclonal antibody from Sigma (Cambridge, UK), Myc-Tag 9B11 antibody from Cell Signaling Technology (Beverly, USA), anti TGN46 from Serotec (Oxford, UK). The anti-Lamp-1 antibody (H4A3) was obtained from Developmental studies Hybridoma bank University of IOWA (USA). The polyclonal antibody against the protein disulfide isomerase was kindly provided by D. Ferrari (R. Jahn laboratory, Göttingen, Germany).

Cell culture reagents were obtained from PAA Laboratories (Linz, Austria). DNA purifications were done using kits from Macherey-Nagel (Duren, Germany). Enzymes for molecular biology were from New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Fluorescein isothiocyanate dextran (MW 150,000) was from Sigma (Cambridge, UK). Other chemicals were purchased from Sigma.

Cell culture, transfection and MyoVa silencing

COS-7 cells used for TIRFM calibration were routinely cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 4.5 g/L glucose and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in 5% CO₂ at 37°C.

Human BON cells (Evers et al., 1991) were provided by C. M. Townsend from The University of Texas Medical Branch, USA. Cells were cultured in Ham's F12/DMEM with 10% FBS at 37°C under 5% CO₂. Cells were plated onto collagen-coated glass coverslips and

3.4.1.4. L'inhibition de l'expression de la myosine Va par interférence à l'ARN modifie la répartition des granules de sécrétion au sein des cellules mais n'induit pas la formation d'agrégats

La fonction de la myosine Va a également été étudiée grâce à l'inhibition de l'expression de cette protéine par la méthode d'interférence à l'ARN (RNAi, voir Matériels et méthodes et (Hannon, 2002) pour une revue sur le principe de cette méthode). Nous avons tout d'abord quantifié l'efficacité d'inhibition de deux séquences d'ARN double-brins différentes dirigées soit contre une zone située au niveau des têtes processives de la myosine Va (RNAi 1), soit contre une région localisée au niveau du domaine globulaire constituant l'extrémité de la queue (RNAi 2). Après trois jours de traitement par l'une ou l'autre de ces séquences, la quantité de myosine Va présente au sein des cellules BON est réduite de 75 % (Figure 48).

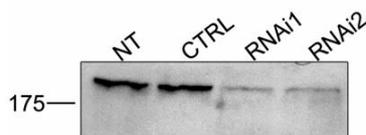


Figure 48 : Contrôle de l'inhibition de l'expression de la myosine Va par RNAi. Après trois transfections successives avec le RNAi (24 h entre chaque transfection), le niveau de myosine Va a été quantifié par un immunomarquage avec un anticorps anti-myosine Va dans des cellules non transfectées (NT), transfectées avec un RNAi témoin (CTRL) ou transfectées avec un RNAi dirigé contre la myosine Va (RNAi 1 ou RNAi 2). En moyenne, la quantité de myosine Va décroît de $74 \pm 10\%$ ($n^9 = 4$) dans les cellules traitées par le RNAi 1 et de $70 \pm 25\%$ ($n = 3$) dans celles traitées par le RNAi 2.

L'inhibition de l'expression de la myosine Va par RNAi ne provoque pas l'agrégation des GS mais induit des modifications importantes dans la répartition de ces organites au sein des cellules. Dans la majorité des cellules témoins, la distribution des GS n'est pas uniforme. Ainsi, ces organites s'accumulent en périphérie des cellules, notamment au niveau des extensions cellulaires (Figure 49). En revanche, dans les cellules traitées par RNAi, les GS sont généralement exclus de telles extensions (Figure 49) et ont plutôt tendance à être concentrés au niveau de la région périnucléaire. Une telle concentration des GS au centre des cellules est ainsi observée dans environ 35 % des cellules traitées par RNAi alors que seulement 1 % des cellules témoins présentent une telle répartition. Cet effet est très similaire à celui observé pour les mélanosomes dans des mélanocytes de souris *dilute* (*i.e.* présentant une myosine Va déficiente, (Wu, Bowers et al., 1998)).

⁹ La lettre n désigne ici le nombre d'expériences indépendantes réalisées.

transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For TIRFM experiments (excepted MyoVa silencing), BON cells were transfected by electroporation. In brief, 1.5×10^6 cells were collected in 50 μ l of phosphate buffer saline containing vector DNAs (5 μ g), electroporated (600 V/cm, 8 x 3 ms) using a PS10 electropulsator (Jouan, Saint Herblain, France), recovered in warm culture medium and plated onto 5 μ g/ml collagen coated glass bottom dishes (MatTEK, Ashland, MA, USA or World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Experiments were performed one or two days after transfection. For TIRFM observation, cells were immersed in Locke solution (Glucose 5.6 mM, HCO_3^- 3.6 mM, Cl^- 159.6 mM, Na^+ 157.6 mM, K^+ 5.6 mM, Hepes-NaOH 5 mM, CaCl_2 2.5 mM, MgCl_2 1.2 mM).

siRNA duplexes were provided by Dharmacon (Chicago, IL, USA) or Sigma (Cambridge, UK). Two siRNAs were directed against human MyoVa: RNAi-1: (5'-GAACAAAUGUGCACUCUUUUU; RNAi-2: 5'-AAAGUAAGGUCGUUGCUGAAAUU. The following siRNAs were used as controls: siGLO Lamin A/C from Dharmacon and a siRNA targeting EGFP: 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUU. Transfection of siRNAs (100 nM) was done with Dharmafect (0.25 μ l/50 000 cells). Cells were daily transfected for three days. For some experiments, the second transfection was done with lipofectamine 2000 in order to co-transfect pNPY-GFP. Cell extracts were prepared in parallel for Western blot analysis of MyoVa expression. The blots were scanned and quantified using Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Levels of actin were used to normalize the results from different samples.

Co-immunoprecipitation

BON cells were transfected three days before the experiment with vectors encoding myc-tagged MyRIP and GFP-MyoVa-LT. Immunoprecipitation was performed as described

previously (Desnos et al., 2003). Eluted proteins were analyzed by immunoblotting for the presence of MyoVa long tail, MyRIP or actin to normalize .

Immunofluorescence microscopy

Immunocytochemistry was performed as described previously (Desnos et al., 2003). Secondary antibodies were coupled to Cy-3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, USA), Alexa-488, Alexa-568 or Alexa-350 (Invitrogen). Cells were visualized using a z-motorized Nikon inverted microscope TE2000E equipped with a 100x objective (NA 1.4) and Coolsnap ES CCD camera (Roper Scientific, Tucson, AZ, USA). When indicated, Z-series were acquired with $\Delta z = 200$ nm and image stacks were restored using the Metamorph PSF-based deconvolution software (Molecular devices, Downingtown, PA, USA).

Evanescent wave fluorescence microscopy (TIRFM)

TIRFM setup

An upright microscope (BX50WI, Olympus, Tokyo) was adapted to TIRFM by the prism approach (Steyer and Almers, 2001). To generate the evanescent wave, light from a multiline argon laser set at 488 or 514 nm (177-G02, Spectra Physics, Newport, Irvine, CA) radially entered a BK7 glass hemisphere and was reflected from its planar face at a supercritical angle. To excite the fluorescence of labeled SG with the evanescent wave, the hemisphere was optically coupled with the glass coverslip on which cells were cultured, using immersion oil (518 C, Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Oberkochen, Germany).

The intensity of the evanescent wave employed to illuminate SG declines exponentially in the normal direction to the interface. The penetration depth δ is defined as the distance over which the intensity falls off to $1/e$ of its value at the surface, and is given by:

$$\delta = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_g^2 \sin^2(\theta) - n_c^2}}, \quad (\text{Eq. 1})$$

where λ is the wavelength of the laser beam, θ its incidence angle and n_g and n_c are the refractive indices of the glass coverslip and the cell medium, respectively (see *Calibration of the evanescence depth*). According to Eq. 1, the penetration depth can be modified by changing the incidence angle of the laser beam reaching the sample. To vary this angle, we used a telecentric system composed of a movable mirror and a lens whose focal point coincided with the center of the hemispheric prism. A translation of the mirror changed the incidence angle of the laser beam and thus the evanescence depth, without modifying the illuminated area on the coverslip.

During timelapse acquisition, the laser power was attenuated to ~ 1 mW and illumination was restricted to image acquisition by a shutter coupled to the camera in order to minimize photobleaching. Cells were observed through a water immersion objective (60X, 0.9 NA, Olympus), and frames were captured with a cooled CCD camera (CoolSnap HQ, Photometrics) controlled by Metaview software (Molecular Devices, Downingtown, PA). Under these conditions of observation, one pixel corresponded to 107.5 nm. In the present work, frames were acquired at 4-10 Hz in stacks of 300-700 images. Exposure times were of 100-200 ms.

For two color imaging, selective observation of the fluorophores was achieved using a custom setup (Errol, Paris, France). Selective excitation was obtained using argon laser lines at 488 nm and 514 nm, and optical filters were used for the emission (Melles Griot Industrie, Voisins Le Bretonneux, France). After a separation of the laser lines *via* a holographic grating, lines at 488 nm and 514 nm were selected using two pinholes and then were spatially recombined. An oscillating slat, synchronized with the emission filters, allowed line selection.

For two color acquisitions, the two channels were then imaged sequentially and finally superimposed to obtain the two color sequences.

Calibration of the evanescence depth

In order to know the thickness of the cell region illuminated using TIRFM, the penetration depth of the evanescent wave must be determined. However, this is a function of the refractive index of the cell medium (see Eq. 1) which is not well defined. Consequently, the evanescence depth had to be evaluated experimentally. To do so, intensities of fluorescent beads adsorbed onto living COS-7 cells were measured as functions of their vertical positions, as previously described by Steyer and Almers (Steyer and Almers, 1999). These measurements were repeated for different incidence angles of the laser beam. The evanescent wave profiles thus obtained were well fitted by simple exponential decays which corresponded to the theoretical profiles. From these fits, evanescence depths between 200 to 300 nm were obtained with a relative error of 15%. Using Eq. 1, we then deduced an average refractive index, n_c for the cell medium of 1.37 ± 0.01 , in agreement with previous estimations (Bereiter-Hahn et al., 1979). It was assumed that the same refractive index was also valid for BON cells. Penetration depths used for timelapse imaging were calculated with this cell medium refractive index.

Image analysis

To evaluate their density in the subplasmalemmal region, labeled SG were either counted manually or using a custom segmentation algorithm software using wavelet based algorithms (Starck et al., 1998) (Fig. 6). The two approaches gave similar results.

From the time lapse experiments, 2 dimensional SG trajectories were obtained by single particle tracking (SPT) using Multidimensional Image Analysis software (Racine et al., 2006). SG mobility was then evaluated by calculating their mean diffusion coefficient D_{xy} as follows. For each SG trajectory, the mean square displacement (MSD) in the x,y plane was

calculated according to Steyer and Almers (Steyer and Almers, 1999). A regression line was fitted through the first 5 points of the MSD curve with each point weighted by the reciprocal of its relative variance V_{rel} , given by (Steyer and Almers, 1999):

$$V_{rel}(n) = \frac{n(2n^2 + 1)}{N - n + 1} \quad (\text{Eq. 2})$$

where N is the total number of particle positions in the considered period of trajectory. The diffusion coefficient D_{xy} was calculated as $D_{xy} = s/4$ with s being the slope of the linear fit. To measure D_{xy} variations along a given trajectory, this parameter was calculated along this trajectory using a rolling analysis window whose width was set at 25 points.

To evaluate the precision of this SPT algorithm, we tracked fluorescent latex beads (200 nm diameter, labeled with fluorescein, Polysciences, Inc., Warrington, PA) immobilized on a coverslip. The laser intensity was adapted to get signal-to-noise ratios for the beads similar to those typical for SG. The positioning error was ~ 16 nm and the minimum detectable diffusion coefficient was $\sim 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Cell stimulation by Ca^{2+} uncaging

To induce rapid elevation of intracellular free Ca^{2+} concentration, cells were incubated 60 min in Locke buffer with 30 μM o-nitrophenyl-EGTA-AM (Invitrogen) followed by 60 min incubation in the culture medium and then illuminated by flashes of UV light generated with a Xenon arc flash lamp (Rapp Optoelectronic, Hamburg, Germany). The UV lamp was coupled to the epifluorescence illumination device of the microscope using a liquid light guide. During a stimulation sequence, UV flashes were delivered every 10 seconds.

Statistical analyses

Values are given as mean \pm S.E.M. Significance of differences was calculated with Student's unpaired t-test, Mann-Whitney U-test or Kolmogorov-Smirnov test when applicable; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Online supplemental material

Fig. S1 illustrates the specificity of MyoVa tail effect. Fig. S2 shows NPY-containing tubules appearing upon MyoVa tail expression. Fig. S3 illustrates how rapidly moving SG were selected. Video1.mov shows the association of GFP-MyoVa tail with moving granules. Video2.mov shows the appearance of NPY-containing tubules upon MyoVa tail expression. Plasmid constructions are described in the supplemental Materials and methods.

Acknowledgments

This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and by the Direction Générale de l'Armement. SH was supported by a fellowship from the Direction Générale de l'Armement and the Association pour la Recherche contre le Cancer and CB by a fellowship from the Deutscher Akademischer Austauschdienst. FD is supported by the INSERM.

Abbreviations

D_{xy} lateral diffusion coefficient; mRFP, monomeric red fluorescent protein; MyoVa, myosin Va; NPY, Neuropeptide-Y; SG, Secretory Granule; TIRFM, total internal reflection microscopy.

References

- Allersma, M.W., M.A. Bittner, D. Axelrod, and R.W. Holz. 2006. Motion Matters: Secretory Granule Motion Adjacent to the Plasma Membrane and Exocytosis. *Mol. Biol. Cell.*
- Becherer, U., T. Moser, W. Stuhmer, and M. Oheim. 2003. Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat. Neurosci.* 6:846-53.
- Bereiter-Hahn, J., C.H. Fox, and B. Thorell. 1979. Quantitative reflection contrast microscopy of living cells. *J. Cell Biol.* 82:767-79.
- Bridgman, P.C. 1999. Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex. *J. Cell Biol.* 146:1045-60.
- Desnos, C., J.S. Schonn, S. Huet, V.S. Tran, A. El-Amraoui, G. Raposo, I. Fanget, C. Chapuis, G. Menasche, G. De Saint Basile, C. Petit, S. Cribier, J.P. Henry, and F. Darchen. 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.
- El-Amraoui, A., J.S. Schonn, P. Kussel-Andermann, S. Blanchard, C. Desnos, J.P. Henry, U. Wolfrum, F. Darchen, and C. Petit. 2002. MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes. *EMBO Rep.* 3:463-470.
- Espreafico, E.M., R.E. Cheney, M. Matteoli, A.A. Nascimento, P.V. De Camilli, R.E. Larson, and M.S. Mooseker. 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.* 119:1541-57.
- Evers, B.M., C.M. Townsend, Jr., J.R. Upp, E. Allen, S.C. Hurlbut, S.W. Kim, S. Rajaraman, P. Singh, J.C. Reubi, and J.C. Thompson. 1991. Establishment and characterization of

- a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth.
Gastroenterology. 101:303-11.
- Fukuda, M., and T.S. Kuroda. 2002. Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin. *J. Biol. Chem.* 277:43096-103.
- Fukuda, M., and T.S. Kuroda. 2004. Missense mutations in the globular tail of myosin-Va in dilute mice partially impair binding of Slac2-a/melanophilin. *J. Cell Sci.* 117:583-91.
- Gross, S.P., M.C. Tuma, S.W. Deacon, A.S. Serpinskaya, A.R. Reilein, and V.I. Gelfand. 2002. Interactions and regulation of molecular motors in *Xenopus* melanophores. *J. Cell Biol.* 156:855-65.
- Hammer, J.A., 3rd, and X.S. Wu. 2002. Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:69-75.
- Ivarsson, R., X. Jing, L. Waselle, R. Regazzi, and E. Renstrom. 2005. Myosin 5a controls insulin granule recruitment during late-phase secretion. *Traffic*. 6:1027-35.
- Jahn, R., T. Lang, and T.C. Sudhof. 2003. Membrane fusion. *Cell*. 112:519-33.
- Krementsov, D.N., E.B. Krementsova, and K.M. Trybus. 2004. Myosin V: regulation by calcium, calmodulin, and the tail domain. *J. Cell Biol.* 164:877-86.
- Kuroda, T.S., and M. Fukuda. 2005. Identification and biochemical analysis of Slac2-c/MyRIP as a Rab27A-, myosin Va/VIIa-, and actin-binding protein. *Methods Enzymol.* 403:431-44.
- Lang, T., I. Wacker, I. Wunderlich, A. Rohrbach, G. Giese, T. Soldati, and W. Almers. 2000. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys. J.* 78:2863-77.
- Langford, G.M. 2002. Myosin-V, a Versatile Motor for Short-Range Vesicle Transport. *Traffic*. 3:859-865.

- Levi, V., V.I. Gelfand, A.S. Serpinskaya, and E. Gratton. 2006a. Melanosomes transported by myosin-V in *Xenopus melanophores* perform slow 35 nm steps. *Biophys. J.* 90:L07-9.
- Levi, V., A.S. Serpinskaya, E. Gratton, and V. Gelfand. 2006b. Organelle transport along microtubules in *Xenopus melanophores*: evidence for cooperation between multiple motors. *Biophys. J.* 90:318-27.
- Li, N., Q. Wang, J. Li, X. Wang, M.R. Hellmich, S. Rajaraman, G.H. Greeley, Jr., C.M. Townsend, Jr., and B.M. Evers. 2005. Inhibition of mitochondrial gene transcription suppresses neurotensin secretion in the human carcinoid cell line BON. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288:G213-20.
- Mehta, A.D., R.S. Rock, M. Rief, J.A. Spudich, M.S. Mooseker, and R.E. Cheney. 1999. Myosin-V is a processive actin-based motor. *Nature.* 400:590-3.
- Ménasché, G., J. Feldmann, A. Houdusse, C. Desaymard, A. Fischer, B. Goud, and G. De Saint Basile. 2003. Biochemical and functional characterization of Rab27a mutations occurring in Griscelli syndrome patients. *Blood.* 101:2736-42.
- Morin, P., C. Sagne, and B. Gasnier. 2004. Functional characterization of wild-type and mutant human sialin. *EMBO J.* 23:4560-70.
- Nakata, T., and N. Hirokawa. 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.* 12:2186-97.
- Nascimento, A.A., R.G. Amaral, J.C. Bizario, R.E. Larson, and E.M. Espreafico. 1997. Subcellular localization of myosin-V in the B16 melanoma cells, a wild-type cell line for the dilute gene. *Mol. Biol. Cell.* 8:1971-88.
- Oheim, M., D. Loerke, W. Stuhmer, and R.H. Chow. 1998. The last few milliseconds in the life of a secretory granule. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Eur. Biophys. J.* 27:83-98.

- Oheim, M., and W. Stühmer. 2000. Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys. J.* 29:67-89.
- Pantaloni, D., C. Le Clainche, and M.F. Carrier. 2001. Mechanism of actin-based motility. *Science.* 292:1502-6.
- Pastural, E., F.J. Barrat, R. Dufourcq-Lagelouse, S. Certain, O. Sanal, N. Jabado, R. Seger, C. Griscelli, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 1997. Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat. Genet.* 16:289-92.
- Prekeris, R., and D.M. Terrian. 1997. Brain myosin V is a synaptic vesicle-associated motor protein: evidence for a Ca²⁺-dependent interaction with the synaptobrevin-synaptophysin complex. *J. Cell Biol.* 137:1589-601.
- Racine, V., A. Hertzog, J. Jouanneau, J. Salamero, C. Kervrann, and J.-B. Sibarita. 2006. Multiple-Target Tracking of 3D Fluorescent Objects Based on Simulated Annealing. In 2006 IEEE International symposium on biomedical Imaging (ISBI 2006), April 6-9, 2006, Arlington, Virginia, USA.
- Rose, S.D., T. Lejen, L. Casaletti, R.E. Larson, T.D. Pene, and J.M. Trifaro. 2003. Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *J. Neurochem.* 85:287-98.
- Roux, A., G. Cappello, J. Cartaud, J. Prost, B. Goud, and P. Bassereau. 2002. A minimal system allowing tubulation with molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99:5394-9.
- Rudolf, R., T. Kogel, S.A. Kuznetsov, T. Salm, O. Schlicker, A. Hellwig, J.A. Hammer, 3rd, and H.H. Gerdes. 2003. Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F- actin rich cortex of PC12 cells. *J. Cell Sci.* 116:1339-48.

- Salas-Cortes, L., F. Ye, D. Tenza, C. Wilhelm, A. Theos, D. Louvard, G. Raposo, and E. Coudrier. 2005. Myosin Ib modulates the morphology and the protein transport within multi-vesicular sorting endosomes. *J. Cell Sci.* 118:4823-32.
- Seabra, M.C., and E. Coudrier. 2004. Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic.* 5:393-9.
- Sellers, J.R., and C. Veigel. 2006. Walking with myosin V. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:68-73.
- Starck, J.-L., F.D. Murtagh, and A. Bijaoui. 1998. Image Processing and Data Analysis : The Multiscale Approach. Cambridge University Press.
- Steyer, J.A., H. Horstmann, and W. Almers. 1997. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature.* 388:474-8.
- Steyer, J.A., and W. Almers. 1999. Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 76:2262-71.
- Steyer, J.A., and W. Almers. 2001. A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:268-75.
- Storrie, B., J. White, S. Rottger, E.H. Stelzer, T. Sukanuma, and T. Nilsson. 1998. Recycling of golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering. *J. Cell Biol.* 143:1505-21.
- Takagishi, Y., S. Oda, S. Hayasaka, K. Dekker-Ohno, T. Shikata, M. Inouye, and H. Yamamura. 1996. The dilute-lethal (dl) gene attacks a Ca²⁺ store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. *Neurosci. Lett.* 215:169-72.
- Trifaro, J., S.D. Rose, T. Lejen, and A. Elzagallaai. 2000. Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie.* 82:339-52.
- Vale, R.D. 2003. Myosin V motor proteins: marching stepwise towards a mechanism. *J. Cell Biol.* 163:445-50.

- Varadi, A., T. Tsuboi, L.I. Johnson-Cadwell, V.J. Allan, and G.A. Rutter. 2003. Kinesin I and cytoplasmic dynein orchestrate glucose-stimulated insulin-containing vesicle movements in clonal MIN6 beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 311:272-82.
- Varadi, A., T. Tsuboi, and G.A. Rutter. 2005. Myosin Va transports dense core secretory vesicles in pancreatic MIN6 beta-cells. *Mol. Biol. Cell.* 16:2670-80.
- Wang, F., K. Thirumurugan, W.F. Stafford, J.A. Hammer, 3rd, P.J. Knight, and J.R. Sellers. 2004. Regulated conformation of myosin V. *J. Biol. Chem.* 279:2333-6.
- Waselle, L., T. Coppola, M. Fukuda, M. Iezzi, A. El-Amraoui, C. Petit, and R. Regazzi. 2003. Involvement of the Rab27 binding protein Slac2c/MyRIP in insulin exocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 14:4103-13.
- Watanabe, M., K. Nomura, A. Ohyama, R. Ishikawa, Y. Komiya, K. Hosaka, E. Yamauchi, H. Taniguchi, N. Sasakawa, K. Kumakura, T. Ushiki, O. Sato, M. Ikebe, and M. Igarashi. 2005. Myosin-Va regulates exocytosis through the submicromolar Ca²⁺-dependent binding of syntaxin-1A. *Mol. Biol. Cell.* 16:4519-30.
- Wu, X., B. Bowers, K. Rao, Q. Wei, and J.A. Hammer, 3rd. 1998. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. *J. Cell Biol.* 143:1899-918.
- Wu, X.S., K. Rao, H. Zhang, F. Wang, J.R. Sellers, L.E. Matesic, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and J.A. Hammer, 3rd. 2002. Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat. Cell Biol.* 4:4.
- Wu, X.S., G.L. Tsan, and J.A. Hammer, 3rd. 2005. Melanophilin and myosin Va track the microtubule plus end on EB1. *J. Cell Biol.* 171:201-7.

Figure legends

Figure 1. Association of Myosin Va tail with secretory granules

GFP (A), GFP-tagged MyoVa globular tail (C) or GFP-tagged MyoVa-tail (E) were co-expressed in BON cells with NPY-mRFP (B, D, F) used as a marker of SG. NPY-mRFP displayed a punctated distribution enriched in cells extensions in control cells (B). GFP-MyoVa globular tail (C) gave a diffuse staining of the cytosol, whereas GFP-MyoVa tail codistributed with NPY-mRFP (E and F). The boxed region in F is shown at higher magnification (inset in E and F). Bars (in A-E), 10 μ m. BON cells expressing GFP-MyoVa tail and NPY-mRFP were imaged successively in the red and green channels at 4 Hz by 2-color TIRFM (G-J, see methods and supplemental Fig1video1.mov). Most of GFP-MyoVa tail-labeled structures (G) co-distributed with NPY-mRFP-labeled SG (H). Bar (in G), 2.5 μ m. (I, J) A single granule displaying a directed motion (arrows) is shown in successive frames. Note that NPY-mRFP (I) and GFP-MyoVa tail (J) moved together. Bar (in J) 1 μ m.

Figure 2. Overexpression of Myosin Va tail induces the formation of SG clusters.

The distribution of SG stained with anti-chomogranin A/B antibodies (B, H), or by NPY-mRFP expression (E) was analyzed in BON cells expressing (A-F) or not expressing (G-I) GFP-MyoVa tail. In control cells, SG appear as small individual dots often enriched in peripheral regions. In contrast, SG are clustered in MyoVa tail expressing cells (A, D). GFP-Myosin Va-tail, Rab27a (C) and Myrip (F) are enriched in SG clusters, in contrast with their distribution in control cells (G, I). Bars, 10 μ m.

Figure 3. The clustering effect of MyoVa-tail is dependent on MyRIP.

BON cells were double transfected with GFP-MyoVa-tail and myc-tagged Rab11b as a control (CTRL) (A-C), myc-tagged MyRIP-RBD (D-F) or myc-tagged MyRIP-full length

(FL) (G-I). Three days after transfection, the distribution of SG (labeled with an anti-chromogranin A/B antibody, C, F, I,) was analyzed in transfected cells (detected with an anti-myc antibody, B, E, H). SG are clustered in CTRL and MyRIP-FL cells but not in MyRIP-RBD cells. Note the diffuse cytosolic pattern of GFP-MyoVa tail in a MyRIP-RBD expressing cell (D). Bar, 10 μ m. (J) The percentage of cells displaying marked SG clustering upon GFP-MyoVa tail expression was counted in myc-tagged Rab11b (CTRL), MyRIP-RBD or MyRIP-FL expressing cells. Shown is the mean (\pm s.e.) of three independent experiments for 240-280 cells in each category. (K) Co-immunoprecipitation of GFP-MyoVa long tail with myc-tagged MyRIP from BON cells extracts prepared three days after transfection with pEGFP-MyoVa long tail, pCMV-MyRIP or both, as indicated. Immunoprecipitation was done with an anti-myc antibody and immunoblotting with anti-MyoVa antibodies. 1/15 of cell extracts and 1/4 of immunoprecipitates were analyzed. The position of endogenous MyoVa and MyoVa tail is shown by an arrowhead and an arrow, respectively.

Figure 4. Silencing of endogenous Myosin Va expression impairs SG distribution

(A) BON cells were daily transfected with different siRNA duplexes for three days. Levels of MyoVa were analyzed by immunoblotting using anti-Myosin Va antibodies in non transfected cells (NT), in cells treated with a control siRNA (CTRL) and in cells treated with siRNAs directed to MyoVa (RNAi1 and RNAi2). Shown is the result of a typical experiment. The mean decrease in MyoVa level was 73.5 ± 10 % (n=4) and 70 ± 25 % (n=3) for RNAi1 and RNAi2, respectively. (B) Pictures showing different patterns of SG distribution. SG (here labeled with anti-Rab27a antibodies) are often enriched at the cell periphery and in cellular extensions (left picture) but can also display an even distribution in the cell (middle panel). Upon MyoVa silencing, SG frequently accumulate in the perinuclear region (right panel). Bar, 10 μ m. (C) Effect of MyoVa silencing on SG distribution. BON cells received

siRNA duplexes as in (A) for 3 days, were fixed and stained with anti-Rab27a or chromogranin A/B antibodies. Cells were classified into 3 categories according to SG distribution: enriched at the cell periphery, evenly distributed or perinuclear accumulation as depicted in (B). Shown is the mean percentage of cells with a marked enrichment of SG at the cell periphery observed in non transfected cells (NT, n=3, 652 cells) and in cells treated with control siRNA (CTRL, n=4, 777 cells), RNAi1 (n=4, 843 cells) or RNAi2 (n=3, 380 cells). (D) The Rab-binding domain of MyRIP (MyRIP-RBD) impairs SG distribution. BON cells were double transfected with NPY-GFP and myc-tagged MyRIP-RBD or an empty vector (CTRL). The percentage of cells with SG enrichment at the cell periphery was counted three days after transfection. Shown is the mean of five independent experiments for control (CTRL, 197 cells) or MyRIP-RBD expressing cells (132 cells).

Figure 5. Myosin Va controls the cortical density of SG

(A) BON cells were co-transfected with pNPY-mRFP and pEGFP-MyoVa-tail (MyoVa tail) or with an empty vector (CTRL) and imaged by TIRFM at a penetration depth δ of 150 nm one day after transfection. For each cell, the density of SG in the subplasmalemmal region was determined by dividing the number of SG observed in the evanescent field by the size of the cell footprint (CTRL, 37 cells; MyoVa-tail, 41 cells, from 2 experiments). (B) Cells were daily transfected with a control siRNA duplex (20 cells) or MyoVa RNAi1 (19 cells) for three days. On day 2, they were co-transfected with pNPY-GFP. The density of SG was determined by TIRFM as in (A) at $\delta = 80$ nm or 150 nm as indicated. Shown is the result of one experiment. Similar results were obtained in another one. (C) The density of SG was counted on BON cells expressing pNPY-mRFP and myc-tagged Rab11b (CTRL, 39 cells), myc-tagged MyRIP-RBD (40 cells) or myc-tagged full length MyRIP (MyRIP-FL, 38 cells) two days after transfection in two independent experiments.

Figure 6. Effect of Myosin Va silencing on cortical distribution of SG

BON cells were daily transfected with a control siRNA duplex (A, B) or MyoVa RNAi1 (C, D) for three days and were co-transfected once (on day 2) with pNPY-GFP. NPY-GFP containing SG were imaged by TIRFM with a penetration depth of 150 nm (A, C). Note in (A) that SG are not homogenously distributed but are enriched near the cell border. The density of SG was reduced by MyoVa silencing (C) and the areas enriched in SG disappeared. To quantify the number of SG, images A and C were segmented using Multidimensional Image Analysis software (B, D). Bars, 2 μ m.

Figure 7: Effect of MyoVa tail on SG mobility in the subplasmalemmal region

(A) BON cells were transfected with pNPY-mRFP (CTRL, white bars) or with pNPY-mRFP and pEGFP-MyoVa-tail (MyoVa tail, black bars) and imaged by TIRFM for 75 sec at 4 Hz. The trajectories of SG were monitored to obtain their mean diffusion coefficient D_{xy} (see *Methods*). Shown is the distribution of D_{xy} values for a representative experiment (CTRL, 326 SG from 5 cells; MyoVa tail, 280 SG from 5 cells). (B) SG moving in a directed manner (see supplemental Fig. 3) were tracked to measure their velocity. Shown is the distribution of SG velocities in control cells (CTRL, upper panel; 112 vesicles from 7 cells) or in MyoVa tail expressing cells (MyoVa tail, lower panel; 126 vesicles from 9 cells).

Figure 8. Impairment of Myosin Va function reduces SG docking at the plasma membrane and exocytosis

BON cells were transfected with pNPY-mRFP and an empty vector (CTRL) or with pNPY-mRFP and pEGFP-MyoVa-tail (MyoVa tail) and were stimulated to secrete two days after transfection by UV flash photolysis of caged calcium. Cells were imaged by TIRFM at

10 Hz. (A) Exocytotic events were detected by visual inspection of image stacks (see text for details). Shown is the percentage of SG in the evanescent field that underwent exocytosis during a 70-s sequence (CTRL, 22 cells, 2854 SG; MyoVa-tail, 18 cells, 1346 SG). (B) In the same experiment, the diffusion coefficient (D_{xy}) of SG was measured after single particle tracking in 20-s sequences. Shown is the percentage of SG with $D_{xy} < 10 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (CTRL, 6 cells, 407 SG; GFP-MyoVa-tail, 6 cells, 322 SG).

Figure 9: Behavior of SG before fusion

SG that underwent exocytosis in the experiments described in Fig. 8 were tracked and their diffusion coefficient D_{xy} was measured as a function of time. Times shown are relative to the fusion event (arrow). Panels (A) and (B) show two examples of SG trajectories. In A, the granule remained almost immobile during the 10-s sequence, as indicated by its very low D_{xy} and by its confined lateral trajectory (inset). In B, the SG was highly mobile, as indicated by its high D_{xy} and then suddenly stopped moving ~ 2 s before fusion; the 2D trajectory of this granule (inset) also shows this transition from an apparently directed motion to a confined behavior. The end of the trajectory is depicted with a filled circle. (C) Mean values of D_{xy} plotted against time (35 SG from 22 cells). Note the narrowing of the distribution before fusion. Bar (inset in A and B), 0.1 μm .

Supplemental figure 1: Specificity of MyoVa tail effect. BON cells were transfected with flag-tagged MyoVa tail (A, B), mRFP-MyoVa-tail (C, D) or GFP-MyoVa-tail (E-J) and immunofluorescence experiments were performed two days after transfection. MyoVa tail is shown in B, D, F, H, I and cells expressing MyoVa tail are outlined. (A) Cells were stained with an anti-EEA1 to label early endosomes and an anti-MyoVa antibody to reveal the presence of MyoVa tail (B). (C) Cells were co-transfected with GFP-GalNAC-T2 to label the

TGN. (E) Lysosomes were stained with an anti-Lamp-1 antibody. (G) Mitochondria were stained with an anti-cytochrome-c antibody. (I) The endoplasmic reticulum was stained with an anti-protein disulfide isomerase antibody. Note that none of those intracellular compartments was affected by MyoVa-tail. From C to J, the images shown were deconvoluted. Bar, 10 μ m.

Supplemental figure 2 : MyoVa tail induces the appearance of NPY-containing tubules. SG labeled with NPY-mRFP were imaged by TIRFM in a control cell (A) or GFP-MyoVa-tail expressing cells (B and C). In control cells, SG appear as individual round structures with a rather constant size. In contrast, in MyoVa-tail expressing cells, SG display various shapes and sizes and some NPY-positive structures appear as tubules. The number of tubes per cell is variable. Similar observations were made in cells transfected with NPY- GFP and mRFP-MyoVa tail. Bar, 2.5 μ m.

Supplemental figure 3 : Selection of moving granules. SG labeled with NPY-mRFP were imaged by TIRFM at 4 Hz. (C) To identify SG moving in a directed manner, ten successive TIRFM frames were superimposed. A moving granule appears as a string (arrows) while immobile vesicles appear as round shaped structures (arrowheads). (A) Frame 1. (B) Frame 10. Bar, 1 μ m.

Supplemental Fig1video1.mov

BON cells expressing GFP-MyoVa tail and NPY-mRFP were imaged by dual-color TIRFM one day after transfection to reduce the expression of MyoVa tail and its clustering effect on SG. Cells were sequentially illuminated at 488 and 514 nm with a 250-ms delay between channels to excite EGFP or mRFP, respectively. Images were taken at 4 Hz. Shown

is a sequence resulting from the combination of the two channels. This is the reason why rapidly moving granules appear with a red front and a green trail. The movie is accelerated 3 times. Bar, 2 μm .

Supplemental video2.mov

BON cells expressing GFP-MyoVa tail and NPY-mRFP were imaged by dual-color TIRFM two days after transfection. Cells were sequentially illuminated at 488 and 514 nm to excite EGFP or mRFP, respectively. Images were taken at 4 Hz. Shown is a sequence resulting from the combination of the two channels that illustrates massive tubularization of the NPY-containing compartment. GFP-MyoVa tail also labels these tubules but appears to be more concentrated in immobile areas. The movie is accelerated 3 times. Bar, 2 μm .

Supplemental Methods

Constructs

The plasmid encoding NPY-GFP (pNPY-GFP) was kindly provided by Dr W. Almers (Portland, USA); pRSET-mRFP (monomeric Red Fluorescent Protein) was a gift from Dr. R. Y. Tsien (San Diego, CA); vectors encoding GFP-sialin (Morin et al., 2004) and GalNacT2-GFP (Storrie et al., 1998) were kindly provided by B. Gasnier (Paris, France) and F. Perez, (Paris, France), respectively; pcDNA3-mycRab11b was a gift from M. Cormont (Nice, France). Vectors encoding MyRIP and Rab27A constructs were described previously (Desnos et al., 2003). pEGFP-C1 was from BD Biosciences Clontech (Basingstoke, UK).

Different myosin Va constructs were generated by PCR using human cDNA clones obtained from RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin, Germany). IMAGp998C0410088Q3 was amplified with Myo5aP1F0 (5'-CGGAAGGCAGCCATCACCAT) and Myo5aP2RE (5'-GTATTGTGGAATCTGTCATTG) and IMAGp998H1610421Q3 with Myo5aP3FO (5'-GAATACAATGACAGATTCCAC) and Myo5aP4RE (5'-AATGCTGCCAGCTGAAGACA). The products were mixed and amplified with Myo5aP5FO (5'-GAATTCCGAGGCTCGCTCAGTGGAGCGCTATAA) and Myo5aP6RE (5'-GTCGACACGGTACCTAGTTGGTTAAG). The product was cloned into PCR-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), digested with EcoRI and Sall and subcloned into pEGFP-C1 vector or pCMV-Tag2A vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA) to generate vectors encoding MyoVa LT tagged with GFP (pEGFP-MyoVaLT) or Flag (pFlag-MyoVaLT). In a similar manner, MyoVa tail was generated by PCR using IMAGp998H1610421Q3 and the primers Myo5aP13FO (5'-GAATCCCGTCAAGAACTAGAATCAGAAAAC) and Myo5aP6RE (5'-GTCGACACGGTACCTAGTTGGTTAAG). MyoVa GT was generated from the same clone using Myo5aP9FO-4592 (5'-GAATTCGATGGAGAACATATCCCCAGGACAG) and

Myo5aP6RE-6054 (5'-GTCGACACGGTACCTAGTTGGTTAAG). MyoVa long tail starts at amino-acid 911, MyoVa tail at position 1208 (beginning of exon A) and MyoVA GT at position 1448 (numbering refer to the sequence of human MyoVa; accession number NM_000259). These fragments were cloned into PCR-TOPO vector, digested with EcoRI and SalI, and subcloned into pEGFP-C1 or pCMV-Tag2A. To generate a vector encoding mRFP-tagged MyoVa tail, a PCR was performed using pRSETb-mRFP as a template and the primers mRFP-NheI (5'-TTTGCTAGCAATGGCCTCCTCCGAGGACG) and mRFP-XhoI (5'-TTTCTCGAGAGGCGCCGGTGGAGTGGCG). The PCR product was purified, digested with NheI and XhoI and inserted into pEGFP-MyoVaLT to replace GFP encoding sequences.

To generate a plasmid encoding mRFP-tagged NPY, pRSET-mRFP was digested using BamHI/EcoRI and subcloned into pCDNA.3.1 (+). The resultant plasmid was cut with BamHI/NotI and the fragment was used to replace the BamHI-NotI fragment in pNPY-GFP to generate an in-frame fusion between NPY and mRFP. The sequence of inserts was confirmed by automated DNA sequencing.

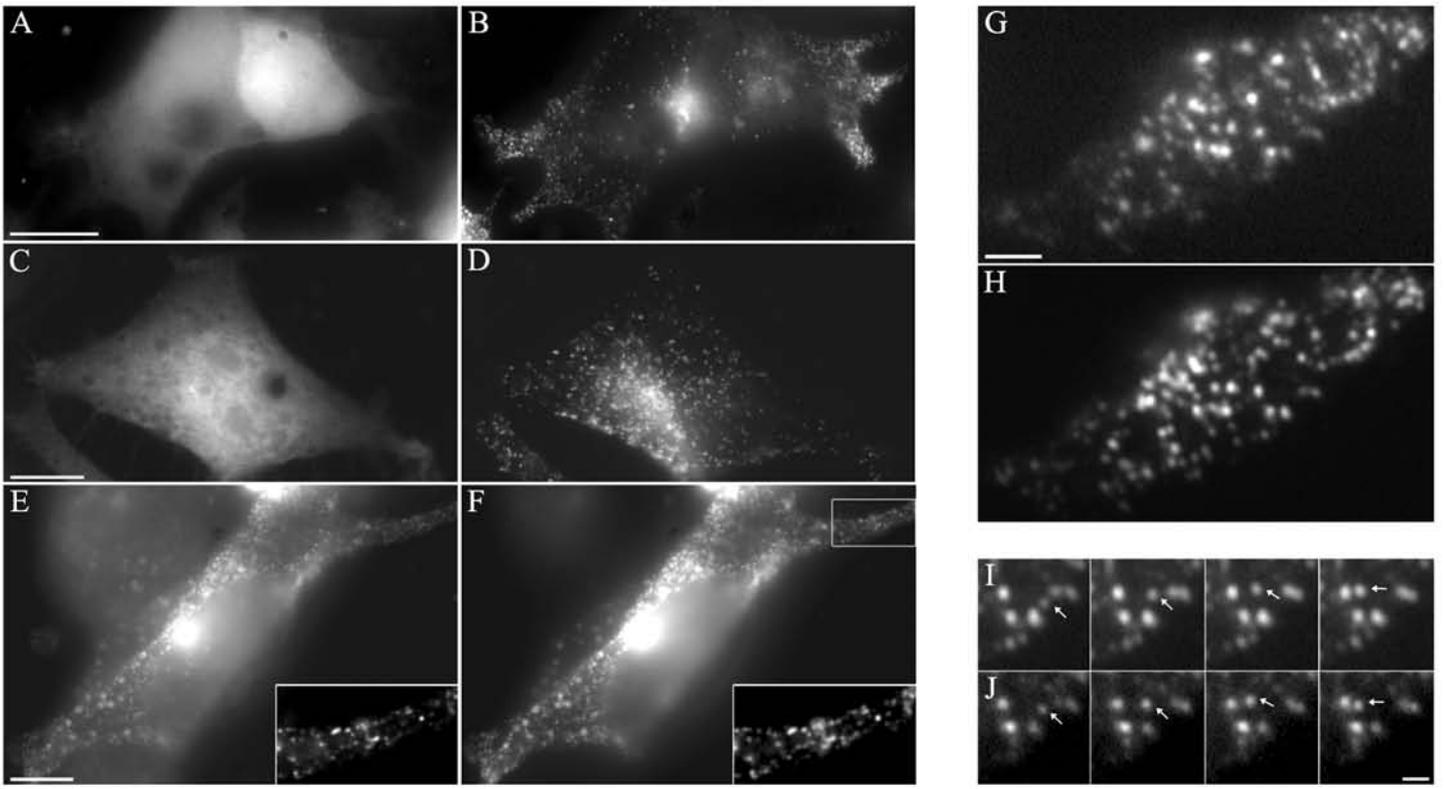


Figure 1

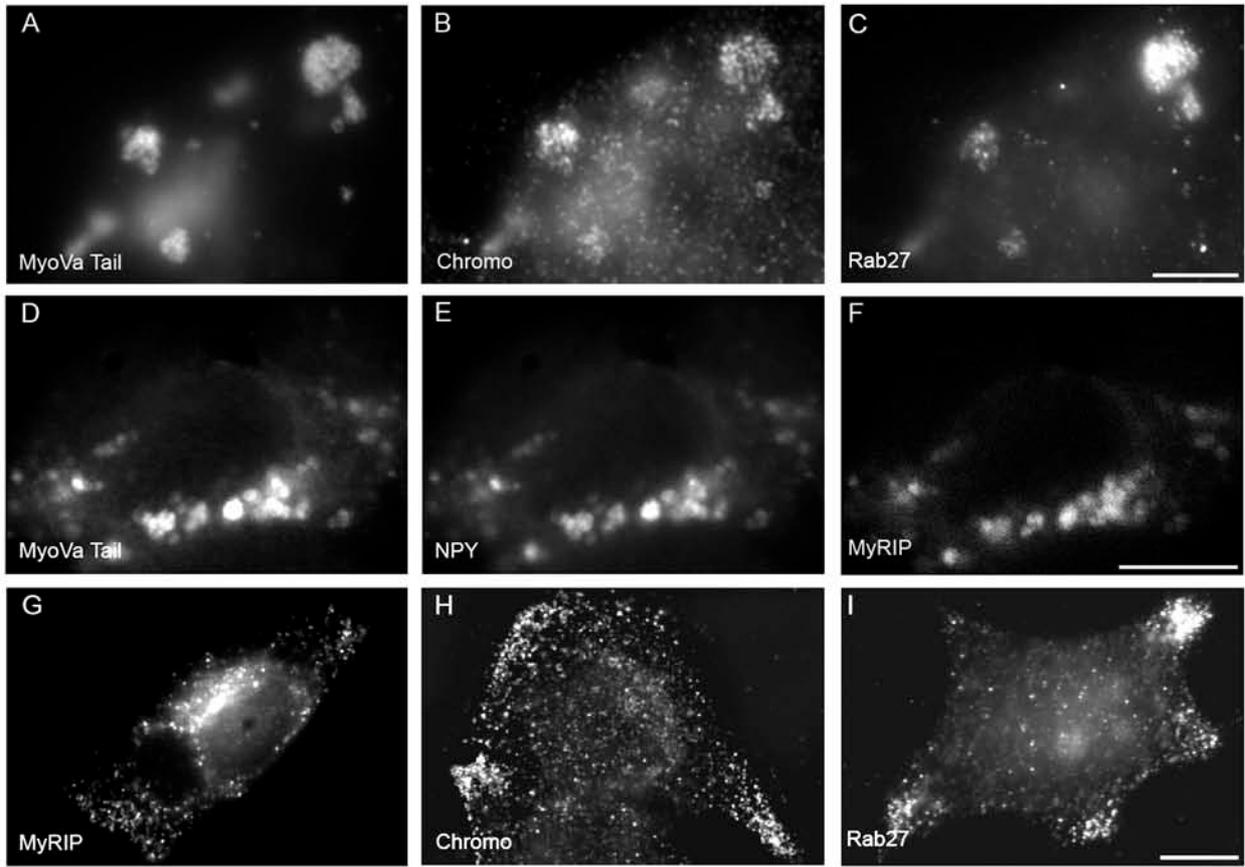


Figure 2

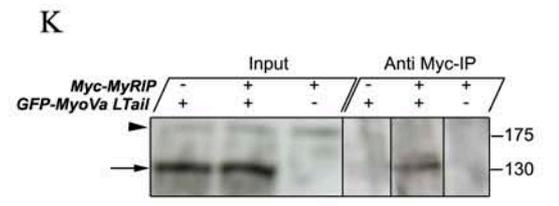
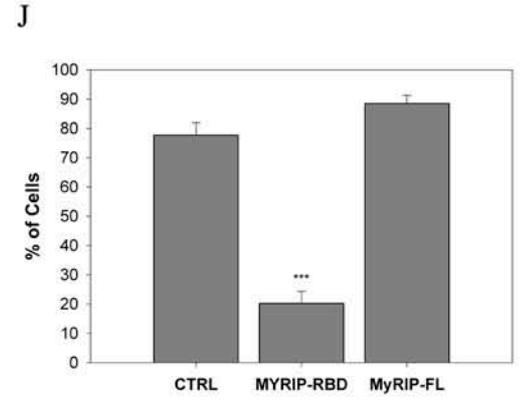
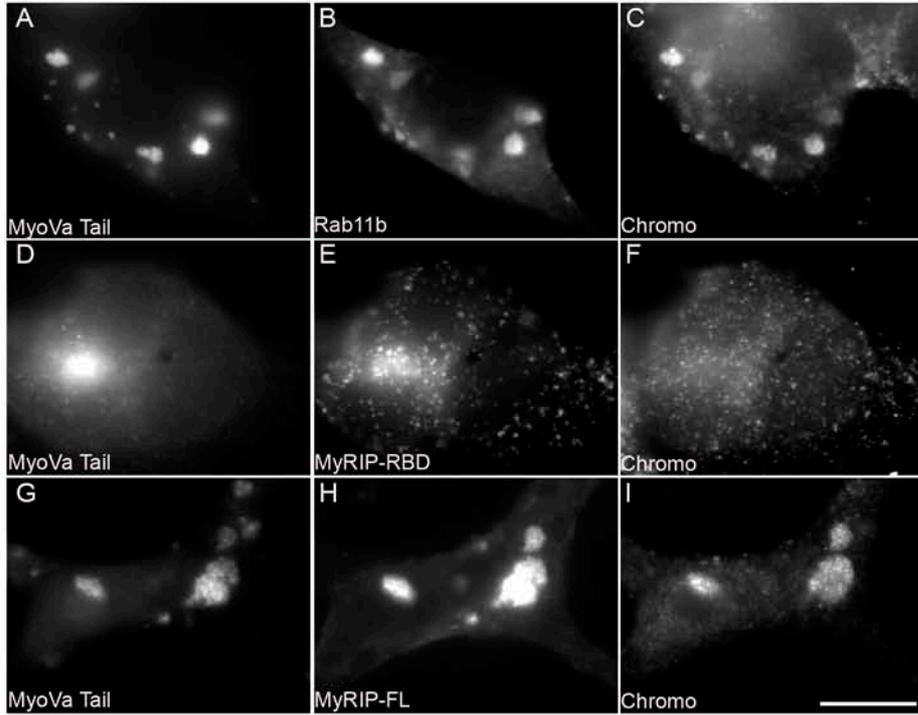


Figure 3

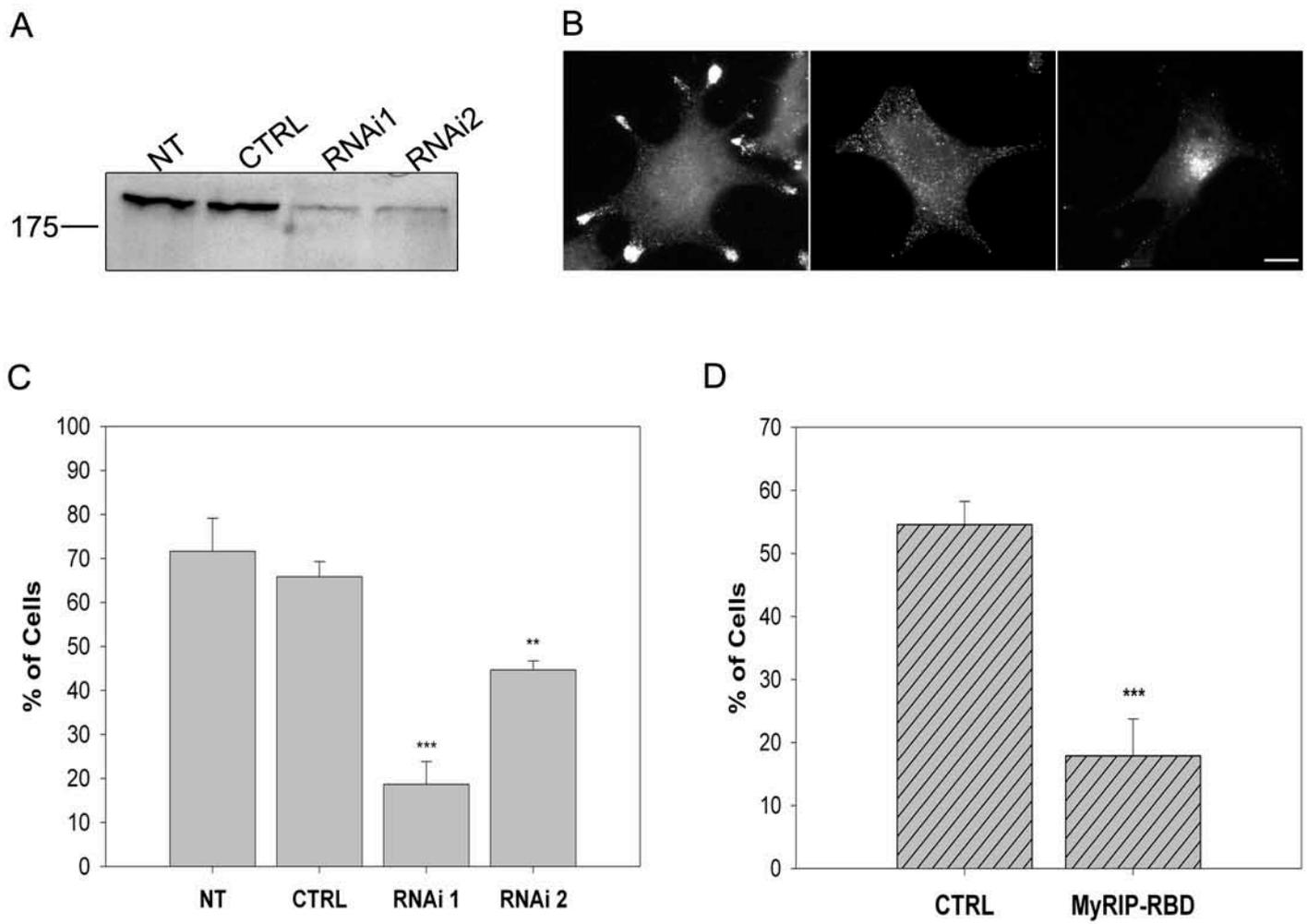


Figure 4

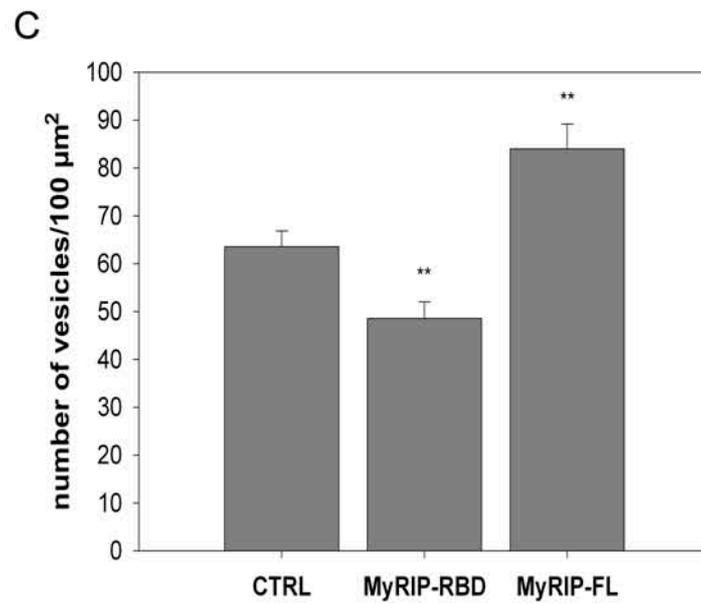
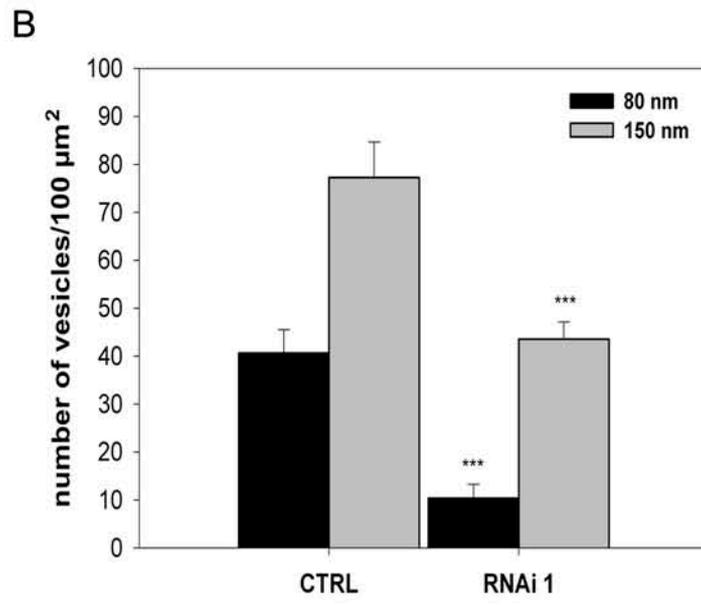
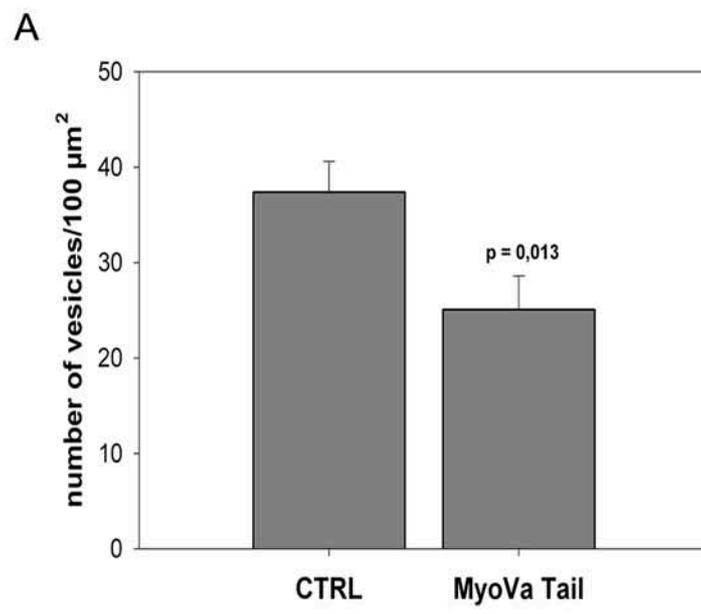


Figure 5

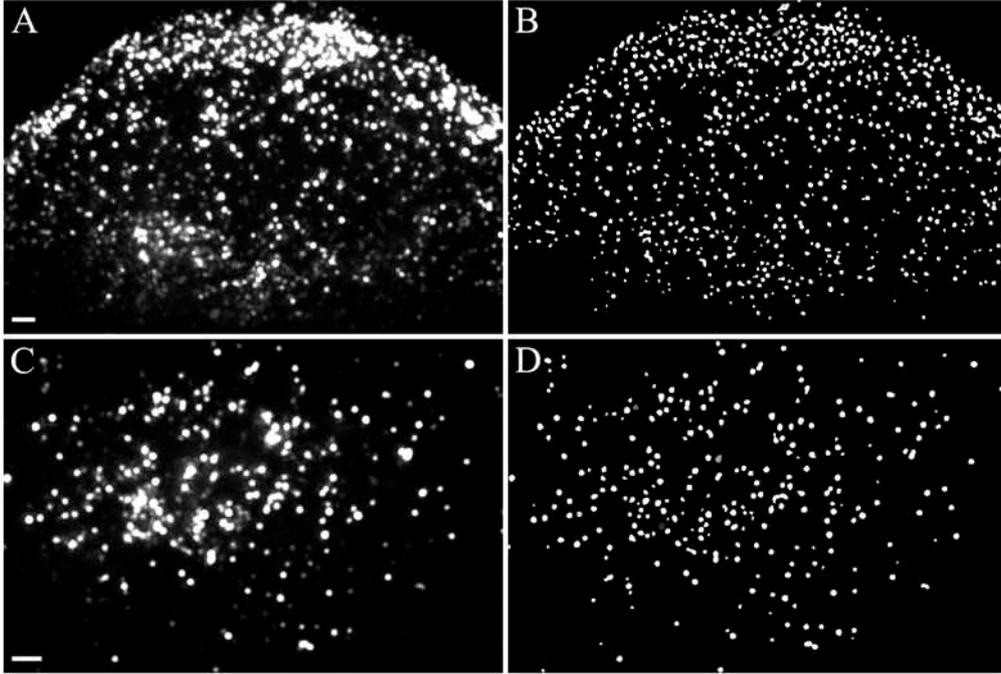
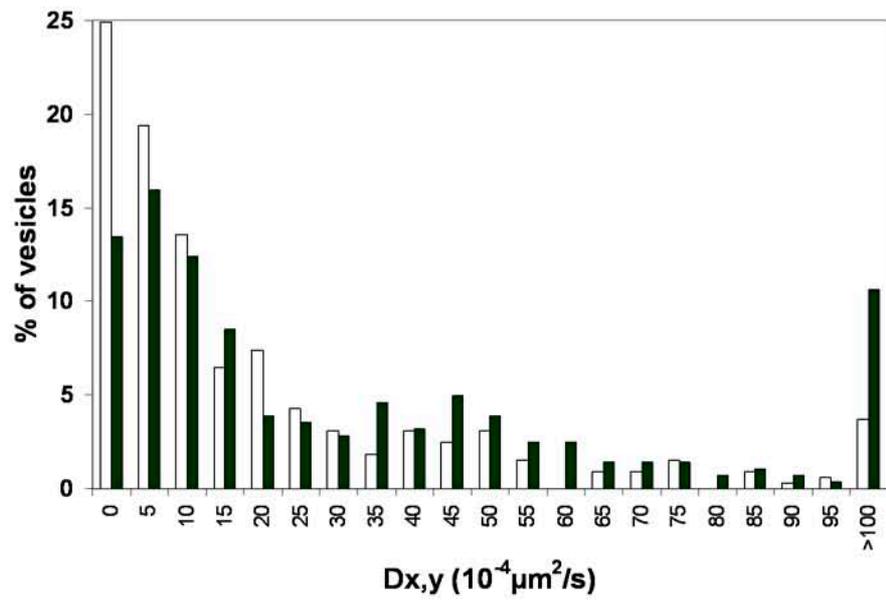


figure 6

A



B

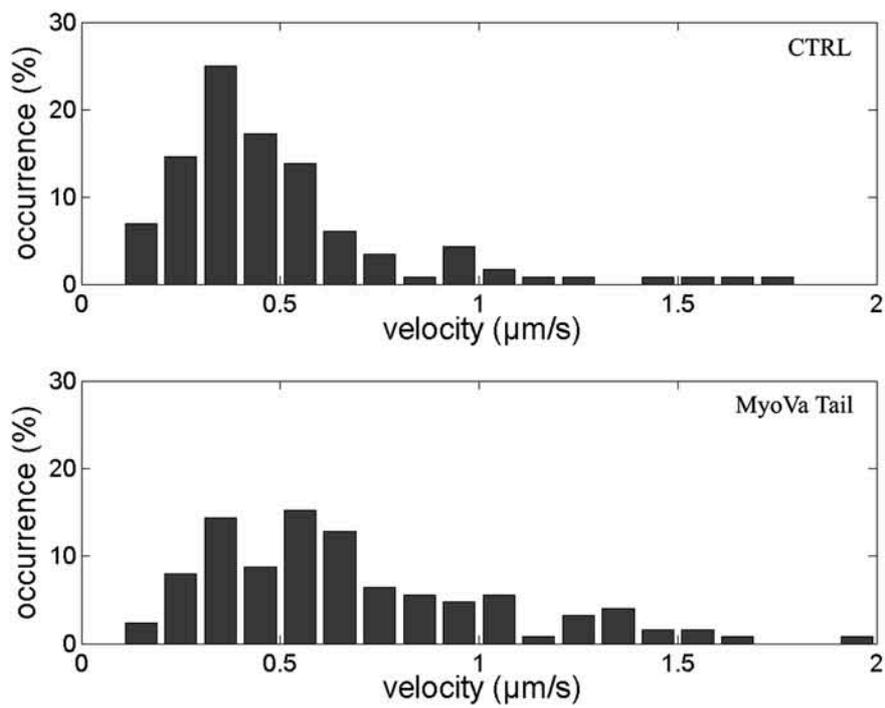


figure 7

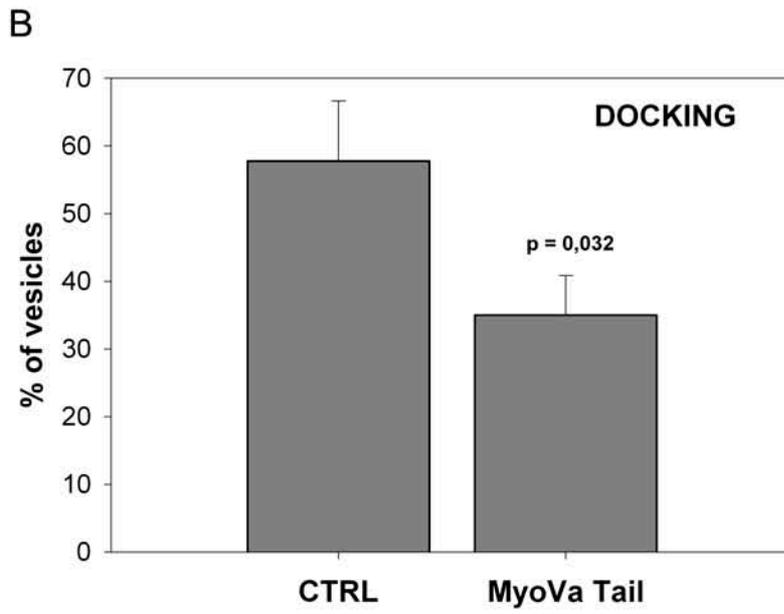
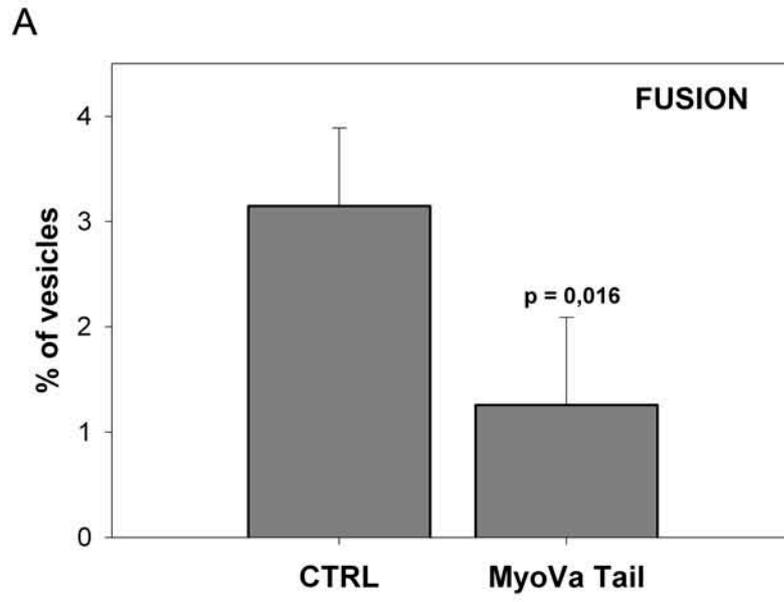


Figure 8

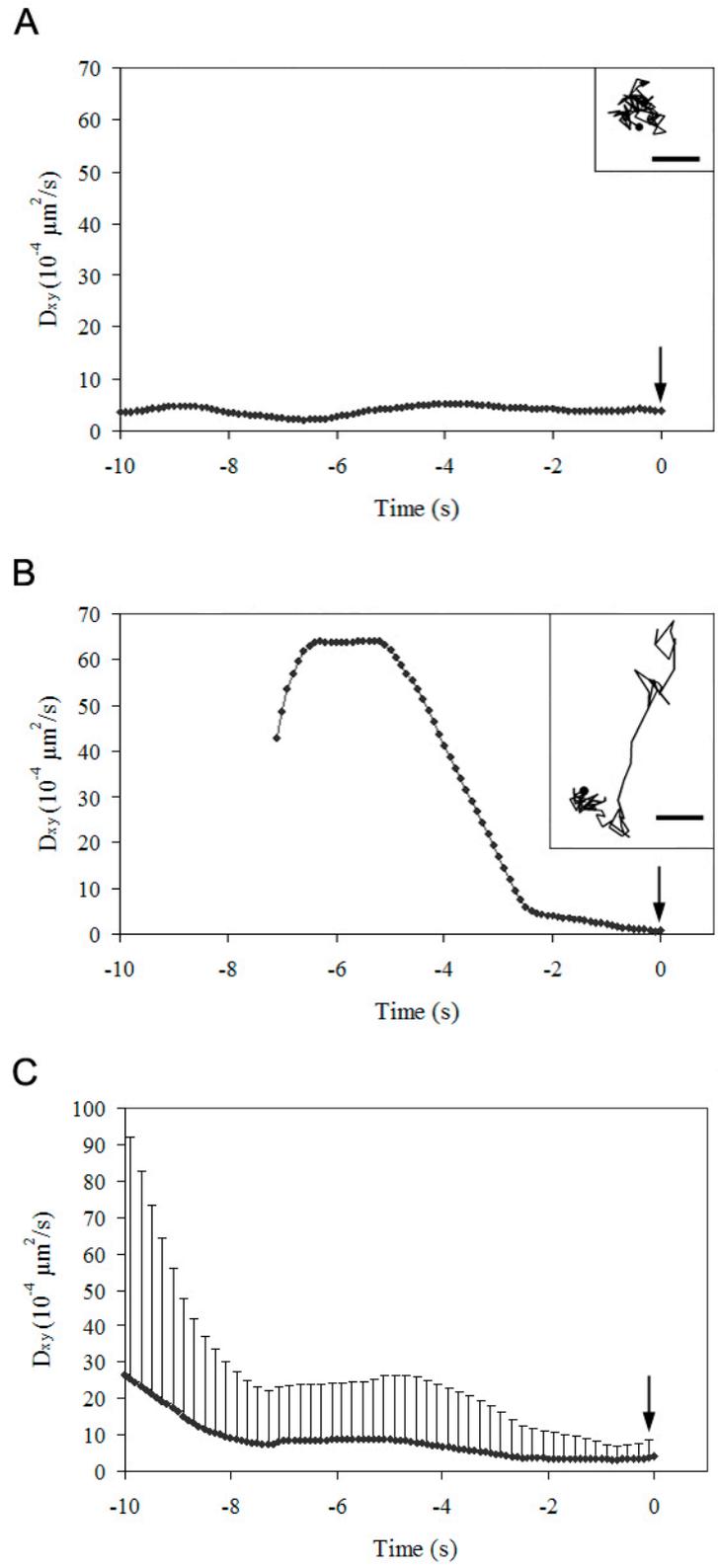


Figure 9

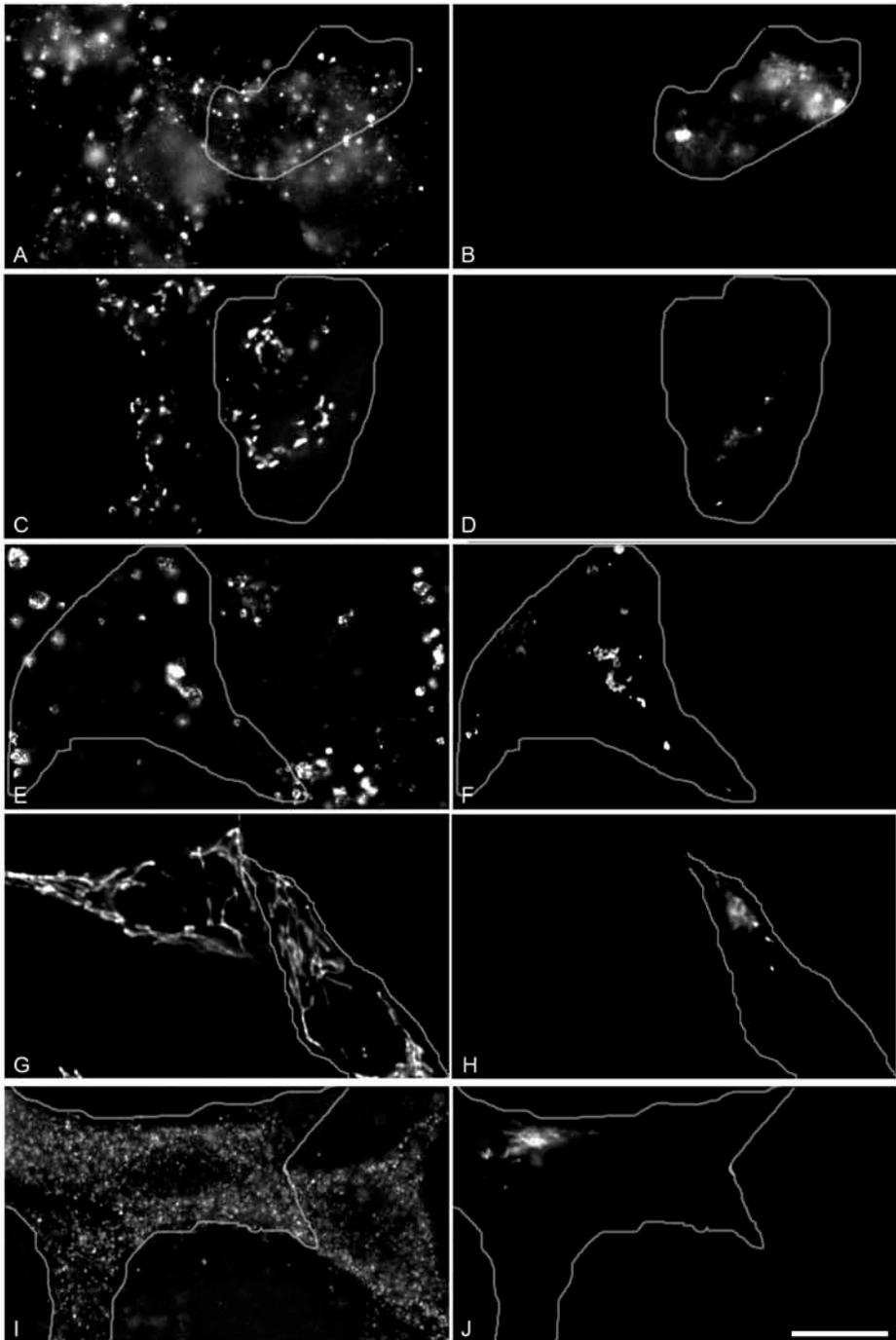


Figure S1

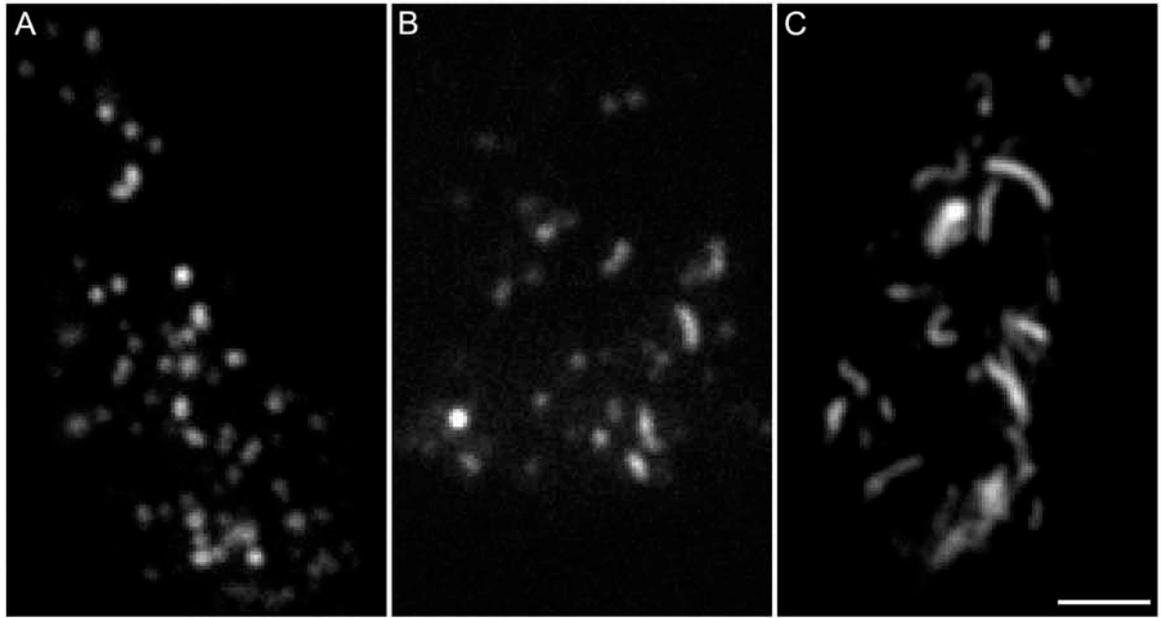


Figure S2

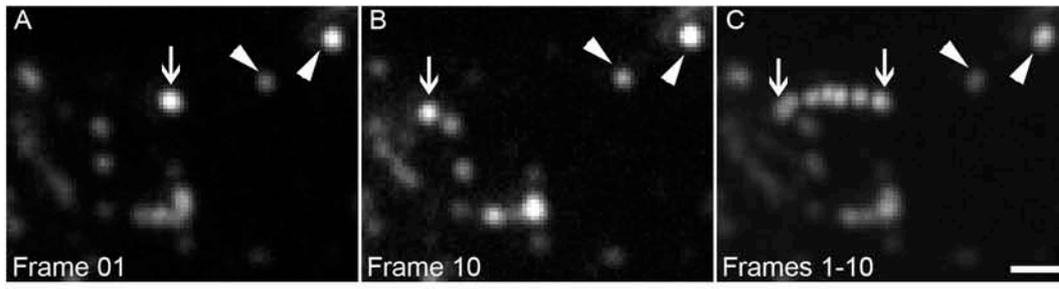


Figure S3

3.5. Discussion

L'application de la microscopie TIRF à l'étude de la dynamique des GS dans la région juxta-membranaire nous a donc permis d'apporter un éclairage nouveau sur les dernières étapes du cycle de sécrétion, depuis l'arrivée de ces organites en périphérie de la cellule le long des microtubules jusqu'à leur fusion avec la membrane plasmique. Les nombreux travaux effectués depuis la mise en évidence, il y a une quarantaine d'années, du rôle central joué par les GS et les VS dans la libération d'hormones et de neurotransmetteurs ont permis la mise en place progressive d'un modèle décrivant la migration de ces organites jusqu'à la membrane plasmique. Au cours de cette discussion, nous nous proposons de remettre en perspective les résultats obtenus durant cette thèse vis-à-vis de ce modèle.

3.5.1. L'arrivée sur les microtubules et la capture en périphérie de la cellule

Le réseau de microtubules joue un rôle essentiel dans le transport des GS sur de longues distances depuis leur site de biogénèse, au niveau du réseau *trans*-golgien, jusqu'à la périphérie de la cellule (Tooze and Burke, 1987 ; Wacker, Kaether et al., 1997 ; Rudolf, Salm et al., 2001 ; Varadi, Tsuboi et al., 2003). Suivant un mécanisme séquentiel calqué sur celui mis en évidence dans le cas des mélanosomes (Wu, Bowers et al., 1998), ces organites se déplaceraient jusqu'au voisinage de la membrane plasmique *via* les microtubules puis seraient piégés dans le cytosquelette d'actine cortical ce qui permettrait leur rétention en périphérie de la cellule.

Les observations que nous avons réalisées par microscopie TIRF mettent en évidence la présence d'un réseau de microtubules relativement dense au voisinage immédiat de la membrane plasmique dans les cellules BON. L'extrémité de ces microtubules pourrait ainsi être directement au contact de cette membrane comme cela a été mis en évidence dans d'autres modèles cellulaires (Krylyshkina, Anderson et al., 2003 ; Etienne-Manneville, Manneville et al., 2005). Nous avons de plus montré par des études en double marquage ou grâce à l'analyse de l'effet de la dépolymérisation du réseau de microtubules sur les mouvements décrits par les GS, que ces organites utilisent ce réseau pour se déplacer sur des distances de plusieurs micromètres en périphérie de la cellule. Les vitesses de transport

associées à ces déplacements ($\sim 0,6 \mu\text{m/s}$) sont compatibles avec celles mesurées pour différents types d'organites se déplaçant le long des microtubules par l'intermédiaire de moteurs moléculaires de la famille des kinésines ou des dynéines (Cordonnier, Dauzonne et al., 2001 ; Gross, Tuma et al., 2002 ; Manneville, Etienne-Manneville et al., 2003 ; Varadi, Tsuboi et al., 2003). Ces résultats suggèrent donc que les GS pourraient utiliser les microtubules pour atteindre directement la membrane plasmique, sans transiter par le cortex d'actine. Un tel mécanisme ne faisant pas intervenir l'actine a notamment été mis en évidence dans le cas des organites spécialisés dans le transport de GLUT4 (*glucose transporter 4*) jusqu'à la membrane plasmique au sein des adipocytes (Lizunov, Matsumoto et al., 2005). Ce modèle est cependant en contradiction avec au moins trois observations. Tout d'abord, les acquisitions en double marquage ainsi que l'étude de l'impact d'un blocage de la dynamique du réseau d'actine sur les mouvements des GS, indiquent qu'une proportion importante de ces GS visibles dans le champ d'évanescence est liée aux filaments d'actine. De plus, l'analyse des trajectoires décrites par les GS montre que les transitions entre une période de mouvement dirigé, correspondant à un déplacement le long des microtubules, et une période d'arrêt ou de déplacement contraint, associée à un accrochage à la membrane plasmique, sont des événements rares en comparaison des autres types de transitions. Enfin, l'inhibition de la fonction de la myosine Va, qui permet de lier les GS à l'actine, se traduit par une diminution importante du nombre de GS présentes en périphérie de la cellule, suggérant que le passage de ces organites dans l'actine est nécessaire à leur rétention en périphérie de la cellule.

En accord avec le modèle classique, le réseau de microtubules permettrait donc plutôt un transport rapide des GS depuis le centre de la cellule jusqu'au niveau du cytosquelette d'actine cortical au sein duquel ces organites seraient ensuite piégés. Il semble cependant que, au moins dans le cas où les cellules sont au repos, les GS puissent utiliser les microtubules pour faire le trajet inverse, c'est-à-dire pour quitter le réseau d'actine et retourner vers la zone périnucléaire. Ainsi, l'analyse des transitions entre les différents types de mouvement décrits par les GS a montré que ces organites passent aussi souvent de l'actine aux microtubules que des microtubules à l'actine. Ce phénomène d'allers et retours entre le centre de la cellule et sa périphérie a également été mis en évidence pour d'autres organites comme les mitochondries au sein des neurones (Morris and Hollenbeck, 1993) ou les mélanosomes dans les mélanophores de xénope (Gross, Tuma et al., 2002 ; Levi, Serpinskaya et al., 2006). Le réseau microtubulaire étant probablement polarisé au sein des cellules BON, avec les extrémités + des microtubules pointant en direction de la membrane plasmique, de tels allers et retours des

GS nécessitent sans doute la présence simultanée à la surface de ces organites de moteurs moléculaires de polarités opposées. L'observation de mouvements dirigés bidirectionnels ou de GS se déplaçant dans des directions opposées le long d'un même rail (Figure 61) est en accord avec cette hypothèse. Le fait que des moteurs de polarités différentes puissent être attachés simultanément à la surface des GS, comme cela a été observé pour plusieurs autres types d'organites (Rogers, Tint et al., 1997 ; Gross, Tuma et al., 2002 ; Ma and Chisholm, 2002), pose alors la question de l'existence d'une coordination entre ces moteurs afin de permettre un transport effectif des GS suivant une direction privilégiée (Welte, 2004).

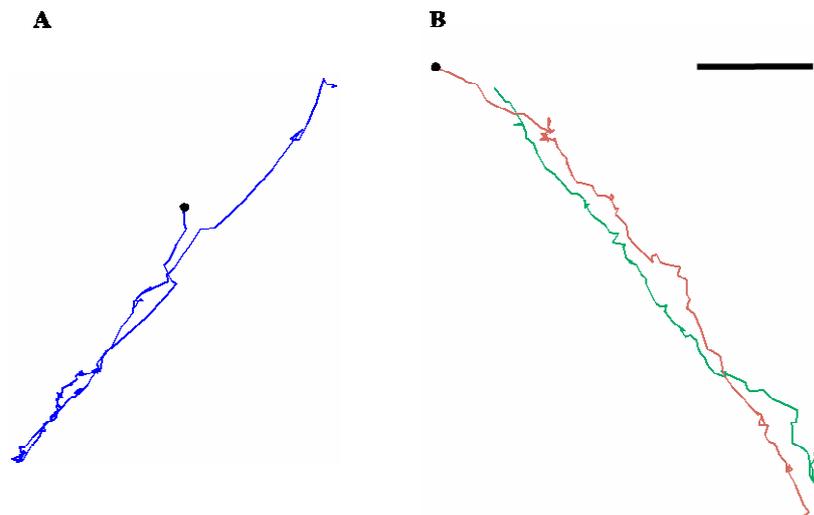


Figure 61 : Les GS peuvent se déplacer dans des directions opposées le long d'un même microtubule. (A) Exemple d'un GS effectuant un aller-retour sur un même microtubule. (B) Exemple de GS se déplaçant dans des directions opposées le long d'un même rail. Ces deux exemples sont issus d'acquisitions réalisées par microscopie TIRF (cadence d'acquisition de 10 Hz, $\delta = 200$ nm) sur des cellules BON exprimant la NPY-GFP. Le début des trajectoires est marqué par un point noir. Barre d'échelle : 500 nm

Les GS semblent pouvoir effectuer des allers et retours entre le centre de la cellule et sa périphérie *via* les microtubules, un processus de capture est sans doute nécessaire pour les retenir dans la région juxta-membranaire. Ce processus de capture a été clairement mis en évidence dans le cas des mélanosomes. Ainsi, les travaux effectués dans le groupe de Hammer ont montré que l'accrochage de ces organites au cytosquelette d'actine cortical par l'intermédiaire du complexe Rab27A/mélanophiline/myosine Va était nécessaire à leur rétention au voisinage de la membrane plasmique (Wu, Rao et al., 2002). L'étude que nous avons effectuée au sujet du rôle de la myosine Va suggère qu'un mécanisme similaire soit responsable de l'accumulation des GS dans la région juxta-membranaire.

Nous avons ainsi tout d'abord mis en évidence que la myosine Va était présente à la surface des GS, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment dans des modèles cellulaires

différents (Rose, Lejen et al., 2003 ; Rudolf, Kogel et al., 2003 ; Varadi, Tsuboi et al., 2005). Le fait que Rab27A et MyRIP se localisent au niveau des GS et que cette dernière protéine interagisse avec la myosine Va nous a amenés à proposer que le complexe Rab27A/MyRIP constitue le récepteur de la myosine Va à la surface de ces organites. Trois observations plaident en faveur de cette hypothèse : (1) MyRIP-RBD (qui n'interagit pas avec la myosine Va) inhibe la formation des agrégats de GS induits par la présence de la MyoVa tail au sein des cellules et semble empêcher cette construction de se localiser à la surface des GS ; (2) l'expression de MyRIP-RBD ou de la MyoVa tail ainsi que l'inhibition de l'expression de la myosine Va par RNAi provoquent une diminution du nombre de GS visibles par microscopie TIRF alors que l'on observe l'effet inverse en cas de surexpression de la protéine MyRIP entière ; (3) l'expression de MyRIP-RBD ou l'inhibition de l'expression de la myosine Va par RNAi empêche l'accumulation des GS dans la région juxta-membranaire, ceux-ci ayant alors tendance à se regrouper au centre de la cellule. L'ensemble de ces résultats suggère donc que le complexe Rab27A/MyRIP/myosine Va, en permettant aux GS de se lier au cytosquelette d'actine cortical, joue un rôle essentiel dans la rétention de ces organites en périphérie de la cellule.

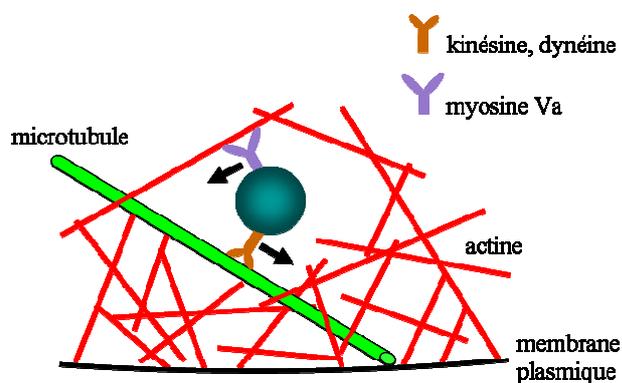


Figure 62 : Compétition entre la myosine Va et les moteurs à l'origine des mouvements le long des microtubules. La myosine Va, en s'accrochant sur les filaments d'actine exerce une force de freinage sur les GS se déplaçant le long des microtubules. Cette force permet aussi de décrocher les GS de ces microtubules.

Tout comme cela a été montré dans le cas d'autres organites (Wu, Bowers et al., 1998 ; Bridgman, 1999 ; Gross, Tuma et al., 2002), nous avons observé que la présence de la MyoVa tail se traduisait par une augmentation de la vitesse des GS se déplaçant le long des microtubules. Ceci suggère que la myosine Va, en s'accrochant aux filaments d'actine, pourrait exercer une force de freinage sur les GS pénétrant au sein du cytosquelette cortical par l'intermédiaire des microtubules (Figure 62). Cette force permettrait également de décrocher ces organites des microtubules afin de les piéger au sein du cortex d'actine. En l'absence d'une myosine Va fonctionnelle, les GS resteraient donc liés aux microtubules et

effectueraient alors des allers et retours rapides entre le centre de la cellule et sa périphérie, comme cela a été observé dans le cas des mélanosomes dans les mélanocytes de souris *dilute* (*i.e.* présentant une myosine Va déficiente, (Wu, Bowers et al., 1998)). Or, l'organisation en astère des microtubules impliquant que ces derniers sont plus denses au centre de la cellule, un tel équilibre des déplacements des GS en direction des extrémités + et – de ces microtubules se traduirait par une distribution globalement périnucléaire de ces organites (Figure 63). Un processus semblable de compétition entre les moteurs responsables des mouvements le long des microtubules et la myosine Va semble être impliqué dans la dispersion des mélanosomes dans les mélanophores de xénope (Gross, Tuma et al., 2002).

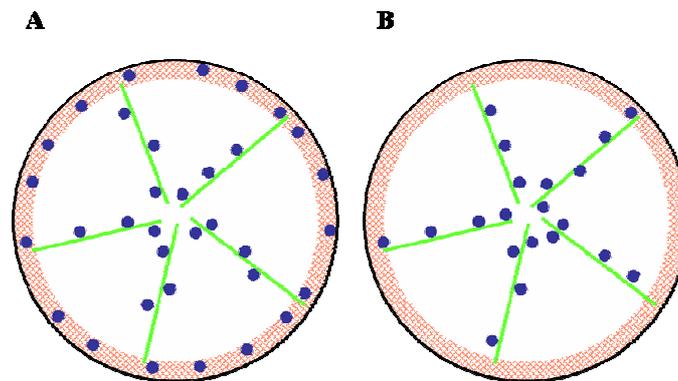


Figure 63 : En l'absence de rétention des GS au sein du réseau d'actine cortical, la répartition de ces organites au sein des cellules est altérée. (A) Dans les cellules témoins, les GS (points bleus) utilisent les microtubules (traits verts) pour se déplacer depuis le centre de la cellule jusqu'à sa périphérie. Ils se lient alors au réseau d'actine cortical (quadrillage rouge) ce qui permet de les retenir à proximité de la membrane. Ce mécanisme induit une accumulation des GS en périphérie de la cellule. (B) Dans les cellules pour lesquelles la myosine Va est déficiente, il n'y a plus de capture des GS au sein du cytosquelette d'actine. Ces organites effectuent des allers et retours le long des microtubules. Du fait de l'organisation en astère du réseau de microtubules, la densité de GS est alors plus importante au centre de la cellule.

Alternativement à cette compétition entre moteurs, le processus de capture des GS au sein du cortex d'actine pourrait impliquer une coordination entre ces différents moteurs, comme cela semble être le cas entre les kinésines et les dynéines lors des déplacements de différents types d'organites le long des microtubules (Welte, 2004). L'activation de la myosine Va en périphérie de la cellule pourrait ainsi se traduire, de manière concomitante, par une inhibition de l'activité des moteurs à l'origine des mouvements des GS le long des microtubules. Ceci favoriserait le décrochement des GS de ces microtubules et leur passage dans l'actine lors de l'arrivée de ces organites à proximité de la membrane. Le mécanisme à l'origine d'une telle coordination reste cependant à définir. Chez la souris, la myosine Va semble pouvoir interagir directement avec la kinésine conventionnelle (Huang, Brady et al., 1999). Cette interaction pourrait permettre une coordination entre ces deux moteurs.

3.5.2. Le rôle du cortex d'actine

Les cellules neuroendocrines possèdent un réseau d'actine cortical particulièrement dense (Nakata and Hirokawa, 1992) souvent considéré comme une barrière bloquant l'accès des GS à la membrane plasmique (Trifaro, Rose et al., 2000). Ce modèle se fonde principalement sur deux observations. Tout d'abord, la stimulation des cellules induit une dépolymérisation du cortex d'actine, permettant ainsi aux GS d'accéder à la membrane plasmique et de fusionner avec elle (Nakata and Hirokawa, 1992 ; Vitale, Seward et al., 1995 ; Giner, Neco et al., 2005). De plus, les observations réalisées en microscopie TIRF montrent que les mouvements des GS dans la région juxta-membranaire sont extrêmement restreints (Steyer and Almers, 1999 ; Oheim and Stuhmer, 2000). Une telle restriction des déplacements des GS a été interprétée comme étant le reflet du piégeage de ces organites au sein du réseau d'actine. Plusieurs études suggèrent cependant que le rôle du cytosquelette d'actine est plus complexe que celui de simple barrière passive. Ainsi, ce réseau pourrait être impliqué dans la dispersion des GS en périphérie de la cellule (Rudolf, Kogel et al., 2003). De plus, les filaments d'actine pourraient servir de rails pour un transport actif des GS (Lang, Wacker et al., 2000).

Les observations que nous avons effectuées par microscopie TIRF sur des cellules BON confirment la présence d'un réseau dense d'actine au voisinage de la membrane plasmique. Ce cortex d'actine est composé non seulement de fibres de stress, connues pour être impliquées dans l'adhérence des cellules (Nobes and Hall, 1995) et dont la structure évolue peu pendant la durée des acquisitions, mais également d'un réseau dense de filaments enchevêtrés se remodelant continuellement. Un tel remodelage du cortex d'actine a également été observé dans le cas des cellules chromaffines d'origine bovine (Giner, Neco et al., 2005) ou des PC-12 (Lang, Wacker et al., 2000).

Les études en double marquage que nous avons réalisées suggèrent que les GS présents au sein du cytosquelette d'actine cortical soient généralement fixés aux filaments d'actine. Ces organites, qui suivent alors les mouvements décrits par le réseau d'actine, possèdent une dynamique de type diffusif. L'analyse des effets des drogues du cytosquelette d'actine est en accord avec ce modèle. Ainsi, l'inhibition de la dynamique du réseau d'actine par un traitement des cellules à la jasplakinolide se traduit par un blocage des mouvements diffusifs. De plus, bien que cet effet soit relativement modeste, la dépolymérisation du cytosquelette cortical par la latrunculine B affecte spécifiquement la catégorie diffuse (voir plus loin pour une discussion plus approfondie au sujet de cette observation). En revanche, une telle

dépolymérisation n'a pas d'impact significatif sur la catégorie regroupant les périodes d'arrêt et de déplacements contraints. Cette catégorie de mouvement avait pourtant souvent été considérée lors de travaux précédents comme correspondant aux GS emprisonnés au sein du cortex d'actine (Steyer and Almers, 1999 ; Oheim and Stuhmer, 2000 ; Manneville, Etienne-Manneville et al., 2003). Il apparaît donc que le rôle du cortex d'actine ne se résume pas à celui d'un simple piège à GS permettant de bloquer l'accès de ces organites à la membrane plasmique. Ainsi, les mouvements décrits par les filaments d'actine pourraient permettre aux GS fixés sur ces filaments de se disperser dans la zone corticale. Ce processus de dispersion permettrait alors de transporter les GS jusqu'à des zones non "desservies" directement par les microtubules. Le fait que certaines régions du réseau d'actine présentent des déplacements suivant des directions privilégiées suggère de plus que ce réseau puisse être impliqué dans le transport des GS jusqu'à certaines zones particulières de la périphérie de la cellule.

Ces observations posent cependant la question de l'origine de la dynamique du cytosquelette d'actine dans ces cellules. En effet, si une telle dynamique a été étudiée en détail dans le cas des cellules en migration (Small, Stradal et al., 2002), peu de travaux ont en revanche porté sur les mouvements décrits par le réseau d'actine dans des cellules non motiles. Il semble toutefois que ces mouvements correspondent à un processus actif de remodelage du cytosquelette cortical. En effet, il a été montré que l'inhibition de l'activité de la myosine II, un moteur moléculaire impliqué notamment dans la contractilité des fibres de stress (Alberts, Johnson et al., 2002), se traduit par un blocage de la dynamique du réseau d'actine cortical et de celle des GS (Neco, Giner et al., 2004 ; Giner, Neco et al., 2005). De plus, en l'absence d'ATP, les mouvements des GS présents au sein du cortex d'actine sont fortement inhibés (Lang, Wacker et al., 2000).

Les travaux que nous avons effectués sur le complexe Rab27A/MyRIP suggèrent que l'accrochage des GS au cytosquelette d'actine passe par ce complexe. Nous avons ainsi proposé que ces organites se lient aux filaments d'actine par l'intermédiaire du domaine C-terminal de la protéine MyRIP. En effet, la mobilité des GS dans la région juxta-membranaire est augmentée dans les cellules exprimant la construction MyRIP- Δ Cter, par rapport aux cellules témoins. A l'opposé, la surexpression de la protéine MyRIP entière ou d'un mutant de Rab27A constitutivement actif se traduit par une inhibition des mouvements décrits par les GS. Ces travaux indiquent également que si la myosine Va, liée aux GS *via* le complexe Rab27A/MyRIP, participe probablement à la capture des GS au sein du réseau d'actine au moment où ceux-ci arrivent en périphérie de la cellule par l'intermédiaire des microtubules,

cette protéine ne semble pas, en revanche, jouer un rôle majeur dans le contrôle de la mobilité de ces organites une fois que ceux-ci sont passés dans le cytosquelette d'actine. Trois observations plaident en faveur de ce modèle : (1) la mobilité des GS dans des cellules exprimant la construction MyRIP-RBD (qui ne peut interagir ni avec la myosine Va, ni avec l'actine) est identique à celle obtenue dans des cellules exprimant MyRIP- Δ Cter (qui peut interagir avec la myosine Va) ; (2) la présence de la MyoVa tail ne semble pas modifier la mobilité des GS présentant des coefficients de diffusion intermédiaires ($10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s} < D_{xy} < 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$), c'est-à-dire ceux interagissant probablement avec l'actine ; (3) d'après les observations en double marquage, peu de GS paraissent se déplacer le long des filaments d'actine.

Le modèle proposé ici soulève deux questions importantes. Tout d'abord, il serait intéressant de déterminer la raison pour laquelle la capture des GS au sein du cortex d'actine fait intervenir la myosine Va alors que ces organites disposent déjà d'un moyen de se fixer sur les filaments d'actine par l'intermédiaire du domaine C-terminal de MyRIP. De plus, il reste à déterminer s'il existe un mécanisme permettant de réguler ces deux modes de liaison des GS à l'actine, en empêchant notamment qu'ils soient activés simultanément.

Un des résultats relativement surprenant issu de l'analyse des mouvements décrits par les GS au voisinage de la membrane plasmique est l'effet relativement modeste de la dépolymérisation du cytosquelette d'actine par la latrunculine sur ces mouvements, à la fois dans le cas des cellules BON et des cellules PC-12. Les autres équipes ayant analysé l'impact de cette drogue sur la dynamique des GS ont rapporté des résultats contradictoires. Ainsi, certains auteurs font état d'une augmentation plus ou moins importante de la mobilité de ces organites (Johns, Levitan et al., 2001 ; Manneville, Etienne-Manneville et al., 2003) tandis que d'autres décrivent l'effet inverse (Lang, Wacker et al., 2000 ; Oheim and Stuhmer, 2000). Ces résultats mettent cependant tous en évidence que même en l'absence d'un réseau dense de filaments d'actine, les mouvements des GS en périphérie de la cellule restent très restreints. Ainsi, après dépolymérisation du cytosquelette d'actine par la latrunculine, le coefficient de diffusion moyen de ces organites n'excède jamais $5 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$. A titre de comparaison, le coefficient de diffusion théorique d'une bille de même diamètre que les GS plongée dans l'eau est égal à environ $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Une première interprétation possible de cet effet relativement modeste du traitement des cellules par la latrunculine pourrait être que cette drogue ne permet pas une dépolymérisation complète du réseau d'actine cortical. La densité des filaments ayant "résistés" à ce traitement

seraient alors suffisante pour restreindre efficacement les mouvements des GS. Deux arguments sont en faveur d'une telle interprétation. Tout d'abord, Bittner et ses collaborateurs ont récemment montré qu'un traitement des cellules par la latrunculine n'induisait pas une dépolymérisation massive du réseau cortical d'actine dans les cellules chromaffines d'origine bovine mais se traduisait plutôt par une réorganisation importante de ce réseau (Bittner and Holz, 2005). De plus, nous avons observé que le traitement des cellules par de faibles concentrations de latrunculine pendant plusieurs heures (1 μ M, 7 heures) semblait induire une augmentation de mobilité des GS plus importante que celle obtenue dans le cas des traitements courts (25 μ M, 5 min), dont l'impact a été analysé en détails dans la partie 3.2.4.3. intitulée "Analyse de l'effet de la latrunculine B". Cette interprétation est cependant difficilement réconciliable avec la disparition quasi totale du réseau d'actine cortical marqué par la rhodamine-phalloïdine et observé par microscopie TIRF, en cas de traitement court par la latrunculine (25 μ M, 5 min, voir Figure 36).

Alternativement, une seconde interprétation de ces résultats pourrait être qu'en l'absence de cytosquelette d'actine cortical, d'autres éléments tels que, par exemple, les filaments intermédiaires, pourraient participer à la restriction des mouvements des GS dans la région juxta-membranaire. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que le cytoplasme des cellules est nettement plus visqueux qu'un réseau d'actine purifié obtenu *in-vitro* (Yamada, Wirtz et al., 2000).

L'impact relativement faible de la dépolymérisation du cytosquelette d'actine sur les mouvements des GS observés par microscopie TIRF est à mettre en parallèle avec l'absence de modification notable de la distribution des coefficients de diffusion moyens de ces organites en cas de stimulation des cellules BON. L'élévation de la concentration de calcium intracellulaire étant connue pour induire une dépolymérisation importante du cortex d'actine (Nakata and Hirokawa, 1992 ; Vitale, Seward et al., 1995), cette observation renforce l'idée selon laquelle ce cortex n'est pas le seul élément à l'origine de la restriction des mouvements des GS en périphérie des cellules.

3.5.3. L'accrochage à la membrane

L'accrochage des GS à la membrane plasmique constitue la dernière étape du processus complexe de migration de ces organites depuis leur site de biogénèse, au niveau du réseau *trans*-golgien, jusqu'à cette membrane. Certains arguments suggèrent que cet accrochage

pourrait se décomposer en deux sous-étapes successives : l'accostage, qui correspond à l'établissement d'un premier lien entre le GS et la membrane plasmique, puis l'arrimage, qui se caractérise principalement par l'assemblage du complexe SNARE (Jahn, Lang et al., 2003 ; Ungermann and Langosch, 2005). La phase d'accostage demeure à l'heure actuelle très mal connue. En particulier, les protéines impliquées lors de cette phase n'ont toujours pas été clairement identifiées.

Comme cela a été observé dans d'autres modèles cellulaires (Steyer, Horstmann et al., 1997 ; Oheim and Stuhmer, 2000 ; Ohara-Imaizumi, Nakamichi et al., 2002), nous avons montré grâce à l'analyse des trajectoires des GS fusionnant avec la membrane plasmique dans les cellules BON, que l'accrochage de ces organites à cette membrane se traduit par une restriction importante de leurs mouvements. Ainsi, les GS interagissant avec la membrane cellulaire semblent présenter essentiellement des mouvements très limités (GS arrêtés ou piégés dans une cage). Ces observations sont confirmées par celles réalisées sur les cellules décalottées. L'évaluation de la taille des cages au sein desquelles sont piégées les GS suggère que ces organites seraient fixés à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un lien dont la longueur serait de quelques dizaines de nanomètres.

Deux observations semblent indiquer de plus qu'il pourrait exister deux états d'accrochage des GS à la membrane plasmique correspondant peut-être aux phases d'accostage ("tethering") et d'arrimage ("docking") : (1) les caractéristiques des mouvements restreints (périodes d'arrêt et de mouvement contraint) décrits par les GS résidants (GS se maintenant à proximité immédiate de la membrane plasmique, et donc sans doute liés à cette membrane, jusqu'à l'exocytose) dans les cellules stimulées sont différentes de celles obtenues dans le cas des cellules au repos ; (2) les observations réalisées par Samuel Tran au cours de sa thèse indiquent que certains GS situés à une distance de la membrane d'environ 20-40 nm se rapprochent brutalement de cette membrane environ deux secondes avant l'exocytose. Cette interprétation suppose toutefois que la liaison établie entre les GS et la membrane plasmique lors de l'accostage soit relativement stable. Les travaux analysant l'effet des neurotoxines clostridiales, qui clivent certaines protéines SNARE, sur les mouvements décrits par les GS en périphérie de la cellule plaident en faveur d'une telle stabilité de la liaison mise en place entre les GS et la membrane plasmique lors de l'accostage. En effet, ces travaux indiquent que, même en cas de blocage de la formation du complexe SNARE par les toxines tétanique ou botulique, les GS parviennent à s'immobiliser au niveau de la membrane plasmique (Johns,

Levitan et al., 2001), suggérant que le complexe SNARE n'est pas l'unique acteur à l'origine d'une telle immobilisation.

S'il semble que la myosine Va ne joue pas un rôle majeur dans le contrôle de la mobilité des GS interagissant avec le cytosquelette d'actine, nous avons en revanche montré qu'elle était impliquée dans l'accrochage de ces organites à la membrane plasmique. Deux observations sont en effet en faveur de l'implication de la myosine Va dans cette étape du cycle de sécrétion. Tout d'abord, l'effet de l'inhibition de l'expression de ce moteur moléculaire par RNAi sur la densité de GS observables dans le champ d'évanescence est inversement corrélé à la distance séparant ces organites de la membrane plasmique. De plus, l'évaluation des coefficients de diffusion moyens des GS suggère que la MyoVa tail induise une diminution de la proportion de GS liés à la membrane plasmique parmi ceux visibles en microscopie TIRF. La myosine Va pourrait alors participer au recrutement des GS à la membrane plasmique *via* deux mécanismes différents. D'une part, cette protéine pourrait jouer un rôle de facteur d'accostage. En effet, il a été montré récemment que la myosine Va interagissait avec la syntaxine 1, une des protéines du complexe SNARE localisée à la membrane plasmique, par l'intermédiaire de l'un de ses domaines IQ (Watanabe, Nomura et al., 2005). D'autre part, bien que la myosine Va ne semble pas contrôler de façon majeure la mobilité des GS présents au sein du cortex d'actine, nous ne pouvons pas exclure que cette protéine participe à un transport actif des GS sur de courtes distances en direction de la membrane plasmique. En effet, il suffirait que la myosine Va induise un déplacement des GS sur des distances correspondant à l'épaisseur du cortex d'actine (*i.e.* 200-400 nm, (Nakata and Hirokawa, 1992 ; Lang, Wacker et al., 2000)) pour permettre à ces organites de traverser ce cortex et d'atteindre la membrane plasmique. Or, la méthode globale de caractérisation des mouvements des GS utilisée lors de l'étude du rôle du complexe Rab27A/MyRIP/myosine Va (calcul du coefficient de diffusion moyen sur les trajectoires entières) ne permettait sans doute pas de mettre en évidence de tels mouvements courts (voisins d'un diamètre de GS). La myosine Va se déplaçant en direction de l'extrémité barbée des filaments d'actine, ce modèle suppose une organisation asymétrique du cytosquelette cortical dans laquelle ces extrémités barbées pointent en direction de la membrane plasmique. Ce type d'organisation a été mis en évidence au niveau du lamellipode des cellules en migration (Pantaloni, Le Clainche et al., 2001).

3.5.4. L'exocytose des granules de sécrétion

Les études par électrophysiologie montrent que la sécrétion d'hormones par les cellules neuroendocrines se déroule suivant une cinétique complexe (Gillis and Chow, 1997). Une première phase caractérisée par un nombre très élevé d'événements d'exocytose par unité de temps et dont la durée est d'environ une seconde (*exocytotic burst*) a ainsi été mise en évidence en cas de stimulation des cellules par photolibération de calcium. Les GS fusionnant avec la membrane plasmique au cours de cette phase sont généralement considérés comme pré-positionnés au niveau de cette membrane. A la suite de cette phase rapide, on observe une phase plus longue (plusieurs minutes) durant laquelle le taux d'exocytose est nettement plus faible (*sustained phase*). En termes de sécrétion cumulée, le nombre d'événements de fusion observés au cours de cette seconde phase est plusieurs fois supérieur à celui caractérisant la première phase. Certains auteurs ont suggéré que les événements d'exocytose observés durant cette seconde phase correspondaient à des GS initialement piégés au sein du réseau cortical d'actine (Vitale, Seward et al., 1995 ; Gil, Rueda et al., 2000). La dépolymérisation de ce cortex d'actine induite par l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire permettrait en effet à ces GS d'atteindre la membrane plasmique et de fusionner avec elle. D'autres études suggèrent cependant que tous les GS accrochés à la membrane plasmique dans les cellules au repos ne fusionnent pas immédiatement avec cette membrane en cas de stimulation (Parsons, Coorssen et al., 1995). Ainsi, certains des GS pré-positionnés au niveau de la membrane plasmique pourraient participer à la phase lente de libération d'hormones. Cette population de GS pourrait correspondre à des organites n'ayant pas subi toutes les étapes de préparation permettant de les rendre compétentes pour la fusion.

La résolution temporelle de la microscopie TIRF (~100 ms) est relativement faible en comparaison de celle obtenue grâce à des techniques d'électrophysiologie (~1 ms). Par conséquent, cette méthode d'imagerie est mal adaptée à l'étude de la phase rapide de la cinétique de libération d'hormones. En revanche, cette méthode permet d'étudier notamment la localisation spatiale des GS fusionnant avec la membrane plasmique au cours de la phase lente.

Grâce à l'analyse des mouvements des GS en périphérie de la cellule, nous avons montré que, pour des profondeurs de pénétration de l'onde évanescente comprises entre 150 et 200 nm, environ la moitié des GS visibles par microscopie TIRF sont au contact de la membrane plasmique dans des cellules BON au repos. Ce résultat est confirmé par la comparaison des

densités de GS entre cellules entières et décalottées. Ces observations mettent donc en évidence qu'un nombre important de GS serait lié à la membrane plasmique en conditions repos. De plus, nous avons montré que la majorité des événements d'exocytose (~75 %) observés au cours d'une séquence de stimulation d'environ 1 min correspondait à des GS sans doute pré-positionnés au niveau de la membrane plasmique. Ces GS dits résidants peuvent fusionner plusieurs dizaines de secondes après l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire induite par la stimulation des cellules.

Ces observations indiquent donc que, pour des durées de stimulation d'environ une minute, la contribution à la libération d'hormones de GS initialement piégés au sein du réseau d'actine est relativement faible. Elles montrent également qu'une telle stimulation n'induit pas une fusion rapide de l'ensemble des GS liés à la membrane plasmique. Il reste cependant à déterminer la raison de ce délai important entre l'accrochage à la membrane et l'exocytose. Un tel délai pourrait être la conséquence d'un processus de maturation destiné à rendre les GS compétents pour la fusion (Klenchin and Martin, 2000).

3.6. Conclusion

Grâce à la microscopie TIRF, il nous a été possible d'étudier précisément la dynamique des GS au voisinage de la membrane plasmique, une région de la cellule présentant une architecture particulièrement complexe, et de mettre en évidence certains des acteurs protéiques jouant un rôle dans cette dynamique.

En combinant des observations en double marquage à la caractérisation des trajectoires décrites par les GS à l'aide de la méthode d'analyse décrite au cours de la première partie de ce manuscrit de thèse, nous avons ainsi tout d'abord pu associer une dynamique granulaire particulière à un environnement spécifique. Cette étude nous a alors permis de préciser le déroulement du processus complexe de migration des GS depuis leur site de biogénèse, au niveau du réseau *trans*-golgien, jusqu'à la membrane plasmique. Les observations réalisées nous ont notamment conduits à proposer que le cytosquelette d'actine cortical jouait un rôle plus complexe que celui d'une barrière bloquant l'accès des GS à la membrane plasmique. La dynamique caractérisant ce cortex permettrait notamment aux GS liés aux filaments d'actine d'être dispersés en périphérie de la cellule. L'analyse des transitions entre les différents types de mouvements décrits par les GS a quant à elle montré que, malgré la présence d'un réseau de microtubules relativement dense au voisinage immédiat de la membrane plasmique, les GS

n'empruntaient pas ce réseau pour atteindre directement la membrane plasmique mais transitaient par le cortex d'actine.

Les travaux effectués par microscopie TIRF ont de plus mis en évidence le rôle essentiel joué par le complexe Rab27A/MyRIP/myosine Va lors des étapes finales du processus de sécrétion régulée. La myosine Va serait ainsi impliquée dans la capture des GS au sein du cytosquelette d'actine, peut-être en permettant de décrocher ces organites des microtubules. Les GS se lieraient ensuite aux filaments d'actine par l'intermédiaire du domaine C-terminal de MyRIP. Cette liaison permettrait notamment de contrôler l'accès de ces organites à la membrane plasmique. Il semble enfin que la myosine Va joue de nouveau un rôle au moment de l'accrochage des GS à la membrane plasmique.

L'ensemble des résultats obtenus a donc permis de mieux comprendre les interactions développées par les GS avec leur environnement, et en particulier avec le réseau d'actine, dans cette zone particulièrement complexe qu'est la région juxta-membranaire.

4. Conclusion et perspectives

L'objectif initial de cette thèse était d'appliquer la microscopie TIRF à l'étude des étapes du processus de sécrétion stimulée se déroulant à proximité de la membrane plasmique. Je me suis ainsi particulièrement intéressé à la caractérisation de la dynamique des GS en périphérie de la cellule afin de mieux comprendre comment ces organites, qui se forment au niveau du réseau *trans*-golgien, parviennent à migrer jusqu'à la membrane plasmique. Cette approche a permis une analyse directe du déroulement et de la dynamique des dernières étapes de ce processus de migration des GS. En parallèle à cette étude exhaustive des mouvements décrits par les GS dans la région juxta-membranaire, j'ai mis à profit les possibilités offertes par la microscopie TIRF pour, en étroite collaboration avec l'équipe de François Darchen, passer à une analyse à l'échelle protéique de ces mécanismes. Nous avons ainsi étudié en particulier les protéines impliquées dans les interactions entre les GS et le cytosquelette cortical d'actine.

4.1. Les développements méthodologiques

Ce travail étant fondé sur l'analyse des mouvements décrits par les GS dans la région juxta-membranaire, il a nécessité le développement d'outils permettant une caractérisation précise de ces mouvements.

Nous avons ainsi tout d'abord tiré profit d'une des spécificités de la microscopie TIRF, à savoir l'excitation des fluorophores à l'aide d'une onde évanescente dont l'intensité décroît exponentiellement lorsque l'on s'éloigne de l'interface verre/cellule, pour réaliser un suivi tridimensionnel des GS. En effet, grâce à la mesure des variations d'intensité de ces organites, il nous a été possible de déterminer les déplacements des GS le long de l'axe orthogonal au plan de focalisation du microscope. Nous avons ensuite cherché à mettre au point une méthode d'analyse précise de ces trajectoires tridimensionnelles. Etant donnée leur complexité, il nous est apparu intéressant de développer une approche permettant de mettre en évidence des comportements transitoires au sein de ces trajectoires. Nous avons ainsi mis au point une méthode fondée sur l'analyse de la courbe du déplacement quadratique moyen et de la forme de la trajectoire (caractérisée à l'aide du paramètre d'asymétrie) qui permet de déterminer l'évolution du comportement du GS suivi au cours de ses déplacements au sein de la région juxta-membranaire.

4.1.1. La mesure de la distance séparant les granules de la membrane plasmique

Lors de cette analyse des trajectoires des GS, nous nous sommes cependant heurtés à un problème important à savoir l'impossibilité de déterminer de manière absolue la position des GS suivant l'axe z et en particulier la distance séparant ces organites de la membrane plasmique (altitude). Les seuls GS dont nous avons pu définir l'altitude sont ceux fusionnant avec la membrane plasmique. En effet, en prenant comme référence la position en z de ces GS immédiatement avant l'exocytose, leur altitude a pu être évaluée tout au long de leur trajectoire. Toutefois, cette solution n'est pas totalement satisfaisante. En effet, elle oblige à se placer dans des conditions stimulées et de plus, elle ne permet d'analyser qu'une certaine population de GS.

Différentes études ont cependant mis en évidence qu'il était possible de déterminer la distance entre un objet marqué en fluorescence et l'interface au niveau de laquelle est générée l'onde évanescente grâce à la mesure de l'intensité de ces objets pour différentes épaisseurs d'évanescence (Olveczky, Periasamy et al., 1997 ; Loerke, Preitz et al., 2000 ; Rohrbach, 2000). Au cours de ma thèse, j'ai commencé à développer une méthode de mesure de l'altitude des GS fondée sur cette approche. Toutefois, faute de temps, ce projet est resté inachevé. Dans ce qui suit, je vais tout de même décrire le principe de cette méthode ainsi que les résultats préliminaires obtenus.

Le principe de la méthode est de comparer les positions des GS suivant l'axe z au sein d'une même cellule, les GS les plus proches de la lamelle de verre étant alors considérés comme liés à la membrane plasmique. Cependant, comme nous l'avons mentionné précédemment, la comparaison des intensités de deux GS pour une profondeur de pénétration donnée de l'onde évanescente ne permet pas de déterminer la différence d'altitude entre ces deux organites. Ceci est dû au fait que, même à niveau d'excitation égal, deux GS différents présentent des intensités "intrinsèques" différentes. Un des moyens de contourner ce problème est alors de mesurer l'intensité de ces deux GS (G_1 et G_2) pour deux profondeurs de pénétration différentes δ et δ' de l'onde évanescente. L'intensité de G_k ($k = 1$ ou 2) pour une épaisseur d'évanescence δ vérifie la relation :

$$I_k = I_k^{ref} \exp(-z_k/\delta), \quad (2)$$

avec z_k la distance entre G_k et l'interface au niveau de laquelle est générée l'onde évanescente et I_k^{ref} l'intensité de G_k si celui-ci était à $z = 0$. Pour une profondeur d'évanescence δ' ,

l'intensité I'_k des GS vérifie le même type de relation. Par conséquent, pour chacun des deux GS, le rapport des intensités obtenues pour des épaisseurs d'évanescence δ et δ' est alors égal à :

$$R_k = \frac{I'_k}{I_k} = \exp\left(z_k \left(\frac{\delta' - \delta}{\delta' \delta}\right)\right). \quad (3)$$

Ce rapport R_k dépend donc uniquement de la position z_k du GS considéré ainsi que des épaisseurs d'évanescence utilisées. On peut alors déduire de l'équation (3) la relation suivante :

$$z_2 - z_1 = \frac{\delta' \delta}{\delta' - \delta} \ln(R_2/R_1). \quad (4)$$

D'après l'équation (4), il est donc possible de comparer les positions suivant l'axe z de deux GS différents grâce à la mesure des intensités de ces GS pour deux épaisseurs d'évanescence différentes. Sur une cellule entière, les positions relatives des différents GS peuvent donc être déterminées grâce à cette méthode. En considérant que les GS les plus proches de la lamelle de verre sont au contact de la membrane plasmique, il est alors possible d'évaluer l'altitude de chacun de ces GS.

Afin d'essayer de valider cette méthode de mesure de l'altitude des GS, nous l'avons tout d'abord appliquée au cas de billes fluorescentes (200 nm de diamètre, marquées par la fluorescéine, Polysciences, Inc.) immobilisées à la surface d'une lamelle de verre. Après avoir mesuré leurs intensités pour des épaisseurs d'évanescence de 100 et 200 nm, les positions relatives de ces billes ont été déterminées grâce à la relation (4). En moyenne, la différence de position entre ces billes suivant l'axe z était égale à ~15 nm (70 billes). Nous avons de plus appliqué cette méthode à la mesure de l'altitude des GS dans des cellules BON après que celles-ci aient été fixées. Ces altitudes ont alors été déterminées en utilisant deux couples d'épaisseurs d'évanescence différents : 100/200 nm et 100/150 nm. Pour un GS donné la différence entre les valeurs d'altitude évaluées grâce aux deux couples d'épaisseurs d'évanescence est de ~25 nm (186 GS issus de 10 cellules). L'ensemble de ces résultats suggère donc que la méthode décrite permet effectivement d'évaluer l'altitude des GS avec une incertitude d'environ 25 nm.

Deux aspects restent cependant à vérifier avant de pouvoir valider complètement cette méthode. Tout d'abord, l'approche utilisée repose sur l'hypothèse que pour une cellule donnée, la distance entre la membrane plasmique et la lamelle de verre varie peu sur la surface de la zone adhérente. En effet, après avoir mesuré les positions relatives des GS, la distance séparant

chacun de ces organites de la membrane plasmique est calculée en prenant comme altitude de référence ($z = 0$) la position des GS les plus proches de la lamelle de verre, considérés comme étant au contact de la membrane. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait possible d'évaluer la distance séparant la membrane plasmique de la lamelle de verre par microscopie à contraste interférentiel en réflexion (*Reflection Interference Contrast Microscopy*, voir (Curtis, 1964 ; Bereiter-Hahn, Fox et al., 1979)). De plus, il reste à déterminer si cette méthode est applicable au cas des cellules vivantes. En raison de la mobilité des GS, ceci nécessite notamment de pouvoir passer rapidement (100-200 ms) d'une épaisseur d'évanescence à une autre, ce que ne permet pas le montage actuel. Dans le cas où elle se révélerait applicable *in-vivo*, l'idée serait alors de coupler cette méthode au suivi tridimensionnel des GS afin des pouvoir mesurer les variations d'altitudes de ces organites. Le protocole d'acquisition de séquences d'images serait alors le suivant : après première image avec une épaisseur d'évanescence δ , le reste de cette séquence serait réalisé à une épaisseur d'évanescence δ' . Ceci permettrait de déterminer les variations d'altitude des GS au cours de la séquence d'images par suivi tridimensionnel en disposant d'une altitude initiale de référence évaluée au début de cette séquence. Il serait ainsi possible d'analyser directement le comportement des GS en fonction de leur distance à la membrane plasmique, donnant ainsi accès à des informations précieuses concernant notamment l'architecture de la région juxta-membranaire.

4.1.2. La combinaison de la microscopie TIRF avec d'autres techniques d'imagerie ou d'électrophysiologie

A plus long terme, deux autres développements méthodologiques apparaissent particulièrement intéressants à envisager. Tout d'abord, l'application de la microscopie TIRF à l'imagerie de transfert résonnant d'énergie de fluorescence (FRET) pourrait permettre d'analyser directement les interactions entre protéines se déroulant à proximité de la membrane plasmique. Si l'on se concentre sur le cas particulier de la sécrétion régulée, cela permettrait par exemple d'analyser à quel moment la myosine Va, qui semble pouvoir osciller entre une conformation active, liée aux GS par l'intermédiaire de MyRIP, et une conformation inactive soluble, est recrutée à la surface de ces GS. Cette combinaison de la microscopie TIRF et de l'imagerie FRET pourrait également être utilisée pour analyser avec plus de précision le processus d'accrochage des GS au niveau de la membrane plasmique grâce, par exemple, à l'analyse des interactions entre les protéines du complexe SNARE, comme cela a été décrit par An et ses collaborateurs (An and Almers, 2004). Une telle combinaison de ces

deux techniques a jusqu'à aujourd'hui été peu utilisée (Riven, Kalmanzon et al., 2003 ; An and Almers, 2004) mais sa mise en œuvre semble possible.

L'association entre la microscopie TIRF et les techniques d'ampérométrie, qui permettent de mesurer avec une excellente résolution temporelle la cinétique de libération de molécules messagères lors de la fusion d'un GS avec la membrane plasmique, semble également être une voie prometteuse. En effet, par des méthodes de lithographie, il semble possible de réaliser un réseau de microélectrodes à la surface d'une lamelle de verre. En cultivant des cellules sur de telles surfaces, il serait possible d'observer simultanément, lors d'un événement d'exocytose, le devenir de la membrane du GS par microscopie TIRF et la libération des molécules messagères par ampérométrie. La publication récente de travaux couplant la microscopie à épifluorescence à des mesures par ampérométrie à l'aide d'un réseau de microélectrodes prouve la faisabilité d'une telle approche (Hafez, Kisler et al., 2005).

4.2. Les perspectives biologiques

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de préciser le déroulement des trois dernières étapes du processus de migration des GS jusqu'à la membrane plasmique à savoir : (1) l'arrivée des GS le long des microtubules et leur capture en périphérie de la cellule, (2) le transport des GS au sein du cytosquelette d'actine cortical et (3) l'accrochage des GS à la membrane plasmique. Les résultats obtenus à propos de chacune de ces étapes ouvrent cependant de nombreuses questions.

4.2.1. L'architecture de la région juxta-membranaire

Les observations en microscopie TIRF ont mis en évidence l'existence d'un réseau de microtubules relativement dense à proximité de la membrane plasmique. Ce résultat relativement inattendu mériterait d'être étudié plus en détail. En particulier, il serait intéressant d'analyser la dynamique de ces microtubules à proximité de la membrane. Les études préliminaires que nous avons effectuées grâce à un marquage de leurs extrémités + à l'aide de la protéine CLIP170 (Perez, Diamantopoulos et al., 1999) fusionnée à la GFP montre que certains microtubules croissent parallèlement à la membrane plasmique au sein des cellules BON. La question des interactions entre ce réseau de microtubules et les filaments d'actine reste également posée. De telles interactions jouent un rôle important dans le cas de la

migration et de la morphogénèse des cellules (Rodriguez, Schaefer et al., 2003). Concernant le mécanisme de sécrétion régulée, l'analyse de ces interactions microtubules/actine permettrait probablement de mieux comprendre comment se déroule le passage des GS du réseau de microtubules au cytosquelette d'actine cortical. Dans le cas des neurones, il a été montré que la protéine MAP1B permettait d'établir une connexion entre les microtubules et les filaments d'actine (Togel, Wiche et al., 1998).

4.2.2. La régulation des mouvements le long des microtubules

L'étude des mouvements des GS le long des microtubules en périphérie de la cellule a montré que de tels mouvements pouvaient être bidirectionnels. Ceci suggère que des moteurs moléculaires de polarités opposées sont présents simultanément à la surface des GS comme cela a été mis en évidence dans le cas d'autres organites (Welte, 2004). La première étape de futurs travaux portant sur l'étude plus approfondie de cet aspect de la dynamique des GS serait d'identifier les types de moteurs à l'origine de ces déplacements le long des microtubules. Il serait ensuite intéressant d'essayer de comprendre les mécanismes à l'origine de la régulation entre ces moteurs, seul moyen de permettre un transport effectif des GS suivant une direction privilégiée. Plusieurs arguments indiquent qu'il existe une coordination, peut-être par l'intermédiaire du complexe dynactine, entre ces moteurs de polarités opposées permettant d'empêcher leur fonctionnement simultané (Martin, Iyadurai et al., 1999 ; Gross, Welte et al., 2002 ; Deacon, Serpinskaya et al., 2003). Une étude récente suggère également que la régulation des mouvements le long des microtubules pourrait impliquer un contrôle du nombre de moteurs présents à la surface des GS (Levi, Serpinskaya et al., 2006).

4.2.3. La régulation du mode d'accrochage des granules à l'actine

De manière surprenante, les résultats que nous avons obtenu indiquent que, si la myosine Va est impliquée dans la capture des GS au sein du réseau cortical d'actine, il semble ensuite que ce soit plutôt le domaine C-terminal de MyRIP qui permette un accrochage de ces organites aux filaments d'actine. Ce lien étant fixe, les GS localisés au niveau du réseau d'actine suivent alors les mouvements des filaments constituant ce réseau. Ces observations suggèrent donc que les GS utilisent deux modes de fixation différents aux filaments d'actine. Ceci pose alors la question de l'existence d'un mécanisme de contrôle du mode de liaison des GS à l'actine. Il est ainsi possible que ces deux modes de liaison ne puissent être activés simultanément. Ainsi,

la liaison de la myosine Va à MyRIP *via* son extrémité globulaire pourrait empêcher l'accrochage des GS à l'actine par l'intermédiaire du domaine C-terminal de MyRIP. Un moyen de tester cette hypothèse serait de comparer la mobilité des GS dans les cellules exprimant la MyoVa tail (construction tronquée de la myosine Va se liant aux GS mais pas à l'actine) et celles dans lesquelles l'expression de la myosine Va a été inhibée par interférence à l'ARN.

4.2.4. L'accrochage à la membrane plasmique

La question de l'accrochage des GS à la membrane plasmique n'a été que peu étudiée au cours de cette thèse. Les observations réalisées suggèrent notamment qu'il puisse exister deux états d'accrochage de ces organites à la membrane cellulaire correspondant peut-être aux étapes d'accostage ("tethering") et d'arrimage ("docking") à cette membrane. Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de cette étape d'accrochage, il faudrait alors chercher à déterminer la nature des protéines à l'origine de ces deux modes de liaison à la membrane. Les travaux en cours effectués par Christophe Tarabout, étudiant en stage de master au sein de l'équipe, visent à progresser dans cette voie. Christophe cherche en effet à analyser l'effet sur les mouvements des GS d'un clivage de certaines protéines SNARE par les neurotoxines clostridiales afin de déterminer si ce clivage se traduit notamment par la disparition de l'un des deux modes d'accrochage. Certains résultats obtenus au cours de ma thèse suggèrent que l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire induite par la stimulation favoriserait le passage d'un état d'accrochage à un autre. Cette hypothèse reste cependant à vérifier. Enfin, il serait intéressant d'étudier si le passage d'un mode d'accrochage à un autre est un processus réversible.

L'étude de l'accrochage des GS à la membrane plasmique a montré qu'un tel accrochage se traduisait par une inhibition des mouvements des GS non seulement suivant l'axe z (orthogonal au plan de la membrane) mais également dans le plan (x,y). Or, la membrane étant une structure "fluide", une telle immobilisation dans le plan (x,y) est relativement inattendue. En effet, si les GS sont simplement liés à la membrane plasmique par l'intermédiaire de protéines pouvant diffuser au sein de cette membrane, ces organites devraient conserver une certaine mobilité dans le plan de focalisation du microscope. Il reste donc à déterminer l'origine exacte de cette immobilisation.

Différents travaux suggèrent qu'il existe des sites préférentiels d'exocytose au niveau de la membrane plasmique des cellules neuroendocrines (Becherer, Moser et al., 2003 ; Allersma, Wang et al., 2004). L'architecture exacte de tels sites préférentiels reste cependant à définir. Grâce à des observations par microscopie TIRF en double marquage, il serait possible de visualiser simultanément les mouvements des GS et la répartition de différentes protéines de la membrane plasmique pouvant participer au recrutement des GS au niveau de cette membrane. Ceci permettrait d'étudier de manière directe si l'immobilisation des GS traduisant leur accrochage à la membrane plasmique se produit au niveau de zones de cette membrane présentant une structure particulière.

4.2.5. L'effet de la stimulation sur les mouvements des granules

La majorité des analyses visant à caractériser les mouvements des GS en périphérie des cellules BON présentées dans ce manuscrit de thèse a été réalisée dans des cellules au repos. La comparaison des histogrammes de coefficients de diffusion moyens indiquent que la stimulation ne semble pas modifier de manière drastique les mouvements de ces organites. Il serait cependant intéressant d'analyser de manière plus détaillée ces mouvements en conditions stimulées. En effet, de nombreux arguments suggèrent que l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire associée à cette stimulation a sans doute des conséquences sur la dynamique des GS. En effet, cette montée de calcium est tout d'abord connue pour induire une réorganisation importante du cytosquelette cortical d'actine (Trifaro, Rose et al., 2000). De plus, plusieurs protéines potentiellement impliquées dans le contrôle des mouvements des GS sont sensibles à la concentration de calcium intracellulaire. Ainsi, par exemple, l'activité motrice de la myosine Va semble inhibée à calcium élevé (Krementsov, Krementsova et al., 2004).

5. Matériels et méthodes

5.1. Biologie cellulaire

5.1.1. Culture et transfection des cellules BON

5.1.1.1. Conditions de culture

Les cellules BON (don de C.M. Townsend, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas) sont cultivées à une densité de 2.10^5 à 4.10^5 cellules/cm² dans des flacons plastiques. Elles sont maintenues à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé est du DMEM-F12 1:1 (Dulbecco's modified Eagle's medium, PAA), complété avec 10 % de sérum de veau fœtal inactivé, 100 µg/mL de streptomycine (PAA) et 50 U/mL de pénicilline (PAA). Les cellules à confluence (25-30 millions/75 cm²) sont repiquées une fois par semaine. Le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées 1 fois avec une solution de PBS (KCl 0,2 g/l, KH₂PO₄ 0,2g/l, NaCl 8g/l et Na₂HPO₄ 1,15g/l). Les cellules sont décollées par un traitement à la trypsine (2 minutes, trypsine 0,5 mg/mL, EDTA 0,2 mg/mL, dans du PBS). L'action de la trypsine est ensuite inhibée par addition de 9 mL de milieu de culture complet. Les cellules sont comptées avec un hématimètre de Malassez, puisensemencées à la densité désirée.

5.1.1.2. Transfection par électroporation

Les cellules sont décollées par un traitement à la trypsine comme décrit précédemment. Elles sont ensuite reprises dans du PBS et centrifugées 10 minutes à 800 g. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans du PBS. Une nouvelle centrifugation est effectuée et le culot est repris délicatement dans 200 µl de PBS et mis sur la glace. Une dilution au 1/10^{ème} est effectuée afin de compter les cellules sur lame de Malassez. La solution de cellules est amenée à une concentration de 40.10^6 cellules par mL.

Les cellules sont ensuite mélangées à l'ADN plasmidique à transférer (entre 2,5 et 10 µg d'ADN pour 50µl de la suspension cellulaire) et déposées entre les électrodes d'un électroporateur (Jouan, Thermo Electron corp.). Une tension de 250V est appliquée sous

forme de 8 impulsions de 3 ms chacune. Les cellules sont alors reprises dans du milieu complet puis réparties dans trois boîtes de culture à fond en verre utilisées pour les observations en microscopie TIRF (MatTek Cultureware ou NPI), à une densité d'environ 5.10^4 cellules/cm². Elles sont observées entre 1 jour et 3 jours après l'électroporation.

Au moment des observations en microscopie TIRF, les cellules sont transférées dans du milieu Locke supplémenté en Ca²⁺ et Mg²⁺ (Glucose 5,6 mM, HCO₃⁻ 3,6 mM, Cl⁻ 159,6 mM, Na⁺ 157,6 mM, K⁺ 5,6 mM, Hepes 5 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1,2 mM). Les cellules sont alors observées pendant environ une heure à une température ambiante de 31-33°C.

5.1.2. Culture et transfection des cellules PC-12

5.1.2.1. Conditions de culture

Les cellules PC-12 (sous clone P38, don de G. Ahnert-Hilger, Berlin, Allemagne) sont cultivées à une densité de 2.10^5 à 4.10^5 cellules/cm² dans des flacons de 75 cm² recouverts de collagène (type VII, 5 µg/cm², Sigma-Aldrich). Elles sont maintenues à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé est du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, glucose 1 g/L), complété avec 5 % de sérum de veau foetal inactivé, 10% sérum de cheval inactivé et 25 µg/mL de gentamicine. Les cellules à confluence (25-30 millions/75 cm²) sont repiquées une fois par semaine, suivant le même protocole que celui utilisé pour les cellules BON.

5.1.2.2. Transfection par lipofection

La veille de la transfection, les cellules sont mises en culture sur les boîtes utilisées pour les observations en microscopie TIRF, à une densité d'environ 1.10^5 cellules/cm². Le mélange lipofectant/ADN, réalisé dans du milieu sans sérum, se compose, pour une boîte, de 1,25 µL de solution de DMRIE-C (Invitrogen) et de 0,8 µg de plasmides. Ce mélange est laissé au contact des cellules pendant 5 heures. Il est ensuite aspiré et remplacé par du milieu complet. Les cellules sont utilisées 2-3 jours après la transfection

Au moment des observations en microscopie TIRF, les cellules sont transférées dans du milieu Locke supplémenté en Ca²⁺ et Mg²⁺. Ces cellules sont alors observées pendant environ une heure à une température ambiante de 31-33°C.

5.1.3. Culture des cellules COS-7

Les cellules de la lignée COS-7 (dérivées de cellules de rein de singe vert d'Afrique) sont cultivées à une densité de 1.10^5 à 2.10^5 cellules/cm² dans des flacons plastiques. Elles sont maintenues à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé est du DMEM (4,5 g/L de glucose, PAA), complété avec 10 % de sérum de veau foetal inactivé, 100 µg/mL de streptomycine (PAA) et 50 U/mL de pénicilline (PAA). Les cellules à confluence (~20 millions/75 cm²) sont repiquées deux fois par semaine, suivant le même protocole que celui utilisé pour les cellules BON.

5.1.4. Les différentes constructions plasmidiques utilisées

Le tableau 8 présente les différentes constructions plasmidiques utilisées ainsi que leurs caractéristiques. Ces constructions ont été purifiées à l'aide d'un kit de purification Macherey Nagel.

Les étiquettes FLAG et myc correspondent respectivement aux séquences d'acides aminés suivantes : DYKDDDDK et EQKLSEEDL.

Nom de la construction plasmidique	Insert	Vecteur	Origine
NPY-GFP	Pro-NPY humain	pEGFPC-N1 (Clontech)	Don de W. Almers
pmRFP-N1	mRFP	pEGFPC-N1 (Clontech) : la EGFP est remplacée par la mRFP	mRFP don de Tsien
NPY-mRFP	Pro-NPY humain	pmRFP-N1	Faite au laboratoire
Tubuline-GFP	Tubuline-a humaine	pAcGFP1	Clontech
Actine-GFP	Actine humaine	pCDNA3	Don de E. Coudrier
MyoVa tail-GFP	Myosine 5a humaine avec les exons ACEF (3624 à 5550 pb)	pEGFP-C1 (Clontech)	Faite au laboratoire
MyoVa tail-mRFP	Myosine 5a humaine avec les exons ACEF (3624 à 5550 pb)	pmRFP-N1	Faite au laboratoire
MyoVa long tail-GFP	Myosine 5a humaine avec les exons ACEF (2733 à 5550 pb)	pEGFP-C1 (Clontech)	Faite au laboratoire
MyoVa globular tail-GFP	Myosine 5a humaine (4254 à 5550 pb)	pEGFP-C1 (Clontech)	Faite au laboratoire
MyoVa tail-FLAG	Myosine 5a humaine avec les exons ACEF (3624 à 5550 pb)	pCMV-tag2A (Stratagène)	Faite au laboratoire
MyoVa long tail- FLAG	Myosine 5a humaine avec les exons ACEF (2733 à 5550 pb)	pCMV-tag2A (Stratagène)	Faite au laboratoire
MyoVa globular tail-FLAG	Myosine 5a humaine avec les exons ACEF (4254 à 5550 pb)	pCMV-tag2A (Stratagène)	Faite au laboratoire
Rab11b-myc	Rab11 humain	pCDNA3 (Invitrogen)	Don de M Cormont
MyRIP FL	MyRIP Humain	pCMV-tag3B (Stratagène)	Don de C. Petit
MyRIP RBD	MyRIP Humain (1 à 407 pb)	pCMV-tag3B (Stratagène)	Don de C. Petit

Tableau 8 : Caractéristiques des différentes constructions plasmidiques utilisées.

5.1.5. Immunomarquage de cellules

Après un lavage en PBS+ (PBS complété par 1 mM de $MgCl_2$), les cellules sont fixées par ajout de paraformaldéhyde (4% dans PBS+) pendant 15 min. Elles sont ensuite lavées trois fois en PBS+ puis sont mises en présence de PBS+ contenant 50 mM de NH_4Cl pendant 10 min afin d'arrêter la fixation. Après un lavage en PBS+, les cellules sont perméabilisées par ajout d'une solution de PBS+/Sap (0,2 % BSA, 0,05 % Saponine) pendant 15 min. L'anticorps primaire, dilué dans du PBS+/Sap (la dilution utilisée dépend de l'anticorps, voir Tableau 9), est déposé sur les cellules pendant 40 min. Celles-ci sont alors lavées 3 fois 5 min en PBS+/Sap puis l'anticorps secondaire (dilution au 1/1000 dans du PBS+/Sap) est déposé sur les cellules pendant 40 min. Les cellules sont ensuite de nouveau lavées, une fois en PBS+/Sap, puis une fois en PBS+. Pour les observations en TIRF, les cellules sont ensuite conservées dans du PBS+. Pour les observations en épifluorescence, les lamelles sur lesquelles sont cultivées les cellules sont lavées une dernière fois avec de l'eau puis déposées sur lame dans une goutte de Fluoromount-G© (SouthernBiotech).

Les tableaux 9 et 10 présentent respectivement les différents anticorps primaires et secondaires utilisés ainsi que leurs caractéristiques. Pour le marquage du réseau d'actine, nous avons utilisé la phalloïdine couplée à la rhodamine (Molecular Probes) à une concentration de $0,05\mu M$ (protocole identique à celui utilisé pour un immunomarquage).

Nom de l'anticorps	Animal d'origine	Type d'anticorps	Dilution utilisée	Origine
Anti-tubuline	Souris	Monoclonal	1/100	Sigma-Aldrich
Anti-myosine Va	Lapin	Polyclonal	1/1000	Don de R. Cheney
Anti-Rab27A	Souris	Monoclonal	1/1000	BD biosceinces
Anti-MyRIP	Lapin	Polyclonal	1/100	Don de C. Petit
Anti-myc	Souris	Monoclonal	1/2000	Cell Signaling Tech.
Anti-lamp1	Souris	Monoclonal	1/2000	Developmental studies Hybrydoma bank, University of Iowa
Anti-EEA1	Souris	Monoclonal	1/100	BD Biosciences
Anti-cytochrome c	Souris	Monoclonal	1/100	BD Biosciences
Anti-disulfide isomerase	Lapin	Polyclonal	1/250	Don de D. Ferrari
Anti-chromogranine A/B	Lapin	Polyclonal	1/800	Abcam
Anti-SNAP25	Souris	Monoclonal	1/500	SYSY

Tableau 9: Caractéristiques des différents anticorps primaires utilisés.

Nom de l'anticorps	Animal d'origine	Fluorophore couplé	Dilution utilisée	Origine
Anti-IgG de souris	Ane	Cy3©	1/1000	Jackson
Anti-IgG de lapin	Ane	Cy3©	1/1000	Jackson
Anti-IgG de souris	Ane	Alexa Fluor 488	1/1000	Molecular Probes
Anti-IgG de souris	Chèvre	Alexa Fluor 350	1/100	Molecular Probes
Anti-IgG de lapin	Chèvre	Alexa Fluor 350	1/100	Molecular Probes

Tableau 10: Caractéristiques des différents anticorps secondaires utilisés.

5.1.6. Obtention des cellules décalottées

Les cellules sont mises en culture sur les boîtes utilisées pour les observations en microscopie TIRF, à une densité d'environ 1.10^5 cellules/cm². Trois jours après cette mise en culture, les cellules sont traitées par la latrunculine B, utilisée à une concentration de 5 μ M, pendant 10 min. Afin de décalotter les cellules, celles-ci sont ensuite soumises à un flux de cisaillement par ajout et aspiration successifs de milieu (1 à 3 cycles d'ajout et aspiration de milieu sont réalisés). Le milieu utilisé pour décalotter les cellules contient (en mM) : glutamate de potassium 139, PIPES 20, HEDTA 2, EGTA 2, Mg²⁺ libre 1, ATP 2, GTP 0,3 et 0,3% de BSA. C'est ce même milieu qui baigne ensuite les cellules au cours des observations en microscopie TIRF. Ces cellules sont observées pendant moins de 15 minutes, immédiatement après avoir été décalottées.

5.2. Le montage de microscopie TIRF

5.2.1. Description du poste d'imagerie

5.2.1.1. Le montage de microscopie

Le système de microscopie TIRF utilisé appartient à la catégorie des montages avec prisme (voir l'introduction générale, partie consacrée aux différents montages de TIRF). Il est constitué d'un microscope droit (BX50WI, Olympus) modifié pour permettre une excitation de la fluorescence par onde évanescente (voir Figure 64 pour un schéma du montage). Lors des observations, les boîtes de culture à fond en verre sur lesquelles sont cultivées les cellules sont couplées optiquement avec la surface plane d'un prisme hémisphérique en verre BK7 en utilisant de l'huile à immersion (518 C, Carl Zeiss MicroImaging, Inc.). Le faisceau laser permettant de générer l'onde évanescente est issu d'un laser à argon (177-G02, Spectra Physics, Newport). Après avoir pénétré radialement le prisme hémisphérique, ce faisceau se réfléchit totalement au niveau de l'interface verre/cellule, créant ainsi une onde évanescente dans le milieu cellulaire.

L'une des spécificités intéressante de ce montage de TIRF est la possibilité de faire varier la profondeur de pénétration de cette onde évanescente, permettant ainsi d'observer des phénomènes localisés à plus ou moins grande distance de la membrane cellulaire. D'après

l'équation (1), cette profondeur de pénétration peut être modifiée en changeant l'angle d'incidence du faisceau laser au niveau de l'interface verre/cellule. Afin de faire varier cet angle, un système télécentrique composé d'un miroir mobile et d'une lentille convergente dont le point focal est confondu avec le centre du prisme hémisphérique est utilisé. La translation du miroir permet alors de modifier l'angle d'incidence du faisceau laser sans changer la position de la zone éclairée au niveau de l'interface verre/cellule (Figure 64). Par conséquent, une même cellule peut être observée en utilisant successivement différentes épaisseurs d'évanescence.

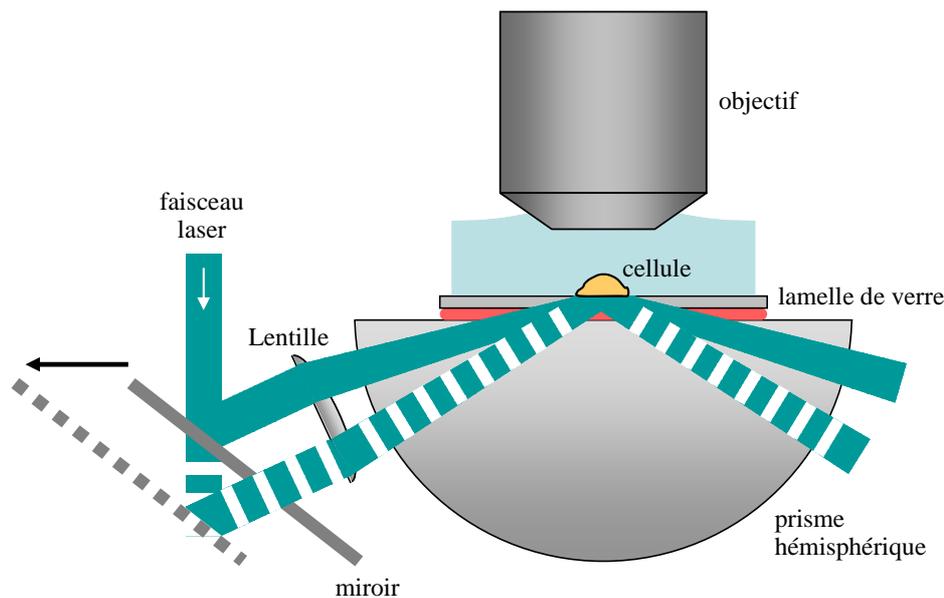


Figure 64 : Schéma du montage utilisé pour les observations en microscopie TIRF. La translation du miroir permet de modifier l'épaisseur d'évanescence sans changer la position de la zone éclairée au niveau de l'interface verre/cellule.

La fluorescence est collectée à l'aide d'un objectif à immersion à eau (grossissement 60x, ouverture numérique 0,9, Olympus). L'acquisition d'images est réalisée à l'aide d'une caméra CCD (CoolSnap HQ, Photometrics, Roper Scientific) pilotée par le logiciel Metaview (Universal Imaging Corporation, Molecular Devices Corporation). Dans ces conditions d'observations, un pixel correspond à 107,5 nm sur les images obtenues. Afin de minimiser le photoblanchiment lors de l'acquisition d'images, la puissance du faisceau laser incident est limitée à ~1 mW et les cellules sont illuminées uniquement durant la période d'acquisition grâce à un obturateur couplé à la caméra.

Le montage permet également des observations en épifluorescence et en lumière blanche. Pour ce dernier type d'observations, le prisme hémisphérique joue le rôle de condenseur.

5.2.1.2. Les observations en double marquage

Le système de TIRF utilisé permet de réaliser des observations en double marquage sur cellules vivantes à l'aide de fluorophores émettant dans le vert (EGFP) et dans le rouge (mRFP).

L'observation spécifique d'un des marqueurs repose sur une sélection à la fois au niveau de l'excitation de la fluorescence et de son émission. La sélection à l'excitation est réalisée grâce à l'utilisation des raies à 488 nm et 514 nm du laser à argon tandis que la sélection à l'émission est obtenue à l'aide de filtres interférentiels (un filtre centré sur 520 nm et de 40 nm de bande passante et un filtre passe haut à 565 nm, OmegaFilters). Après une séparation des raies laser *via* un réseau holographique, les faisceaux à 488 nm et 514 nm passent à travers deux trous de sélection puis sont recombinaés spatialement (voir Figure 65, montage mis en place par la société Eyrrol). Une lame oscillante, dont le basculement est synchronisé avec le changement de filtre d'émission, permet alors de sélectionner l'une des deux raies.

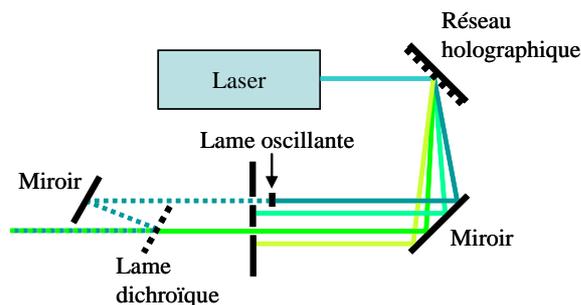


Figure 65 : Montage de sélection de la raie laser. Les différentes raies émises par la laser sont séparées spatialement à l'aide d'un réseau holographique. Les faisceaux à 488 et 512 nm passent ensuite à travers deux trous de sélection puis sont recombinaés spatialement. Une lame oscillante permet de sélectionner l'une des deux raies.

Avec un tel système, l'acquisition est réalisée successivement dans les canaux vert et rouge. Par conséquent, après l'acquisition d'une séquence d'images, les images n et $n+1$ sont superposées afin d'obtenir la séquence résultat.

5.2.1.3. La stimulation des cellules par photolibération de calcium

Les cellules sont tout d'abord incubées pendant 60 minutes dans du milieu Locke supplémenté en Ca^{2+} et Mg^{2+} et contenant 30 μM de o-nitrophenyl-EGTA-AM (Invitrogen). Les cellules sont ensuite incubées pendant 60 minutes dans du milieu de culture complet. La photolibération de calcium est induite par des flashes UV (durée des impulsions : 1 ms, 1 mJ/impulsion, $275 \text{ nm} < \lambda < 375 \text{ nm}$) générés par une lampe au xénon à arc (Rapp Optoelectronics). Cette lampe est couplée au système d'illumination par épifluorescence

présent sur le microscope *via* un guide de lumière à cœur liquide. Lors d'une séquence de stimulation, les flashes UV sont délivrés toutes les 10 secondes.

L'élévation de la concentration de calcium intracellulaire provoquée par les flashes UV peut être contrôlée par imagerie calcique. Pour cela, la phase d'incubation des cellules dans du milieu complet est réduite à 30 minutes, ces cellules étant ensuite incubées pendant 30 minutes dans du milieu Locke contenant 5 μ M de Fluo-4-AM (Invitrogen). La photolibération de calcium se traduit par une augmentation brutale de la fluorescence du Fluo4 présent dans le cytosol des cellules.

5.2.2. Calibration de l'épaisseur d'évanescence

5.2.2.1. Mesure de l'épaisseur d'évanescence

Lors des observations par microscopie TIRF, les fluorophores sont excités par l'intermédiaire d'une onde évanescente générée au niveau de l'interface verre/cellule. L'intensité de cette onde évanescente décroît exponentiellement lorsque l'on s'éloigne de l'interface avec une profondeur de pénétration δ vérifiant l'équation (1). δ est notamment fonction de l'indice de réfraction du milieu cellulaire dont la valeur n'est pas définie avec précision. Par conséquent, il est nécessaire d'évaluer expérimentalement la valeur de cette profondeur de pénétration. Pour cela, nous avons utilisé une méthode décrite précédemment par Steyer et Almers (Steyer and Almers, 1999). Le principe de cette méthode est de reconstruire le profil d'intensité de l'onde évanescente grâce à la mesure de la position suivant l'axe z et de l'intensité de billes fluorescentes adsorbées à la surface de cellules adhérant à la lamelle de verre au niveau de laquelle est générée cette onde évanescente (Figure 66).

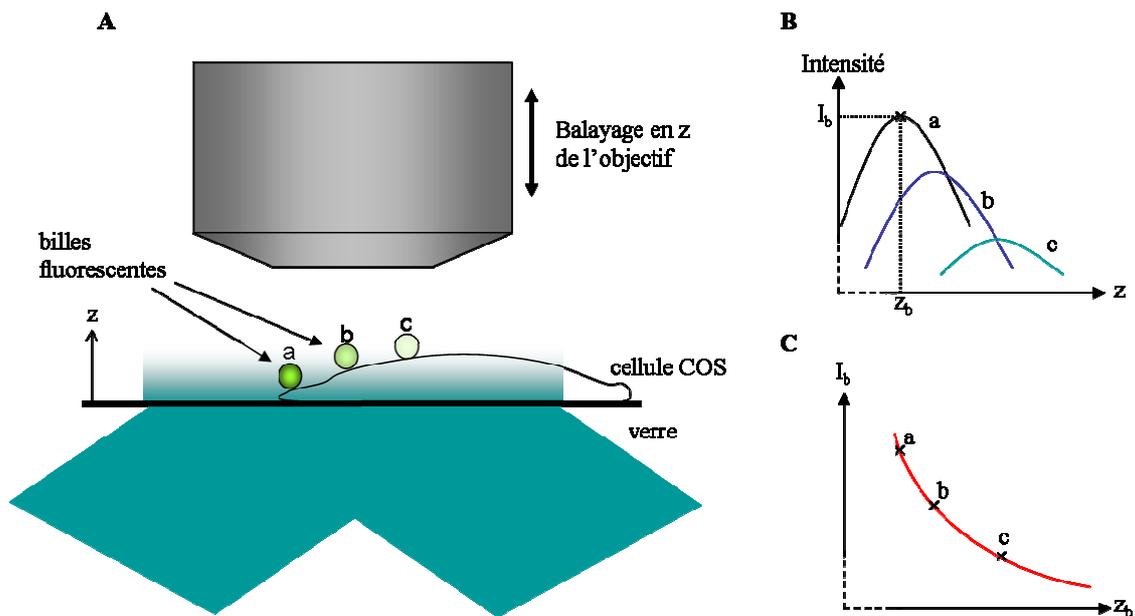


Figure 66 : Principe de la méthode de mesure de l'épaisseur d'évanescence. (A) Des billes fluorescentes sont déposées à la surface de cellules COS-7 et éclairées par l'onde évanescente dont on cherche à évaluer la profondeur de pénétration. Une série d'images de ces billes dans différents plans de focalisation est réalisée grâce au déplacement de l'objectif suivant l'axe z . (B) A partir de cette séquence d'image, l'intensité des billes en fonction de la position en z de l'objectif est mesurée. Pour chaque bille la valeur du maximum d'intensité I_b ainsi que la position z_b de ce maximum sont ensuite évaluées. (C) La courbe de I_b en fonction de z_b pour les différentes billes permet de reconstruire le profil d'intensité de l'onde évanescente.

Des billes fluorescentes (200 nm de diamètre, marquées par la fluorescéine, Polysciences, Inc.) ont ainsi été déposées sur des cellules COS-7 cultivées directement sur lamelles de verre. Une série d'images est alors réalisée dans différents plans de focalisation séparés de $\Delta z = 50$ nm en déplaçant l'objectif du microscope à l'aide d'une céramique piézoélectrique (Polytec-Pi). Le "profil d'intensité" $I(z)$ de chaque bille est ensuite déterminé¹⁰ (Figure 67). Ces profils sont alors lissés afin d'éliminer le bruit haute fréquence. L'intensité calculée pour une position z donnée est ainsi remplacée par la moyenne des intensités obtenues pour les positions comprises entre $z-3\Delta z$ et $z+3\Delta z$. L'intensité du fond (définie comme étant la valeur d'intensité minimale sur chaque profil) est ensuite soustraite à ces profils L'intensité I_b d'une bille est alors définie comme étant le maximum d'intensité du profil. La position z_b de cette bille est quant à elle obtenue en calculant le barycentre des points du profil ayant une intensité supérieure à $I_b/2$:

$$z_b = \frac{\sum z \cdot I(z)}{\sum I(z)} \quad (5)$$

¹⁰ L'intensité d'une bille dans un plan de focalisation donné est définie comme le niveau de gris maximal mesuré dans une région de l'image centrée sur la bille considérée

La "capacité à fluorescer" des billes utilisées variant d'une bille à l'autre (i.e. deux billes recevant une excitation identique présentent des intensités différentes), le graphe de I_b en fonction de z_b pour ces différentes billes ne peut pas être utilisé directement pour reconstruire le profil d'excitation de l'onde évanescente. La solution employée pour s'affranchir de ce problème est la réalisation, après la première acquisition pour laquelle la fluorescence des billes est excitée par l'onde évanescente, d'une seconde acquisition (effectuée de nouveau par un balayage en z de l'objectif) pour laquelle ces billes sont cette fois éclairées par épifluorescence. Avec ce dernier mode d'excitation, toutes les billes sont éclairées de la même façon et par conséquent, les différences d'intensité mesurées sont dues à des capacités à fluorescer différentes. A partir de cette acquisition par épifluorescence, chaque bille est alors affectée d'un coefficient, correspondant à sa capacité à fluorescer, utilisé pour normaliser l'intensité de cette bille pour un éclairage évanescent.

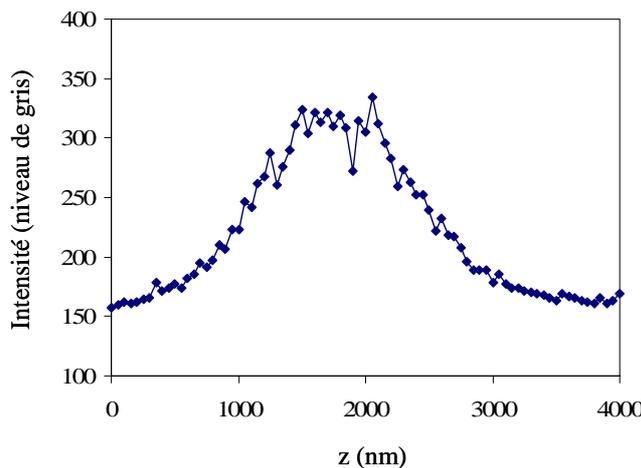


Figure 67 : Exemple de profil d'intensité obtenu pour une bille fluorescente. Ce profil est obtenu en mesurant l'intensité de la bille considérée dans différents plans de focalisation séparés de $\Delta z = 50$ nm. La position $z = 0$ correspond au plan de focalisation le plus proche de la lamelle de verre.

La valeur de δ est alors déterminée par ajustement du profil théorique correspondant à une excitation par onde évanescente, à la courbe de l'intensité normalisée des billes I_b^n en fonction de leur position suivant l'axe z . Ce profil théorique est cependant à priori plus complexe qu'une simple exponentielle décroissante. En effet, à proximité d'une interface, les propriétés d'émission d'un fluorophore dépendent de la distance le séparant de cette interface (Hellen and Axelrod, 1987). Par conséquent, l'intensité des billes en fonction de leur distance à la lamelle de verre vérifie la relation :

$$I_b^n(z_b) \propto I_{eva}(z_b) \times Q(z_b) , \quad (6)$$

avec $I_{eva}(z_b) = I_0 \exp(-z_d / \delta)$, l'intensité de l'onde évanescente et $Q(z_b)$, l'efficacité de détection qui dépend non seulement de la distance entre la bille et l'interface mais également

du rapport d'indice de réfraction entre les deux milieux composant cette interface et de l'ouverture numérique de l'objectif utilisé pour détecter la fluorescence (Hellen and Axelrod, 1987 ; Olveczky, Periasamy et al., 1997). Dans nos conditions expérimentales (l'ouverture numérique de l'objectif est égale à 0,9 et le rapport d'indice *est* inférieur à 1,14), la perturbation apportée par le terme $Q(z_b)$ est toutefois relativement modeste (Oheim and Stuhmer, 2000). De plus, l'influence de ce terme diminue très rapidement lorsque l'on s'éloigne de l'interface et devient négligeable pour des distances verre/fluorophore supérieures à ~40 nm (Oheim and Stuhmer, 2000). Plusieurs travaux portant sur l'adhérence des cellules ont montré que la distance séparant la lamelle de verre de la membrane plasmique est voisine de quelques dizaines de nanomètres (Curtis, 1964 ; Lanni, Waggoner et al., 1985 ; Olveczky, Periasamy et al., 1997). Par conséquent, nous avons considéré que l'influence du terme $Q(z_b)$ était négligeable. La valeur de δ a donc été obtenue *via* un ajustement par une exponentielle décroissante de la courbe de l'intensité normalisée des billes en fonction de leur position en z (Figure 68).

Cette méthode nous a permis de mesurer des épaisseurs d'évanescence comprises entre 200 et 300 nm avec une précision relative d'environ 15 %. Grâce, de plus, à la détermination de l'angle d'incidence du faisceau laser au niveau de l'interface verre/cellule (voir plus loin), nous en avons déduit la valeur de l'indice de réfraction moyen des cellules à partir de l'équation (1). Cet indice est égal à $1,37 \pm 0,01$ (l'incertitude correspond à la déviation standard), ce qui est en accord avec les estimations effectuées précédemment sur des modèles cellulaires différents (Bereiter-Hahn, Fox et al., 1979 ; Lanni, Waggoner et al., 1985). Nous avons considéré que cette valeur d'indice, mesurée pour des cellules COS-7, était également valable dans le cas des cellules BON et PC-12.

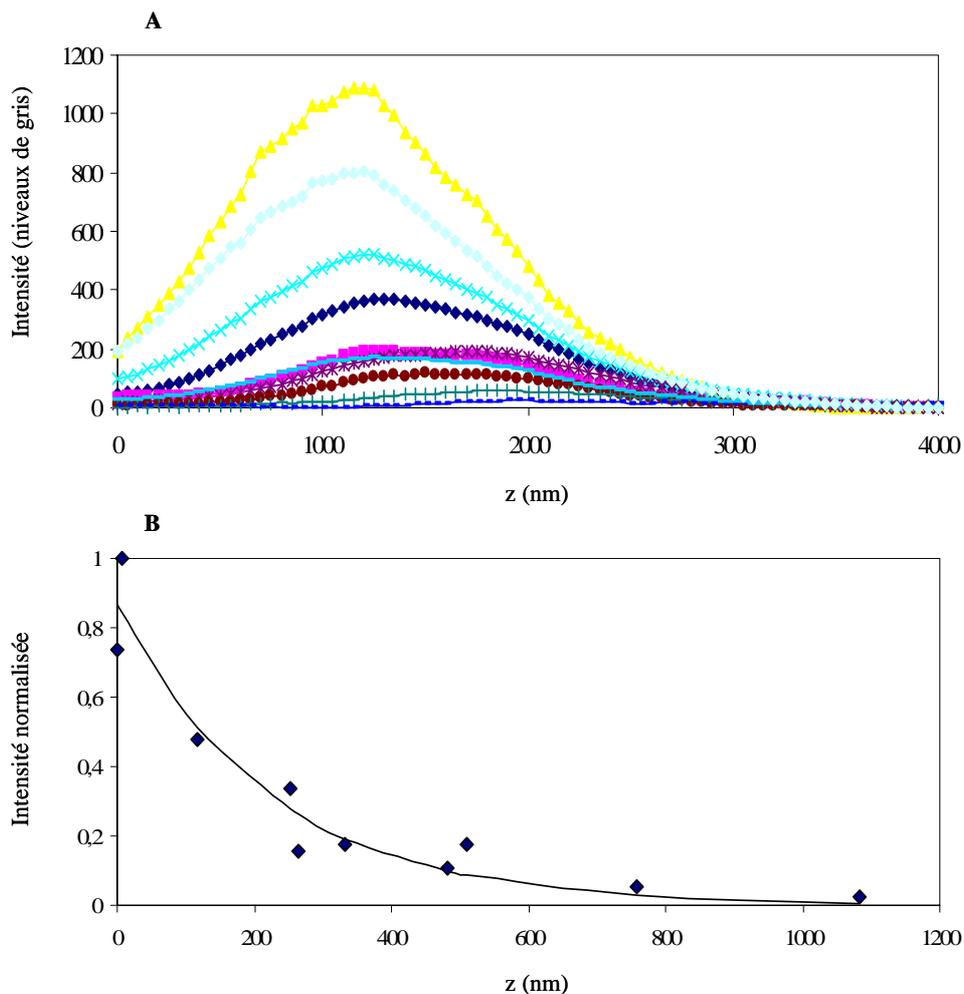


Figure 68 : Exemple de reconstruction du profil d'intensité de l'onde évanescente. (A) Profils d'intensité des billes fluorescentes après lissage et suppression du fond. La position $z = 0$ correspond au plan de focalisation le plus proche de la lamelle de verre. (B) Graphe représentant l'intensité normalisée des billes en fonction de leur position en z (losanges bleus). La profondeur de pénétration de l'onde évanescente est évaluée en ajustant ces points expérimentaux par une exponentielle décroissante (courbe en traits pleins). La position $z = 0$ correspond à celle de la bille la plus proche de la lamelle de verre.

5.2.2.2. Mesure de l'angle d'incidence du faisceau laser au niveau de l'interface verre/cellule

Afin de déterminer l'angle d'incidence, au niveau de l'interface verre/cellule, du faisceau laser utilisé pour générer l'onde évanescente, un prisme hémisphérique (identique à celui utilisé lors des observations en TIRF) est mis au contact de celui présent sur le montage (voir Figure 69, le contact est réalisé grâce à une huile d'indice proche de celui du BK7). Le faisceau laser traverse donc la lentille "boule" formée par l'association des deux prismes hémisphériques et vient frapper l'un des murs de la pièce où se trouve le microscope. En mesurant les valeurs de d et h (définis sur la Figure 69), il est donc possible d'accéder à la valeur de l'angle d'incidence.

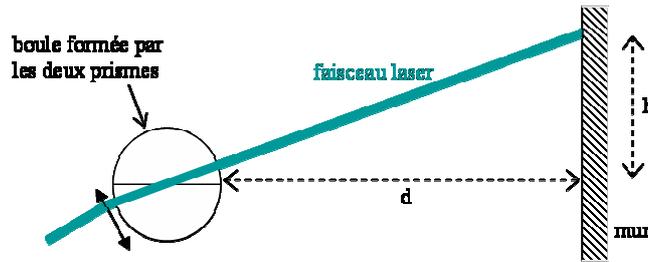


Figure 69 : Méthode de mesure de l'angle d'incidence du faisceau laser au niveau de l'interface verre/cellule. L'association des deux prismes hémisphériques permet de former une "boule" complète. Au lieu d'être réfléchi au niveau de l'interface plane du premier prisme, le faisceau laser traverse donc cette boule et vient frapper l'un des murs de la pièce où se trouve le microscope. L'angle d'incidence peut alors être déduit de la mesure de d et h .

Toutefois, les prismes hémisphériques utilisés n'étant pas des demi-boules entières¹¹, le faisceau laser subit une légère déviation au moment de la traversée de la seconde interface verre/air (Figure 70). Cette déviation peut être déterminée en supposant que le faisceau laser passe par le centre de la demi-boule utilisée habituellement sur le montage (ce qui est le cas lorsque que le réglage a permis d'obtenir un point d'impact fixe au niveau de l'interface verre/cellule pour des angles d'incidence variables). On obtient ainsi la relation (les grandeurs utilisées sont définies sur la Figure 70) :

$$\theta = \left(\frac{\pi}{2} - i\right) - (n - 1) \frac{2a - e}{R} \sin(i) \quad (7)$$

La mesure de d et h donne la valeur de θ , puis l'angle d'incidence i est déterminé à partir de l'équation précédente. La précision de cette méthode de mesure de l'angle d'incidence a été évaluée expérimentalement à environ $0,5^\circ$.

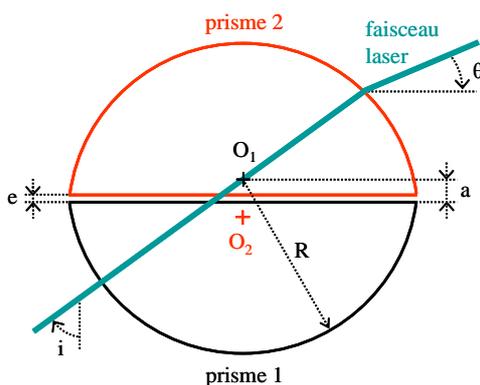


Figure 70 : Déviation du faisceau laser lors de la traversée des deux prismes. Les points O_1 et O_2 correspondent aux centres des deux prismes. $R = 22,1$ mm, $a = 0,2$ mm, e (épaisseur d'huile optique entre les deux prismes) est négligeable. Les prismes sont en verre BK7 d'indice optique $n = 1,52$.

¹¹ Lors des observations en microscopie TIRF, la lamelle de verre sur laquelle sont déposées les cellules est mise en contact avec la partie plane du prisme hémisphérique. C'est l'association du prisme et de la lamelle qui forme une demi-boule entière.

5.3. Observations en épifluorescence

Les observations en épifluorescence ont été réalisées soit à l'aide du microscope utilisé pour les observations en TIRF avec un objectif à immersion à eau (grossissement 60x, ouverture numérique 0,9, Olympus), soit à l'aide d'un microscope inversé (TE2000E, Nikon) avec un objectif à immersion à huile (grossissement 100x, ouverture numérique 1,4, Nikon). Sur ce second microscope, les acquisitions sont effectuées à l'aide d'une caméra CCD (CoolSnap ES, Photometrics, Roper Scientific) pilotée par le logiciel Metaview.

5.4. Etude des trajectoires des granules de sécrétion

5.4.1. Suivi tridimensionnel des granules de sécrétion

5.4.1.1. Suivi des granules dans le plan de focalisation du microscope

A partir des séquences d'images réalisées par microscopie TIRF, les trajectoires bidimensionnelles (x,y) des GS ont été obtenues par deux méthodes différentes. La première méthode utilise l'algorithme de suivi de particule semi-automatique disponible sur le logiciel Metamorph. Les GS sont alors suivis un par un. Pour chaque image, la position du GS considéré (x_G, y_G) est définie par le barycentre des pixels inclus dans une zone de 5x5 pixels centrée sur le spot fluorescent correspondant à ce GS :

$$x_G = \frac{\sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^5 x_i \cdot I_{ij}}{\sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^5 I_{ij}} \text{ et } y_G = \frac{\sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^5 y_j \cdot I_{ij}}{\sum_{i=1}^5 \sum_{j=1}^5 I_{ij}}, \quad (8)$$

avec x_i et y_j les coordonnées des pixels suivant les axes x et y et I_{ij} l'intensité de ces pixels. Afin de minimiser l'erreur sur le positionnement du GS suivi, il est important d'exclure de ce calcul du barycentre les pixels correspondant au fond. Pour cela, les pixels dont l'intensité est inférieure à un seuil choisi manuellement sont exclus du calcul (la valeur de ces pixels est pour cela mise à zéro). Grâce à cette méthode, chaque spot fluorescent correspondant à un GS est suivi au cours de la séquence d'images jusqu'à ce qu'il disparaisse ou qu'il "fusionne" avec un autre spot (un tel événement se produit lorsque deux GS se croisent à faible distance).

La seconde méthode de suivi de particule utilisée a été développée par Victor Racine et Jean-Baptiste Sibarita à l'Institut Curie (Racine, Hertzog et al., 2006). Cette méthode, entièrement automatisée, permet de suivre simultanément l'ensemble des GS observables au cours des

séquences d'images obtenues en TIRF. En résumé, le suivi des spots est réalisé en deux grandes étapes. Tout d'abord, les spots fluorescents correspondant aux GS sont détectés par segmentation des images grâce à une méthode ayant recours à la décomposition de ces images dans différents plans d'ondelettes (Starck, Murtagh et al., 1998). Les GS sont ensuite suivis à l'aide d'un algorithme dont le principe est de comparer les caractéristiques des objets détectés dans deux plans successifs afin d'associer chaque objet du plan i à un objet du plan $i+1$, permettant ainsi de reconstruire, de proche en proche, la trajectoire de ces objets. Cette méthode de suivi automatique des GS ayant parfois tendance à "sauter" d'une particule à une autre, il est toutefois nécessaire de vérifier les trajectoires obtenues afin d'éliminer celles présentant de tels sauts.

5.4.1.2. Evaluation des mouvements des granules suivant l'axe orthogonal au plan de focalisation

Lors des observations par microscopie TIRF, les fluorophores sont excités par l'intermédiaire d'une onde évanescente générée au niveau de l'interface verre/cellule. L'intensité de cette onde évanescente décroît exponentiellement selon l'axe orthogonal à cette interface (axe z) avec une profondeur de pénétration connue. Il est par conséquent possible de déterminer les mouvements des GS suivant l'axe z grâce à la mesure des variations de leur intensité (Steyer and Almers, 1999 ; Oheim and Stuhmer, 2000 ; Johns, Levitan et al., 2001).

Afin d'évaluer l'intensité d'un GS sur une image donnée, le "profil d'étalement de la fluorescence" $I_{fluo}(r)$ associé à cet organite est tout d'abord déterminé (Figure 71, méthode dérivée de celle publiée par Zenisek et ses collaborateurs, voir (Zenisek, Steyer et al., 2002)). Pour cela, l'intensité de fluorescence est mesurée sur des cercles centrés sur la position du GS déterminée par suivi de particule dans le plan (x,y) . Le rayon de ces cercles r est égal à un nombre entier de pixel. $I_{fluo}(r = 0)$ correspond à l'intensité du pixel central. Pour $r \geq 1$, $I_{fluo}(r)$ correspond à la moyenne de l'intensité mesurée sur 100 points répartis uniformément le long du cercle de rayon r . Cette procédure est appliquée pour des rayons r croissants jusqu'à ce que $I_{fluo}(r)$ cesse de décroître ($r = r_{max}$). $I_{fluo}(r_{max})$ correspond ainsi à l'intensité du fond au niveau du GS. $I_{fluo}(r)$ est alors ajusté par une fonction gaussienne :

$$I_{fit}(r) = I_0 e^{\left(\frac{-r}{\sigma}\right)^2} + I_{bg} , \quad (9)$$

avec I_0 et σ les paramètres d'ajustement et $I_{bg} = I_{fluo}(r_{max})$, l'intensité du fond. L'intensité I_{ves} du GS correspond alors à l'aire sous cet ajustement gaussien donnée par la relation : $I_{ves} = I_0 \cdot \sigma$.

En répétant cette procédure le long de la trajectoire dans le plan (x,y) décrite par le GS considéré, les variations d'intensité de cet organite en fonction du temps $I_{ves}(t)$ peuvent être déterminées. Les mouvements de ce GS suivant l'axe z sont alors calculés grâce à la relation suivante :

$$z(t) = -\delta \ln \left(\frac{I_{ves}(t)}{I_{ves}(0)} \right), \quad (10)$$

avec δ la profondeur de pénétration de l'onde évanescente.

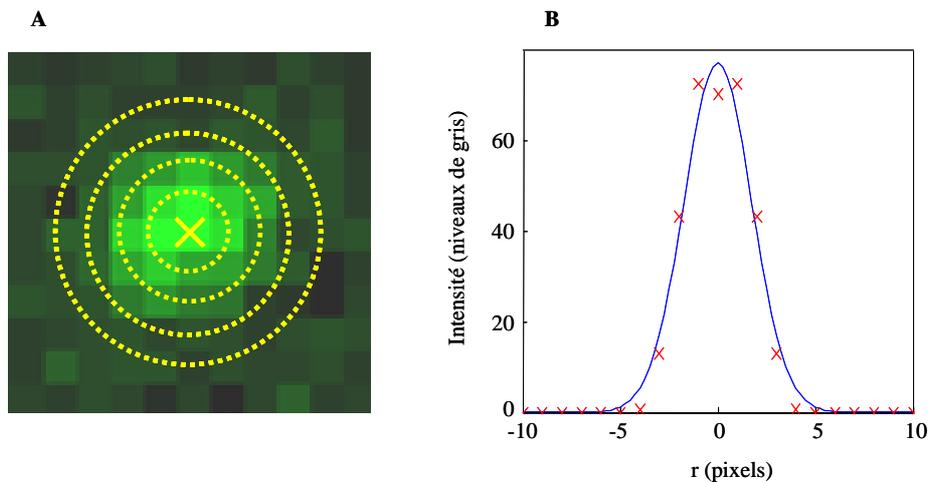


Figure 71 : Méthode d'évaluation de l'intensité des granules. (A) Mesure de l'intensité de fluorescence moyenne sur des cercles centrés sur la position du GS et dont le rayon r est égal à un nombre entier de pixel. (B) Courbe représentant les valeurs d'intensité de fluorescence obtenues en fonction de r après soustraction du fond (croix rouges). Cette courbe est ajustée par une fonction gaussienne (courbe bleue).

5.4.1.3. Evaluation de la précision de la méthode de suivi tridimensionnel

Afin de déterminer la précision de notre méthode de suivi tridimensionnel des granules, nous l'avons appliqué à des billes fluorescentes (200 nm de diamètre, marquées par la fluorescéine, Polysciences, Inc.) immobilisées à la surface d'une lamelle de verre et éclairées par une onde évanescente dont la profondeur de pénétration était de 200 nm. Les billes suivies présentaient des RSB voisins de ceux caractérisant les GS (en moyenne le RSB de ces billes était égal à 14). L'incertitude sur la position de ces billes suivant les axes x et y a alors été évaluée à 16 ± 3 nm (moyenne sur 34 billes, l'incertitude correspond à la déviation standard) pour la méthode de suivi utilisant l'algorithme disponible sur le logiciel Metamorph et à 15 ± 5 nm (moyenne sur 24 billes) pour la méthode de suivi automatique. L'incertitude suivant l'axe z est quant à elle égale à 15 ± 3 nm (moyenne sur 58 billes). Pour une profondeur d'évanescence de

200 nm, la précision de notre méthode de suivi tridimensionnel est donc identique suivant les axes x, y et z.

5.4.1.4. Validation de la méthode de suivi tridimensionnel

Afin de valider notre méthode de suivi tridimensionnel, et en particulier le fait que l'on puisse utiliser les variations d'intensité des objets suivis pour évaluer leurs mouvements suivant l'axe z, nous avons appliqué cette méthode à l'étude de la dynamique de billes fluorescentes plongées dans un milieu visqueux. Nous avons cherché à nous placer dans des conditions expérimentales telles que le coefficient de diffusion de ces billes soit proche de celui obtenu pour les GS présentant des mouvements diffusifs (*i.e.* $D \approx 2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, voir Tableau 2) dans le cas des cellules BON.

Pour ces observations, les billes étaient ainsi plongées dans un mélange de glycerol et d'eau (75-80 % de glycérol en volume) dont la viscosité était de 50-80 centipoises (cP). Pour une telle viscosité, des billes de 200 nm de diamètre (*i.e.* dont la taille est proche de celle des GS) présentent un coefficient de diffusion nettement plus élevé que celui des GS ($D_{\text{bille}} / D_{\text{ves}} \approx 15$). Cependant, pour des mélanges de viscosité plus importante présentant une proportion plus élevée de glycérol, il était difficile d'atteindre la réflexion totale au niveau de l'interface verre/milieu. En effet, l'indice de réfraction du glycérol est proche de celui du verre ($n_{\text{glycerol}} = 1,48$) et de plus notre montage ne nous permet pas d'atteindre des angles d'incidence supérieurs à 73-74 degrés pour le faisceau laser générant l'onde évanescente. Afin d'obtenir des coefficients de diffusion plus faibles, nous avons alors utilisés des billes de diamètre plus élevé (475 nm). La taille de ces billes est toutefois toujours suffisamment faible pour qu'elles apparaissent comme des spots fluorescents limités par la diffraction sur les images obtenues. Nous avons alors réalisé des séquences d'acquisition à une cadence de 10 Hz, la profondeur de pénétration de l'onde évanescente étant de 200 nm. Les coefficients de diffusion des billes calculés à partir des trajectoires tridimensionnelles (voir plus loin) étaient alors égaux à $D_{xy} = (13 \pm 3) \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $D_z = (5 \pm 2) \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (moyenne sur 40 billes, les incertitudes correspondent aux déviations standards). Ces valeurs sont proches de celles calculées théoriquement dans le cas d'une particule se déplaçant à proximité d'une interface plane (Brenner, 1961 ; Goldman, Cox et al., 1967 ; Banerjee and Kihm, 2005). Ainsi, pour une taille de billes et une viscosité du milieu dans lequel elles sont plongées identiques à celles utilisées expérimentalement, et en considérant que la distance moyenne entre les billes et l'interface est

comparable à la profondeur d'évanescence, les valeurs théoriques des coefficients de diffusion sont $D_{xy} = (8-13) \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $D_z = (5-7) \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$, la viscosité du milieu étant égale respectivement à 80 et 50 cP.

Ces résultats permettent donc de valider la méthode de suivi tridimensionnel utilisée pour l'analyse des mouvements des GS.

5.4.2. Calcul des coefficients de diffusion à partir des trajectoires décrites par les granules

Le coefficient de diffusion d'un GS est déterminé à partir de l'analyse de la courbe du déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction de Δt (intervalle de temps séparant deux positions sur la trajectoire). Le MSD suivant l'axe x est calculé grâce à la relation :

$$MSD_x(n\delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{k=1}^{N-n} \{ [x((k+n)\delta t) - x(k\delta t)]^2 \}, \quad (11)$$

avec δt l'intervalle de temps entre deux positions successives sur la trajectoire, n un entier ($\Delta t = n \delta t$) et N le nombre total de positions sur la trajectoire considérée. Le MSD suivant les axes y et z est calculé de la même façon. Le MSD associé aux mouvements des GS dans le plan (x,y) est alors égal à $MSD_{xy} = MSD_x + MSD_y$. De même, si l'on considère les mouvements dans les trois dimensions de l'espace, on a $MSD_{xyz} = MSD_x + MSD_y + MSD_z$. Un ajustement linéaire des cinq premiers points de la courbe du MSD est ensuite réalisé¹². Pour cet ajustement, chaque point est affecté d'un poids correspondant à l'inverse de la variance relative V_{rel} de ce point calculée à partir de la relation (dérivée de (Qian, Sheetz et al., 1991)):

$$V_{rel}(n) = \frac{n(2n^2 + 1)}{N - n + 1}, \quad (12)$$

Si p désigne la pente de cet ajustement linéaire, alors le coefficient de diffusion du GS est égal à $p / (2d)$ avec $d = 1, 2$ ou 3 suivant que le MSD a été calculé en 1, 2 ou 3 dimensions.

Afin d'évaluer les variations du coefficient de diffusion bidimensionnel D_{xy} au cours des trajectoires des GS, une fenêtre d'analyse glissante de 25 points a été utilisée. Pour chaque position de cette fenêtre, le D_{xy} a été calculé comme décrit ci-dessus. La valeur obtenue est

¹² Dans le cas de la mesure du coefficient de diffusion D_{act} des GS semblant fixés aux filaments d'actine (observations en double marquage), l'ajustement linéaire est réalisé uniquement sur les deux premiers points du MSD (sans pondération) en raison du faible nombre de points sur les trajectoires (cadences d'acquisitions comprises entre 0,5 et 4 Hz).

alors affectée à l'ensemble des points de la trajectoire inclus dans la fenêtre. Par conséquent, chaque point de la trajectoire est associé à plusieurs valeurs de D_{xy} car la fenêtre d'analyse englobe plusieurs fois le même point. La valeur finale du D_{xy} pour chaque point de la trajectoire correspond alors à la moyenne de ces valeurs.

5.5. La méthode de corrélation d'images

L'objectif de la méthode de corrélation spatio-temporelle d'images mise au point par l'équipe dirigée par le professeur Wiseman au sein de l'Université McGill (Montréal, Canada) est d'analyser les fluctuations d'intensité sur des séquences d'images obtenue par microscopie de fluorescence afin notamment d'en extraire une éventuelle composante correspondant à un transport suivant une direction privilégiée (Hebert, Costantino et al., 2005).

En résumé, pour une zone donnée de la séquence d'images analysée, la fonction de corrélation spatio-temporelle est tout d'abord calculée. Cette fonction est ensuite filtrée afin d'éliminer la composante non mobile. L'analyse de l'évolution de la fonction de corrélation au cours du temps permet alors de déterminer si les fluctuations d'intensité observées correspondent plutôt à une dynamique brownienne, un transport suivant une direction particulière ou une superposition de ces deux types de dynamiques. Dans le cas où un phénomène de transport est mis en évidence, il est possible d'évaluer sa direction et sa vitesse moyennes.

5.6. Analyses statistiques

Sauf mention contraire, l'incertitude donnée pour les valeurs expérimentales correspond à l'erreur standard. Afin de vérifier si deux distributions étaient significativement différentes, nous avons utilisé, lorsqu'ils étaient applicables, les tests statistiques de Mann-Whitney ou Kolmogorov-Smirnov.

Annexe : Protocoles supplémentaires

Les protocoles supplémentaires décrits dans cette annexe sont des protocoles que je n'ai pas appliqués personnellement mais qui ont été utilisés au cours de certaines expériences décrites dans ce manuscrit de thèse.

5.7. Test de sécrétion sur population

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes 24 puits, à une densité de 300 000 cellules par puits. Après deux jours de culture à 37°C, le milieu des puits de culture est remplacé par 500 µL de milieu complet contenant 100 nM de sérotonine tritiée (Amersham Pharmacia Biotech, 5-20 Ci/mmol). Après 2h à 37°C, les cellules sont lavées avec 500 µL de solution de Locke, et remises à 37°C pendant 2h dans du milieu de culture complet. Les cellules sont ensuite à nouveau rincées (2 x 5 min dans du Locke). La sécrétion est stimulée par 500 µl de Locke complété avec le sécrétagogue voulu (acétylcholine, baryum...), les conditions non stimulées sont réalisées en présence de solution de Locke. Après 10 minutes d'incubation, le surnageant est collecté, et les cellules reprises dans 0,5 ml d'une solution détergente de Triton X-100 (1%) additionnée d'EDTA (1 mM). La radioactivité présente dans le surnageant et les cellules est déterminée par comptage par scintillation.

5.8. Etablissement des lignées stables

Afin d'obtenir des cellules BON exprimant constitutivement NPY-GFP, des transfections stables ont été réalisées. Pour cela, $5 \cdot 10^6$ cellules ont été mélangées à 5 µg d'ADN plasmidique NPY-GFP et électroporées comme décrit précédemment. Après ajout de 10 mL de milieu de culture complet, les cellules ont été déposées sur boîte de culture. 48 h après la transfection, 0.8 mg/mL de G418 (Sigma-Aldrich) a été ajouté dans le milieu de culture, cet antibiotique permettant de sélectionner les cellules ayant incorporées dans leur génome l'ADN recombinant. Les cellules sont alors maintenues en culture en présence de l'agent sélectif jusqu'à apparition de colonies visibles à l'œil nu. Ces colonies sont alors prélevées par aspiration et transférées chacune dans un puits d'une plaque 24 puits. 100 µL de trypsine/EDTA sont ajoutés afin de dissocier les cellules et après 5 min d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par 500 µL de milieu de culture complet dépourvu d'agent de sélection.

Lorsque les cellules atteignent la confluence, elles sont décollées par un traitement à la trypsine et mises en culture en flacon de 75 cm². Chacun des clones stables obtenus a été observé en épifluorescence afin de vérifier qu'il exprimait correctement la NPY-GFP puis en microscopie TIRF afin de contrôler que les cellules s'étaient correctement étalées sur lamelle de verre. La réponse à différents sécrétagogues des clones ainsi sélectionnés est ensuite testée grâce à des tests de sécrétion sur population.

5.9. Transfection des cellules BON par lipofection pour les expériences d'interférence à l'ARN

Les cellules sont mises en culture sur des boîtes à fond en verre à raison de 100 000 cellules par boîte. Elles sont ensuite transfectées avec le RNAi par lipofection une fois par jour pendant trois jours avec, pour une boîte, 0,25µL de Dharmafect (Dharmacon), et 100nM final de RNAi. Le mélange lipofectant/ARN, réalisé dans du milieu de culture sans sérum, est déposé sur les cellules baignant dans du milieu complet. Dans le cas des observations en microscopie, la seconde transfection est remplacée par une co-transfection du RNAi et du plasmide codant pour la NPY-GFP. Le mélange de transfection, réalisé dans du milieu sans sérum, est composé, pour une boîte, de 0,3µg du plasmide codant pour la NPY-GFP, 100nM de RNAi et 4µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Ce mélange est laissé au contact des cellules pendant 3 heures puis remplacé par du milieu complet. Les cellules sont alors observées le quatrième jour.

Les séquences des RNAi utilisées afin d'inhiber l'expression de la myosine Va d'origine humaine sont les suivantes : pour le RNAi 1 : 5'-GAACAAAUGUGCACUCUUUUU et pour le RNAi 2 : 5'-AAAGUAAGGUCGUUGCUGAAUU. Les RNAi témoins étaient soit un siGLO Lamin A/C (Dharmacon), soit un RNAi dirigé contre la EGFP : 5'-GCAAGCUGACCCUGAAGUU.

5.10. Co-immunoprécipitation

Le protocole de co-immunoprécipitation est décrit dans l'article publié dans *The Journal of Cell Biology* (voir article joint à la fin de la partie 3.3. intitulée "Le rôle de Rab27A et MyRIP dans l'accrochage des granules de sécrétion au cortex d'actine").

Abréviations :

GS : granule de sécrétion

VS : vésicule synaptique

TIRF : total internal reflection fluorescence microscopy

NSF : N-ethylmaleimide-sensitive factor

SNAP : soluble NSF attachment protein

SNARE : soluble NSF attachment protein receptor

SNAP25 : synaptosomal associated protein of 25 kDa

MSD : mean square displacement

EGFP : enhanced green fluorescent protein

NPY : neuropeptide Y

mRFP : monomeric red fluorescent protein

MyRIP: myosin VIIa and Rab interacting protein

MyRIP-RBD: MyRIP-Rab binding domain

RSB : rapport signal à bruit

Références bibliographiques

- Alberts, B., A. Johnson, et al. (2002). Molecular biology of the cell, Garland Science.
- Albillos, A., G. Dernick, et al. (1997). "The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry." Nature **389**(6650): 509-12.
- Ales, E., L. Tabares, et al. (1999). "High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism." Nat Cell Biol **1**(1): 40-4.
- Allersma, M. W., L. Wang, et al. (2004). "Visualization of regulated exocytosis with a granule-membrane probe using total internal reflection microscopy." Mol Biol Cell **15**(10): 4658-68.
- Amatore, C., Y. Bouret, et al. (2000). "Interplay between membrane dynamics, diffusion and swelling pressure governs individual vesicular exocytotic events during release of adrenaline by chromaffin cells." Biochimie **82**(5 SU -): 481-496.
- An, S. and D. Zenisek (2004). "Regulation of exocytosis in neurons and neuroendocrine cells." Curr Opin Neurobiol **14**(5): 522-30.
- An, S. J. and W. Almers (2004). "Tracking SNARE Complex Formation in Live Endocrine Cells." Science **306**(5698): 1042-1046.
- Aravanis, A. M., J. L. Pyle, et al. (2003). "Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity." Nature **423**(6940): 643-7.
- Avery, J., D. J. Ellis, et al. (2000). "A cell-free system for regulated exocytosis in PC12 cells." J Cell Biol **148**(2): 317-24.
- Axelrod, D. (1981). "Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence." J Cell Biol **89**(1): 141-5.
- Axelrod, D. (2001). "Selective imaging of surface fluorescence with very high aperture microscope objectives." J Biomed Opt **6**(1): 6-13.
- Axelrod, D. (2001). "Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology." Traffic **2**(11): 764-74.
- Bader, M. F., F. Doussau, et al. (2004). "Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases." Biochim Biophys Acta **1742**(1-3): 37-49.
- Baker, J. E., E. B. Kremmentsova, et al. (2004). "Myosin V processivity: multiple kinetic pathways for head-to-head coordination." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5542-6.
- Banerjee, A., V. A. Barry, et al. (1996). "N-Ethylmaleimide-sensitive factor acts at a prefusion ATP-dependent step in Ca²⁺-activated exocytosis." J Biol Chem **271**(34): 20223-6.
- Banerjee, A. and K. D. Kihm (2005). "Experimental verification of near-wall hindered diffusion for the Brownian motion of nanoparticles using evanescent wave microscopy." Physical Review E **72**(042101).
- Becherer, U., T. Moser, et al. (2003). "Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles." Nat Neurosci **6**(8): 846-53.
- Bereiter-Hahn, J., C. H. Fox, et al. (1979). "Quantitative reflection contrast microscopy of living cells." J Cell Biol **82**(3): 767-79.
- Bittner, M. A. and R. W. Holz (2005). "Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate: actin dynamics and the regulation of ATP-dependent and -independent secretion." Mol Pharmacol **67**(4): 1089-98.

- Bonifacino, J. S. and B. S. Glick (2004). "The mechanisms of vesicle budding and fusion." Cell **116**(2): 153-66.
- Bornfleth, H., P. Edelmann, et al. (1999). "Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy." Biophys J **77**(5): 2871-86.
- Brandhorst, D., D. Zwilling, et al. (2006). "Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Brenner, H. (1961). "The slow motion of a sphere through a viscous fluid towards a plane surface." Chem Eng Sci **16**: 242-251.
- Bridgman, P. C. (1999). "Myosin Va movements in normal and dilute-lethal axons provide support for a dual filament motor complex." J Cell Biol **146**(5): 1045-60.
- Brown, S. S. (1999). "Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 63-80.
- Bubb, M. R., A. M. Senderowicz, et al. (1994). "Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin." J Biol Chem **269**(21): 14869-71.
- Burgoyne, R. D. and M. J. Clague (2003). "Calcium and calmodulin in membrane fusion." Biochim Biophys Acta **1641**(2-3): 137-43.
- Carlsson, A. E., A. D. Shah, et al. (2002). "Quantitative analysis of actin patch movement in yeast." Biophys J **82**(5): 2333-43.
- Chabrilat, M. L., C. Wilhelm, et al. (2005). "Rab8 regulates the actin-based movement of melanosomes." Mol Biol Cell **16**(4): 1640-50.
- Chanat, E., U. Weiss, et al. (1993). "Reduction of the disulfide bond of chromogranin B (secretogranin I) in the trans-Golgi network causes its missorting to the constitutive secretory pathways." Embo J **12**(5): 2159-68.
- Chanturiya, A., E. Leikina, et al. (1999). "Short-chain alcohols promote an early stage of membrane hemifusion." Biophys J **77**(4): 2035-45.
- Chen, Y. A., S. J. Scales, et al. (1999). "SNARE complex formation is triggered by Ca²⁺ and drives membrane fusion." Cell **97**(2): 165-74.
- Chernomordik, L., A. Chanturiya, et al. (1995). "The hemifusion intermediate and its conversion to complete fusion: regulation by membrane composition." Biophys J **69**(3): 922-9.
- Chernomordik, L. V. and M. M. Kozlov (2003). "Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes." Annu Rev Biochem **72**: 175-207.
- Chernomordik, L. V. and M. M. Kozlov (2005). "Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps." Cell **123**(3): 375-82.
- Coorsen, J. R., P. S. Blank, et al. (1998). "Biochemical and functional studies of cortical vesicle fusion: the SNARE complex and Ca²⁺ sensitivity." J Cell Biol **143**(7): 1845-57.
- Cordonnier, M. N., D. Dauzonne, et al. (2001). "Actin filaments and myosin I alpha cooperate with microtubules for the movement of lysosomes." Mol Biol Cell **12**(12): 4013-29.
- Croxall, J. P., J. R. Silk, et al. (2005). "Global circumnavigations: tracking year-round ranges of nonbreeding albatrosses." Science **307**(5707): 249-50.
- Curtis, A. S. (1964). "The Mechanism of Adhesion of Cells to Glass. A Study by Interference Reflection Microscopy." J Cell Biol **20**: 199-215.

- Daumas, F., N. Destainville, et al. (2003). "Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking." *Biophys J* **84**(1): 356-66.
- de Win, A. H., E. S. Pierson, et al. (1999). "Rational analyses of organelle trajectories in tobacco pollen tubes reveal characteristics of the actomyosin cytoskeleton." *Biophys J* **76**(3): 1648-58.
- Deacon, S. W., A. S. Serpinskaya, et al. (2003). "Dynactin is required for bidirectional organelle transport." *J Cell Biol* **160**(3): 297-301.
- Desnos, C., M. P. Laran, et al. (1995). "Long term stimulation changes the vesicular monoamine transporter content of chromaffin granules." *J Biol Chem* **270**(27): 16030-8.
- Ehre, C., A. H. Rossi, et al. (2005). "Barrier role of actin filaments in regulated mucin secretion from airway goblet cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(1): C46-56.
- Eitzen, G. (2003). "Actin remodeling to facilitate membrane fusion." *Biochim Biophys Acta* **1641**(2-3): 175-81.
- El-Amraoui, A., J. S. Schonn, et al. (2002). "MyRIP, a novel Rab effector, enables myosin VIIa recruitment to retinal melanosomes." *EMBO Rep* **3**(5): 463-70.
- Etienne-Manneville, S., J. B. Manneville, et al. (2005). "Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association ofDlg1 and APC to control cell polarization." *J Cell Biol* **170**(6): 895-901.
- Evers, B. M., C. M. Townsend, Jr., et al. (1991). "Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth." *Gastroenterology* **101**(2): 303-11.
- Fasshauer, D., W. Antonin, et al. (1999). "Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties." *J Biol Chem* **274**(22): 15440-6.
- Fasshauer, D. and M. Margittai (2004). "A transient N-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly." *J Biol Chem* **279**(9): 7613-21.
- Feder, T. J., I. Brust-Mascher, et al. (1996). "Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces: a new interpretation." *Biophys J* **70**(6): 2767-73.
- Fujiwara, T., K. Ritchie, et al. (2002). "Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane." *J Cell Biol* **157**(6): 1071-81.
- Fukuda, M. and T. S. Kuroda (2002). "Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin." *J Biol Chem* **277**(45): 43096-103.
- Fukuda, M. and T. S. Kuroda (2004). "Missense mutations in the globular tail of myosin-Va in dilute mice partially impair binding of Slac2-a/melanophilin." *J Cell Sci* **117**(Pt 4): 583-91.
- Fukuda, M., T. S. Kuroda, et al. (2002). "Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport." *J Biol Chem* **277**(14): 12432-6.
- Fulop, T., S. Radabaugh, et al. (2005). "Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells." *J Neurosci* **25**(32): 7324-32.
- Garner, C. C., S. Kindler, et al. (2000). "Molecular determinants of presynaptic active zones." *Curr Opin Neurobiol* **10**(3): 321-7.
- Gasman, S., S. Chasserot-Golaz, et al. (2004). "Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments." *Mol Biol Cell* **15**(2): 520-31.
- Ghosh, R. N. and W. W. Webb (1994). "Automated detection and tracking of individual and clustered cell surface low density lipoprotein receptor molecules." *Biophys J* **66**(5): 1301-18.

- Gil, A., J. Rueda, et al. (2000). "The F-actin cytoskeleton modulates slow secretory components rather than readily releasable vesicle pools in bovine chromaffin cells." Neuroscience **98**(3): 605-14.
- Gillis, K. D. and R. H. Chow (1997). "Kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells." Semin Cell Dev Biol **8**(2): 133-40.
- Giner, D., P. Neco, et al. (2005). "Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton during secretion from chromaffin cells." J Cell Sci **118**(Pt 13): 2871-80.
- Giraud, C. G., C. Hu, et al. (2005). "SNAREs can promote complete fusion and hemifusion as alternative outcomes." J Cell Biol **170**(2): 249-60.
- Goldman, A. J., R. G. Cox, et al. (1967). "Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall-1 Motion through a quiescent fluid." Chem Eng Sci **22**: 637-651.
- Gomi, H., S. Mizutani, et al. (2005). "Granuphilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery." J Cell Biol **171**(1): 99-109.
- Goos, F. and H. Hänchen (1947). "Ein neuer und fundamentaler Versuch zur Total-reflexion." Ann. Phys. (Leipzig) **1**(6): 333-346.
- Graf, R., J. Rietdorf, et al. (2005). "Live cell spinning disk microscopy." Adv Biochem Eng Biotechnol **95**: 57-75.
- Graham, M. E., D. W. O'Callaghan, et al. (2002). "Dynamin-dependent and dynamin-independent processes contribute to the regulation of single vesicle release kinetics and quantal size." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 7124-9.
- Gross, S. P., M. C. Tuma, et al. (2002). "Interactions and regulation of molecular motors in *Xenopus* melanophores." J Cell Biol **156**(5): 855-65.
- Gross, S. P., M. A. Welte, et al. (2002). "Coordination of opposite-polarity microtubule motors." J Cell Biol **156**(4): 715-24.
- Hafez, I., K. Kisler, et al. (2005). "Electrochemical imaging of fusion pore openings by electrochemical detector arrays." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13879-84.
- Han, X. and M. B. Jackson (2006). "Structural transitions in the synaptic SNARE complex during Ca²⁺-triggered exocytosis." J Cell Biol **172**(2): 281-93.
- Han, X., C. T. Wang, et al. (2004). "Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca²⁺-triggered exocytosis." Science **304**(5668): 289-92.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." Nature **418**(6894): 244-51.
- Harata, N. C., S. Choi, et al. (2006). "Frequency-dependent kinetics and prevalence of kiss-and-run and reuse at hippocampal synapses studied with novel quenching methods." Neuron **49**(2): 243-56.
- Hebert, B., S. Costantino, et al. (2005). "Spatiotemporal Image Correlation Spectroscopy (STICS) Theory, Verification, and Application to Protein Velocity Mapping in Living CHO Cells." Biophys J **88**(5): 3601-14.
- Hellen, E. H. and D. Axelrod (1987). "Fluorescence emission at dielectric and metal-film interfaces." J. Opt. Soc. Am. B **4**(3): 337-350.
- Henkel, A. W. and W. Almers (1996). "Fast steps in exocytosis and endocytosis studied by capacitance measurements in endocrine cells." Curr Opin Neurobiol **6**(3): 350-7.
- Henry, J. P., C. Sagne, et al. (1998). "The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain." Neurochem Int **32**(3): 227-46.

- Heun, P., T. Laroche, et al. (2001). "Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus." *Science* **294**(5549): 2181-6.
- Heuser, J. (2000). "The production of 'cell cortices' for light and electron microscopy." *Traffic* **1**(7): 545-52.
- Heuvingsh, J., F. Pincet, et al. (2004). "Hemifusion and fusion of giant vesicles induced by reduction of inter-membrane distance." *Eur Phys J E Soft Matter* **14**(3): 269-76.
- Hiesinger, P. R., A. Fayyazuddin, et al. (2005). "The v-ATPase V0 subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*." *Cell* **121**(4): 607-20.
- Hirokawa, N. (1998). "Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport." *Science* **279**(5350): 519-26.
- Holroyd, P., T. Lang, et al. (2002). "Imaging direct, dynamin-dependent recapture of fusing secretory granules on plasma membrane lawns from PC12 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16806-11.
- Hsu, S. C., D. TerBush, et al. (2004). "The exocyst complex in polarized exocytosis." *Int Rev Cytol* **233**: 243-65.
- Hua, S. Y. and M. P. Charlton (1999). "Activity-dependent changes in partial VAMP complexes during neurotransmitter release." *Nat Neurosci* **2**(12): 1078-83.
- Huang, J. D., S. T. Brady, et al. (1999). "Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors." *Nature* **397**(6716): 267-70.
- Ivarsson, R., X. Jing, et al. (2005). "Myosin 5a controls insulin granule recruitment during late-phase secretion." *Traffic* **6**(11): 1027-35.
- Jahn, R., T. Lang, et al. (2003). "Membrane fusion." *Cell* **112**(4): 519-33.
- Jaiswal, J. K., N. W. Andrews, et al. (2002). "Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells." *J Cell Biol* **159**(4): 625-35.
- Johns, L. M., E. S. Levitan, et al. (2001). "Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells." *J Cell Biol* **153**(1): 177-90.
- Katz, B. (1962). "The transmission of impulses from nerve to muscle, and the subcellular unit of synaptic action." *Proc R Soc London Ser B* **155**: 455-477.
- Klenchin, V. A. and T. F. J. Martin (2000). "Priming in exocytosis: Attaining fusion-competence after vesicle docking." *Biochimie* **82**(5 SU -): 399-407.
- Klumperman, J., R. Kuliawat, et al. (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**(2): 359-71.
- Koh, T. W. and H. J. Bellen (2003). "Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release." *Trends Neurosci* **26**(8): 413-22.
- Kopell, W. N. and E. W. Westhead (1982). "Osmotic pressures of solutions of ATP and catecholamines relating to storage in chromaffin granules." *J Biol Chem* **257**(10): 5707-10.
- Kozlovsky, Y. and M. M. Kozlov (2002). "Stalk model of membrane fusion: solution of energy crisis." *Biophys J* **82**(2): 882-95.
- Krementsov, D. N., E. B. Krementsova, et al. (2004). "Myosin V: regulation by calcium, calmodulin, and the tail domain." *J Cell Biol* **164**(6): 877-86.
- Kromer, A., M. M. Glombik, et al. (1998). "Essential role of the disulfide-bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis." *J Cell Biol* **140**(6): 1331-46.

- Krylyshkina, O., K. I. Anderson, et al. (2003). "Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions." J Cell Biol **161**(5): 853-9.
- Kuhn, J. R. and T. D. Pollard (2004). "Real time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy." Biophys J.
- Kuliawat, R., J. Klumperman, et al. (1997). "Differential sorting of lysosomal enzymes out of the regulated secretory pathway in pancreatic beta-cells." J Cell Biol **137**(3): 595-608.
- Kusumi, A., Y. Sako, et al. (1993). "Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells." Biophys J **65**(5): 2021-40.
- Lakadamyali, M., M. J. Rust, et al. (2003). "Visualizing infection of individual influenza viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9280-5.
- Lang, T., D. Bruns, et al. (2001). "SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis." Embo J **20**(9): 2202-13.
- Lang, T., I. Wacker, et al. (1997). "Ca²⁺-triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy." Neuron **18**(6): 857-63.
- Lang, T., I. Wacker, et al. (2000). "Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells." Biophys J **78**(6): 2863-77.
- Lanni, F., A. S. Waggoner, et al. (1985). "Structural organization of interphase 3T3 fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy." J Cell Biol **100**(4): 1091-102.
- Leduc, C., O. Campas, et al. (2004). "Cooperative extraction of membrane nanotubes by molecular motors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17096-101.
- Levi, V., V. I. Gelfand, et al. (2006). "Melanosomes Transported by Myosin-V in Xenopus Melanophores Perform Slow 35 nm Steps." Biophys J **90**(1): L07-9.
- Levi, V., Q. Ruan, et al. (2005). "3-D particle tracking in a two-photon microscope: application to the study of molecular dynamics in cells." Biophys J **88**(4): 2919-28.
- Levi, V., Q. Ruan, et al. (2005). "Chromatin dynamics in interphase cells revealed by tracking in a two-photon excitation microscope." Biophys J **89**(6): 4275-85.
- Levi, V., A. S. Serpinskaya, et al. (2006). "Organelle Transport along Microtubules in Xenopus Melanophores: Evidence for Cooperation between Multiple Motors." Biophys J **90**(1): 318-27.
- Li, C. H., L. Bai, et al. (2004). "Dynamic tracking and mobility analysis of single GLUT4 storage vesicle in live 3T3-L1 cells." Cell Res **14**(6): 480-6.
- Li, D., J. Xiong, et al. (2004). "Three-dimensional tracking of single secretory granules in live PC12 cells." Biophys J **87**(3): 1991-2001.
- Li, G., E. Rungger-Brandle, et al. (1994). "Effect of disruption of actin filaments by Clostridium botulinum C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets." Mol Biol Cell **5**(11): 1199-213.
- Lindau, M. and G. Alvarez de Toledo (2003). "The fusion pore." Biochim Biophys Acta **1641**(2-3): 167-73.
- Lizunov, V. A., H. Matsumoto, et al. (2005). "Insulin stimulates the halting, tethering, and fusion of mobile GLUT4 vesicles in rat adipose cells." J Cell Biol **169**(3): 481-9.
- Loerke, D., B. Preitz, et al. (2000). "Super-resolution measurements with evanescent-wave fluorescence excitation using variable beam incidence." J Biomed Opt **5**(1): 23-30.

- Ma, L., V. P. Bindokas, et al. (2004). "Direct imaging shows that insulin granule exocytosis occurs by complete vesicle fusion." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Ma, S. and R. L. Chisholm (2002). "Cytoplasmic dynein-associated structures move bidirectionally in vivo." J Cell Sci **115**(Pt 7): 1453-60.
- Mallik, R. and S. P. Gross (2004). "Molecular motors: strategies to get along." Curr Biol **14**(22): R971-82.
- Manneville, J. B., S. Etienne-Manneville, et al. (2003). "Interaction of the actin cytoskeleton with microtubules regulates secretory organelle movement near the plasma membrane in human endothelial cells." J Cell Sci **116**(Pt 19): 3927-38.
- Mark, B. L., O. Jilkina, et al. (1996). "Association of Ral GTP-binding protein with human platelet dense granules." Biochem Biophys Res Commun **225**(1): 40-6.
- Marks, M. S. and M. C. Seabra (2001). "The melanosome: membrane dynamics in black and white." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 738-48.
- Marrink, S. J. and A. E. Mark (2003). "The mechanism of vesicle fusion as revealed by molecular dynamics simulations." J. Am. Chem. Soc. **125**: 11144-11145.
- Martin, D. S., M. B. Forstner, et al. (2002). "Apparent subdiffusion inherent to single particle tracking." Biophys J **83**(4): 2109-17.
- Martin, M., S. J. Iyadurai, et al. (1999). "Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport." Mol Biol Cell **10**(11): 3717-28.
- Mathur, A. B., G. A. Truskey, et al. (2000). "Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells." Biophys J **78**(4): 1725-35.
- Matter, K., F. Dreyer, et al. (1989). "Actin involvement in exocytosis from PC12 cells: studies on the influence of botulinum C2 toxin on stimulated noradrenaline release." J Neurochem **52**(2): 370-6.
- Mayer, A. (2002). "Membrane fusion in eukaryotic cells." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 289-314.
- Mazia, D., G. Schatten, et al. (1975). "Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy." J Cell Biol **66**(1): 198-200.
- McBride, H. M., V. Rybin, et al. (1999). "Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13." Cell **98**(3): 377-86.
- Meier, J., C. Vannier, et al. (2001). "Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin." Nat Neurosci **4**(3): 253-60.
- Meilhac, N., L. Le Guyader, et al. (2006). "Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories." Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys **73**(1 Pt 1): 011915.
- Melia, T. J., T. Weber, et al. (2002). "Regulation of membrane fusion by the membrane-proximal coil of the t-SNARE during zippering of SNAREpins." J Cell Biol **158**(5): 929-40.
- Menasche, G., C. H. Ho, et al. (2003). "Griscelli syndrome restricted to hypopigmentation results from a melanophilin defect (GS3) or a MYO5A F-exon deletion (GS1)." J Clin Invest **112**(3): 450-6.
- Menasche, G., E. Pastural, et al. (2000). "Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome." Nat Genet **25**(2): 173-6.
- Merrifield, C. J., D. Perrais, et al. (2005). "Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells." Cell **121**(4): 593-606.

- Moore, M. S., D. T. Mahaffey, et al. (1987). "Assembly of clathrin-coated pits onto purified plasma membranes." Science **236**(4801): 558-63.
- Morel, N., J. C. Dedieu, et al. (2003). "Specific sorting of the $\alpha 1$ isoform of the V-H+ATPase a subunit to nerve terminals where it associates with both synaptic vesicles and the presynaptic plasma membrane." J Cell Sci **116**(Pt 23): 4751-62.
- Morris, R. L. and P. J. Hollenbeck (1993). "The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth." J Cell Sci **104** (Pt 3): 917-27.
- Moskalenko, S., D. O. Henry, et al. (2002). "The exocyst is a Ral effector complex." Nat Cell Biol **4**(1): 66-72.
- Mousavi, S. A., L. Malerod, et al. (2004). "Clathrin-dependent endocytosis." Biochem J **377**(Pt 1): 1-16.
- Muallem, S., K. Kwiatkowska, et al. (1995). "Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells." J Cell Biol **128**(4): 589-98.
- Nakata, T. and N. Hirokawa (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**(6): 2186-97.
- Neco, P., D. Giner, et al. (2003). "Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells." Eur J Neurosci **18**(4): 733-42.
- Neco, P., D. Giner, et al. (2004). "New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin cells." J Biol Chem **279**(26): 27450-7.
- Ng, Y. K., X. Lu, et al. (2002). "Physical mobilization of secretory vesicles facilitates neuropeptide release by nerve growth factor-differentiated PC12 cells." J Physiol **542**(Pt 2): 395-402.
- Njus, D., P. M. Kelley, et al. (1986). "Bioenergetics of secretory vesicles." Biochim Biophys Acta **853**(3-4): 237-65.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." Cell **81**(1): 53-62.
- Obermuller, S., A. Lindqvist, et al. (2005). "Selective nucleotide-release from dense-core granules in insulin-secreting cells." J Cell Sci **118**(Pt 18): 4271-82.
- Ohara-Imaizumi, M., Y. Nakamichi, et al. (2002). "Imaging exocytosis of single insulin secretory granules with evanescent wave microscopy: distinct behavior of granule motion in biphasic insulin release." J Biol Chem **277**(6): 3805-8.
- Ohara-Imaizumi, M., C. Nishiwaki, et al. (2004). "Site of docking and fusion of insulin secretory granules in live MIN6 beta cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin 1 antibody and total internal reflection fluorescence microscopy." J Biol Chem **279**(9): 8403-8.
- Oheim, M., D. Loerke, et al. (1998). "The last few milliseconds in the life of a secretory granule. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)." Eur Biophys J **27**(2): 83-98.
- Oheim, M., D. Loerke, et al. (1999). "Multiple stimulation-dependent processes regulate the size of the releasable pool of vesicles." Eur Biophys J **28**(2): 91-101.
- Oheim, M. and W. Stuhmer (2000). "Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex." Eur Biophys J **29**(2): 67-89.
- Olivos Ore, L. and A. R. Artalejo (2004). "Intracellular Ca²⁺ microdomain-triggered exocytosis in neuroendocrine cells." Trends Neurosci **27**(3): 113-5.

- Olveczky, B. P., N. Periasamy, et al. (1997). "Mapping fluorophore distributions in three dimensions by quantitative multiple angle-total internal reflection fluorescence microscopy." Biophys J **73**(5): 2836-47.
- Palfrey, H. C. and C. R. Artalejo (1998). "Vesicle recycling revisited: rapid endocytosis may be the first step." Neuroscience **83**(4): 969-89.
- Pantaloni, D., C. Le Clainche, et al. (2001). "Mechanism of actin-based motility." Science **292**(5521): 1502-6.
- Parekh, D., J. Ishizuka, et al. (1994). "Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion." Pancreas **9**(1): 83-90.
- Parsons, T. D., J. R. Coorsen, et al. (1995). "Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells." Neuron **15**(5): 1085-96.
- Pastural, E., F. J. Barrat, et al. (1997). "GrisCELLI disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene." Nat Genet **16**(3): 289-92.
- Pawley, J. B. (1996). Handbook of Biological Confocal Microscopy. New York, Plenum Press.
- Perez, F., G. S. Diamantopoulos, et al. (1999). "CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo." Cell **96**(4): 517-27.
- Perrais, D., I. Kleppe, et al. (2004). "Recapture after exocytosis causes differential retention of protein in granules of bovine chromaffin cells." J Physiol.
- Peters, C., M. J. Bayer, et al. (2001). "Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion." Nature **409**(6820): 581-8.
- Polzin, A., M. Shipitsin, et al. (2002). "Ral-GTPase influences the regulation of the readily releasable pool of synaptic vesicles." Mol Cell Biol **22**(6): 1714-22.
- Pruyne, D. W., D. H. Schott, et al. (1998). "Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast." J Cell Biol **143**(7): 1931-45.
- Purcell, T. J., H. L. Sweeney, et al. (2005). "A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13873-8.
- Qian, H., M. P. Sheetz, et al. (1991). "Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems." Biophys J **60**(4): 910-21.
- Racine, V., A. Hertzog, et al. (2006). Multiple-Target Tracking of 3D Fluorescent Objects Based on Simulated Annealing. 2006 IEEE International symposium on biomedical imaging (ISBI 2006), Arlington, Virginia, USA.
- Reck-Peterson, S. L., D. W. Provance, Jr., et al. (2000). "Class V myosins." Biochim Biophys Acta **1496**(1): 36-51.
- Renshaw, D. and J. P. Hinson (2001). "Neuropeptide Y and the adrenal gland: a review." Peptides **22**(3): 429-38.
- Riven, I., E. Kalmanzon, et al. (2003). "Conformational rearrangements associated with the gating of the G protein-coupled potassium channel revealed by FRET microscopy." Neuron **38**(2): 225-35.
- Rizo, J. and T. C. Sudhof (2002). "Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion." Nat Rev Neurosci **3**(8): 641-53.
- Rodriguez, O. C., A. W. Schaefer, et al. (2003). "Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis." Nat Cell Biol **5**(7): 599-609.
- Rogers, S. L., I. S. Tint, et al. (1997). "Regulated bidirectional motility of melanophore pigment granules along microtubules in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3720-5.

- Rohrbach, A. (2000). "Observing secretory granules with a multiangle evanescent wave microscope." *Biophys J* **78**(5): 2641-54.
- Rose, S. D., T. Lejen, et al. (2003). "Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion." *J Neurochem* **85**(2): 287-98.
- Rothman, J. E. (1994). "Mechanisms of intracellular protein transport." *Nature* **372**(6501): 55-63.
- Rudnick, J. and G. Gaspari (1987). "The shapes of random walks." *Science* **237**: 384-389.
- Rudolf, R., T. Kogel, et al. (2003). "Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells." *J Cell Sci* **116**(Pt 7): 1339-48.
- Rudolf, R., T. Salm, et al. (2001). "Dynamics of immature secretory granules: role of cytoskeletal elements during transport, cortical restriction, and F-actin-dependent tethering." *Mol Biol Cell* **12**(5): 1353-65.
- Salas-Cortes, L., F. Ye, et al. (2005). "Myosin Ib modulates the morphology and the protein transport within multi-vesicular sorting endosomes." *J Cell Sci* **118**(Pt 20): 4823-32.
- Samson, F., J. A. Donoso, et al. (1979). "Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport." *J Pharmacol Exp Ther* **208**(3): 411-7.
- Saxton, M. J. (1993). "Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion." *Biophys J* **64**(6): 1766-80.
- Saxton, M. J. (1994). "Single-particle tracking: models of directed transport." *Biophys J* **67**(5): 2110-9.
- Schapper, F., J. T. Goncalves, et al. (2003). "Fluorescence imaging with two-photon evanescent wave excitation." *Eur Biophys J* **32**(7): 635-43.
- Simson, R., E. D. Sheets, et al. (1995). "Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis." *Biophys J* **69**(3): 989-93.
- Slepnev, V. I. and P. De Camilli (2000). "Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis." *Nat Rev Neurosci* **1**(3): 161-72.
- Small, J. V., T. Stradal, et al. (2002). "The lamellipodium: where motility begins." *Trends Cell Biol* **12**(3): 112-20.
- Sollner, T., M. K. Bennett, et al. (1993). "A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion." *Cell* **75**(3): 409-18.
- Sorensen, J. B., G. Nagy, et al. (2003). "Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23." *Cell* **114**(1): 75-86.
- Sorensen, J. B., K. Wiederhold, et al. (2006). "Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles." *Embo J*.
- Spector, I., N. R. Shochet, et al. (1983). "Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells." *Science* **219**(4584): 493-5.
- Starck, J.-L., F. D. Murtagh, et al. (1998). *Image Processing and Data Analysis : The Multiscale Approach*, Cambridge University Press.
- Steyer, J. A. and W. Almers (1999). "Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy." *Biophys J* **76**(4): 2262-71.
- Steyer, J. A. and W. Almers (2001). "A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(4): 268-75.

- Steyer, J. A., H. Horstmann, et al. (1997). "Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells." Nature **388**(6641): 474-8.
- Stock, K., R. Sailer, et al. (2003). "Variable-angle total internal reflection fluorescence microscopy (VA-TIRFM): realization and application of a compact illumination device." J Microsc **211**(Pt 1): 19-29.
- Sudhof, T. C. (1995). "The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions." Nature **375**(6533): 645-53.
- Sudhof, T. C. (2004). "The synaptic vesicle cycle." Annu Rev Neurosci **27**: 509-47.
- Tabb, J. S., B. J. Molyneaux, et al. (1998). "Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V." J Cell Sci **111** (Pt 21): 3221-34.
- Takahashi, N., T. Kishimoto, et al. (2002). "Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet." Science **297**(5585): 1349-52.
- Takai, Y., T. Sasaki, et al. (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev **81**(1): 153-208.
- Takei, K. and V. Haucke (2001). "Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger." Trends Cell Biol **11**(9): 385-91.
- Taraska, J. W. and W. Almers (2004). "Bilayers merge even when exocytosis is transient." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23): 8780-5.
- Taraska, J. W., D. Perrais, et al. (2003). "Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 2070-5.
- Tchakarov, L. E., L. Zhang, et al. (1998). "Light and electron microscopic study of changes in the organization of the cortical actin cytoskeleton during chromaffin cell secretion." J Histochem Cytochem **46**(2): 193-203.
- Thiele, C. and W. B. Huttner (1998). "Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to secretory granules-recent developments." Semin Cell Dev Biol **9**(5): 511-6.
- Togel, M., G. Wiche, et al. (1998). "Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain." J Cell Biol **143**(3): 695-707.
- Tooze, J. and B. Burke (1987). "Accumulation of adrenocorticotropin secretory granules in the midbody of telophase AtT20 cells: evidence that secretory granules move anterogradely along microtubules." J Cell Biol **104**(4): 1047-57.
- Tooze, S. A., T. Flatmark, et al. (1991). "Characterization of the immature secretory granule, an intermediate in granule biogenesis." J Cell Biol **115**(6): 1491-503.
- Tooze, S. A., G. J. Martens, et al. (2001). "Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE." Trends Cell Biol **11**(3): 116-22.
- Tran, V. S., A. M. Marion-Audibert, et al. (2004). "Serotonin secretion by human carcinoid BON cells." Ann N Y Acad Sci **1014**: 179-88.
- Trifaro, J.-M., S. D. Rose, et al. (2000). "Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis." Biochimie **82**(4 SU -): 339-352.
- Tsuboi, T., G. DaSilva Xavier, et al. (2003). "5' AMP-activated protein kinase controls insulin-containing secretory vesicle dynamics." J Biol Chem.
- Tsuboi, T. and M. Fukuda (2005). "The C2B domain of rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells." J Biol Chem **280**(47): 39253-9.

- Tsuboi, T. and M. Fukuda (2006). "The Slp4-a Linker Domain Controls Exocytosis through Interaction with Munc18-1{middle dot}Syntaxin-1a Complex." Mol Biol Cell **17**(5): 2101-12.
- Tsuboi, T., H. T. McMahon, et al. (2004). "Mechanisms of Dense Core Vesicle Recapture following "Kiss and Run" ("Cavcapture") Exocytosis in Insulin-secreting Cells." J Biol Chem **279**(45): 47115-24.
- Tsuboi, T., M. A. Ravier, et al. (2005). "Mammalian exocyst complex is required for the docking step of insulin vesicle exocytosis." J Biol Chem **280**(27): 25565-70.
- Tsuboi, T. and G. A. Rutter (2003). "Multiple Forms of "Kiss-and-Run" Exocytosis Revealed by Evanescent Wave Microscopy." Curr Biol **13**(7): 563-7.
- Ungermann, C. and D. Langosch (2005). "Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing." J Cell Sci **118**(Pt 17): 3819-28.
- Ungermann, C., K. Sato, et al. (1998). "Defining the functions of trans-SNARE pairs." Nature **396**(6711): 543-8.
- Vacquier, V. D. (1975). "The isolation of intact cortical granules from sea urchin eggs: calcium ions trigger granule discharge." Dev Biol **43**(1): 62-74.
- Vale, R. D. (2003). "The molecular motor toolbox for intracellular transport." Cell **112**(4): 467-80.
- Vale, R. D. (2003). "Myosin V motor proteins: marching stepwise towards a mechanism." J Cell Biol **163**(3): 445-50.
- Vale, R. D. and R. A. Milligan (2000). "The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins." Science **288**(5463): 88-95.
- Varadi, A., E. K. Ainscow, et al. (2002). "Involvement of conventional kinesin in glucose-stimulated secretory granule movements and exocytosis in clonal pancreatic beta-cells." J Cell Sci **115**(Pt 21): 4177-89.
- Varadi, A., T. Tsuboi, et al. (2003). "Kinesin I and cytoplasmic dynein orchestrate glucose-stimulated insulin-containing vesicle movements in clonal MIN6 beta-cells." Biochem Biophys Res Commun **311**(2): 272-82.
- Varadi, A., T. Tsuboi, et al. (2005). "Myosin Va Transports Dense Core Secretory Vesicles in Pancreatic MIN6 {beta}-Cells." Mol Biol Cell **16**(6): 2670-80.
- Vazquez, J., A. S. Belmont, et al. (2001). "Multiple regimes of constrained chromosome motion are regulated in the interphase Drosophila nucleus." Curr Biol **11**(16): 1227-39.
- Videen, J. S., M. S. Mezger, et al. (1992). "Calcium and catecholamine interactions with adrenal chromogranins. Comparison of driving forces in binding and aggregation." J Biol Chem **267**(5): 3066-73.
- Vitale, M. L., A. Rodriguez Del Castillo, et al. (1991). "Cortical filamentous actin disassembly and scinderin redistribution during chromaffin cell stimulation precede exocytosis, a phenomenon not exhibited by gelsolin." J Cell Biol **113**(5): 1057-67.
- Vitale, M. L., E. P. Seward, et al. (1995). "Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis." Neuron **14**(2): 353-63.
- Wacker, I., C. Kaether, et al. (1997). "Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein." J Cell Sci **110** (Pt 13): 1453-63.
- Wang, C. T., J. Bai, et al. (2006). "Synaptotagmin-Ca²⁺ triggers two sequential steps in regulated exocytosis in rat PC12 cells: fusion pore opening and fusion pore dilation." J Physiol **570**(Pt 2): 295-307.
- Wang, F., K. Thirumurugan, et al. (2004). "Regulated conformation of myosin V." J Biol Chem **279**(4): 2333-6.
- Watanabe, M., K. Nomura, et al. (2005). "Myosin-Va Regulates Exocytosis through the Submicromolar Ca²⁺-dependent Binding of Syntaxin-1A." Mol Biol Cell.

- Welte, M. A. (2004). "Bidirectional transport along microtubules." Curr Biol **14**(13): R525-37.
- Wendler, F., L. Page, et al. (2001). "Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation requires syntaxin 6." Mol Biol Cell **12**(6): 1699-709.
- White, J. G., J. M. Squirrell, et al. (2001). "Applying multiphoton imaging to the study of membrane dynamics in living cells." Traffic **2**(11): 775-80.
- Winkler, H., D. K. Apps, et al. (1986). "The molecular function of adrenal chromaffin granules: established facts and unresolved topics." Neuroscience **18**(2): 261-90.
- Wolf, H. and R. Wehner (2000). "Pinpointing food sources: olfactory and anemotactic orientation in desert ants, *Cataglyphis fortis*." J Exp Biol **203**(Pt 5): 857-68.
- Wu, X., B. Bowers, et al. (1998). "Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo." J Cell Biol **143**(7): 1899-918.
- Wu, X. S., K. Rao, et al. (2002). "Identification of an organelle receptor for myosin-Va." Nat Cell Biol **4**(4): 271-8.
- Xu, T., B. Rammner, et al. (1999). "Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis." Cell **99**(7): 713-22.
- Xu, Y., F. Zhang, et al. (2005). "Hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion." Nat Struct Mol Biol **12**(5): 417-22.
- Yamada, S., D. Wirtz, et al. (2000). "Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology." Biophys J **78**(4): 1736-47.
- Zenisek, D., J. A. Steyer, et al. (2000). "Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones." Nature **406**(6798): 849-54.
- Zenisek, D., J. A. Steyer, et al. (2002). "A membrane marker leaves synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells." Neuron **35**(6): 1085-97.
- Zerial, M. and H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 107-17.

Résumé

La sécrétion régulée d'hormones est un processus décomposable en plusieurs étapes. Les granules de sécrétion (GS) contenant ces hormones sont formés au niveau du réseau *trans*-golgien puis migrent jusqu'à la périphérie de la cellule. Ces hormones sont libérées dans le milieu extérieur par exocytose en cas de stimulation de la cellule. Grâce à l'observation des GS situés dans la région juxta-membranaire par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente, les mouvements de ces organites ont été étudiés à l'échelle du granule unique. Une méthode d'analyse permettant la mise en évidence de comportements transitoires au sein des trajectoires tridimensionnelles des GS a été mise au point. Grâce à son application à l'étude des effets de drogues du cytosquelette et à des observations en double marquage, nous avons pu associer chaque type de mouvements décrit par les GS à un environnement particulier (GS lié à la membrane plasmique, au cytosquelette d'actine ou de microtubules). Nous avons de plus étudié le rôle du complexe protéique Rab27A/MyRIP/Myosine Va lors de la capture des GS en périphérie de la cellule et leur accrochage aux filaments d'actine.

Abstract

Regulated hormone secretion is a multi-step process. Secretory granules (SG), which contain hormones, are formed by budding from the *trans*-golgi network and then migrate towards the cell periphery. Hormones are released by exocytosis when cells are stimulated. We applied total internal reflection fluorescence microscopy to study the dynamics of SG located in the subplasmalemmal region. We developed a motion analysis method to highlight transient behaviours along three-dimensional SG trajectories. The application of this method to the study of the effects of cytoskeletal drugs on SG dynamics and double labelling observations allowed us to associate each type of movement with a particular environment (SG linked to the plasma membrane, the actin filaments or the microtubules). We also studied the role of the complex formed by the proteins Rab27A, MyRIP and Myosin Va during the capture of SG in the cell periphery and their attachment to actin filaments.