



HAL
open science

Etude de la sécrétion régulée par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente.

S. Tran

► **To cite this version:**

S. Tran. Etude de la sécrétion régulée par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente.. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT : . tel-00343385

HAL Id: tel-00343385

<https://theses.hal.science/tel-00343385>

Submitted on 1 Dec 2008

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

Viet Samuel TRAN

pour obtenir le grade de

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

Etude de la sécrétion régulée par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente

Soutenu publiquement le 29 Septembre 2008 devant le jury composé de :

M. le Dr. Jean-Pierre HENRY
M. le Dr. Bernard POULAIN
M. le Dr. Laurent BOURDIEU
Mme la Pr. Sophie CRIBIER

Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Bernard Poulain et Laurent Bourdieu pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et pour avoir pu tenir des délais aussi brefs.

Merci également à Sophie Cribier qui m'a encadré pendant mon stage de DEA et au début de ma thèse. Malgré son emploi du temps chargé, elle a toujours été disponible pour m'aider ou répondre à mes questions, avec le sourire.

Merci à Jean-Pierre Henry qui m'a encadré tout au long de cette thèse. S'il n'y avait pas eu votre optimisme sans faille pour contrebalancer mon manque de confiance en ce que je faisais, je n'aurais pas été bien loin. Merci aussi pour votre infinie patience au cours de cette longue rédaction de trois ans et pour avoir supporté autant de reports de rendez-vous.

Merci aussi à tous les autres membres de notre équipe. Avec vous, j'ai vraiment découvert ce qu'était le travail en équipe. Merci pour la fin du tracking effectué après mon départ. Merci à Erdem Karatekin pour ses analyses et son rôle prépondérant dans l'écriture des articles, qui sinon ne seraient peut-être pas encore publiés. Merci à Sebastien Huet avec qui j'ai travaillé pendant plus de trois ans sur le montage de microscopie à onde évanescente. Je suis d'accord avec toi : travailler en parallèle sur ce montage a été une grande chance qui nous a permis de progresser plus rapidement et de résoudre efficacement les nombreux problèmes expérimentaux que nous avons rencontrés. J'ai toujours été admiratif devant ton esprit d'analyse. Tu as vraiment l'âme et les capacités d'un très bon chercheur et je te souhaite une belle carrière. Merci enfin à Isabelle Fanget aussi à Catherine Chapuis pour les belles cellules qu'elles m'ont préparées et pour les tests de sécrétion en population de cellules.

Merci également à l'ensemble des membres de l'UPR 1929 que j'ai côtoyés au cours de ma thèse. Grâce à vous, le laboratoire a toujours été un endroit agréable où j'avais plaisir à venir. Merci particulièrement à Bruno Gasnier pour toutes les discussions toujours intéressantes que nous avons eues et pour son clone N13. Sans ces cellules, mes résultats auraient été bien plus longs à obtenir et sûrement moins convaincants. Merci aussi à François Darchen et Claire Desnos pour leurs avis éclairants. Merci à Corinne Sagné, Jean-Sébastien, Christine, Cécile, Raquel, Marine, Azita, Irène, Viviane. Merci à Marie, Sandrine, Gian-Carlo, Francesco, Pierre, Anne, Anna, et à tous les autres qui ont quitté le laboratoire depuis.

Merci à mes parents qui m'ont toujours permis de faire les études que je désirais et pour leur soutien. Merci à ma sœur et également à Papi qui n'a cessé de prendre des nouvelles de ma thèse depuis que nous nous connaissons. Penser à vous dans les moments de découragements m'a permis de ne jamais baisser les bras.

Merci à ma belle maman pour les moments de disponibilité qu'elle m'a donné en gardant Emmanuel cet été et qui m'ont permis de finir cette rédaction. Je sais que cela n'a pas toujours été de tout repos.

Merci enfin à ma femme Isabelle. Notre histoire est intimement liée à celle de cette thèse qui aura connu notre rencontre, notre mariage, la naissance de notre merveilleux petit garçon, ... Merci pour avoir supporté tous ces weekends sacrifiés et toutes ces vacances très réduites ... Sans ton soutien permanent, surtout en cette fin de rédaction, je crois que je n'aurais jamais réussi à terminer et je t'en serais toujours reconnaissant.

Résumé

La sécrétion régulée d'hormones est un processus décomposable en plusieurs étapes : migration des granules de sécrétion (GS) vers la membrane plasmique (MP), accostage et arrimage des GS à la MP, exocytose ou fusion des GS avec la MP permettant la libération du contenu des GS dans le milieu extracellulaire.

Bien que très utiles, les méthodes électrophysiologiques et électrochimiques ne donnent d'informations ni sur la localisation ou les mouvements des GS avant fusion, ni sur le devenir de la membrane des GS après fusion. Plusieurs techniques d'imagerie *in vivo* cherchent à répondre à ces questions. La mieux adaptée est la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente (TIRFM) qui permet d'observer les mouvements de GS individuels à proximité immédiate de la MP. Nous avons appliqué cette approche à l'étude de la sécrétion des cellules BON (lignée dérivée d'un carcinome). Leur stimulation a été faite par la technique du Ca cagé, appliquée pour la première fois en microscopie TIRF.

Après exocytose, nous avons observé et quantifié le phénomène de persistance de la forme d'une partie des GS, ainsi que l'exocytose séquentielle de GS situés plus à distance de la MP. De manière surprenante, l'exocytose séquentielle représente ~25% des événements d'exocytose. L'analyse détaillée des trajectoires en 3 dimensions des GS avant leur fusion nous a montré qu'environ 40% des GS effectuent une transition de 20 nm vers la MP, puis fusionnent dans un délai de ~3 s. Cette observation originale de la transition entre l'accostage et l'arrimage des GS pourrait être la traduction d'évènements moléculaires impliqués dans l'amorçage des GS, nécessaire à la fusion.

Titre anglais : *Regulated secretion studied by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*

Abstract

Regulated secretion of neuroendocrine cells is a multi-step process involving translocation of secretory granules (SG) toward the plasma membrane (PM), tethering and docking of SG at the PM, exocytosis or fusion of SG membrane with PM, leading to the release of SG contents to the extracellular medium.

Electrophysiological and electrochemical methods are useful, but they cannot give information about localization or movement of SG before fusion and about the fate of the SG membrane after fusion. Many *in vivo* imaging techniques try to answer these questions. The most suited one is TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) that allows observation of single SG and of their movements in the area just beneath the PM, with evanescence depth ranging from 50 to 300 nm. We have applied this approach to the study of the secretion of BON cells (a cell line derived of a carcinoma). Cells were stimulated by the caged Ca technique, applied for the first time to TIRF microscopy.

Using these techniques, we observed fusions which were not accompanied by the flattening of the SG membrane. These empty membranes became targets for sequential fusions with deeper lying vesicles. Overall, ~25% of all exocytotic events occurred via sequential fusion. We also analysed in detail 3D-trajectories of SG shortly before their fusion. We reported that about 40% of SG underwent a 20-nm step toward the PM before fusing ~3 s later. This new observation, the first direct visualization of the transition between tethered and docked states at the PM, might correspond to molecular events involved in the priming steps required for the maturation of SG before fusion.

Mots-clés français

Biophysique, sécrétion régulée, cellules endocrines, exocytose, vésicules de sécrétion, microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente

Mots-clés anglais

Biophysics, regulated secretion, endocrin cells, exocytosis, secretory vesicle, total internal reflection fluorescence microscopy, TIRF, evanescent wave, evanescent field

Laboratoire où la thèse a été préparée :

Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Sécrétion - CNRS UPR 1929
Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC) - 13, rue Pierre et Marie Curie 75005 Paris

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., Ménasché 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.

Journal of Cell Biology (2003) 163(3):559-70

Huet S., Karatekin E., **Tran V.S.**, Fanget I., Cribier S., Henry J.P.

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

Biophysical Journal (2006) 91(9):3542-59.

Tran V.S., Huet S., Fanget I., Cribier S., Henry J.P., Karatekin E.

Characterization of sequential exocytosis in a human neuroendocrine cell line using evanescent wave microscopy and "virtual trajectory" analysis.

European Biophysical Journal (2007) 37(1):55-69.

Karatekin E. [#], **Tran V.S.** [#], Huet S., Fanget I., Cribier S., Henry J.P.

A 20-nm step toward the cell membrane preceding exocytosis may correspond to docking of tethered granules.

Biophysical Journal (2008) 94(7):2891-905.

([#]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

Annals of New-York Academy of Sciences (2004) 1014:179–188

([#]contributions égales à ce travail)

Table des matières

INTRODUCTION	14
I. INTRODUCTION GENERALE.....	16
I.1. LA SECRETION REGULEE	16
I.1.1. Importance physiologique	16
I.1.2. Le cycle de sécrétion.....	17
<i>I.1.2.1. Biogénèse et maturation des GS.....</i>	18
<i>I.1.2.2. Migration des GS vers la membrane plasmique</i>	19
<i>I.1.2.3. Accrochage des GS à la membrane plasmique</i>	19
<i>I.1.2.4. Amorçage de la fusion</i>	21
<i>I.1.2.5. Fusion.....</i>	21
I.2. MODELES CELLULAIRES DE LA SECRETION REGULEE.....	24
I.2.1. Cellules neuroendocrines.....	25
<i>I.2.1.1. Cellules chromaffines</i>	25
<i>I.2.1.2. Cellules PC12.....</i>	25
<i>I.2.1.3. Cellules bêta-pancréatiques</i>	25
<i>I.2.1.4. Cellules BON.....</i>	25
I.2.2. Cellules de la lignée hématopoïétique.....	25
<i>I.2.2.1. Granulocytes</i>	26
<i>I.2.2.2. Mastocytes</i>	26
I.2.3. Neurones.....	26
I.3. METHODES D'ETUDE	27
I.3.1. Méthodes électriques.....	27
<i>I.3.1.1. Electrophysiologie.....</i>	27
<i>I.3.1.2. Ampérométrie à fibre de carbone</i>	30
I.3.2. Méthodes optiques.....	33
I.4. LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE A EXCITATION PAR ONDE EVANESCENTE OU MICROSCOPIE TIRF	34
I.4.1. Principe de la microscopie TIRF	34
I.4.2. Avantages et inconvénients de la microscopie TIRF vis-à-vis des microscopies confocale et à deux photons	36
I.4.3. Les montages de microscopie TIRF.....	37
I.5. CONNAISSANCES DE LA SECRETION REGULEE APORTEES PAR LA MICROSCOPIE TIRF	39
I.5.1. Premiers articles.....	39
I.5.2. Mouvement des granules de sécrétion dans la région juxta-membranaire.....	40
<i>I.5.2.1. Outils d'analyse des mouvements.....</i>	40
<i>I.5.2.2. Le transport des GS avant fusion : diffusion ou transport actif ?.....</i>	40
<i>I.5.2.3. Rôle de l'actine dans le transport des GS.....</i>	41
<i>I.5.2.4. Relation entre transport et sécrétion</i>	43
I.5.3. Relation entre granules de sécrétion et membrane cellulaire	43

I.5.3.1.	<i>Définition du pool libérable : vésicules liées à la membrane ?</i>	43
I.5.3.2.	<i>Une immobilisation à la membrane de longue durée est-elle nécessaire ?</i>	44
I.5.4.	Données sur la fusion	45
I.5.4.1.	<i>Rôle du Ca²⁺ dans l'exocytose</i>	45
I.5.4.2.	<i>Rôle des SNARE dans l'exocytose</i>	46
I.5.4.3.	<i>Etape de fusion proprement dite</i>	46
I.6.	CONCLUSION ET BUT DU TRAVAIL	51
II.	<u>LA SECRETION DES CELLULES BON ET L'EVENEMENT D'EXOCYTOSE VU EN MICROSCOPIE TIRF</u>	54
II.1.	SECRETION DES CELLULES BON	54
II.1.1.	Choix du modèle cellulaire	54
II.1.2.	Sécrétion en population de cellules	55
II.1.2.1.	<i>Lignée BON originelle</i>	<i>55</i>
II.1.2.2.	<i>BON N13</i>	<i>56</i>
II.1.3.	Sécrétion en cellule individuelle par TIRFM	57
II.1.3.1.	<i>Lignée BON originelle</i>	<i>57</i>
II.1.3.2.	<i>BON N13</i>	<i>58</i>
II.1.3.3.	<i>Photolibération de « Ca²⁺ cagé »</i>	<i>60</i>
II.2.	L'EVENEMENT D'EXOCYTOSE	62
II.2.1.	L'événement d'exocytose vu en TIRFM	62
II.2.1.1.	<i>L'événement d'exocytose « normal » : le « flash » d'exocytose</i>	<i>62</i>
II.2.1.2.	<i>Autres types d'événements</i>	<i>63</i>
II.2.2.	Persistance de forme	64
II.2.3.	Evénements de type lent	66
II.2.4.	Exocytose séquentielle	67
II.2.4.1.	<i>Terminologie</i>	<i>67</i>
II.2.4.2.	<i>Etendue de l'exocytose séquentielle</i>	<i>67</i>
II.2.4.3.	<i>Difficultés de la détection</i>	<i>69</i>
II.3.	DISCUSSION	70
III.	<u>METHODES DE SUIVI ET D'ANALYSE DES TRAJECTOIRES 3D DES GRANULES DE SECRETION</u> 72	
III.1.	METHODE DE SUIVI 3D DES TRAJECTOIRES DES GRANULES DE SECRETION :	73
III.2.	METHODE D'ANALYSE DES TRAJECTOIRES COMPLEXES	75
III.3.	RESULTATS	76
III.3.1.	Dynamique des granules de sécrétion	76
III.3.2.	Organisation dynamique de la région juxta-membranaire	77
III.3.2.1.	<i>Classe dirigée</i>	<i>78</i>
III.3.2.2.	<i>Classe diffusive ou brownienne</i>	<i>78</i>
III.3.2.3.	<i>Classe arrêtée/contrainte</i>	<i>79</i>
III.3.2.4.	<i>Transitions entre classes</i>	<i>79</i>
III.3.2.5.	<i>Modèle de l'organisation dynamique juxta-membranaire</i>	<i>80</i>

III.4. DISCUSSION.....	81
<u>IV. DIFFERENTS ETATS DE LIAISON DES GRANULES DE SECRETION A LA MEMBRANE CELLULAIRE : TRANSITION ENTRE ETAT ACCOSTE ET ETAT ARRIME.....</u>	84
IV.1. ACCROCHAGE DES GRANULES DE SECRETION A LA MEMBRANE	84
IV.1.1. Variation de D_{xy} lors de l'accrochage	85
IV.1.2. Régime à bas D_{xy}	85
IV.2. DISTINCTION ENTRE ARRIVANTS ET RESIDANTS	86
IV.2.1. Définitions	86
IV.2.2. Mouvements des granules de sécrétion arrivants avant accrochage à la membrane.....	88
IV.2.3. Temps de vie caractéristique à la membrane	88
IV.3. TRANSITION AXIALE.....	89
IV.3.1. La transition a-t-elle une réalité physique ?	89
IV.3.2. La transition a-t-elle une réalité biologique ?	90
IV.3.3. Est-ce une observation originale ?	90
IV.3.4. Est-ce une étape obligatoire vers la fusion ?	90
IV.3.5. Est-elle dépendante de la concentration en Ca^{2+} ?	91
IV.4. MODELE	91
IV.4.1.1. <i>Rappel du modèle de la sécrétion dans les cellules BON</i>	91
IV.4.1.2. <i>Discussion</i>	93
IV.5. CINETIQUES DE SECRETION.....	93
IV.5.1. Modèle des pools cinétiques de Neher	93
IV.5.2. Différences expérimentales entre les approches	94
IV.5.3. Comparaison des cinétiques de sécrétion.....	95
IV.5.4. Interprétation des différences	97
IV.6. RECHERCHE DES ACTEURS MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS L'ACCOSTAGE ET L'ARRIMAGE.....	97
IV.7. CONCLUSION.....	100
<u>V. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</u>	102
<u>VI. MATERIELS ET METHODES</u>	106
VI.1. BIOLOGIE CELLULAIRE.....	106
VI.1.1. Cellules	106
VI.1.1.1. <i>Lignée BON originelle</i>	106
VI.1.1.2. <i>Clone BON « N13 »</i>	106
VI.1.2. Culture cellulaire.....	106
VI.1.3. Construction plasmidique.....	106
VI.1.4. Transfection par électroporation.....	107
VI.1.5. Conditions d'observation en microscopie TIRF.....	107

VI.2. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE TIRF	107
VI.2.1. Le montage de microscopie TIRF	107
VI.2.2. Calibration de l'épaisseur d'évanescence	108
VI.2.2.1. Mesure de l'épaisseur d'évanescence	108
VI.2.2.2. Mesure de l'angle d'incidence du faisceau laser au niveau de l'interface verre/cellule <i>109</i>	
VI.2.3. Observations en simple marquage	110
VI.2.4. Observations en double marquage	110
VI.2.4.1. Adaptation du montage	110
VI.2.4.2. Observation de la persistance de forme des GS après exocytose	111
VI.3. STIMULATION DE CELLULES INDIVIDUELLES	111
VI.3.1. Dispositif de perfusion	111
VI.3.1.1. Matériel	111
VI.3.1.2. Positionnement de la pointe et calibration du débit	111
VI.3.1.3. Aspiration	112
VI.3.1.4. Commutateur	112
VI.3.2. Solutions de stimulations	113
VI.3.2.1. Ba²⁺	113
VI.3.2.2. Ach	113
VI.3.3. Perméabilisation à la digitonine en présence de Ca²⁺	114
VI.3.3.1. Solutions de bain et de stimulation	114
VI.3.3.2. Optimisation des conditions de perfusion	114
VI.3.3.3. Vitesse de montée du Ca²⁺	114
VI.3.3.4. Capillaires de verre étirés	115
VI.3.3.5. Autres perméabilisations possibles	115
VI.3.4. Imagerie calcique par le Fluo-4	116
VI.3.5. Photolibération de calcium	116
VI.3.5.1. Avantages et inconvénients du NP-EGTA-AM.	116
VI.3.5.2. Imagerie calcique	117
VI.4. DETECTION DES EVENEMENTS D'EXOCYTOSE	117
VI.4.1. Difficultés de l'analyse des images	117
VI.4.2. Discussion sur le repérage du moment de la fusion	119
VI.4.3. Type de résultats obtenus	120
VI.5. ANALYSE DES TRAJECTOIRES DES GRANULES DE SECRETION	120
VI.5.1. Obtention des trajectoires tridimensionnelles	120
VI.5.1.1. Suivi des granules en 2D dans le plan de focalisation du microscope	120
VI.5.1.2. Evaluation des mouvements des granules suivant l'axe z orthogonal au plan de focalisation	120
VI.5.2. Détection des transitions axiales	124
VI.5.3. Calcul des coefficients de diffusion Dxy à partir des trajectoires 2D décrites par les granules	126
VI.5.4. Calcul des « trajectoires virtuelles » pour l'étude de l'exocytose séquentielle ... 126	

VI.6. MESURE DE LA SECRETION DE [³H]5-HT SUR POPULATION DE CELLULES	127
<u>VII. ANNEXES</u>	<u>128</u>
VII.1. ABREVIATIONS	128
VII.2. ARTICLE PARU DANS <i>ANNALS OF NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES</i> (2004) « SEROTONIN SECRETION BY HUMAN CARCINOID BON CELLS »	128
VII.3. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129

Introduction

Ce mémoire de thèse décrit mon travail qui s'est effectué à l'interface entre la physique et la biologie. Il montre comment une méthode optique récente, la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente (ou en anglais TIRFM pour Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy), combinée à des méthodes d'analyses issues de la physique, a permis de progresser dans la compréhension d'un phénomène biologique important : la sécrétion régulée d'hormones ou de neurotransmetteurs. Après avoir effectué quelques rappels sur la sécrétion régulée, ainsi que sur les modèles cellulaires et les méthodes permettant de l'étudier, nous verrons les connaissances que le TIRFM a déjà apportées sur ce phénomène complexe, qui est encore loin d'avoir révélé tous ses secrets. Notre contribution à cette étude a donné lieu à la publication de trois articles de recherche qui seront discutés dans ce manuscrit de thèse.

Partie I

Introduction générale

I. Introduction générale

I.1. La sécrétion régulée

I.1.1. Importance physiologique

La sécrétion régulée, c'est-à-dire déclenchée par un stimulus, est un mécanisme primordial à la base de toute communication intercellulaire au sein d'un organisme pluricellulaire. Elle consiste en une libération contrôlée par des cellules spécialisées de substances messagères à destination de cellules cibles. Ces substances contenues dans la cellule sécrétrice doivent traverser la membrane cellulaire : cela est accompli au moyen d'organites spécialisés appelés vésicules de sécrétion, également délimités par une membrane et contenant les substances à libérer. En réponse à un signal physiologique, ces vésicules de sécrétion viennent fusionner avec la membrane plasmique et libérer leur contenu à l'extérieur de la cellule.

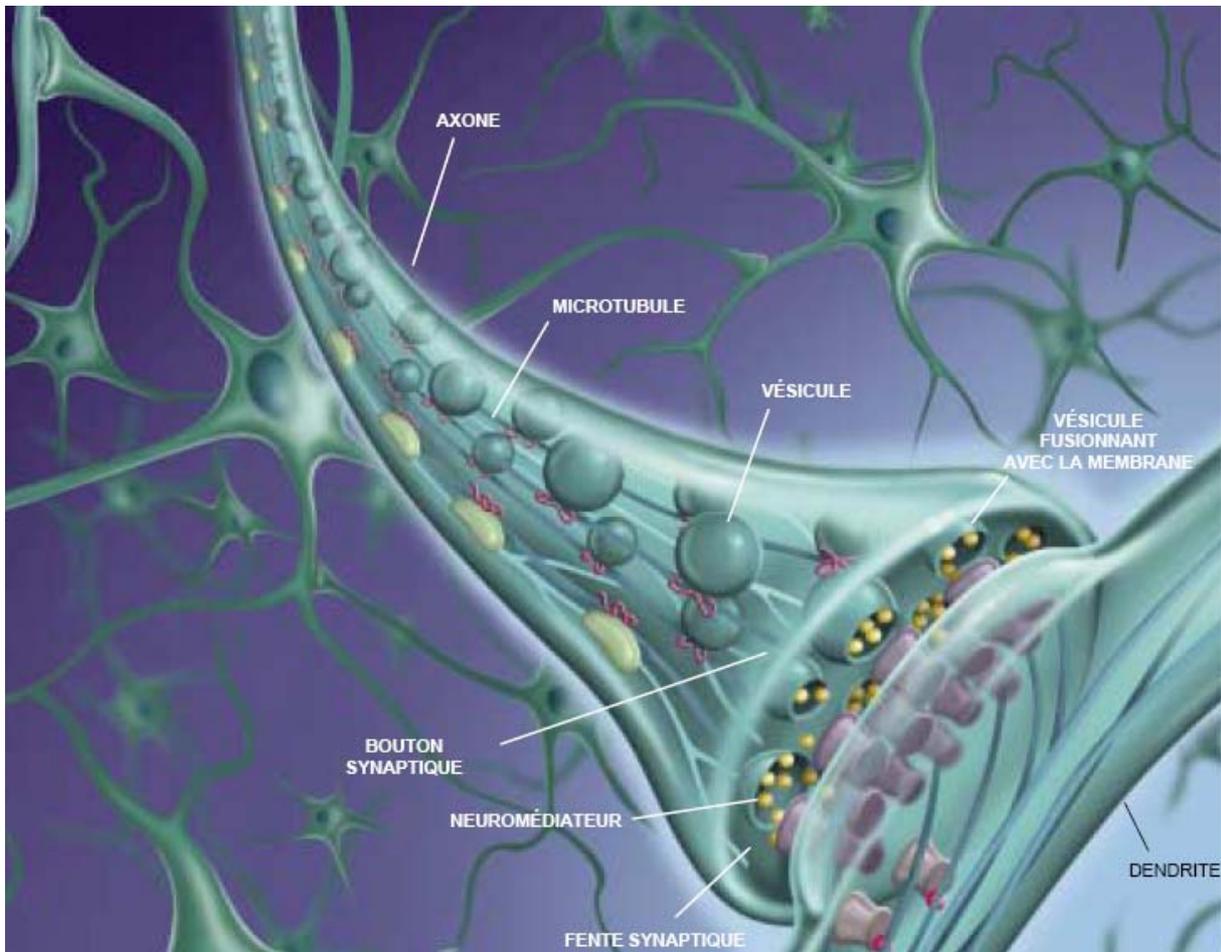


Figure 1 : Vue d'artiste d'une synapse. Dans le cerveau, les neurones échangent de l'information en acheminant des vésicules, transportées le long de microtubules (des « rails ») jusqu'aux synapses, les espaces entre les neurones. Sur l'illustration, le bouton synaptique mesure environ un dixième de micromètre de largeur. Extrait de (Galli et Paumet 2002).

Ce mécanisme, également appelé exocytose (du grec *exo* « hors de » et *kutos* « cellule ») régulée, intervient dans la sécrétion des neurotransmetteurs et des hormones. Dans le premier cas, les neurotransmetteurs contenus dans des vésicules synaptiques (VS) sont libérés par un neurone pré-synaptique dans la fente synaptique et permettent la propagation de l'influx nerveux, en venant se fixer sur des récepteurs spécifiques situés à la membrane du neurone post-synaptique (Figure 1). Les hormones, contenues quant à elles dans des granules à cœur dense ou granules de sécrétion (GS), sont libérées dans la circulation sanguine par des cellules neuroendocrines et remplissent une grande variété de fonctions physiologiques en agissant à longue portée.

Contrairement à la transmission synaptique chimique qui a lieu sur des échelles spatiales et temporelles très réduites (quelques centaines de nanomètres entre les deux neurones et un délai de quelques millisecondes), la sécrétion hormonale met en jeu des distances entre cellules émettrices et réceptrices pouvant atteindre plusieurs mètres et des délais d'action variant de la seconde à plusieurs jours. Malgré ces différences, la libération de neurotransmetteurs et la sécrétion hormonale sont basés sur les mêmes mécanismes moléculaires. De nombreuses protéines impliquées dans ces mécanismes ont été identifiées au cours des deux dernières décennies. Les interactions entre ces protéines et la façon dont une élévation de la concentration intracellulaire en calcium, $[Ca^{2+}]_i$, provoque l'exocytose des VS ou des GS sont connues dans leurs grandes lignes, mais de nombreux aspects des processus impliqués restent encore à éclaircir.

1.1.2. Le cycle de sécrétion

De nombreuses études ont utilisé des méthodes électriques (voir I.3.1) pour suivre la réponse sécrétrice de neurones ou de différentes cellules neuroendocrines. Ces méthodes ainsi que des données biochimiques et morphologiques ont permis de converger vers un modèle appelé « cycle de sécrétion » (Sudhof 1995 ; Sudhof 2004) dans lequel les VS ou les GS jouent un rôle central. Ce modèle séquentiel comporte plusieurs étapes depuis la formation de ces organites jusqu'à leur fusion et leur recyclage éventuel au niveau de la membrane cellulaire.

Nous allons décrire brièvement ces étapes dans le cas particulier des GS (Figure 2) (pour une revue voir (Burgoyne et Morgan 2003)). Notons que notre figure ne comporte pas l'étape d'amorçage (*priming*) car, comme nous allons le voir, cette étape n'est pas encore clairement délimitée.

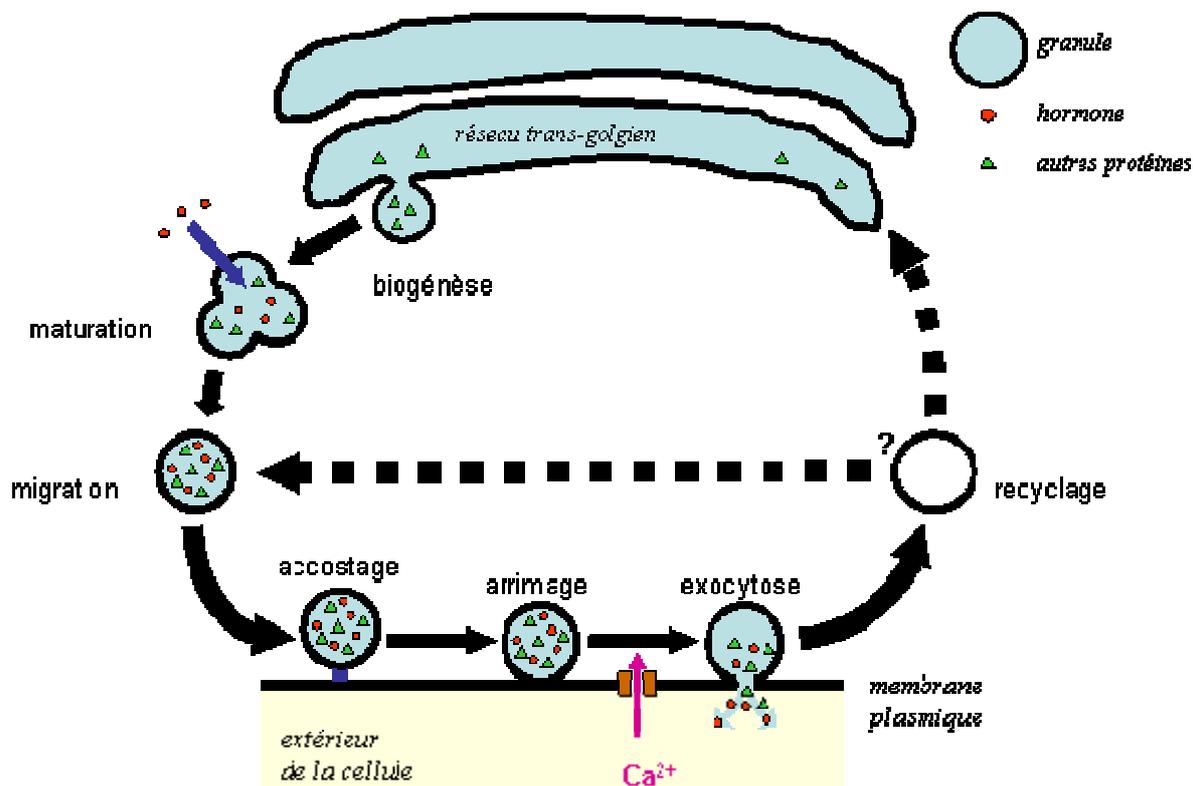


Figure 2 : Les différentes étapes du cycle de sécrétion. Les GS sont formés par bourgeonnement à partir du réseau *trans*-golgien. Au cours de leur maturation, les GS sont transportés jusqu'à la périphérie de la cellule. L'accostage avec la membrane plasmique se déroule alors en deux étapes : l'accostage qui établit un premier lien physique (lâche) entre le GS et la membrane cellulaire ; l'arrimage qui établit un lien plus fort en prélude à la fusion. L'influx de calcium provoque la fusion du GS avec la membrane plasmique et la libération des hormones dans le milieu extracellulaire. Le GS peut alors soit fusionner complètement avec la membrane plasmique, soit se refermer après avoir libéré au moins une partie de son contenu. Enfin, le recyclage du GS se déroule, probablement différemment suivant qu'il a subi une fusion complète ou partielle. Schéma adapté de ((Sudhof 1995)).

I.1.2.1. Biogénèse et maturation des GS

La biogénèse des GS débute, au niveau de la membrane du réseau *trans*-golgien, par une accumulation locale de protéines destinées à se retrouver au sein de GS, comme par exemple la chromogranine B. Un granule, dit immature, se forme alors par bourgeonnement à partir du réseau *trans*-golgien (Tooze, Martens *et al.* 2001).

Ce granule subit ensuite une phase de maturation où il se remplit en hormones telles les monoamines (adrénaline, sérotonine, ...), en molécules d'ATP, d'acide ascorbique et en ions Ca^{2+} . Ce remplissage se fait grâce à des transporteurs spécifiques situés sur la membrane granulaire qui accumulent dans le GS les hormones partiellement synthétisées dans le cytoplasme (Henry, Sagne *et al.* 1998).

Enfin, la maturation implique un processus de condensation du contenu des granules. A terme, l'intérieur des granules est ainsi constitué d'une matrice à cœur protéique extrêmement compact. Les protéines constituant cette matrice, en particulier les chromogranines A et B dans les GS des cellules chromaffines, assurent la chélation des éléments accumulés à haute concentration au sein des granules (monoamines, Ca^{2+} , ...), permettant ainsi de maintenir l'équilibre osmotique à l'intérieur des granules (Kopell et Westhead 1982 ; Videen, Mezger *et al.* 1992).

I.1.2.2. Migration des GS vers la membrane plasmique

Afin de subir l'exocytose au niveau de la membrane cellulaire, les GS sont transportés depuis le réseau *trans*-golgien jusqu'à la périphérie de la cellule et une partie des GS est retenue dans la zone juxta-membranaire. Ces processus de transport et de rétention des GS en périphérie font intervenir respectivement le réseau de microtubules (Neco, Giner *et al.* 2003) et de filaments d'actine (Rudolf, Salm *et al.* 2001), ce dernier étant particulièrement dense en périphérie de la cellule (Nakata et Hirokawa 1992). Le transport des GS se produit alors que ceux-ci semblent encore immatures (Rudolf, Salm *et al.* 2001), la maturation se produisant alors dans le cortex d'actine.

I.1.2.3. Accrochage des GS à la membrane plasmique

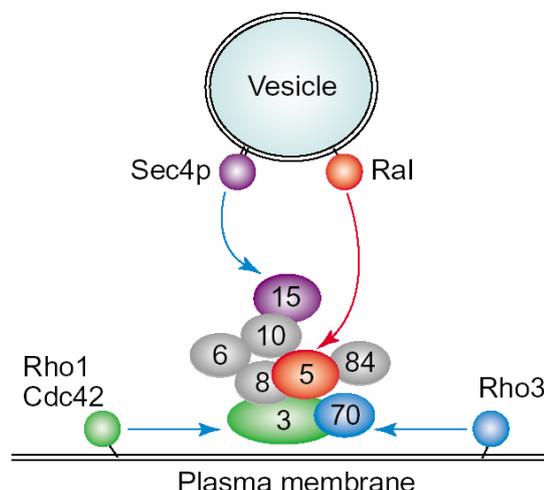
Le terme anglais *docking* possède des sens qui diffèrent selon les auteurs. Une première traduction possible est « accrochage » : les vésicules accrochées (*docked*) sont traditionnellement définies comme les vésicules qui apparaissent accolées à la membrane plasmique sur les clichés de microscopie électronique. Cette définition est donc morphologique.

L'accrochage à la membrane peut être décomposé en deux étapes successives. Suivant les auteurs, elles sont nommées *tethering* et *docking* (Jahn, Lang *et al.* 2003; Ungermann et Langosch 2005) ou *docking* et *priming* (Sudhof 1995 ; Sudhof 2004) d'où une certaine confusion. Nous les désignerons en français par les termes « marins » d'accostage et d'arrimage. L'accostage correspond à l'établissement du premier lien physique entre le GS et la membrane cellulaire. Ce lien est encore lâche et constitue une première étape dans la reconnaissance entre le GS et la membrane cible. Un lien plus fort est ensuite établi entre la membrane et le GS, en prélude à la fusion : c'est l'arrimage. Ces deux dernières définitions impliquent donc des supports moléculaires de nature différente ou arrangés différemment.

Cependant, les acteurs impliqués dans l'accostage et l'arrimage ne sont pas encore complètement identifiés. Parmi les candidats possibles, les protéines SNARE, également impliquées dans la fusion, pourraient intervenir dans ces deux étapes (voir I.1.2.5). Les petites protéines G à activité GTPasique de la famille Rab semblent également jouer un rôle important dans l'accostage. Ces protéines existent sous deux formes : d'une part une forme liée au GDP et inactive, d'autre part une forme liée au GTP, active et associée aux membranes (Takai, Sasaki *et al.* 2001 ; Zerial et McBride 2001). Ainsi, certaines de ces protéines Rab, présentes sous leur conformation active à la surface des GS, pourraient réguler le recrutement d'effecteurs permettant de lier ces GS à la membrane plasmique.

Figure 3 : Résumé des interactions entre le complexe exocyste et des petites GTPases.

Chez la levure, la protéine Rab Sec4p, présente sur les vésicules sécrétoires, interagit avec la protéine Sec15p de l'exocyste. Rho1 et Cdc42 interagissent avec Sec3p, tandis que Rho3 interagirait avec Exo70p. Chez les mammifères, Ral interagirait avec la protéine Sec5p de l'exocyste. Les interactions découvertes chez la levure sont indiquées par des flèches bleues; celle trouvée chez le mammifère est indiquée par la flèche rouge. Extrait de (Novick et Guo 2002)



Ces effecteurs, ou facteurs d'accostage, sont généralement des complexes protéiques de taille importante. Le mieux caractérisé d'entre eux est le complexe exocyste, encore appelé complexe Sec6/8. Il s'agit d'un gros complexe protéique, conservé dans l'évolution, de ~730 kDa formé de huit sous-unités (Sec3/5/6/8/10/15/exo70/exo84) (Figure 3). Sa structure, visualisée en microscopie électronique, forme comme un « T » ou un « Y », d'une taille estimée à 13 nm de large pour une longueur de 30-45 nm suivant sa conformation ((Hsu, Hazuka *et al.* 1998 ; Hsu, Hazuka *et al.* 1999)). Il joue un rôle dans la sécrétion chez la levure et possède un équivalent chez les mammifères (Hsu, Hazuka *et al.* 1999 ; Hsu, TerBush *et al.* 2004).

L'assemblage du complexe exocyste est probablement régulé par des petites GTPases et se ferait en plusieurs étapes (Figure 4). Une première partie du complexe serait recruté au niveau de la membrane vésiculaire par la protéine Rab Sec4p chez la levure, tandis que chez les mammifères, le recrutement d'une des sous-unités de l'exocyste s'effectuerait par la protéine Ral (Figure 3) (Moskalenko, Henry *et al.* 2002; Sugihara, Asano *et al.* 2002), dont les propriétés sont proches de celles des Rab (Mark, Jilkina *et al.* 1996 ; Moskalenko, Henry *et al.* 2002). Du côté de la membrane cellulaire, une seconde partie du complexe serait également recrutée par des protéines, dont la nature reste à déterminer chez le mammifère. Ces deux sous-complexes s'assembleraient ensuite pour former l'exocyste.

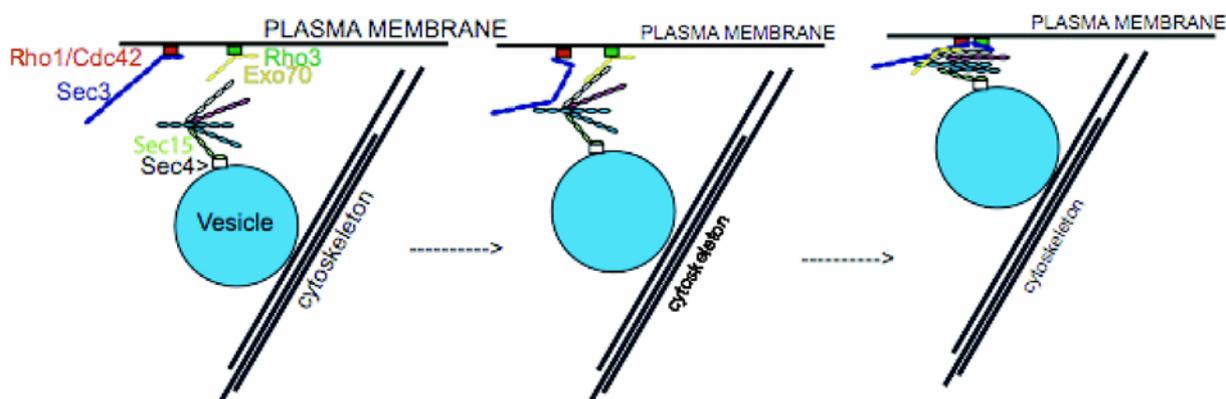


Figure 4 : Modèle de l'assemblage de l'exocyste. Le complexe exocyste est assemblé à partir de huit sous-unités, dont au moins quatre sont composées, en partie ou en totalité, de faisceaux en hélice disposés bouts à bouts dans de longues tiges. Ces tiges s'alignent côte à côte dans le complexe entièrement assemblé. Dans la levure, six des sous-unités surmontent la vésicule le long de câbles d'actine jusqu'aux sites d'exocytose, alors que Sec3p et Exo70p peuvent identifier ces sites par un mécanisme indépendant de l'actine. Sec3p se lie à Rho1-GTP ou Cdc42-GTP, tandis qu'Exo70p se lie à Rho3-GTP et Sec15p à Sec4-GTP. Extrait de (Novick, Medkova *et al.* 2006).

Chez les mammifères, l'exocyste joue certainement un rôle dans la polarisation de la sécrétion constitutive (Hsu, Hazuka *et al.* 1999 ; Hsu, TerBush *et al.* 2004), mais des informations contradictoires existent dans le cas de la sécrétion régulée. L'inhibition de RalA diminue en effet la sécrétion stimulée dans les cellules PC12 (Moskalenko, Henry *et al.* 2002) et diminue la taille du *pool* libérable de vésicules synaptiques dans les synaptosomes (Polzin, Shipitsin *et al.* 2002). Ces résultats suggèrent donc indirectement que le complexe exocyste intervient dans la sécrétion régulée. Cependant, il ne semble pas impliqué dans l'exocytose des vésicules synaptiques dans les neurones. Des expériences d'inactivation ou de sous-unités du complexe chez la drosophile montrent en effet que la neurotransmission n'est pas affectée (Andrews, Zhang *et al.* 2002 ; Murthy, Garza *et al.* 2003).

Ces différentes hypothèses concernant les acteurs impliqués dans l'accostage et l'arrimage demandent encore à être vérifiées. Notons que dans la suite de ce manuscrit, nous emploierons les termes « accrochage » ou « accroché » de manière générique, sans préciser le mode de liaison à la membrane. Les termes d'accostage et d'arrimage correspondront

respectivement aux termes anglais *tethering* et *docking* employés dans notre article du *Biophysical Journal* 2008 discuté dans la partie IV.

I.1.2.4. Amorçage de la fusion

L'amorçage (*priming*) englobe l'ensemble des processus (réarrangements moléculaires, modifications protéiques et/ou lipidiques) rendant les GS compétents pour la fusion (Klenchin et Martin 2000). Cette définition possède en fait deux variantes. La première provient des expériences réalisées en cellules perméabilisées (Holz, Bittner *et al.* 1989 ; Bittner et Holz 1992 ; Hay et Martin 1992). La compétence à la sécrétion diminue après la perméabilisation. L'amorçage a alors été défini comme les processus dépendant du MgATP et du Ca^{2+} qui permettent de rétablir la compétence à la sécrétion. Une deuxième définition provient de l'électrophysiologie (voir I.3.1.1.b), où l'amorçage est défini comme le processus permettant de repeupler la population des GS « rapidement libérable » lors d'une augmentation brutale de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$. Que ce soit l'une ou l'autre définition de l'amorçage, la relation entre cette étape et celles d'accostage et d'arrimage n'a pas encore été résolue. Dans la suite, nous considérerons plutôt la définition électrophysiologique de l'amorçage, où il suffit d'une élévation suffisante de $[Ca^{2+}]_i$ pour déclencher presque instantanément la fusion des GS amorcés (*primed*) avec la membrane plasmique.

I.1.2.5. Fusion

Il est maintenant admis que l'exocytose des GS fait intervenir un ensemble de protéines appelées SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*) (Sollner, Bennett *et al.* 1993). En effet, le clivage de ces protéines par des neurotoxines clostridiales botuliques et tétaniques, (issues respectivement de *Clostridium botulinum* et de *Clostridium tetani*) (Schiavo, Benfenati *et al.* 1992), empêche la fusion vésiculaire et la sécrétion des hormones et des neurotransmetteurs est ainsi fortement inhibée (pour une revue, voir (Humeau, Doussau *et al.* 2000)).

Les protéines SNARE constituent, en fait, une grande famille de protéines impliquées dans la majorité des échanges entre compartiments intracellulaires (pour une revue voir (Jahn, Lang *et al.* 2003)). A chaque endroit où une fusion entre deux membranes a lieu, un ensemble de protéines SNARE spécifiques des organites impliqués est mis en jeu. Dans le cas de la fusion entre un GS ou une VS et la membrane cellulaire, trois protéines SNARE interviennent : d'une part la synaptobrevine (ou VAMP-2 pour *vesicle associated membrane protein*) située au niveau de la membrane vésiculaire (on parle de *vesicular* ou v-SNARE), et d'autre part la syntaxine-1 et SNAP-25 (*synaptosomal associated protein of 25 kDa*) au niveau de la membrane plasmique (on parle de *target* ou t-SNARE). Ces protéines sont capables de s'associer au sein d'un complexe protéique appelé complexe SNARE (Figure 5). La mise en place de ce complexe implique des motifs particuliers, appelés motifs SNARE, qui sont présents sur chacune de ces trois protéines.

Une nouvelle classification des protéines SNARE, plus large, a été établie selon qu'elles possèdent au centre de leur motif SNARE une arginine (R-SNARE) ou une glutamine (Q-SNARE). Dans le cas de la fusion des GS avec la membrane cellulaire, la famille des R-SNARE correspond à celle des v-SNARE, et celle des Q-SNARE à celle des t-SNARE. Le complexe tripartite SNARE fait donc intervenir un R-SNARE, la synaptobrevine/VAMP-2, et deux Q-SNARE, la syntaxine-1 et SNAP-25.

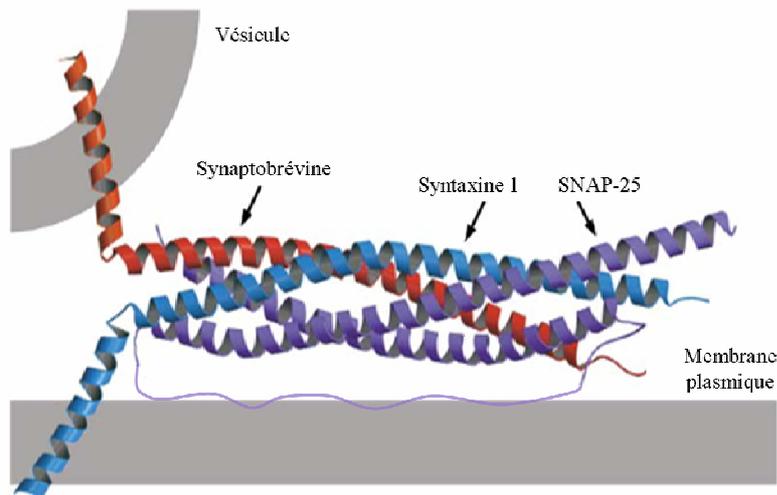


Figure 5 : Le complexe SNARE *trans*. Un faisceau de quatre hélices α parallèles est formé par l'association de la synaptobrevine, sur les vésicules, avec la syntaxine 1 et la SNAP25, sur la membrane plasmique. D'après (Bonifacino et Glick 2004).

Quel(s) rôle(s) les SNARE jouent-ils dans l'exocytose ? Ils pourraient intervenir à trois niveaux. Les SNARE sont *a priori* aptes à jouer un rôle dans la reconnaissance de la membrane cible par le GS, grâce aux interactions entre des Q-SNARE et des R-SNARE. La fusion entre deux membranes particulières serait associée à l'assemblage d'un complexe formé de protéines SNARE spécifiques (Jahn, Lang *et al.* 2003). Cette hypothèse doit cependant être nuancée. En effet, *in vitro*, un R-SNARE donné pourrait s'apparier avec plusieurs sortes de Q-SNARE (Fasshauer, Antonin *et al.* 1999; Brandhorst, Zwillig *et al.* 2006). Par ailleurs, dans des cellules chromaffines de souris n'exprimant pas la SNAP-25, l'étude des cinétiques de sécrétion a montré que l'absence de cette protéine pouvait être partiellement compensée par l'expression d'un de ses homologues, la SNAP23 (Sorensen, Nagy *et al.* 2003). Enfin, il semble qu'il existe d'autres systèmes en amont des SNARE qui permettent l'accostage des GS et soient au moins en partie responsables de la spécificité des événements de fusion (Zerial et McBride 2001).

Les SNARE sont plus certainement impliqués dans l'étape d'arrimage des GS à la membrane plasmique. Cette étape correspondrait à la mise en place du complexe SNARE formé en *trans* (*i.e.* entre deux membranes différentes). C'est, en effet, l'association des motifs SNARE, initialement peu structurés, pour former un faisceau très stable de quatre hélices α parallèles, qui constitue le cœur du complexe SNARE (*core complex*) (Figure 5) (Jahn, Lang *et al.* 2003).

Enfin, les SNARE pourraient intervenir dans le mécanisme de la fusion elle-même, en agissant comme une nanomachine. A la manière d'une « fermeture éclair », la fermeture progressive du complexe SNARE à partir des extrémités N-terminales des protéines (*i.e.* des extrémités cytoplasmiques) pourrait ainsi permettre de surmonter les forces de répulsions électrostatiques entre les membranes cellulaires et vésiculaires et de rapprocher les membranes jusqu'à ce que seulement quelques nanomètres les sépare (Melia, Weber *et al.* 2002; Sorensen, Wiederhold *et al.* 2006). La fusion serait alors une conséquence purement mécanique du rapprochement induit par la mise en place progressive du complexe SNARE. Ce modèle impliquant les SNARE seuls reste cependant controversé. La fusion serait plutôt le résultat d'un mécanisme concerté impliquant les SNARE et d'autres protéines (Sudhof 2007).

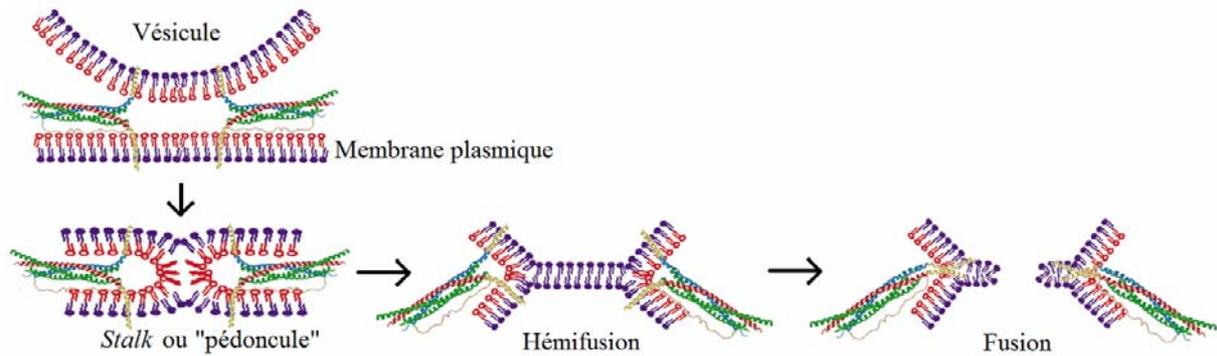


Figure 6 : Rôle mécanique des SNARE proposé dans le rapprochement des membranes vésiculaire et plasmique. (1) Rapprochement des deux membranes. (2) Formation du pédoncule lipidique (3) Hémifusion. (4) Formation d'un pore de fusion lipidique. Adapté de (Brunger 2000).

La fusion des membranes s'effectue en plusieurs étapes. D'après le modèle courant, le rapprochement des bicouches lipidiques provoque d'abord la formation d'un « pédoncule » entre les monocouches lipidiques proximales (*i.e.* celles tournées vers le cytoplasme, voir Figure 6). L'extension progressive de ce pédoncule aboutit à un stade dit d'« hémifusion » dans lequel les monocouches proximales sont en continuité mais les monocouches distales restent disjointes. A ce stade, il n'y a donc pas encore d'échange entre l'intérieur de la vésicule et le milieu extracellulaire. Ces deux milieux n'entrent en communication qu'au moment de l'ouverture d'un pore de fusion à travers les monocouches distales.

Dans le modèle décrit ci-dessus, le pore de fusion est de nature purement lipidique. Un mécanisme faisant intervenir un pore de nature protéique a également 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) (Figure 7). Dans ce modèle, le complexe SNARE joue un rôle uniquement lors du rapprochement des deux membranes destinées à fusionner. Le pore de fusion est ensuite constitué par l'accolement en *trans* de deux secteurs V_0 de l'ATPase vacuolaire (Mayer 2002). D'autres modèles proposent que la structure annulaire formée par les domaines transmembranaires des protéines du complexe SNARE puisse constituer le pore de fusion (Han, Wang *et al.* 2004). Cette hypothèse du pore protéique reste aujourd'hui encore très controversée.

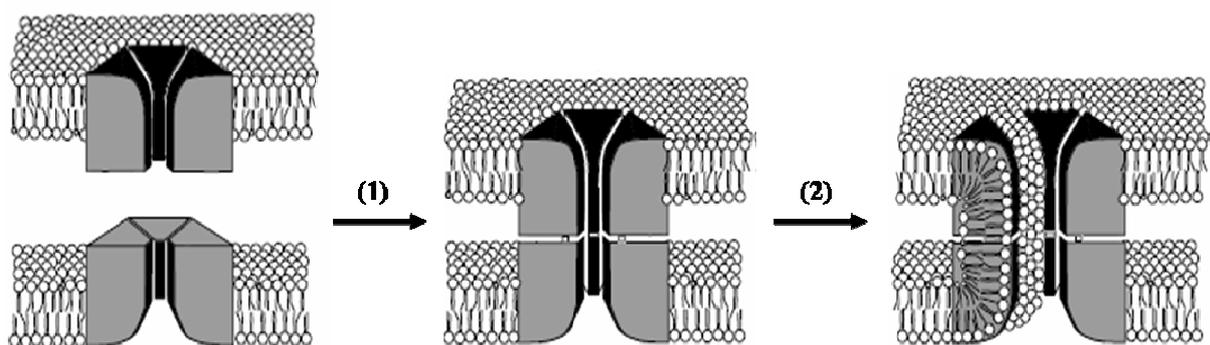


Figure 7 : Fusion via un pore protéique. (1) Formation du pore de fusion par accolement des secteurs V_0 de l'ATPase. (2) Dissociation des sous-unités des secteurs V_0 permettant l'invasion du pore par les phospholipides puis sa dilatation. D'après (Mayer 2002).

Quelle que soit la nature du pore de fusion, son ouverture peut déboucher sur deux possibilités (Figure 8). Soit le pore s'étend, permettant la libération du contenu du GS à l'extérieur de la cellule et le GS fusionne alors complètement avec la membrane plasmique. Soit l'ouverture du pore n'est que transitoire et de courte durée (<1 s) et le pore se referme après que le GS a libéré au moins une partie de son contenu. Dans le premier cas, le recyclage de la membrane

vésiculaire et de ses composants se produit lors d'un processus séparé appelé endocytose, qui est en quelque sorte le processus inverse de l'exocytose. L'endocytose implique un tri moléculaire, met généralement en jeu des protéines spécifiques, telles que la clathrine et la dynamine, et impose un passage par le réseau *trans*-golgien. Dans le second cas, le recyclage peut être plus rapide : la vésicule, dont la membrane est quasi intacte, peut repartir et revenir ultérieurement à la membrane cellulaire, sans repasser par le réseau *trans*-golgien, d'où l'appellation de *kiss-and-run* pour cette seconde option. Celle-ci, d'abord proposée pour la fusion des VS dans les neurones, reste encore très discutée (pour une revue voir (Sudhof 2004)).

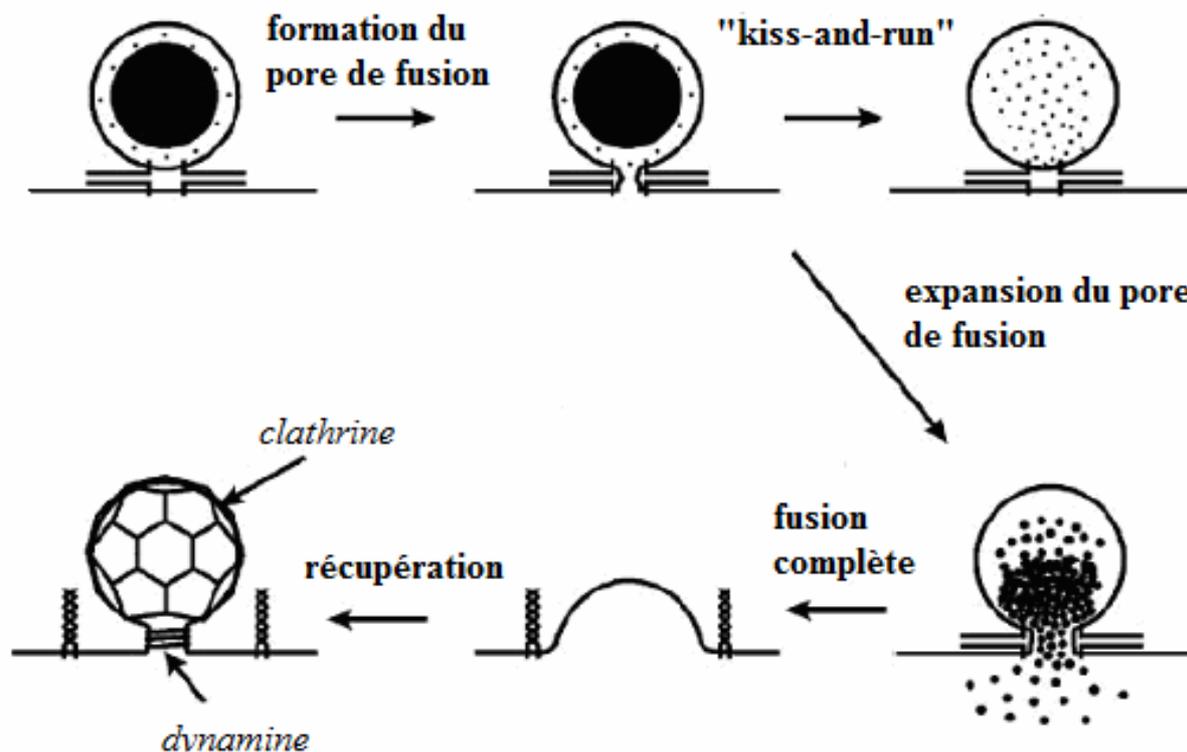


Figure 8 : Comparaison entre *kiss-and-run* et fusion complète. La fusion des membranes débute par la formation d'un pore de fusion. L'expansion du pore de fusion permet la libération du contenu du GS. Soit la libération est limitée par une refermeture rapide du pore de fusion (*kiss-and-run*). Soit le vidage complet du GS est suivi par un mécanisme de récupération impliquant la dynamine et la clathrine. Adapté de (Burgoyne et Morgan 2003).

I.2. Modèles cellulaires de la sécrétion régulée

Afin d'étudier les mécanismes de la sécrétion régulée, divers types de cellules sécrétrices ont été utilisés. Pour qu'un type de cellule sécrétrice soit un bon modèle, il doit répondre à quelques critères. Les cultures cellulaires doivent être relativement simples à préparer : celles-ci peuvent être des cultures primaires ou, encore plus simplement, des lignées, cellules capables de se multiplier indéfiniment. Ces cultures doivent être « propres », c'est-à-dire qu'elles ne contiennent pas ou peu de contaminants. Les cellules doivent être suffisamment abondantes pour permettre des études biochimiques. Enfin, les GS doivent être suffisamment gros et nombreux pour que l'exocytose soit facile à observer. Dans le cas des lignées, on choisira celles qui présentent la sécrétion la plus physiologique.

I.2.1. Cellules neuroendocrines

La majorité des études sur la sécrétion régulée s'effectue actuellement sur des cellules neuroendocrines.

I.2.1.1. Cellules chromaffines

Les plus étudiées sont les cellules chromaffines extraites de glandes médullo-surrénales de bœuf (Fenwick, Fajdiga *et al.* 1978 ; Livett 1984). Certains utilisent également les cellules chromaffines de la médullo-surrénale de souris qui présentent l'avantage d'autoriser des manipulations génétiques plus poussées que celles de bœuf (Voets, Toonen *et al.* 2001). Les cellules chromaffines sont responsables de la libération, en réaction au stress, de catécholamines comme l'adrénaline et de divers peptides. Leur inconvénient est l'obligation de refaire des cultures primaires à chaque expérience.

I.2.1.2. Cellules PC12

Les cellules de la lignée tumorale PC12, issues d'un phéochromocytome de la médullo-surrénale de rat (Greene et Tischler 1976), permettent de s'affranchir de la contrainte de ces cultures primaires. Ces cellules, en développant des neurites sous l'effet du facteur NGF (*nerve growth factor*), offrent également la possibilité d'étudier l'effet de la différenciation cellulaire. Les cellules PC12 différenciées sont alors utilisées comme modèle de neurones. Cependant, la dérive du clone original explique qu'il existe aujourd'hui non pas une mais de nombreuses lignées PC12 qui diffèrent sensiblement les unes des autres. En particulier, certaines lignées sécrètent toujours quand d'autres ont perdu cette faculté.

I.2.1.3. Cellules bêta-pancréatiques

Les cellules bêta-pancréatiques sont un autre type de cellules neuroendocrines, qui, comme elles sécrètent l'insuline, sont au cœur des recherches sur le diabète. Il est là encore difficile de travailler sur des cultures primaires. La plupart des travaux s'effectuent donc sur des lignées tumorales issues de cellules bêta-pancréatiques, comme les lignées INS ou MIN6.

I.2.1.4. Cellules BON

Enfin, la lignée cellulaire BON que nous avons utilisée est une lignée entérochromaffine dérivant d'une tumeur carcinoïde humaine issue du pancréas (Evers, Townsend *et al.* 1991). En culture, ces cellules sécrètent de manière régulée principalement de la sérotonine (5-HT ou 5-Hydroxytryptamine) et divers peptides (neurotensine, pancréastatine...) (Parekh, Ishizuka *et al.* 1994) en réponse, notamment, à une stimulation par l'acétylcholine (Parekh, Ishizuka *et al.* 1994; Tran, Marion-Audibert *et al.* 2004). Chez les patients affectés par ce type de tumeur, ces sécrétions sont responsables de symptômes tels que rougeurs, diarrhées et vasoconstrictions. Le contenu cellulaire en sérotonine est faible (environ trois ordres de grandeurs plus faible que le contenu en catécholamine des cellules chromaffines bovines en culture). Encore mal caractérisées, les cellules BON restent très peu utilisées. Elles présentent néanmoins de nombreux avantages pour la microscopie TIRF (voir II.1.1).

I.2.2. Cellules de la lignée hématopoïétique

D'autres équipes ont étudié certaines cellules de la lignée sanguine qui contiennent des granules de sécrétion.

I.2.2.1. Granulocytes

Les granulocytes, sont des globules blancs qualifiés de « non spécifiques » dans la mesure où ils ne sont pas dirigés contre un seul antigène. Il existe trois catégories de granulocytes : les éosinophiles, les neutrophiles et les basophiles, cette dénomination étant basée sur leur affinité à absorber des colorants à base d'éosine, neutres ou basiques (colorant MGG ou *May-Grünwald Giemsa*). En outre, leurs rôles dans le corps sont différents.

- Les granulocytes neutrophiles (Lollike, Lindau *et al.* 2002) sont des phagocytes, c'est-à-dire des cellules capables d'avaloir et de digérer les antigènes comme les bactéries après les avoir intégrées dans un compartiment intracellulaire nommé phagosome. Ils possèdent des granules, considérés comme des lysosomes, contenant des enzymes cytotoxiques qui peuvent être déversées soit dans le phagosome, soit hors de la cellule.

- Les granulocytes éosinophiles (étudiées par (Scepek et Lindau 1993)) ont pour rôle de s'attaquer aux parasites de l'organisme : ils s'y fixent, puis sécrètent directement sur la surface de ces parasites des enzymes destinées à les détruire.

- Les granulocytes basophiles attirent les autres globules blancs en sécrétant l'histamine contenue dans leurs granules. Cette histamine active la réaction inflammatoire et intervient également dans les réactions allergiques.

I.2.2.2. Mastocytes

Les mastocytes sont des cellules immunitaires de lignée sanguine capables de sécréter principalement de l'histamine et de la sérotonine lorsqu'elles détectent un complexe antigène-IgE (immunoglobulines de type E). L'exocytose est alors massive et entraîne une dégranulation du mastocyte. Zimmerberg *et al.* (Zimmerberg, Curran *et al.* 1987) ont étudié les mastocytes chez la souris beige, une lignée de souris mutante, caractérisée par des granules géants, de l'ordre du micron (voir I.3.1.1).

I.2.3. Neurones

Les neurones, qu'il s'agisse de lignées ou de cultures primaires, remplissent très mal les critères d'un bon modèle pour l'étude des mécanismes de la sécrétion régulée.

Les lignées, d'ailleurs peu nombreuses, présentent l'inconvénient de sécréter de manière peu physiologique. Notons tout de même l'utilisation des cellules PC12 différenciées comme modèles de neurones possédant des vésicules à cœur dense. Quant aux cultures primaires, bien qu'il soit possible de les obtenir à partir d'une grande diversité de types de neurones, le choix est plus limité pour l'étude des mécanismes fondamentaux de la libération des neurotransmetteurs, aux niveaux cellulaire et moléculaire. Ce type d'étude présente en effet un certain nombre de problèmes. D'une part, des préparations neuronales suffisamment pures sont difficiles à obtenir à partir de tissu nerveux. D'autre part, les vésicules synaptiques sont petites et peu nombreuses. La libération est donc extrêmement limitée, rendant l'étude de l'exocytose difficile quelque soit la technique utilisée.

Malgré ces difficultés, différents types d'études sur la sécrétion ont été faites avec ces cultures primaires. Pour les études biochimiques sur des populations de cellules, les limitations ont conduit à travailler sur une préparation particulière : les synaptosomes. Relativement faciles à préparer en laboratoire, les synaptosomes sont obtenus par simple homogénéisation et fractionnement de tissu nerveux. Ils sont constitués d'une membrane phospholipidique sur laquelle se trouvent les protéines synaptiques nécessaires à l'absorption, au stockage et à la

libération de neurotransmetteurs et contiennent de nombreuses vésicules synaptiques au contenu généralement hétérogène. Ainsi les synaptosomes se présentent-ils comme l'équivalent de la synapse isolée d'un neurone.

Les études sur les neurones isolés, en particulier celles utilisant des méthodes optiques, sont rares. Un type de neurone très spécifique, le neurone bipolaire de la rétine du poisson rouge, a été étudié de manière approfondie en raison de la très grande taille de sa synapse, qui comporte près d'un million de vésicules synaptiques (Zenisek, Steyer *et al.* 2000; Zenisek, Steyer *et al.* 2002). Des neurones d'hippocampe ont également été étudiés (Silverman, Johnson *et al.* 2005).

En fait, le véritable intérêt des préparations neuronales réside dans l'étude des réseaux neuronaux. Il s'agit là de déterminer comment la réponse d'un neurone est modulée par les neurones qui l'entourent. Ces travaux, effectués sur des coupes de tissus nerveux, permettent aussi bien des observations en électrophysiologie (voir I.3.1.1) qu'en ampérométrie (voir I.3.1.2) ou encore en microscopie bi-photonique (voir I.3.2 et I.4.2). Des réseaux neuronaux de taille réduite, donc plus faciles à contrôler, peuvent également être créés *in vitro* par dépôt sur des surfaces lithographiées (Wyart, Ybert *et al.* 2002). Elles permettent des observations en microscopie de fluorescence classique.

I.3. Méthodes d'étude

Il existe de nombreuses méthodes d'étude de la sécrétion et on distingue méthodes biochimiques, électriques et optiques. Les méthodes biochimiques permettent de caractériser rapidement et efficacement la sécrétion d'une population de cellules en observant sa réponse à différents sécrétagogues (voir Matériels et méthodes). Mais la réponse sécrétrice, mesurée par des dosages, n'est faite ni en temps réel ni avec une résolution temporelle très précise (au mieux de l'ordre de quelques secondes)

En revanche, les méthodes électriques et optiques sont utilisées pour les observations en cellule unique et offrent la possibilité de mesurer la sécrétion en temps réel et avec une résolution temporelle très précise : inférieure à la ms en électrophysiologie et en ampérométrie à fibre de carbone et au mieux de l'ordre d'une dizaine de ms pour les méthodes optiques. Ces dernières sont, en outre, les seules à fournir des informations spatiales. Notons enfin que seules les méthodes électriques et optiques permettent l'étude d'un événement unique d'exocytose.

I.3.1. Méthodes électriques

I.3.1.1. Electrophysiologie

I.3.1.1.a. Mesure de la capacité membranaire

La technique du *patch-clamp* (Hamill, Marty *et al.* 1981) a ouvert les portes de l'étude de la sécrétion en cellule unique. Cette technique est très utilisée dans l'étude des canaux ioniques et, associée à la mesure de la capacité électrique membranaire, notée C_m (Neher et Marty 1982), elle permet de détecter avec une grande résolution temporelle l'addition ou la récupération de membrane dues à l'exocytose et à l'endocytose dans une cellule sécrétrice unique.

Cette technique a d'abord été utilisée en configuration cellule entière (*whole cell*) (Figure 9A), configuration qui donne accès à l'intégralité de la membrane cellulaire interne.

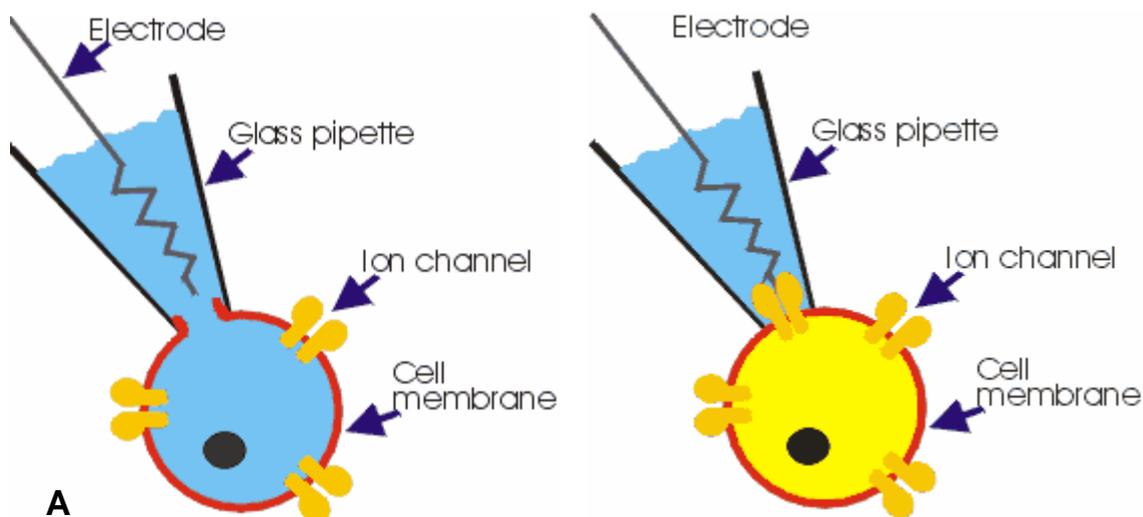


Figure 9 : Schémas des configurations de *patch-clamp* « Cellule entière » et « Cellule attachée ». (A) *patch-clamp* en configuration cellule entière. Quand l'aspiration est appliquée à l'arrière de la pipette pour rompre la membrane cellulaire, on entre dans le mode d'enregistrement en cellule entière. Dans cette configuration, la solution contenue dans la pipette et l'intérieur de la cellule sont en communication. (B) *patch-clamp* en configuration cellule attachée. Quand la pipette touche la membrane cellulaire et forme une jonction de haute résistance (~ 1 GOhm), on entre alors en configuration cellule attachée. Schémas tirés de <http://www.iac-usnc.org/Methods/wholecell/equipment.html>.

Comment mesurer la capacité membranaire d'une cellule ? Rappelons que, du point de vue électrique, la membrane cellulaire peut se modéliser comme l'association d'une conductance membranaire G_m (due aux canaux ioniques) et d'une capacité membranaire C_m (proportionnelle à la surface de la membrane lipidique isolante). Une mesure de l'intensité I du courant électrique traversant l'électrode à potentiel U fixé permet d'obtenir simplement la conductance G_m ($G_m = I/U$) (la capacité n'intervenant plus en régime permanent). En revanche, accéder à la capacité membranaire C_m est un peu plus difficile. Cela exige en effet des mesures d'intensité du courant à potentiel sinusoïdal imposé, afin de déterminer l'admittance Y_m du circuit électrique équivalent à la membrane. Cette admittance permet alors de calculer simplement C_m à condition que G_m ne varie pas pendant la mesure, ce qui est techniquement contraignant mais réalisable. Cela nécessite des conditions ioniques bien déterminées ou encore des toxines afin de bloquer les canaux ioniques. Nous verrons que, dans le cas de l'exocytose, l'admittance donne accès à la conductance du pore de fusion.

Une deuxième difficulté est due au fait que les variations de C_m donnent accès à un bilan exocytose-endocytose et non pas seulement à l'addition de membrane par exocytose. Par conséquent, quand la reprise de membrane par endocytose n'a pas débuté, l'augmentation de C_m rend bien compte de la quantité de sécrétion. En revanche, pour des temps plus longs, elle tend à la sous-estimer.

Enfin, la sensibilité de la technique empêche le passage de l'étude de la sécrétion en cellule unique à l'étude de l'événement unique d'exocytose. Celle-ci requiert en effet la mesure de l'augmentation de C_m (ΔC_m) associée à un événement individuel d'exocytose. Or, en configuration cellule entière, cette mesure est rendue difficile par le nombre élevé d'événements (qui peuvent donc se chevaucher). Mais c'est surtout le faible rapport signal à bruit de ΔC_m pour chacun des événements qui est le plus limitant.

Deux solutions ont permis de résoudre ce problème. Les premières études de l'événement unique en électrophysiologie (Zimmerberg, Curran *et al.* 1987) ont utilisé un type particulier de cellules, les mastocytes de souris beige. Chez cette lignée de souris mutante, les GS contenant l'histamine fusionnent en partie entre eux dans le cytosol, donnant lieu à un nombre réduit de GS (de 1 à 10) mais de taille très importante (2-6 μm de diamètre). L'amplitude de la variation de C_m étant liée à la taille du GS, l'exocytose d'un de ces GS est donc facilement détectable. Une deuxième solution est apparue à la fin des années 1990, avec la mise au point de la configuration cellule attachée (*cell-attached*) (Figure 9B). Celle-ci a permis l'étude de l'événement unique dans d'autres types cellulaires, comme les cellules chromaffines (Albillos, Dernick *et al.* 1997). Cette configuration permet de mesurer uniquement la capacité d'un petit fragment de membrane cellulaire contenu dans la pipette de *patch-clamp*. Comme la surface étudiée est petite, les perturbations sont limitées et le rapport signal à bruit d'un événement d'exocytose est meilleur. Toutefois, l'accès au côté extracellulaire et non intracellulaire de la membrane rend la stimulation plus difficile.

I.3.1.1.b. Modèle cinétique de la sécrétion dans les cellules chromaffines

La mesure de la capacité membranaire a permis des avancées remarquables dans l'étude de la cinétique de sécrétion en cellule unique. Néanmoins, pour donner sa pleine mesure, la grande résolution temporelle de cette technique doit s'accompagner d'une stimulation des cellules également très précise au niveau temporel. Outre la stimulation électrique, cela a été rendu possible par le développement de molécules capables de piéger le Ca^{2+} (communément appelées « calcium cagé ») et de le libérer sous effet d'un flash de lumière ultraviolette (UV) (voir II.1.3.3). En effet, dans les cellules neuroendocrines, l'exocytose des GS est déclenchée par une élévation rapide de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire [Ca^{2+}]_i. La photolibération de Ca^{2+} cagé permet donc de déclencher quasi-instantanément la sécrétion en s'affranchissant de la régulation du Ca^{2+} par la cellule. Neher et Zucker (Neher et Zucker 1993) ont été les premiers à utiliser le « Ca^{2+} cagé » pour étudier la sécrétion. Cette méthode de stimulation a depuis permis de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes de la sécrétion dans les cellules chromaffines.

Grâce à l'association de la mesure de capacité membranaire et de la photolibération de Ca^{2+} cagé, des études plus quantitatives de la dépendance du taux de sécrétion vis-à-vis de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire ont été menées dans les cellules chromaffines (Heidelberger, Heinemann *et al.* 1994; Heinemann, Chow *et al.* 1994). En outre, l'utilisation de ces techniques a révélé que l'exocytose régulée des GS se produit en phases cinétiques temporellement distinctes (Neher et Zucker 1993; Parsons, Coorssen *et al.* 1995; Eliasson, Renstrom *et al.* 1997). Une première phase rapide (<0,5 s), caractérisée par un nombre très élevé d'événements d'exocytose par unité de temps, constitue la « décharge exocytotique » (*exocytic burst*). A la suite de cette phase rapide, on observe une phase plus longue, appelée phase soutenue (*sustained phase*), au cours de laquelle le taux d'exocytose est nettement plus faible. Cependant, en termes de sécrétion cumulée, le nombre d'événements de fusion observés au cours de la phase soutenue est très largement supérieur à celui caractérisant la phase rapide. Suivant le type cellulaire, la décharge exocytotique dure de quelques centaines de millisecondes à plusieurs secondes, et la phase soutenue dure de quelques dizaines de secondes à plusieurs minutes.

L'électrophysiologie ne permettant pas de localiser les GS dans la cellule, ce sont des données complémentaires obtenues en microscopie électronique qui ont conduit à l'hypothèse que les GS fusionnant au cours de la décharge exocytotique sont accrochés (*morphologically docked*) à la membrane cellulaire. La phase lente correspondrait quant à elle à des GS situés légèrement plus profondément dans le cytosol (et par conséquent légèrement plus éloignés de la membrane plasmique et des canaux Ca^{2+} associés à la membrane). Ces GS forment ainsi

une réserve destinée à reconstituer la population des GS associés à la phase rapide quand celle-ci a été vidée par l'exocytose.

Par la suite, la décharge exocytotique a été décomposée en deux composantes cinétiques distinctes (Voets, Neher *et al.* 1999), qui ont été interprétés en termes de populations (*pools*) de GS plus ou moins « prêts » à subir l'exocytose. La composante la plus rapide a été attribuée à l'existence d'un petit *pool* de GS à libération rapide (*readily* ou *rapidly releasable pool* ou RRP), totalement compétents pour subir l'exocytose lors d'un influx de calcium. Ces GS sont dits amorcés (*primed*). La composante lente correspond à un *pool* de GS à libération lente (*slowly releasable pool* ou SRP). Les GS de ce *pool* sont sécrétés plus lentement, probablement parce qu'ils ne sont pas complètement amorcés. La différence entre RRP et SRP est encore discutée : selon certains, elle s'expliquerait par un état plus ou moins fermé des complexes SNARE (Xu, Rammner *et al.* 1999 ; Voets 2000) alors que d'autres auteurs impliqueraient plutôt des isoformes différents de la synaptotagmine, plus ou moins sensibles au Ca^{2+} (Nagy, Kim *et al.* 2006). La synaptotagmine est en effet considérée comme le senseur calcique de l'exocytose, c'est-à-dire la protéine à l'origine de la sensibilité au Ca^{2+} du phénomène de fusion membranaire (pour des revues, voir (Koh et Bellen 2003 ; Sudhof 2004)). Le modèle des *pools* cinétiques proposé par l'équipe de Neher sera discuté plus en détail dans la partie IV (voir IV.5.1 et Figure 32).

I.3.1.1.c. Etude du pore de fusion initial

Une autre possibilité qu'offre l'électrophysiologie est l'étude du pore de fusion initial, rendue possible par le passage à l'événement unique d'exocytose. En effet, dans ce cas, l'admittance donne simultanément accès à la variation de capacité ΔC_m due à l'exocytose d'un seul GS et la conductance de son pore de fusion initial. On peut alors en déduire la surface du GS et le diamètre du pore de fusion initial. Dans les mastocytes de souris beige (Zimmerberg, Curran *et al.* 1987) et les cellules chromaffines (Albillos, Dernick *et al.* 1997), une conductance de 300-400 pS en moyenne correspond à un pore de fusion initial de 1-2 nm de diamètre, soit à peu près la taille d'un phospholipide. Dans la plupart des cas, le pore s'élargit très rapidement dans les dix premières millisecondes. Plus rarement, des fluctuations du pore sont observées : le pore s'ouvre et se ferme par intermittence avant de se fermer définitivement. La fusion est donc dans un premier temps réversible et n'aboutit pas forcément à une exocytose complète.

Finalement, cette technique fournit assez peu d'informations sur la cinétique de l'exocytose d'un GS individuel. Les détails sous-vésiculaires de la libération ont plutôt été étudiés grâce aux microélectrodes à fibre de carbone.

I.3.1.2. Ampérométrie à fibre de carbone

L'ampérométrie à fibre de carbone est une méthode électrochimique basée sur l'oxydation des produits de sécrétion au contact d'une microélectrode placée au voisinage d'une cellule sécrétrice (Figure 10A). Elle permet donc de caractériser en temps réel l'activité sécrétrice de cellules uniques isolées, à condition que les substances libérées soient oxydables : c'est le cas des catécholamines telles la noradrénaline et l'adrénaline pour les cellules chromaffines, de l'histamine et de la sérotonine pour les mastocytes, et de l'insuline pour les cellules bêta-pancréatiques. En présence d'un potentiel approprié, ces molécules libèrent des électrons qui peuvent être collectés. Le courant d'oxydation mesuré est proportionnel à la quantité de produit de sécrétion libérée par la cellule. L'électrode joue en quelque sorte le rôle de l'élément post-synaptique (Wightman, Jankowski *et al.* 1991 ; Chow, von Ruden *et al.* 1992).

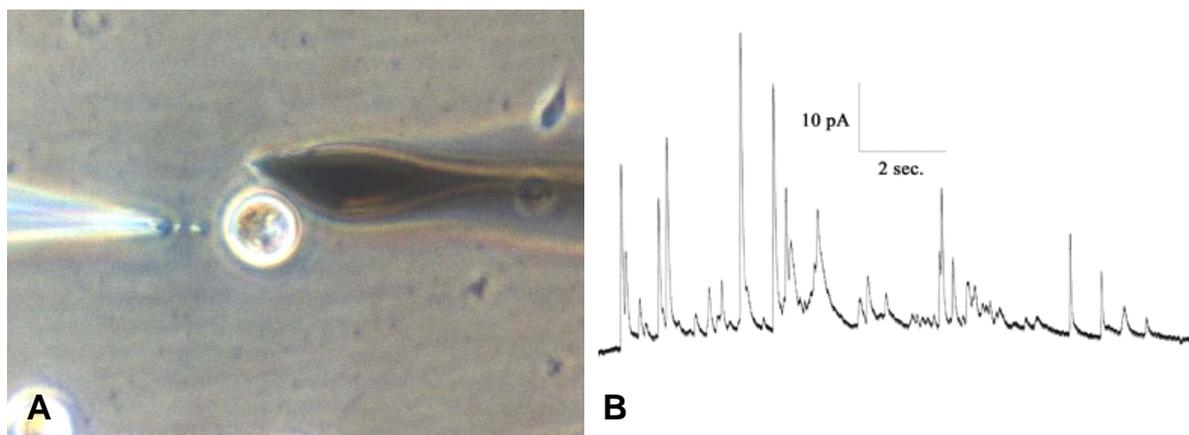


Figure 10 : Mesure de l'exocytose par ampérométrie à fibre de carbone. (A) la cellule au centre est stimulée au moyen d'une micropipette placée à sa gauche; la microélectrode à fibre de carbone (potentiel $\sim 750\text{mV}$) est placée à sa droite. (B) chaque pic de courant représente l'oxydation du contenu d'un GS individuel, libéré lors de l'exocytose.

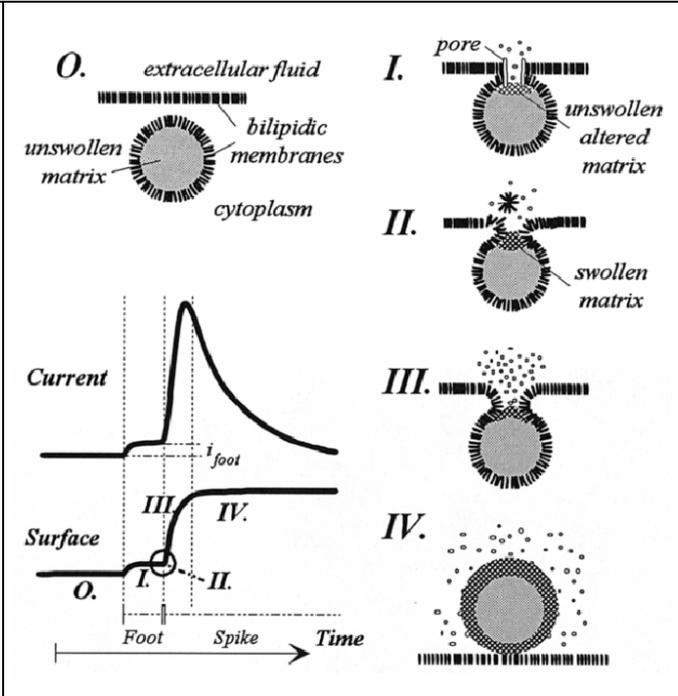
Cette technique possède l'avantage d'être beaucoup plus facile d'emploi que l'électrophysiologie. De plus, la sensibilité et la résolution temporelle de cette technique sont telles que les pics individuels correspondant à l'exocytose d'un GS unique sont facilement isolables. Dans les cellules chromaffines, de tels pics ont des hauteurs de plusieurs dizaines de pA et des durées d'environ 20 ms (Figure 10B). L'intégration par rapport au temps de ces pics de courant donne des valeurs d'environ 1 pC, ce qui correspond à environ 3×10^6 molécules de catécholamines dans un GS. Cela est compatible avec ce qui est estimé dans un GS par des méthodes biochimiques (concentration molaire en catécholamines de 0,5 M) et des mesures morphométriques (diamètre d'un GS d'environ 270 nm).

I.3.1.2.a. Analyse du pic ampérométrique

L'approche ampérométrique a ouvert beaucoup de nouvelles possibilités. Une voie très intéressante est l'analyse théorique de la forme du pic ampérométrique (Amatore, Bouret *et al.* 2000). Cette forme (Figure 11) reflète la vitesse de sécrétion des catécholamines d'un GS. Plusieurs facteurs peuvent limiter la cinétique de sécrétion : l'expansion du pore de fusion et la diffusivité des molécules sécrétées dans la matrice du GS. En effet, dans la matrice du GS, au pH intragranulaire acide, les monoamines sécrétées sont sous forme de cations qui neutralisent des polymères de la matrice, chargés négativement, tels les protéines chromogranines des granules chromaffines ou les protéoglycanes des granules des mastocytes. Des liaisons électrostatiques et hydrogène maintiennent cet ensemble compact en équilibre osmotique.

Lors de l'exocytose, ces cations sont échangés avec des ions Na^+ présents dans le milieu extracellulaire. Cela induit cependant la perte de l'organisation précédente, provoquant une dissociation du complexe et un gonflement de la matrice dû à une augmentation de la pression osmotique ((Figure 11, II). En conséquence, la matrice aurait plusieurs effets sur la sécrétion des hormones : i) le gonflement du gel de la matrice serait la force motrice contrôlant l'expansion irréversible du pore de fusion ; ii) la libération des hormones serait régulée par un processus d'échange ionique au niveau du gel ; et iii) la libération des hormones serait contrôlée par le gonflement du gel.

Figure 11 : Les étapes successives de la libération du contenu d'un GS, avec formation d'un pore initial de conductance limitée. La formation de ce pore (I) conduit à la libération des catécholamines contenues dans le GS, faisant apparaître un faible signal ampérométrique (*foot* ou « pied »). Les échanges osmotiques entre le contenu granulaire et le milieu extracellulaire (II) induisent une augmentation des forces dans la bicouche lipidique (III) aboutissant à la fusion complète du GS avec la membrane plasmique. La dernière phase (IV) correspond à la diffusion des catécholamines depuis la matrice maintenant totalement exposée au milieu extracellulaire. Extrait de (Amatore, Bouret *et al.* 2000).



Très souvent, le pic ampérométrique est précédé par un petit « pied » (Figure 11, I) (Amatore, Bouret *et al.* 2000). Ce phénomène a été étudié en couplant des mesures ampérométriques à des mesures de capacité membranaire. Les analyses, d'abord effectuées sur la sécrétion de vésicules géantes de mastocytes de souris beige (Chow, von Ruden *et al.* 1992 ; Alvarez de Toledo, Fernandez-Chacon *et al.* 1993), indiquent que le pied est associé à l'ouverture du pore de fusion d'un granule. La sérotonine est sécrétée à travers le pore de fusion, avant son expansion irréversible qui provoque le pic ampérométrique (Figure 11, III). Pendant la durée du pied, le taux de sécrétion, estimé à partir de l'amplitude du courant ampérométrique, est proportionnel à la taille du pore, calculée à partir de la conductance. Quand le pore fluctue, le signal ampérométrique suit la même cinétique.

La répétition de ce type d'expérience sur l'exocytose des GS plus petits des cellules chromaffines a été rendu possible par les progrès dans les mesures de capacité (Albillos, Dernick *et al.* 1997). Dans ces cellules, la capacité est mesurée en configuration cellule-attachée, sur un morceau de membrane cellulaire électriquement isolée à l'intérieur de la pipette (Figure 9B). Les mesures ampérométriques nécessitent que la microélectrode à fibre de carbone soit placée à l'intérieur de la pipette de *patch-clamp* (*patch-amperometry*). Là encore, la libération du produit de sécrétion, les catécholamines, est observée à travers le pore de fusion, avant son expansion irréversible.

I.3.1.2.b. Le kiss-and-run

La libération des catécholamines est aussi observée pendant des fluctuations du pore sans pic ampérométrique rapide (plus de 10% des événements d'exocytose). Ces pieds isolés ont été interprétés comme des fusions transitoires. Le fait que l'exocytose, dans les cellules chromaffines, puisse se produire sans expansion irréversible du pore est intéressant du point de vue théorique, puisque cela donne du crédit à l'hypothèse du *kiss-and-run* (voir I.1.2.5). D'après cette hypothèse, d'abord proposée pour les neurones, la libération rapide de neurotransmetteurs n'impliquerait pas la fusion complète, le neurotransmetteur pouvant diffuser rapidement à travers un pore de fusion transitoire. Un tel mécanisme de *kiss-and-run* serait plus adapté à la sécrétion des neurones qu'à celle des cellules endocrines pour plusieurs raisons : i) la neurotransmission demande un recyclage plus rapide des VS, des trains

d'impulsions étant souvent observés ; ii) les VS, de taille réduite (diamètre ~50 nm), peuvent se vider très rapidement (en moins d'1 ms) de leur contenu en neurotransmetteurs à travers un pore de fusion transitoire d'environ 1 nm de diamètre, ce qui ne serait pas possible pour les GS chromaffines (diamètre ~270 nm) ; iii) un tel pore ne serait pas perméable aux polymères de la matrice d'un GS alors que les VS ne contiennent aucune protéine soluble sécrétée. Il a été également montré par ampérométrie dans les cellules chromaffines (Ales, Tabares *et al.* 1999) que le *kiss-and-run* serait favorisé à haute concentration extracellulaire en Ca^{2+} , bien que les concentrations ne soient plus physiologiques (plusieurs dizaines de mM).

1.3.2. Méthodes optiques

Les méthodes électrophysiologiques et électrochimiques permettent d'étudier la sécrétion avec une grande résolution temporelle. Cependant, elles ne donnent aucune information spatiale sur la localisation ou la mobilisation des GS lors des étapes précédant la fusion. Plusieurs techniques d'imagerie *in vivo* cherchent à répondre à ces questions.

La majorité des méthodes optiques appliquées à l'étude de la sécrétion utilisent des marqueurs fluorescents pour visualiser les GS en microscopie de fluorescence. On peut néanmoins noter une étude de la sécrétion en microscopie à contraste interférentiel en réflexion (RICM) (Llobet, Beaumont *et al.* 2003). Cette technique permet de s'affranchir de l'étape de marquage et peut être utilisée en combinaison avec les autres méthodes pour obtenir des informations supplémentaires.

Les premiers articles utilisant la microscopie de fluorescence (à champ large) s'appuient sur des mesures de fluorescence globale au niveau de la membrane cellulaire (Betz et Bewick 1992 ; Ryan, Reuter *et al.* 1993). Les cellules, il s'agit ici de neurones, sont incubées dans un milieu contenant un marqueur membranaire fluorescent, le FM1-43. Celui-ci s'intègre préférentiellement à la membrane cellulaire par simple coefficient de partage. Par endocytose, des VS marquées se forment et sont stockées dans le cytoplasme. Un lavage élimine la fluorescence de la membrane cellulaire. Après stimulation des cellules, on détecte l'exocytose par une augmentation de la fluorescence au niveau de la surface cellulaire. Cependant, la détection d'un événement unique d'exocytose ne peut être réalisée que dans des cas rares (en réussissant à marquer uniquement quelques VS) (Ryan, Reuter *et al.* 1997) et de ce fait cette technique n'a pas eu le succès des méthodes électriques.

Grâce à des marqueurs fluorescents comme l'acridine orange, il est aussi possible de marquer les compartiments acides des cellules, en particulier les GS. Mais ce sont les protéines fluorescentes, dérivées de la GFP (*green fluorescent protein*), permettant de marquer spécifiquement les GS qui mettent les méthodes optiques sur le devant de la scène. La microscopie de fluorescence apparaît dès lors comme un outil de choix pour l'étude de la dynamique des GS à l'intérieur de la cellule.

Cependant, ce type de microscopie (dite de fluorescence à champ large ou encore à épifluorescence) ne permet pas d'obtenir des images de qualité suffisante pour suivre les GS de manière individuelle (voir I.4.1 Figure 13B). En effet, la fluorescence des GS est excitée par une lampe éclairant l'ensemble du volume de la cellule. A l'image nette des GS situés dans le plan de focalisation du microscope se superpose donc une fluorescence parasite provenant des nombreux GS situés hors de ce plan. Il en résulte un fond continu qui réduit fortement le rapport signal à bruit des images obtenues.

Afin de résoudre ce problème, deux voies, reposant sur le principe de la section optique, ont été explorées. La première consiste à éliminer la fluorescence parasite pour ne recueillir que

celle provenant du plan de focalisation du microscope. C'est ce principe qui est utilisé dans la microscopie confocale (Pawley 1996). Peu d'études sur la sécrétion ont été effectuées en microscopie confocale, probablement en raison de sa faible résolution temporelle, et du volume d'excitation important qui provoque un photoblanchiment accéléré des fluorophores utilisés pour marquer les GS.

Une seconde approche pour améliorer le rapport signal à bruit consiste à limiter l'excitation des fluorophores au niveau du plan de focalisation. C'est le principe utilisé en microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente et en microscopie bi-photonique (Denk, Strickler *et al.* 1990) voire tri-photonique (Maiti, Shear *et al.* 1997). Pour ces dernières, l'avantage est de pouvoir regarder dans des cellules au sein d'organes (Nemoto, Kimura *et al.* 2001 ; Takahashi, Kishimoto *et al.* 2002).

I.4. La microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente ou microscopie TIRF

I.4.1. Principe de la microscopie TIRF

Le phénomène optique de réflexion totale (*Total Internal Reflection*, TIR en anglais) peut être observé dans la vie de tous les jours : fibres optiques, éclat des diamants, ... Le principe, basé sur les lois de Snell-Descartes, est relativement simple : si un faisceau lumineux traversant un milieu 1 d'indice élevé n_1 (par exemple du verre) rencontre un milieu 2 d'indice plus faible n_2 (par exemple un milieu aqueux ou une cellule adhérent) et que l'angle d'incidence α est faible, le faisceau est partiellement réfracté et se propage dans le milieu 2 (Figure 12A). Cependant, si l'angle d'incidence α dépasse un certain angle critique α_c ($\alpha \geq \alpha_c$ avec $\alpha_c = \arcsin(n_2/n_1)$), le faisceau subit une réflexion totale et il n'y a plus de rayon réfracté (Figure 12B).

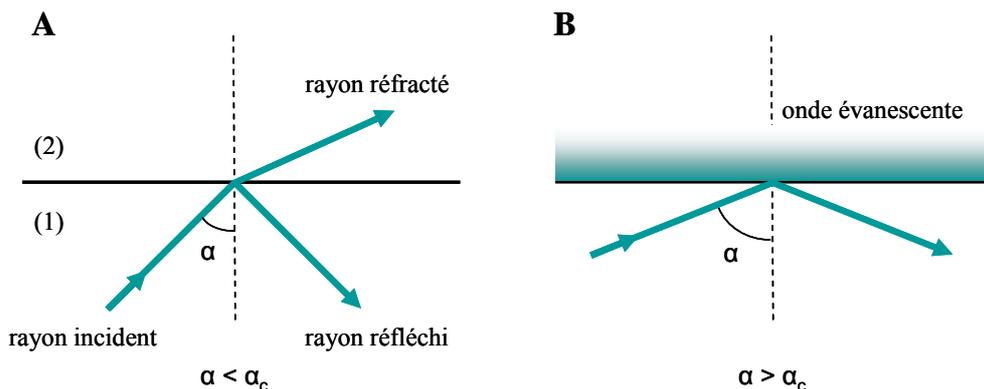


Figure 12 : Réfraction au niveau d'un dioptre plan. (A) Pour un angle d'incidence inférieur à l'angle critique, le faisceau incident est partiellement réfracté. (B) Pour un angle d'incidence supérieur à l'angle critique, le faisceau est totalement réfléchi et une onde évanescente est créée dans le milieu 2. Son intensité décroît exponentiellement lorsque l'on s'éloigne de l'interface.

Les lois de l'électromagnétisme interdisent une discontinuité d'un champ électromagnétique au voisinage d'une interface diélectrique. C'est pourquoi, même s'il est totalement réfléchi, le faisceau incident crée un champ électromagnétique dit évanescent qui pénètre dans le milieu 2

et dont l'intensité décroît exponentiellement avec la distance z de l'interface : $I(z) = I_0 \exp(-z/\delta)$ (Steyer et Almers 2001). La profondeur de pénétration caractéristique δ , appelée aussi profondeur ou épaisseur d'évanescence (qui correspond à la distance au bout de laquelle l'intensité a diminué d'un facteur e soit de 37%), dépend de l'angle d'incidence, de la longueur d'onde et de la polarisation de la lumière ainsi que des indices de réfraction des milieux 1 et 2 :

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

avec λ la longueur d'onde du faisceau lumineux incident (δ est de l'ordre de $\lambda/5$).

Par conséquent, un faisceau laser ($\lambda \sim 500$ nm) venant se réfléchir 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, génère une onde évanescente qui excite spécifiquement les fluorophores situés au voisinage de l'interface (Figure 13A). La fluorescence émise est observée au moyen d'un microscope couplé à une caméra (d'où le nom de *TIR-FM* ou *TIRFM* pour *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*).

En variant l'angle d'incidence α , l'épaisseur d'évanescence peut être ajustée entre 50 et 300 nm, ce qui est très inférieur à la profondeur de champ du microscope ($\approx 1 \mu\text{m}$). Il en résulte un rapport signal à bruit amélioré.

La microscopie TIRF peut donc être utilisée dans l'étude de phénomènes se produisant au voisinage de l'interface verre/cellule. Une des premières applications de cette technique a été d'observer les contacts cellule-substrat dans les années 1980. Ce n'est qu'à la fin des années 1990 que cette technique, permettant d'observer spécifiquement les GS localisés dans la région juxta-membranaire (Figure 13C), est utilisée pour analyser le processus de sécrétion régulée. Le rapport signal à bruit des images obtenues est alors suffisant pour suivre les trajectoires de ces GS de manière individuelle.

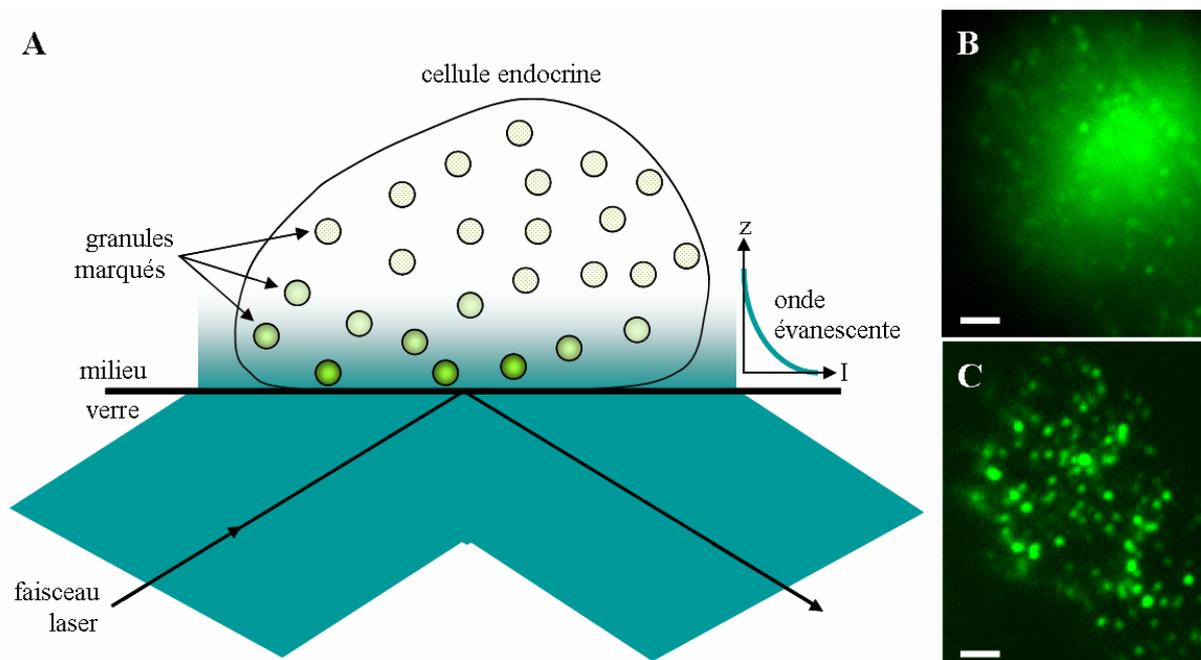


Figure 13 : Observation des GS en microscopie TIRF. (A) L'excitation des GS marqués *via* une onde évanescente permet d'observer spécifiquement les GS présents au voisinage de la membrane plasmique. (B) Observation en épifluorescence d'une cellule neuroendocrine de la lignée BON dont les GS sont marqués par la protéine chimérique NPY-GFP. (C) La même cellule observée en microscopie TIRF. Barre d'échelle pour (B) et (C) : 2 μm

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

La capacité d'effectuer une coupe optique de taille comparable à celle d'une fine coupe de microscopie électronique est au cœur des applications de la microscopie TIRF. Comment cette technique se situe-t-elle par rapport aux microscopies confocale et 2-photons, plus familières et fondées également sur le principe de la section optique ?

La microscopie confocale utilise un sténopé (*pinhole* en anglais) situé sur le trajet optique pour éliminer la fluorescence ne provenant pas du plan de focalisation du microscope (Pawley 1996), tandis que la microscopie à deux photons consiste en une excitation bi-photonique des fluorophores uniquement situés au niveau du point de focalisation d'un laser (White, Squirrell *et al.* 2001).

Le principal inconvénient de la microscopie TIRF par rapport à ces deux autres techniques est son incapacité à observer des phénomènes se produisant à distance de l'interface cellule/verre. En revanche, pour des observations au voisinage de la membrane plasmique basale, la microscopie TIRF, possède deux avantages majeurs.

D'une part, la microscopie TIRF permet *a priori* une acquisition d'image plus rapide. En effet, les images de TIRFM sont capturées image par image au moyen de caméras CCD (*charge-coupled-device*). Ces caméras sont sensibles et/ou rapides (mais rarement les deux) et peuvent maintenant atteindre des rendements quantiques d'environ 80% et des vitesses d'environ 200 Hz (images/s). En revanche, la plupart des systèmes confocaux balayent l'échantillon point par point et utilisent des photomultiplicateurs pour détecter la fluorescence. L'image est ensuite reconstituée à partir de ces points. Par ailleurs, le rendement de détection

des photons est relativement faible. Tout cela fait que les cadences d'acquisition sont généralement lentes (~0,1-5 Hz). Cette différence dans les vitesses d'acquisition tend cependant à se réduire avec le développement de systèmes confocaux multipoints, basés sur des disques Nipkow rotatifs (*spinning disk confocal microscopy*) et qui utilisent pour la détection des caméras CCD. Ils permettent d'atteindre des cadences d'acquisition environ 10 fois plus rapides (Graf, Rietdorf *et al.* 2005).

D'autre part, la microscopie TIRF illumine une coupe verticale d'épaisseur $\sim <100$ nm à comparer aux $\sim 500-800$ nm des microscopies confocale et bi-photonique respectivement. Cette fine coupe optique permet donc un bien meilleur rapport signal à bruit et une meilleure résolution spatiale suivant l'axe orthogonal au plan de focalisation. Les dommages cellulaires et le photoblanchiment des fluorophores dus à l'illumination sont considérablement minimisés.

Ainsi, la microscopie TIRF se présente-t-elle comme la méthode d'imagerie la plus performante pour l'observation de processus biologiques ayant lieu au niveau de la membrane plasmique ou à proximité de celle-ci.

1.4.3. Les montages de microscopie TIRF

Au moment où débutait ma thèse, la plupart des équipes travaillant avec la microscopie TIRF utilisaient des montages « maison ». En fait, plusieurs configurations sont possibles et les choix à faire sont nombreux : microscope inversé ou droit, guidage de la lumière par des miroirs ou par des fibres optiques, excitation *via* un prisme ou à travers l'objectif (*prismless*),... Il n'y a pas de solution idéale, tout dépend des besoins de l'utilisateur. Néanmoins, il faut garder à l'esprit quelques règles et connaître les problèmes pouvant se poser (Oheim 2001).

Il existe deux grands types de montages de microscopie TIRF : à prisme et à excitation par l'objectif. Les deux types de systèmes utilisent des lasers comme source lumineuse. Dans les montages à prisme, les voies d'excitation et de détection de la fluorescence sont découplées (Figure 14A). Le faisceau laser destiné à générer l'onde évanescente vient frapper l'interface lamelle/cellule après avoir traversé un prisme de verre de forme cubique, hémicylindrique ou hémisphérique. En utilisant un prisme hémicylindrique ou hémisphérique, la position du spot lumineux illuminant l'échantillon est fixe même si l'angle d'incidence varie. 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 deuxième type de montage utilise un microscope inversé, l'excitation de la fluorescence et sa détection se faisant à travers l'objectif (Figure 14B). Ce dernier doit posséder une grande ouverture numérique (ON) car celle-ci limite l'angle d'incidence du faisceau laser au niveau de l'interface verre/cellule. En effet : $ON = n_1 \cdot \sin \alpha_{max}$, où n_1 est l'indice de réfraction du milieu entre l'objet et l'objectif et α_{max} le demi-angle d'ouverture, c'est-à-dire l'angle entre l'axe optique et le rayon le plus écarté. Soit : $\alpha_{max} = \arcsin(ON/n_1)$. Pour un indice cellulaire moyen d'environ 1,37 (voir Matériels et méthodes), seul un objectif dont l'ON est supérieur à 1,37 permet d'obtenir des angles d'incidence supérieurs à l'angle critique et de générer une onde évanescente. Des objectifs spéciaux ont donc été développés à cet usage. Les objectifs d'ON 1,45 sont compatibles avec les lamelles de verre et les huiles à immersion standards. Cependant, ils ne permettent de faire varier la profondeur de pénétration que sur une plage d'angles très réduite (pour $n_1=1,52$ et $n_2=1,37$, $64^\circ < \alpha < 72^\circ$ pour $90 < \delta < 200$ nm). Le réglage est donc moins précis. Les objectifs d'ON 1,65 autorisent un réglage sur une plage d'angles plus importante ($51^\circ < \alpha < 66^\circ$ pour $40 < \delta < 100$ nm), mais doivent être utilisés avec des lamelles et

des huiles à immersion à indice de réfraction élevé. Ces lamelles ($n=1,788$), sont relativement coûteuses et ces huiles ($n_1=1,78$) ont l'inconvénient d'être toxiques, volatiles et de laisser des cristaux sur l'objectif après quelques heures en environnement chauffé.

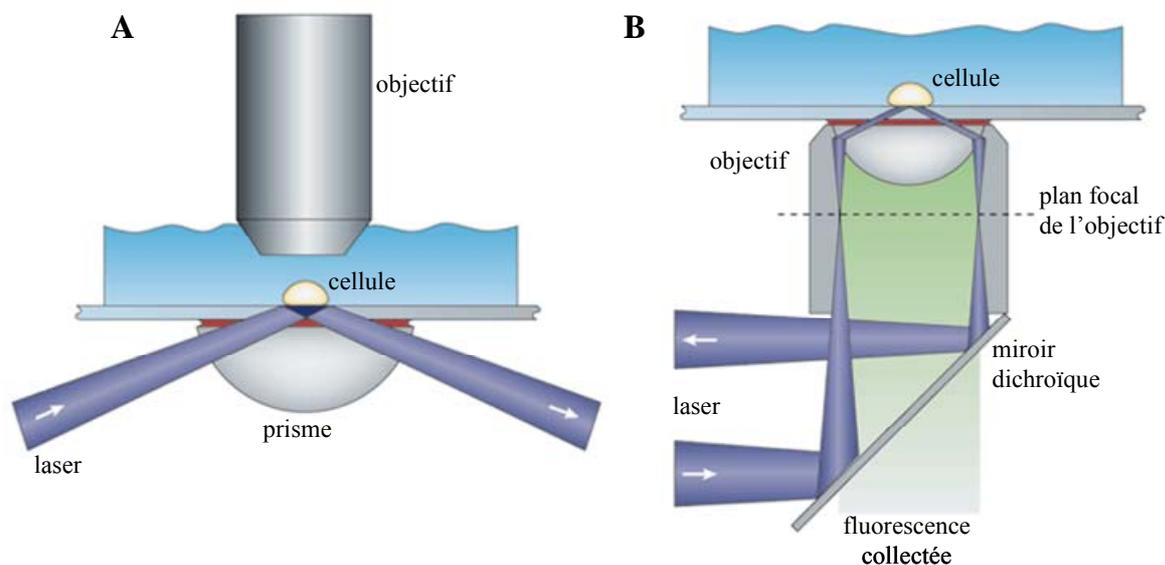


Figure 14 : Les deux catégories de montage utilisées en microscopie à onde évanescente. (A) Montage avec prisme caractérisé par un découplage entre les voies d'excitation et de détection de la fluorescence. (B) Montage pour lequel l'excitation de la fluorescence et sa détection se font à travers l'objectif. D'après (Steyer et Almers 2001).

Un avantage majeur des montages à excitation par l'objectif est de permettre à la fois l'observation et la manipulation aisée des cellules par *patch-clamp*, micro-injection ou d'autres techniques de micromanipulation, alors que cela est difficile sur les montages à prisme. Les microscopes à excitation par l'objectif présentent aussi l'avantage de mieux collecter la fluorescence émise (Steyer et Almers 2001).

L'avantage des montages à prisme réside dans le fait que l'angle d'incidence du faisceau laser peut être ajusté simplement et précisément sur une grande plage. La profondeur de pénétration est par conséquent mieux contrôlée qu'avec les montages à excitation par l'objectif. Par ailleurs, un montage à prisme permet l'utilisation de plusieurs faisceaux à différents angles ou à différentes longueurs d'onde, ce qui autorise une plus grande flexibilité.

Aujourd'hui, la grande majorité des équipes scientifiques travaillant avec la microscopie TIRF pour des applications biologiques utilisent des montages à excitation à travers l'objectif, d'autant que les montages commercialisés (Olympus, Zeiss, Nikon, Leica) sont également de ce type. Au laboratoire, nous avons toutefois préféré une configuration à prisme (voir Matériels et méthodes) afin de pouvoir contrôler simplement et précisément les caractéristiques de l'onde évanescente d'excitation.

Les derniers développements techniques de la microscopie TIRF ont essentiellement consisté à l'associer avec d'autres techniques d'imagerie afin d'étudier différents phénomènes biologiques. Concernant l'étude de la sécrétion régulée, la microscopie TIRF a été associée aux mesures de capacité afin d'étudier simultanément la sécrétion aux pôles apical et basal de cellules chromaffines (Becherer, Pasche *et al.* 2007).

I.5. Connaissances de la sécrétion régulée apportées par la microscopie TIRF

La microscopie TIRF comble les lacunes des méthodes électrophysiologiques et électrochimiques. Grâce à l'observation des positions des GS avant exocytose, les étapes préalables à l'exocytose sont enfin accessibles. Elle apporte aussi des informations complémentaires sur l'événement de fusion. Enfin, grâce à elle, différents mécanismes de reprise de membrane des GS après exocytose ont pu être étudiés.

I.5.1. Premiers articles

La microscopie TIRF étant l'outil de choix pour visualiser des événements se produisant à la membrane cellulaire, elle a été utilisée dans un premier temps pour vérifier les hypothèses sur la localisation des *pools* cinétiques définis grâce aux études électrophysiologiques, en particulier le *pool* RRP supposé situé à la membrane cellulaire.

Steyer, Horstmann et Almers (Steyer, Horstmann *et al.* 1997) ont été les premiers à utiliser la microscopie TIRF pour étudier la sécrétion stimulée dans des cellules chromaffines bovines. Ils ont, en préliminaire, observé par microscopie électronique qu'une petite sous-population des GS accrochés à la membrane plasmique subissait sélectivement l'exocytose lors de la stimulation par une solution à concentration élevée en K^+ , et pourrait correspondre au *pool* RRP mesuré en électrophysiologie. Mais ces données ne restaient encore que des clichés statiques pris à des intervalles de temps différents.

Ils ont pu, grâce à un montage de TIRF à excitation par l'objectif, étudier les propriétés de cette sous-population en visualisant pour la première fois en temps réel des événements uniques d'exocytose au niveau de cette membrane : des GS individuels disparaissent de manière caractéristique en laissant des zones de membrane plasmique vides. Ces zones sont remplies à nouveau de manière lente par de nouveaux GS venant du cytosol pour s'accrocher à la membrane, accrochage qui entraîne une diminution de leur mobilité latérale. Enfin, l'accrochage est réversible : des GS accrochés peuvent quitter la membrane pour retourner au cytosol.

Peu de temps après, Oheim, Loerke, Stühmer et Chow (Oheim, Loerke *et al.* 1998) ont publié des résultats comparables avec le même type de stimulation dans les cellules chromaffines mais en utilisant un montage de TIRF à prisme. Ils ont défini un « *pool* visible », correspondant aux GS les plus proches de la membrane plasmique visibles en microscopie TIRF et ont constaté que le nombre de GS était inférieur à celui observé en microscopie électronique et coïncidait partiellement avec le RRP. Une dépolarisation de la membrane de ces cellules provoque un vidage de ce « *pool* visible » en quelques centaines de millisecondes, en accord avec le concept de RRP. Ils se sont intéressés à la mobilité latérale, mais également à la mobilité axiale des GS (*i.e.* à la mobilité selon l'axe orthogonal au plan de focalisation du microscope) et ont observé que cette dernière chutait d'un ordre de grandeur lors de leur accrochage à la membrane plasmique.

Ces deux premiers articles ont permis d'introduire la microscopie TIRF comme une technique de choix pour l'étude de la sécrétion régulée. Dans la suite de cette partie, nous verrons, pour chaque étape du cycle de sécrétion, les connaissances que la microscopie TIRF a apportées ou remises en cause.

1.5.2. Mouvement des granules de sécrétion dans la région juxta-membranaire

La microscopie TIRF, en offrant la possibilité de suivre les mouvements des GS dans les trois dimensions de l'espace avec une bonne résolution, a permis d'analyser leur comportement dans la région juxta-membranaire. De nombreuses études ont été menées pour étudier les processus de transport des GS jusqu'à la membrane plasmique.

1.5.2.1. Outils d'analyse des mouvements

Les premiers travaux en microscopie TIRF ont introduit différents outils pour quantifier les mouvements des GS. La première étape consiste à suivre les trajectoires de GS individuels dans le plan de focalisation de l'objectif, au moyen d'un algorithme de suivi de particule individuelle (*single particle tracking* ou SPT). Ces trajectoires peuvent être examinées visuellement pour déterminer qualitativement si le mouvement est apparemment aléatoire ou non. Ces trajectoires sont ensuite analysées en calculant les déplacements quadratiques moyens (*mean squared displacement* ou MSD) et en les traçant en fonction du temps. On parle de mouvement diffusif ou brownien lorsque la courbe de MSD en fonction de t est linéaire. La pente de la courbe est alors proportionnelle au coefficient de diffusion latéral D_{xy} . Une courbe ayant une concavité vers le haut correspond à un mouvement dirigé, basé sur des moteurs, tandis qu'une courbe ayant une concavité vers le bas correspond à un mouvement cagé (Steyer et Almers 1999; Oheim et Stuhmer 2000).

Grâce à une mesure d'intensité de fluorescence du GS (après soustraction du bruit de fond local, voir III.1) et à une calibration du champ évanescent, il est par ailleurs possible de déterminer les déplacements axiaux de GS individuels (perpendiculairement au plan de focalisation) avec une résolution de l'ordre de la dizaine de nanomètres (Steyer et Almers 1999). Oheim *et al.* (Oheim et Stuhmer 2000) ont ainsi utilisé les trajectoires tridimensionnelles pour déterminer les MSD et coefficients de diffusion D_{xyz} en trois dimensions. Ils ont ainsi pu distinguer dans les cellules chromaffines trois types de population de GS dont deux majoritaires, la population mobile ($D_{xyz} \sim 3 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$) et la population immobile ou accrochée ($D_{xyz} \sim 2 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$), le reste étant des mouvements à longue portée (vitesse de dérive $\sim 0,3 \mu\text{m}/\text{s}$).

1.5.2.2. Le transport des GS avant fusion : diffusion ou transport actif ?

Ces différentes méthodes ont été utilisées pour distinguer les mouvements diffusifs et dirigés des GS approchant de la membrane plasmique avant fusion. En effet, la diffusion et le transport actif basé sur des moteurs jouent tous deux des rôles importants dans l'acheminement des biomolécules vers leurs destinations. Dans certains cas, comme dans le transport à longue portée le long de neurones, la diffusion est nettement trop lente pour assurer la demande cellulaire et n'est donc pas le mode de transport principal. Cependant, elle peut être suffisante pour les transports à courte portée vers les sites d'exocytose sur la membrane plasmique, et par conséquent des efforts considérables ont été mis en œuvre pour déterminer quel mode de transport principal est utilisé pour acheminer les GS juxta-membranaires à la membrane plasmique avant l'exocytose.

Dans les cellules neuroendocrines au repos, comme les cellules chromaffines (Oheim, Loerke *et al.* 1998; Steyer et Almers 1999), les cellules PC12 (Han, Ng *et al.* 1999 ; Lang, Wacker *et al.* 2000 ; Desnos, Schonn *et al.* 2003; Ng, Lu *et al.* 2003) et les cellules endothéliales (Manneville, Etienne-Manneville *et al.* 2003), la quasi-totalité des GS mobiles dans la région

juxta-membranaire présentent des déplacements latéraux de type diffusif. Par ailleurs, les coefficients de diffusion latéraux de ces GS sont très faibles, de 3-4 ordres de grandeur inférieurs à ceux estimés par la loi de Stokes pour des sphères de même taille placées dans une solution aqueuse (Lang, Wacker *et al.* 2000; Oheim et Stuhmer 2000). Ces mouvements diffusifs sont donc de très faible amplitude. Quelques mouvements dirigés ont cependant été observés dans les cellules PC12 au repos (Lang, Wacker *et al.* 2000).

Pour obtenir des résultats portant plus directement sur l'exocytose, l'analyse des mouvements a également été effectuée dans des cellules neuroendocrines stimulées. Les résultats sont très proches de ceux obtenus dans les cellules au repos. Dans les cellules chromaffines (Oheim, Loerke *et al.* 1998 ; Steyer et Almers 1999; Oheim et Stuhmer 2000), les cellules PC12 (Han, Ng *et al.* 1999 ; Ng, Lu *et al.* 2003), et les cellules bêta-pancréatiques (Ohara-Imaizumi, Nakamichi *et al.* 2002b), les GS arrivant à la membrane avant de subir l'exocytose présentent majoritairement des mouvements latéraux diffusifs. Dans les cellules chromaffines, quelques GS présentent cependant des mouvements apparemment dirigés avant fusion (Steyer et Almers 1999 ; Oheim et Stuhmer 2000) : ils atteignent la membrane non pas perpendiculairement à celle-ci mais avec des angles, supérieurs à 45°. Les vitesses d'approche de ces GS ont été évaluées à 40 nm/s en moyenne (Steyer et Almers 1999).

Plus récemment, un comportement particulier des GS a été observé dans les neurones d'hippocampe en développement : les GS mobiles dans la région juxta-membranaire présentent des mouvements latéraux de type diffusif (55% des GS) mais également des mouvements latéraux rapides (~1 $\mu\text{m/s}$) et dirigés avec une proportion beaucoup plus importante (31%) que dans les cellules neuroendocrines (Silverman, Johnson *et al.* 2005).

I.5.2.3. Rôle de l'actine dans le transport des GS

L'existence des mouvements de GS observés en TIRFM dans la région juxta-membranaire, en particulier dans les cellules au repos, a profondément remis en cause l'hypothèse de la « barrière d'actine ». En effet la face cytoplasmique de la membrane plasmique des cellules eucaryotes est entourée par un réseau de filaments d'actine connu sous le nom de cortex d'actine (Alberts, Johnson *et al.* 2002). Dans les premiers clichés de cellules chromaffines en microscopie électronique, ce cortex apparaît dense et la taille caractéristique des mailles de ce réseau (50-100 nm) est inférieure à celle des GS (200-300 nm de diamètre) (Nakata et Hirokawa 1992). Ces observations ont conduit à l'hypothèse que le cortex d'actine agit envers les GS dans les cellules au repos comme une barrière passive, empêchant les mouvements des GS dans la zone juxta-membranaire. Au moment de la stimulation, cette barrière doit être transitoirement et localement délogée par des enzymes pour permettre le mouvement des GS vers la membrane avant exocytose (Trifaro, Rose *et al.* 2000). Les résultats obtenus en TIRFM ont introduit une nouvelle manière de voir le cortex d'actine : non pas comme une simple barrière passive, mais comme possédant aussi un rôle dans les mouvements des GS.

Les filaments d'actine pourraient intervenir dans les mouvements des GS de plusieurs façons. Les mouvements diffusifs sont probablement causés par un accrochage des GS au cytosquelette d'actine. La faible amplitude de ces mouvements rejoint un peu l'idée de la barrière d'actine, à la différence que celle-ci n'est pas statique, les GS n'étant ni immobiles ni cagés. Ce serait au contraire une barrière dynamique qui permettrait aux GS de se déplacer à courte portée. Les mouvements diffusifs des GS seraient dus à la dynamique propre du réseau d'actine, celui-ci agissant à la manière d'un « tapis roulant » par sa polymérisation et sa dépolymérisation continue. Des arguments en faveur de ce couplage entre les GS proviennent de l'utilisation de drogues agissant sur la dynamique de l'actine. Ainsi, des traitements à la jasplakinolide (Oheim et Stuhmer 2000) (cellules chromaffines) ou à la phalloïdine (Lang, Wacker *et al.* 2000) (cellules PC12), drogues qui stabilisent le cortex d'actine en induisant la

polymérisation, provoquent une immobilisation presque complète des GS ayant des mouvements diffusifs. Avec la latrunculine B, une autre drogue censée dépolymériser les filaments d'actine, des résultats contradictoires ont été obtenus.

Les mouvements dirigés observés dans les cellules neuroendocrines pourraient également impliquer le réseau d'actine. En effet, les quelques vitesses estimées (<100 nm/s) (Steyer et Almers 1999) sont compatibles avec le déplacement de moteurs à base de myosines sur des rails d'actine (Neco, Giner *et al.* 2003 ; Rose, Lejen *et al.* 2003 ; Rudolf, Kogel *et al.* 2003). Il s'agit d'un transport actif qui requiert l'hydrolyse d'ATP. Il a ainsi été montré dans les cellules PC12 que la petite proportion des GS juxta-membranaires présentant des mouvements dirigés se déplace le long de faisceaux d'actine (Lang, Wacker *et al.* 2000). Les mouvements sont aussi diminués par un inhibiteur de la myosine et bloqués en piégeant le Mg^{2+} intracellulaire (Lang, Wacker *et al.* 2000). Dans les neurones d'hippocampe en développement, les mouvements dirigés semblent également être en partie basés sur l'actine. En effet, l'actine est aussi le principal constituant du cytosquelette accolé à la membrane plasmique des neurones d'hippocampe et les mouvements rapides persistent après la rupture totale du réseau de microtubules par le nocodazole ((Silverman, Johnson *et al.* 2005).

Deux types de moteurs myosines, les myosines II et Va, pourraient être responsables de ces mouvements. La myosine II est un moteur moléculaire impliqué notamment dans la contractilité des fibres de stress (Alberts, Johnson *et al.* 2002). Elle serait capable de tirer sur les filaments d'actine et de déplacer les GS qui y sont liés. L'autre possibilité serait la myosine V qui est la seule myosine processive capable de se déplacer sur les rails d'actine. Les GS liés à cette protéine pourraient donc être directement transportés le long des filaments d'actine, comme cela a été décrit pour le transport des mélanosomes dans les mélanocytes (Wu, Rao *et al.* 2002).

A l'heure actuelle, les seuls résultats obtenus sur l'implication de l'une ou l'autre des myosines proviennent de la microscopie confocale et semblent parfois contradictoires. Ainsi pour certains, c'est l'inhibition de l'activité de la myosine II qui se traduit par un plus fort blocage de la dynamique du réseau cortical d'actine et des GS dans les cellules chromaffines (Neco, Gil *et al.* 2002; Neco, Giner *et al.* 2004), alors que d'autres données indiquent que c'est la myosine V qui serait le principal moteur responsable des mouvements dirigés juxta-membranaires dans les cellules PC12 (Rudolf, Kogel *et al.* 2003) et chromaffines (Rose, Lejen *et al.* 2003).

La microscopie TIRF étant mieux adaptée que la microscopie confocale pour sonder les mouvements juxta-membranaires dans le cortex d'actine, on aurait pu espérer qu'elle apporte d'autres éléments de réponse. Mais de manière étonnante, les études en microscopie TIRF ont pour l'instant fourni peu de preuves de mouvements de GS basés sur la myosine et l'actine dans les cellules neuroendocrines. Comme l'a montré Sébastien Huet dans sa thèse, cela serait dû au fait que ces mouvements dirigés sont transitoires et de durée relativement brève. Ils ne sont donc pas détectés par des méthodes analysant des trajectoires dans leur ensemble (Huet, Karatekin *et al.* 2006). Ainsi, il ne s'agit pas de remettre en cause le TIRFM comme la méthode d'observation la mieux adaptée ici mais de lui associer une méthode d'analyse appropriée à ce type de mouvements (voir III.2).

En résumé, en se basant sur les preuves actuelles, le cortex d'actine semble jouer un double rôle dans le transport des GS, le gênant et le facilitant à la fois.

I.5.2.4. Relation entre transport et sécrétion

La sécrétion de GS en réponse à une stimulation prolongée par une concentration élevée en KCl possède des composantes rapides et une composante soutenue (de quelques dizaines de secondes à quelques minutes). Cette composante soutenue pourrait refléter une limitation du transport des GS vers les sites d'exocytose. Cette idée est appuyée par des données démontrant que l'exocytose de GS dans les neurones d'hippocampe et dans les cônes de croissance de cellules PC12 différenciées concerne en grande partie des GS diffusant lentement et situés à des centaines de nanomètres voire des micromètres de la membrane plasmique (Burke, Han *et al.* 1997; Ng, Lu *et al.* 2002b ; Silverman, Johnson *et al.* 2005). A partir de ces distances et des mesures de coefficients de diffusion des GS, l'échelle de temps de l'arrivée des GS à la membrane plasmique peut être calculée (Ng, Lu *et al.* 2003; Silverman, Johnson *et al.* 2005). Elle s'étend d'environ 50 millisecondes à environ 30 minutes, démontrant que la composante soutenue de l'exocytose des GS dans les cellules différenciées est une conséquence prévisible des transports lents et diffusifs des GS à courte portée avant l'exocytose.

Des modifications dans ces transports peuvent significativement altérer les taux de sécrétion des GS. Dans les cônes de croissance de cellules PC12 différenciées, une stimulation par le Ba^{2+} ou une dépolymérisation des filaments d'actine augmente simultanément la mobilité des GS et la composante soutenue de la sécrétion (Ng, Lu *et al.* 2002a). De même, dans les cellules chromaffines, le transport des GS et la sécrétion soutenue du contenu vésiculaire sont tous deux perturbés par des manipulations altérant la fonction de moteurs à base de myosines (Neco, Gil *et al.* 2002). Des travaux de notre laboratoire (Desnos, Schonn *et al.* 2003) ont montré que, dans les cellules chromaffines et PC12, des complexes protéiques (impliquant des protéines nommées MyRIP et Rab27A) peuvent relier les GS à l'actine et contrôler leurs mouvements vers les sites de sécrétion à travers le cortex d'actine. Inhiber leur action provoque une diminution à la fois des mouvements des GS et de la réponse sécrétrice. Ces résultats suggèrent l'importance du transport des GS dans la détermination des taux de sécrétion soutenue des GS.

Dans des lignées de cellules bêta-pancréatiques, des résultats comparables ont été obtenus (Ivarsson, Jing *et al.* 2005 ; Varadi, Tsuboi *et al.* 2005) : l'inhibition de l'action de la myosine Va, également impliquée dans le transport des GS vers la membrane cellulaire, provoque une diminution du nombre de GS accrochés à la membrane ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'insuline. La réalité est peut-être plus complexe encore, car il a été montré très récemment que la myosine Va, outre son effet sur le transport, aurait également un rôle direct dans l'accrochage stable des GS à la membrane plasmique (Desnos, Huet *et al.* 2007). Dans le paragraphe qui suit, nous allons voir que la microscopie TIRF a permis d'étudier de manière très détaillée cette étape d'accrochage des GS.

I.5.3. Relation entre granules de sécrétion et membrane cellulaire

Des données obtenues en microscopie TIRF ont confirmé des idées communément répandues à propos de la distribution et de la mobilité des GS. Cependant, elles ont aussi permis d'en revoir certaines.

I.5.3.1. Définition du *pool* libérable : vésicules liées à la membrane ?

Comme nous l'avons vu précédemment, les premiers articles utilisant la microscopie TIRF pour étudier la sécrétion des cellules chromaffines bovines ont confirmé l'hypothèse selon

laquelle la sécrétion se fait d'abord préférentiellement à partir d'une sous-population de GS situés à la membrane cellulaire. Ils ont également montré que ces GS situés à la membrane ont des mouvements très limités (Oheim, Loerke *et al.* 1998 ; Oheim et Stuhmer 2000 ; Johns, Levitan *et al.* 2001). Une stimulation plus prolongée provoque ensuite le recrutement à la membrane plasmique de GS situés plus profondément dans la cellule (Oheim et Stuhmer 2000).

La microscopie TIRF a permis la vérification expérimentale d'une autre « vieille » idée, selon laquelle les GS nouvellement synthétisés seraient préférentiellement libérées (Duncan, Greaves *et al.* 2003 ; Wiegand, Duncan *et al.* 2003). L'utilisation d'une protéine granulaire fluorescente pouvant changer de couleur avec le temps a permis de montrer dans les cellules chromaffines que le *pool* libérable est formé de GS certes immobiles et accrochés à la membrane plasmique, mais surtout que ces GS sont recrutés à la membrane peu après leur biogénèse, alors que les GS plus « vieux » sont mobiles et localisés plus profondément dans la cellule, formant un *pool* de réserve cytoplasmique.

Toujours en microscopie TIRF, des résultats en contradiction avec ceux qui précèdent ont été publiés. Dans les cônes de croissance de cellules PC12 différenciées (Han, Ng *et al.* 1999 ; Ng, Lu *et al.* 2003) et les neurones d'hippocampe en développement (Silverman, Johnson *et al.* 2005), la majorité des GS sont mobiles. Ce sont eux qui subissent préférentiellement l'exocytose (Han, Ng *et al.* 1999) et forment donc le *pool* libérable, alors que les GS immobiles à la membrane semblent constituer un *pool* réfractaire (Han, Ng *et al.* 1999 ; Ng, Lu *et al.* 2003). L'origine de la différence entre ces résultats et les précédents reste encore inconnue.

I.5.3.2. Une immobilisation à la membrane de longue durée est-elle nécessaire ?

Dans les cellules chromaffines bovines, nous avons vu précédemment que la majorité des GS qui vont subir l'exocytose voient diminuer leur mobilité de manière importante, d'environ deux ordres de grandeur, lors de leur arrivée à la membrane cellulaire (Steyer et Almers 1999 ; Oheim et Stuhmer 2000 ; Johns, Levitan *et al.* 2001), comme s'ils étaient piégés dans une cage ou attachés à un lien. L'origine moléculaire de cette immobilisation est encore discutée. De même, les rapports de cette immobilisation avec les phénomènes d'accostage et d'accrochage sont obscurs.

Les protéines SNARE impliquées dans la fusion des GS avec la membrane plasmique (voir I.5.4.2) pourraient jouer un rôle dans l'accrochage des GS à la membrane plasmique. Cependant, les travaux de Johns *et al.* (Johns, Levitan *et al.* 2001) suggèrent un accrochage par des structures différentes des SNARE. Un autre candidat pour l'accrochage des GS à la membrane cellulaire pourrait être le complexe exocyste (voir I.1.2.3). Le rôle potentiel de l'exocyste dans la sécrétion stimulée sera examiné avec plus de détails dans la discussion de la partie IV (voir IV.6).

La vision classique de la sécrétion propose que les GS passent par un état accroché et immobile de longue durée avant de fusionner. Cette idée s'appuie sur les observations de microscopie électronique. Toutefois cette technique ne donne qu'une vision statique. Elle semble valide pour les cellules chromaffines, les cellules PC12 non différenciées, et les cellules beta-pancréatiques. Par exemple, approximativement 70% des événements de fusion dans les cellules chromaffines impliquent des GS qui sont présents dans le champ évanescent au moins 12 secondes avant la fusion, tandis qu'approximativement 20% des événements impliquent des GS qui ne résident pas plus de 300 millisecondes dans le champ évanescent (Allersma, Wang *et al.* 2004). Cela indique que la majorité des GS dans les cellules

chromaffines se déplacent sur de très petites distances axiales pendant une période longue avant la fusion et qu'ils sont par conséquent relativement immobiles.

Des articles récents ont montré des déplacements possibles des GS déjà accrochés à la membrane lorsque les cellules sont stimulées. Une élévation de la concentration en Ca^{2+} au niveau de la membrane cellulaire provoque une augmentation de la colocalisation entre les GS accrochés à la membrane et les sites d'entrée du Ca^{2+} (Becherer, Moser *et al.* 2003) : les GS qui n'auraient pas subi l'exocytose lors d'une stimulation se déplaceraient donc latéralement pour se rapprocher des canaux Ca^{2+} afin d'augmenter l'efficacité d'une stimulation ultérieure. Cela peut être mis en relation avec le fait que les événements d'exocytose ne se répartissent pas de manière uniforme à la surface des cellules chromaffines d'origine bovine mais se produisent préférentiellement au niveau de zones particulières d'environ 600 nm de diamètre (Allersma, Wang *et al.* 2004).

L'immobilisation à la membrane pendant un temps plus ou moins long avant exocytose peut aussi dépendre du mode de stimulation. Dans les lignées de cellules béta-pancréatiques MIN6, des comportements distincts ont été observés durant les deux phases de l'exocytose stimulée par le glucose (Ohara-Imaizumi, Nakamichi *et al.* 2002b). Durant la première phase, qui dure environ 2 minutes et qui correspond aussi à celle observée en stimulant par le KCl, l'exocytose se fait préférentiellement à partir de GS immobilisés à la membrane et de nouveaux GS arrivent à la membrane. Durant la deuxième phase, qui dure 10 minutes, la sécrétion se fait préférentiellement à partir de GS nouvellement arrivés à la membrane. Dans les cellules chromaffines bovines, la stimulation par le Ba^{2+} libère préférentiellement les « vieux » GS situés dans le cytosol et qui doivent venir à la membrane avant de subir l'exocytose (Duncan, Greaves *et al.* 2003).

En revanche, dans les cônes de croissance de cellules PC12 différenciées et les neurones d'hippocampe en développement, les GS ne semblent généralement pas passer par un état immobile de longue durée avant la fusion (Han, Ng *et al.* 1999; Silverman, Johnson *et al.* 2005). Dans le cas des cellules PC12, les GS s'approchent de la membrane avec des trajectoires aléatoires. Des mesures de l'amplitude des mouvements de ces GS à des instants différents permettent de voir que cette amplitude ne varie pas à l'approche de la fusion et qu'il n'y a pas d'immobilisation mesurable jusqu'à 2 s avant la fusion (Ng, Lu *et al.* 2003). Dans le cas des neurones d'hippocampe en développement, les GS s'approchent de la membrane avec des trajectoires aléatoires ou dirigées. Celles-ci ne montrent pas non plus d'immobilisation de longue durée avant la fusion (Silverman, Johnson *et al.* 2005).

1.5.4. Données sur la fusion

1.5.4.1. Rôle du Ca^{2+} dans l'exocytose

Les méthodes optiques, en particulier la microscopie TIRF, ont bien sûr permis d'observer la fusion des GS situés à la membrane cellulaire lors de l'élévation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Les observations en TIRF ont en outre permis de constater que tous les GS situés à la membrane cellulaire ne subissent pas forcément l'exocytose (Steyer, Horstmann *et al.* 1997 ; Han, Ng *et al.* 1999 ; Steyer et Almers 1999 ; Duncan, Greaves *et al.* 2003 ; Ng, Lu *et al.* 2003 ; Ma, Bindokas *et al.* 2004). D'autres processus de régulation entrent en effet en jeu.

En ce qui concerne la régulation par le Ca^{2+} , la microscopie TIRF a permis d'obtenir des informations spatiales importantes : Becherer *et al.* (Becherer, Moser *et al.* 2003) ont montré dans les cellules chromaffines qu'une condition nécessaire pour qu'un GS subisse l'exocytose

est qu'il soit situé à proximité de canaux Ca^{2+} (<300 nm). Cette condition n'est pas toutefois pas suffisante, le rendement étant seulement d'environ 10%.

I.5.4.2. Rôle des SNARE dans l'exocytose

Nous avons vu que les SNARE pouvaient jouer des rôles à différentes étapes du cycle de sécrétion. La microscopie TIRF a permis de confirmer certains de ces rôles.

Les résultats obtenus par Johns *et al.* (Johns, Levitan *et al.* 2001) montrent que les SNARE ne semblent pas nécessaires à l'accostage des GS à la membrane plasmique. En effet, en faisant exprimer dans des cellules chromaffines des chaînes de toxines tétaniques ou botuliniques clivant les SNARE, la restriction des mouvements des GS au niveau de la membrane cellulaire n'est pas levée pour autant. En revanche, l'accrochage stable à la membrane cellulaire est perturbé. La fusion ne pouvant avoir lieu sans un tel accrochage stable ou arrimage, les SNARE sont donc nécessairement impliqués, directement ou indirectement, dans la fusion.

Dans les cellules bêta-pancréatiques MIN6, une inhibition de la formation du complexe SNARE par l'introduction du motif SNARE (domaine H3) de la syntaxine entraîne non seulement une inhibition de la sécrétion d'insuline par des GS déjà accrochés à la membrane plasmique mais aussi une inhibition de l'accrochage de nouveaux GS à la membrane plasmique (Ohara-Imaizumi, Nakamichi *et al.* 2002a). La syntaxine-1 joue donc deux rôles, à la fois dans la fusion et dans l'accrochage des GS à la membrane plasmique.

Cependant, pour que les SNARE puissent remplir efficacement ces rôles, une concentration locale suffisamment élevée au niveau de la membrane est nécessaire. Lang *et al.* (Lang, Bruns *et al.* 2001) ont montré dans les cellules PC12 que la syntaxine-1 et SNAP-25 sont partiellement colocalisés dans des microdomaines d'environ 200 nm, où les GS viennent préférentiellement s'accrocher et fusionner. Une déplétion en cholestérol provoque la disparition de ces microdomaines, entraînant une diminution de la sécrétion, sans pour autant modifier les caractéristiques de l'événement de fusion proprement dit. Ohara-Imaizumi *et al.* (Ohara-Imaizumi, Nishiwaki *et al.* 2004a) ont trouvé des résultats similaires en microscopie TIRF dans les cellules MIN6. Ils ont en effet observé que la diminution de la sécrétion due à la déplétion en cholestérol correspond à une diminution de l'accrochage des GS à la membrane cellulaire. Ces études ne permettent cependant pas de savoir si ce sont les Q-SNARE qui se regroupent en microdomaines pour constituer des sites préférentiels d'accrochage à la membrane cellulaire ou si c'est l'accrochage de GS au niveau de cette membrane qui provoque le recrutement local de ces protéines.

Dans les cellules bêta-pancréatiques de rats diabétiques, le défaut de sécrétion, par rapport aux rats normaux, à partir de GS déjà accrochés à la membrane est fortement corrélé au nombre réduit de microdomaines de Q-SNARE (syntaxine et SNAP-25) et de GS accrochés (Ohara-Imaizumi, Nishiwaki *et al.* 2004c). L'introduction de SNAP-25 dans ces cellules permet de restaurer à un niveau normal ces trois facteurs. Cela montre le rôle important de SNAP-25 à la fois dans l'accrochage et dans la fusion des GS.

I.5.4.3. Etape de fusion proprement dite

Les connaissances sur le phénomène de fusion proprement dit proviennent de la biochimie, un peu de l'électrophysiologie, mais surtout de l'ampérométrie à fibre de carbone, comme nous l'avons déjà vu (voir I.3.1). Indépendamment des espèces moléculaires et des mécanismes qui interviennent et qui sont toujours débattus, ces techniques ont apporté des informations sur la

formation du pore de fusion, sur son expansion, et ont permis de formuler des hypothèses pour expliquer cette expansion (Amatore, Bouret *et al.* 2000).

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'ouverture du pore de fusion peut être reliée à la conductance mesurée en électrophysiologie et correspond au « pied » situé à la base du pic d'ampérométrie. Les deux techniques permettent une estimation de la taille du pore initial. Cependant, lorsque le pore s'étend, la conductance devient « infinie » c'est-à-dire qu'elle devient trop grande pour être mesurable. L'électrophysiologie ne fournit alors plus d'informations. En revanche, la forme du pic d'ampérométrie donne des indications sur la cinétique de l'élargissement du pore sous l'influence du gonflement du GS.

La microscopie TIRF a permis de retrouver certaines caractéristiques du pore de fusion obtenues en électrophysiologie et en ampérométrie.

I.5.4.3.a. Existence et taille du pore de fusion initial

L'utilisation de différents marqueurs solubles situés dans la lumière des GS montre des vitesses de libération après fusion très différentes. Ces observations ont été expliquées par des vitesses de diffusion du contenu des GS dépendant de la taille du pore de fusion initial (Perrais, Kleppe *et al.* 2004). Elles se placent dans l'hypothèse où la membrane du GS ne fusionne pas complètement avec la membrane cellulaire et où le pore de fusion initial a une stabilité temporelle suffisante.

L'existence du pore et le passage de molécules à travers ce pore ont d'abord été observés avec des GS contenant de l'acridine orange (AO). Cette molécule fluorescente de petite taille (poids moléculaire ~300 Da, taille <1 nm) s'accumule dans les compartiments acides de la cellule, qui sont majoritairement des GS dans les cellules chromaffines (Steyer, Horstmann *et al.* 1997 ; Oheim, Loerke *et al.* 1998) et béta-pancréatiques INS-1 (Tsuboi, Zhao *et al.* 2000). Lors de l'exocytose, l'observation en microscopie TIRF de ces GS qui fusionnent montre une augmentation de l'intensité de fluorescence, due à la sortie de l'AO à travers le pore et à son rapprochement dans le champ évanescent. Suit une diffusion à partir du point de fusion, avant disparition complète et très rapide (en ~100 ms) de la fluorescence.

Des observations similaires sont obtenues lorsque des chimères GFP (25-26kDa) du pro-neuropeptide Y (NPY, 4 kDa, dimension ~4-5 nm), présent dans la lumière des GS, sont libérées dans les cellules PC12 (Taraska, Perrais *et al.* 2003), les cellules chromaffines (Perrais, Kleppe *et al.* 2004) et les cellules béta-pancréatiques (Tsuboi et Rutter 2003 ; Tsuboi, McMahon *et al.* 2004), avec toutefois la différence que la fluorescence peut mettre jusqu'à une seconde avant de disparaître (pour une description plus détaillée de l'événement d'exocytose, voir II.2.1).

L'activateur de tissu plasminogène (tPA) est une protéine également présente dans la lumière des GS et de taille plus importante (63 kDa, dimension ~10-15 nm). La chimère EGFP de cette protéine voit son intensité de fluorescence augmenter brutalement lors de l'ouverture du pore au début de l'exocytose. La fluorescence du spot observé diminue ensuite progressivement sans s'élargir et peut ainsi rester visible plus d'une minute dans les cellules PC12 (Taraska, Perrais *et al.* 2003), chromaffines (Perrais, Kleppe *et al.* 2004) et béta-pancréatiques (Tsuboi, McMahon *et al.* 2004). La persistance de la fluorescence de tPA-EGFP pourrait s'interpréter comme la rétention de cette chimère dans le GS après la refermeture du pore de fusion. De ce fait, la diminution de la fluorescence de tPA-EGFP observée ensuite ne peut être due à une diffusion du tPA-EGFP dans le milieu extracellulaire. En revanche, la sensibilité de l'EGFP au pH permettrait d'expliquer la diminution de la fluorescence comme résultant de la réacidification de l'intérieur du GS après la refermeture

du pore. Lorsque le gradient de pH est annulé au moyen de NH_4Cl introduit dans le milieu extracellulaire, la fluorescence de tPA-EGFP réapparaît, prouvant ainsi que le tPA-EGFP est toujours présent dans le GS (Taraska, Perrais *et al.* 2003 ; Perrais, Kleppe *et al.* 2004).

En somme, d'après les hypothèses de Perrais *et al.*, la taille du pore de fusion initial permettrait le passage rapide de NPY-EGFP à travers le pore de fusion. En revanche, la taille du pore de fusion limiterait le passage de tPA-EGFP. Ces observations donnent ainsi une certaine estimation de la taille du pore de fusion.

I.5.4.3.b. Nature du pore de fusion initial

Une question débattue est la nature du pore de fusion initial (Chernomordik et Kozlov 2005): est-il de nature lipidique ou de nature protéique comme l'ont suggéré les travaux du groupe de Mayer (Peters, Bayer *et al.* 2001)? Un pore de fusion initial purement protéique ferait barrière à la diffusion de marqueurs lipidiques ou de protéines membranaires depuis la membrane du GS vers la membrane plasmique, tandis qu'un pore lipidique permettrait la mise en continuité immédiate des membranes et la diffusion des constituants de la membrane du GS à travers ce pore.

La microscopie TIRF a donné des éléments de réponse. Dans les neurones bipolaires de la rétine (Zenisek, Steyer *et al.* 2002), le marqueur membranaire lipidique FM1-43 diffuse très rapidement de la membrane de la vésicule synaptique vers la membrane cellulaire, dans les 20 ms suivant la fusion (Figure 15B et Figure 15C). Dans les cellules PC12, un autre marqueur membranaire lipidique, le FM4-64, diffuse aussi très rapidement de la membrane des GS vers la membrane plasmique lors de l'exocytose (Taraska et Almers 2004).

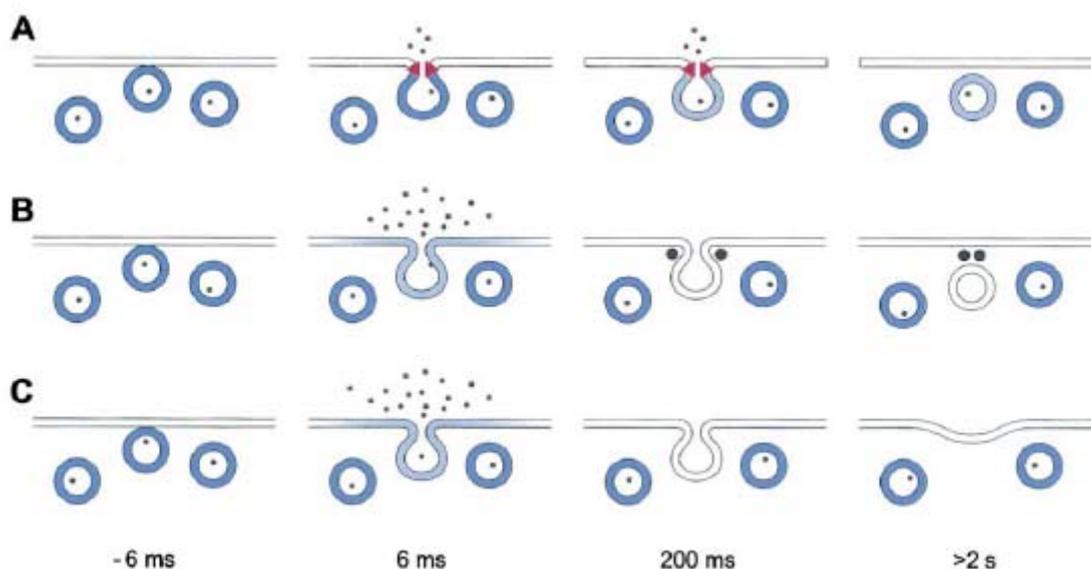


Figure 15 : Trois devenir possibles d'une vésicule après fusion, visualisés au moyen du marqueur lipidique FM1-43 (en bleu). Fusion incomplète (A et B) ou fusion complète (C). (A) Un pore de fusion imperméable aux lipides empêche leur fuite de la membrane vésiculaire vers la membrane cellulaire. Le marqueur doit ressortir de la membrane vésiculaire pour revenir en solution dans la lumière de la vésicule avant de s'échapper par le pore. Une partie du marqueur reste dans la vésicule quand le pore de fusion se referme. (B) Le marqueur quitte rapidement la vésicule par diffusion dans la bicouche lipidique puis se détache de la membrane plasmique. Ensuite, le pore de fusion se referme, probablement par l'action de protéines de fission s'assemblant au site d'exocytose (gros points noirs). (C) Le marqueur s'échappe comme en (B) mais la vésicule s'aplatit dans la membrane plasmique. Les temps sont donnés par rapport au moment de la fusion. Les petits points représentent les molécules de marqueur en solution. Les molécules de marqueur en solution dans la vésicule sont rares. A une concentration de $5 \mu\text{M}$, il y aurait en moyenne 0.04 molécule de FM1-43 dans une vésicule. Extrait de (Zenisek, Steyer *et al.* 2002).

Par ailleurs, une chimère GFP de la protéine SNARE synaptobrevine/VAMP-2 (poids moléculaire total de 13 kDa avec moins de 1 kDa du côté luminal du GS), située sur la membrane des GS, diffuse vers la membrane cellulaire dans les 1 à 10 s après la fusion dans les cellules bêta-pancréatiques (Tsuboi et Rutter 2003 ; Tsuboi, McMahon *et al.* 2004) et les cellules chromaffines (Allersma, Wang *et al.* 2004). Néanmoins, ce marqueur peut aussi, dans certains cas, ne pas diffuser du tout (Tsuboi et Rutter 2003 ; Allersma, Wang *et al.* 2004).

Enfin, une protéine de taille plus importante également située à la membrane des GS, la phogrine (*phosphatase on the granule of insulinoma*) (111 kDa dont 64 kDa du côté luminal du GS), fusionnée à l'EGFP, ne diffuse pas ou très partiellement dans la membrane cellulaire. Sa fluorescence décroît lentement en ~1 s, puis persiste pendant une durée supérieure à une minute dans les cellules PC12 (Taraska, Perrais *et al.* 2003) et dans des cellules bêta-pancréatiques (Tsuboi, Zhao *et al.* 2000 ; Tsuboi et Rutter 2003 ; Tsuboi, McMahon *et al.* 2004). Ces plus grosses protéines sont retenues, au moins partiellement, par les GS qui ont subi une exocytose.

Les résultats sur la diffusion rapide des marqueurs membranaires lipidiques s'opposent à l'hypothèse d'un pore initial de nature protéique (Figure 15A). Le pore initial serait donc de nature lipidique. Pourtant, dans le cas des marqueurs membranaires protéiques, la diffusion n'est que partielle. Cela pourrait s'expliquer par une refermeture de ce pore lipidique.

I.5.4.3.c. Persistance de forme

Pour qu'il puisse y avoir refermeture du pore de fusion, il faut que le GS garde une partie de sa forme pendant un certain temps après le début de la fusion au lieu de s'aplatir immédiatement et complètement dans la membrane plasmique. Cette persistance de la concavité d'un GS est indépendante du fait que le GS se vide partiellement ou complètement et a pu être observée en microscopie TIRF, ce que ne permettaient pas les techniques électrophysiologiques ou en ampérométries.

Comme nous l'avons vu, la rétention de fluorescence des chimères tPA ou phogrine au niveau des GS, à la suite de l'exocytose, est un premier argument indirect en faveur de la persistance de la concavité.

Une preuve plus directe a été obtenue dans les cellules PC12 exprimant à la fois du tPA-EYFP (luminal, jaune) et du ECFP soluble (cytosolique, bleu) (Taraska, Perrais *et al.* 2003). L'observation par microscopie TIRF en deux couleurs montre que les GS situés à la membrane avant exocytose produisent un signal jaune qui se superpose à une zone sans signal cyan. En effet, l'ECFP remplit le cytosol mais est exclu de l'espace occupé par un GS intact (repéré par le tPA-EYFP). Il donne donc directement une image « en négatif » du GS. Après stimulation, beaucoup de GS ayant subi l'exocytose et refermé leur pore de fusion continuent de produire un signal jaune plus faible, qui se superpose toujours à une région sans signal cyan. Cela a été interprété comme une sécrétion incomplète associée à une persistance de la concavité du GS.

Allersma *et al.* (Allersma, Wang *et al.* 2004) ont à leur tour observé cette persistance de forme des GS dans les cellules chromaffines mais avec une méthode plus indirecte utilisant le marqueur de la membrane granulaire VAMP-EGFP. Avant exocytose, les GS situés à la membrane plasmique produisent un signal fluorescent circulaire. Lors de l'exocytose, la majorité des GS fusionnent complètement avec la membrane plasmique et voient leur signal diffuser et disparaître. Dans 10% des cas, des signaux correspondants à des anneaux pouvant persister quelques secondes ont également été observés. Ceux-ci correspondraient à des GS qui conservent partiellement leur forme après fusion. Cette proportion de persistance de forme

est peut-être sous-estimée si on considère les cas où le marqueur membranaire peut s'échapper et disparaître dans la membrane plasmique alors que le GS garde sa forme. Une modélisation a permis d'estimer la profondeur de la concavité persistante à environ 200 nm de profondeur (soit environ 2/3 du diamètre du granule).

Une méthode simple et directe a été utilisée par Ma *et al.* (Ma, Bindokas *et al.* 2004) qui ont observé le phénomène de persistance de forme des GS dans les cellules bêta-pancréatiques par les microscopies confocale et TIRF. Ils ont utilisé simultanément un marqueur intragranulaire vert (syncolline-GFP ou PC3-GFP) et un marqueur extracellulaire imperméant rouge (le dextrane-rhodamine). Quand l'exocytose d'un GS se produit, le marqueur vert s'échappe du GS et le signal disparaît. Dans la majorité des cas, un signal rouge apparaît alors à sa place, correspondant à l'entrée du marqueur rouge dans la concavité persistante du GS. Ce signal rouge persiste en moyenne une dizaine de secondes (de 0,24 s à 82 s) avant de disparaître à son tour. C'est cette méthode que nous avons choisie pour étudier la persistance de forme des GS dans les cellules BON (voir II.2.2).

I.5.4.3.d. Récupération directe

Cette persistance de la concavité du GS peut déboucher, après la refermeture du pore de fusion, sur un recyclage du GS vers l'intérieur de la cellule. Ce GS est repris en bloc, c'est-à-dire ayant conservé tout ou partie de son intégrité et de sa forme. Ce processus a été nommé « récupération directe » (*cavity capture* ou *cavicapture*) (Taraska, Perrais *et al.* 2003 ; Sokac et Bement 2006). Ce processus doit être distingué du *kiss-and-run* (voir I.1.2.5 et I.3.1.2.b) même si on regroupe souvent sous ce terme tout ce qui a trait à la refermeture des vésicules. En effet, rappelons que le *kiss-and-run* correspond en toute rigueur à un événement de fusion transitoire de courte durée (< 1 s) au cours duquel un pore de fusion de quelques nanomètres de diamètre connecte l'intérieur de la vésicule au milieu extracellulaire (Aravanis, Pyle *et al.* 2003 ; Sokac et Bement 2006). Or, dans le cas de la récupération directe, le « pore » connectant la concavité persistante du GS au milieu extérieur peut être aussi large que le diamètre du GS et exister plusieurs minutes avant de se refermer (Sokac et Bement 2006)

Un mécanisme de récupération directe présente plusieurs avantages. En particulier, il court-circuite la nécessité d'un nouveau tri complet par endocytose des composants membranaires, et il facilite la réutilisation de membrane et du contenu luminal des GS afin qu'elles puissent subir une seconde phase d'exocytose. Un autre intérêt de la récupération directe a été suggéré par Taraska *et al.* (Taraska, Perrais *et al.* 2003) et Perrais *et al.* (Perrais, Kleppe *et al.* 2004) : elle pourrait permettre la régulation de la sécrétion différentielle des protéines de la matrice granulaire, étant donné que celles-ci sont sécrétées à des vitesses et en des quantités assez différentes selon leur nature.

I.5.4.3.e. Fusion complète

Cependant la persistance de forme ne débouche par forcément sur une récupération directe du GS. Après un temps plus ou moins long, la membrane du GS peut également finir par s'aplatir complètement dans la membrane plasmique. Le contenu vésiculaire est alors complètement libéré. Ce processus correspond au modèle « classique » de la fusion complète (voir Figure 15C), à cela près que celle-ci est retardée.

Ma *et al.* (Ma, Bindokas *et al.* 2004) ont montré dans les cellules bêta-pancréatiques que la persistance de la concavité débouche majoritairement sur une fusion complète. Ils n'ont vu que des cas rares de refermeture, contrairement à Taraska *et al.* (Taraska, Perrais *et al.* 2003)

et Perrais *et al.* (Perrais, Kleppe *et al.* 2004) qui ont observé une prédominance de la récupération complète respectivement dans les cellules PC12 et chromaffines.

I.6. Conclusion et but du travail

La microscopie TIRF a apporté beaucoup d'éléments nouveaux dans la connaissance de la sécrétion, en particulier concernant les différentes étapes précédant la fusion des GS avec la membrane cellulaire, étapes accessibles seulement aux méthodes optiques. Dans la plupart des cas, elle a proposé de nouvelles descriptions. Ainsi sont apparues des notions comme la persistance de forme et la récupération directe qui n'étaient pas anticipées.

Cependant, au niveau de la description de l'événement d'exocytose proprement dit, différents phénotypes ont été observés, dépendant du type cellulaire, du marqueur utilisé... L'interprétation de ces événements n'est pas encore complètement claire, c'est pourquoi nous les avons étudiés en détail, après avoir optimisé leur obtention dans un type cellulaire encore peu utilisé mais très adapté aux études par microscopie TIRF. De nombreux événements d'exocytose ont ainsi pu être étudiés grâce à l'association de la microscopie TIRF avec la technique de photolibération de Ca^{2+} cagé, ce qui n'avait jamais été fait auparavant à notre connaissance. Cela nous a permis de stimuler la sécrétion des cellules en nous affranchissant de la régulation du Ca^{2+} intracellulaire. Ce travail sera présenté dans la partie II de cette thèse et a donné lieu à la publication d'un article dans l'*European Biophysical Journal* en 2007 (Tran, Huet *et al.* 2007).

Par ailleurs, encore peu d'études en TIRFM ont tiré parti d'un de ses avantages majeurs : la possibilité d'étudier les mouvements des GS dans les trois dimensions de l'espace. Grâce à celle-ci, des analyses beaucoup plus fines des mouvements sont réalisables. Le montage et des méthodes d'analyse associées ont été développés en collaboration avec Sébastien Huet et ont fait l'objet d'une publication dans le *Biophysical Journal* en 2006 (Huet, Karatekin *et al.* 2006). Ma contribution à ce travail sera évoquée dans la partie III de cette thèse.

Enfin, l'observation des mouvements des GS avant leur exocytose par microscopie TIRF a permis de progresser dans la compréhension des étapes préparatoires à la fusion situées à la membrane cellulaire (accostage, arrimage, amorçage), mais leur description reste encore incomplète. Par ailleurs, la microscopie TIRF n'a pas encore apporté de modèle comparable à celui des *pools* cinétiques défini grâce à l'électrophysiologie pour l'étude de l'exocytose dans cellules chromaffines. Un article paru dans le *Biophysical Journal* en 2008 (Karatekin, Tran *et al.* 2008), qui donne les résultats de notre travail sur ces points, sera présenté dans partie IV de la thèse.

Partie II

La sécrétion des cellules BON et l'événement d'exocytose vu en microscopie TIRF

Tran VS, Huet S, Fanget I, Cribier S, Henry JP, Karatekin E.
Characterization of sequential exocytosis in a human neuroendocrine cell line using evanescent wave microscopy and "virtual trajectory" analysis.

European Biophysical Journal. 2007 Dec; 37(1):55-69

II. La sécrétion des cellules BON et l'événement d'exocytose vu en microscopie TIRF

Dans cette partie, le but du travail a été de caractériser l'événement d'exocytose en TIRFM à la fois de manière qualitative mais aussi quantitative.

Le début du travail a donc consisté à rechercher le type cellulaire le plus adapté à ce type d'observation et à trouver la stimulation la plus efficace, afin d'obtenir un maximum d'événements d'exocytose.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux différentes manifestations possibles de l'événement d'exocytose en TIRFM. Mis à part l'événement d'exocytose « normal » déjà largement décrit dans la littérature, nous avons recherché une interprétation à certains types d'événements particuliers.

II.1. Sécrétion des cellules BON

II.1.1. *Choix du modèle cellulaire*

Après avoir testé les cellules chromaffines bovines et les cellules de la lignée PC12 en TIRFM, nous avons opté pour les cellules BON. Comme indiqué préalablement, cette lignée dérive d'une tumeur carcinoïde humaine et elle a les caractéristiques des cellules entérochromaffines. Ses vésicules contiennent de la sérotonine (5-HT) et de nombreux peptides. Bien qu'elles soient mal connues et moins bien caractérisées au niveau du processus de sécrétion, nous avons préféré ces cellules neuroendocrines aux modèles cellulaires classiquement utilisés pour l'étude de la sécrétion d'hormones (en particulier dans notre laboratoire : les cellules chromaffines de la glande médullo-surrénale de bœuf ou celles de la lignée PC12). Elles présentent en effet plusieurs avantages.

Par rapport aux cellules chromaffines qui sont des cultures primaires, elles ont les avantages des lignées cellulaires : rapidité d'obtention et souplesse dans la culture. Leur transfection est relativement plus aisée et elles permettent d'obtenir des lignées stables transfectées.

Par rapport aux cellules de la lignée PC12, elles présentent des granules de sécrétion de taille plus importante (200-300 nm) (Parekh, Ishizuka *et al.* 1994), ce qui se traduit par un meilleur rapport signal à bruit en imagerie de fluorescence et permet d'utiliser des conditions d'excitation minimisant le photoblanchiment des fluorophores (voir clichés en microcopies électronique et optique dans la figure S1 des matériels supplémentaires de l'article du *Biophysical Journal* 2008 (Karatekin, Tran *et al.* 2008)).

Enfin, elles peuvent être cultivées et adhérer directement sur les lamelles de verre « nu », ce qui est particulièrement intéressant pour des observations en microscopie TIRF. En effet, les dépôts de polylysine ou de collagène, destinés à favoriser l'adhésion des cellules sur les lamelles, entraînent une diffusion de l'onde évanescente (Rohrbach 2000). La culture sur

verre « nu » permet donc une meilleure précision sur la profondeur d'évanescence, et donc sur les mouvements calculés à partir des intensités de fluorescence (voir III.1).

Dans le cadre de nos expériences, nous avons à la fois utilisé les cellules BON de la lignée originelle (*wild type*, WT) et un clone nommé N13 qui a été purifié par Bruno Gasnier (voir Matériels et méthodes).

II.1.2. Sécrétion en population de cellules

L'étude de la sécrétion des cellules BON sur des populations de cellules m'a permis de choisir les sécrétagogues les plus appropriés pour passer ensuite à l'étude de la sécrétion en cellule unique, en TIRFM.

Alors que les cellules BON sont habituellement étudiées en mesurant leur sécrétion endogène à l'aide d'anticorps dirigés contre les produits de sécrétion (peptides ou sérotonine), nous avons d'abord commencé par caractériser ces cellules en utilisant les méthodes utilisées pour étudier la sécrétion des cellules neuroendocrines comme les cellules chromaffines et les cellules PC12.

Les cellules sont incubées dans un milieu contenant de la sérotonine tritiée [³H]5-HT (voir Matériels et méthodes). La sérotonine est accumulée dans les cellules grâce à un transporteur de recapture situé sur la membrane plasmique, puis dans les GS grâce à un transporteur vésiculaire de monoamine (VMAT1, sensible à la réserpine). Le pompage vésiculaire est facilement démontré en utilisant des cellules dont les membranes plasmiques ont été perméabilisées par un traitement à la digitonine. Après lavage du milieu radioactif, la sécrétion de la population de cellules est stimulée par un milieu Locke complété avec le sécrétagogue voulu (acétylcholine, baryum...) en présence de Ca²⁺, les conditions non stimulées étant réalisées en présence de solution de Locke seul.

II.1.2.1. Lignée BON originelle

Les propriétés sécrétrices de la lignée cellulaire originale ont été testées en population de cellules en collaboration avec Isabelle Fanget. Suivant les données de la littérature sur la physiologie des cellules entérochromaffines (Tran, Marion-Audibert *et al.* 2004) (voir Annexe VII.2), dont dérivent les cellules BON, nous avons testé des agonistes muscariniques et β-adrénergiques (Figure 16).

L'agoniste physiologique le plus efficace est l'acétylcholine (ACh à 100 μM) avec 8% de sécrétion. La stimulation par l'ACh est de type muscarinique et non nicotinique : elle est mimée par la muscarine et elle n'est pas strictement dépendante de la concentration extracellulaire en calcium. Elle agit vraisemblablement par libération des stocks intracellulaires de calcium. L'isoprotérénol (10 μM), qui agit sur les récepteurs β-adrénergiques, donne des résultats très faibles.

Les agonistes couramment utilisés pour déclencher la sécrétion des cellules chromaffines (nicotine et dépolarisation par K⁺Cl⁻) donnent des résultats quasi-nuls (Tran, Marion-Audibert *et al.* 2004). Les cellules BON présentent donc une différence avec les cellules chromaffines avec lesquelles une augmentation de [K⁺] extracellulaire induit une dépolarisation de la membrane plasmique et une ouverture des canaux Ca²⁺ voltage-dépendants. On peut suggérer deux causes possibles pour expliquer cette absence de réponse dans les cellules BON : soit la dépolarisation nécessaire est trop importante pour être déclenchée par l'augmentation de [K⁺] extracellulaire, soit ces canaux Ca²⁺ se referment trop vite.

Quant aux seconds messagers, la forskoline, qui agit par la protéine kinase A, donne des résultats faibles (5% de sécrétion), et le PMA, un ester de phorbol agissant par la protéine kinase C, donne de meilleurs résultats (18% de sécrétion).

Le sécrétagogue pharmacologique le plus efficace est le baryum (Ba^{2+} à 3,7 mM), avec 22% de sécrétion. Habituellement, le Ba^{2+} bloque les canaux K^+ , entraînant une dépolarisation de la cellule, et donc l'ouverture des canaux calciques sensibles au potentiel de membrane. Comme ici la dépolarisation par le K^+ est inefficace, on peut penser que le Ba^{2+} déclenche directement l'ouverture des canaux calciques. Les ions Ba^{2+} peuvent ensuite pénétrer dans les cellules par ces canaux calciques (cela est confirmé par le fait que la nifédipine inhibe la sécrétion induite par le Ba^{2+}) (Tran, Marion-Audibert *et al.* 2004). Enfin, leur mode d'action n'est pas encore bien déterminé, mais deux voies sont possibles : ils peuvent soit agir à la place des ions Ca^{2+} (le milieu extracellulaire n'en contenant pas) en mimer leur action sur la machinerie d'exocytose, soit déclencher des événements aboutissant à la libération de Ca^{2+} intracellulaire.

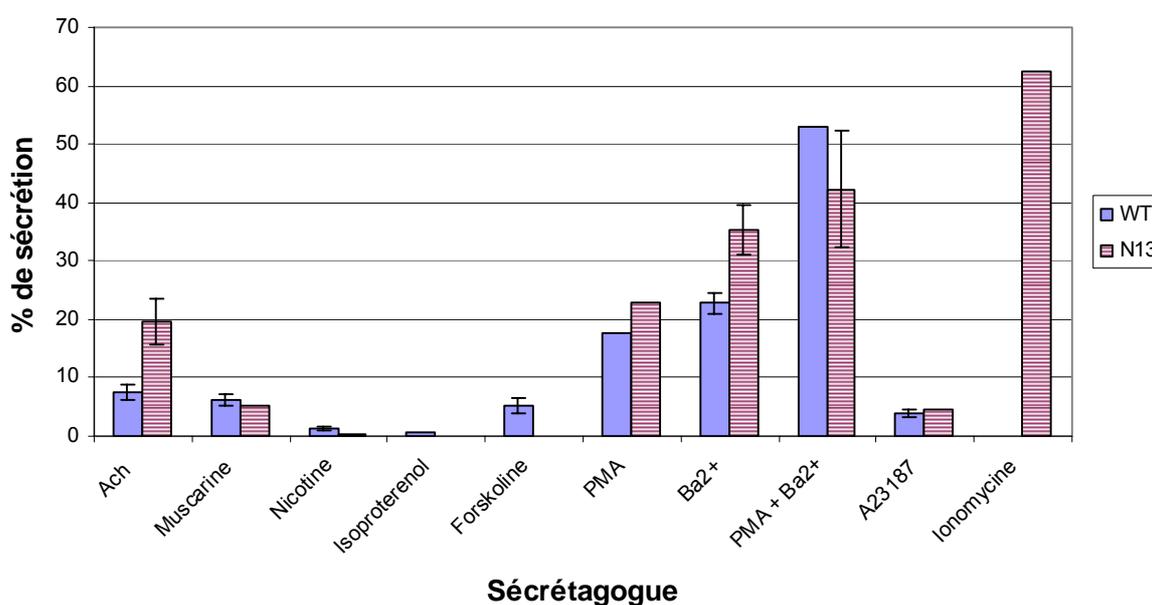


Figure 16 : Comparaison des lignées BON originelle (WT *wild-type*) et N13 en sécrétion de population pour différents types de sécrétagogues. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

II.1.2.2. BON N13

La majorité des travaux en TIRF ayant été effectués avec le clone N13, pour des raisons que nous expliciterons plus loin, nous avons également comparé la réponse sécrétrice du clone N13 à celle de la lignée BON originelle.

Le clonage n'a pas modifié qualitativement les propriétés sécrétrices des cellules : seuls les sécrétagogues qui déclenchaient significativement la sécrétion des cellules BON de la lignée originelle fonctionnent aussi sur le clone N13.

En revanche, les résultats ont été quantitativement améliorés (Figure 16). En effet, avec ces cellules, l'efficacité de l'acétylcholine et du Ba^{2+} pour induire la libération de $[^3H]5-HT$ a augmenté pour atteindre, respectivement, 20 % et 35 % au lieu de 8% et 22%, bien que ces chiffres soient variables suivant les cultures cellulaires. Pour le PMA, l'augmentation est plus faible (de 18 à 22 %). L'origine de cette amélioration sera éclaircie par les travaux sur cellules uniques.

Sur la lignée N13, nous avons aussi testé l'effet de l'ionomycine, un ionophore calcique (10 μM), en présence de 2 mM de Ca^{2+} . Ce composé a donné une réponse forte et reproductible (60%). Le fait que cet ionophore donne des résultats plus reproductibles suggère que la signalisation calcique soit à l'origine des difficultés de reproductibilité.

II.1.3. Sécrétion en cellule individuelle par TIRFM

Parmi tous les sécrétagogues testés en population, nous nous sommes d'abord limités à l'acétylcholine (ACh) qui était le sécrétagogue le plus physiologique et au baryum (Ba^{2+}) qui était le sécrétagogue pharmacologique le plus efficace.

II.1.3.1. Lignée BON originelle

II.1.3.1.a. Stimulation par le Ba^{2+} et l'ACh

Nous avons vu que la sécrétion de population de cellules BON de la lignée originelle était loin d'être satisfaisante. L'observation de la sécrétion en TIRFM fut encore plus décevante. En effet, le taux de cellules positives (cellules produisant au moins un événement d'exocytose après stimulation) était faible : en moyenne 30% pour le Ba^{2+} , et 20% pour l'ACh (Figure 17). De plus, de même qu'en sécrétion de population, ces résultats pouvaient varier fortement suivant les cultures cellulaires : le taux de cellules positives pouvait chuter jusqu'à 20% (une cellule sur cinq) pour le Ba^{2+} et 6% (une cellule sur quinze) pour l'ACh.

Les résultats en Ba^{2+} ont été confirmés par des études de sécrétion faites en ampérométrie (Koulm Guillaumie, données non montrées) : la majorité des cellules ne répondaient pas à la stimulation par le Ba^{2+} . Le faible taux de cellules positives observé en TIRFM n'est donc pas dû à une différence de réponse entre le pôle basal et le pôle apical de la cellule.

Ce faible taux de cellules positives suggère une hétérogénéité de la lignée BON originelle au niveau de la réponse sécrétrice, ce qui pourrait expliquer les résultats en sécrétion de population : les faibles taux de sécrétion obtenus (Ba^{2+} 22%, ACh 8%) seraient donc principalement dus à l'hétérogénéité de la lignée BON, qui comporterait des cellules non stimulables dans les conditions expérimentales choisies.

II.1.3.1.b. Perméabilisation par la digitonine

Pour étudier les étapes finales de l'exocytose, l'important est avant tout de maximiser les réponses sécrétrices. Nous avons donc cherché à utiliser les méthodes de stimulations les plus efficaces que nous avons à notre disposition, en particulier les méthodes de perméabilisation.

Des études antérieures ont montré que l'on pouvait s'affranchir des mécanismes de régulation du calcium cytosolique en perméabilisant la membrane plasmique avec des substances telles que la digitonine (Dunn et Holz 1983 ; Sarafian, Aunis *et al.* 1987). Ces méthodes ont permis de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes de la sécrétion dans les cellules chromaffines (Holz, Bittner *et al.* 1989 ; Bittner et Holz 1992 ; Morgan et Burgoyne 1992) et PC12 (Hay et Martin 1992)). La digitonine entraîne des perforations dans la membrane cellulaire par interaction avec le cholestérol. Dans ces conditions, il n'existe plus aucun gradient ionique au niveau de cette membrane. La concentration en Ca^{2+} intracellulaire est alors tamponnée au niveau de la concentration extracellulaire, et cette brusque augmentation provoque la sécrétion.

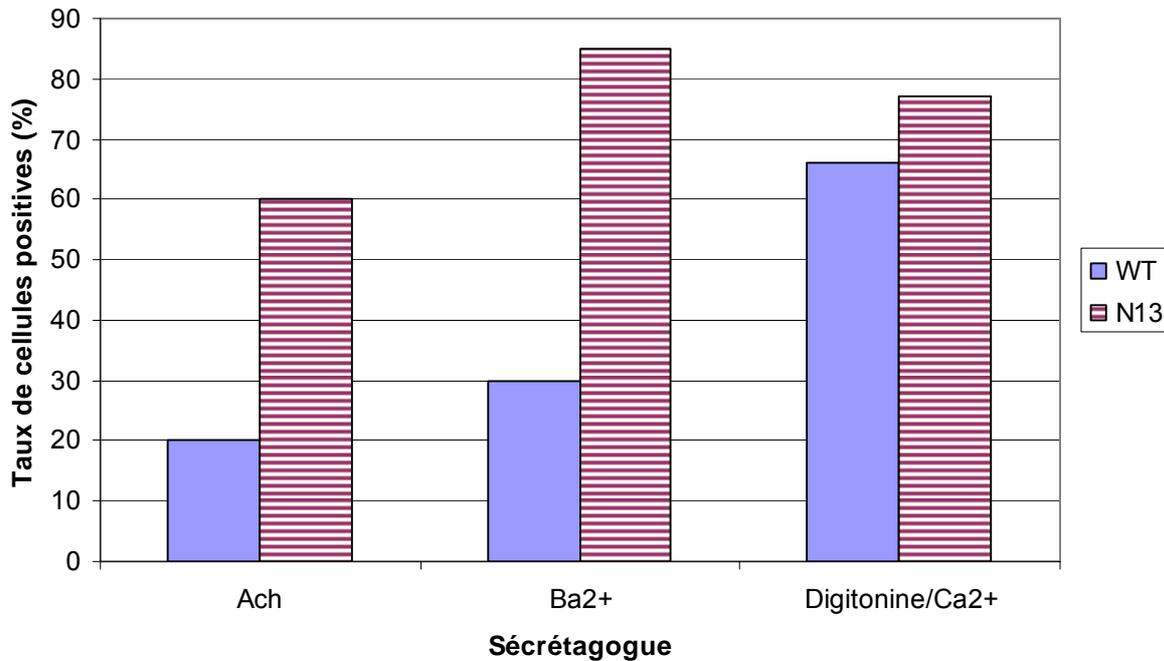


Figure 17 : Comparaison des lignées BON originelle (WT *wild-type*) et N13 en sécrétion en cellule individuelle (TIRFM) pour différents types de sécrétagogues.

La perméabilisation des cellules à la digitonine en présence de Ca²⁺ extracellulaire permet d'obtenir un taux de cellules positives plus élevé qu'avec la stimulation par le Ba²⁺ et l'ACh : 66% des cellules (2 sur 3) ont répondu positivement (Figure 17) au lieu de 30% et 20% avec le Ba²⁺ et l'ACh respectivement. Ces résultats suggèrent que les faibles réponses obtenues par les cellules BON avec le Ba²⁺ et l'ACh ne sont pas dues à une limitation au niveau de leur machinerie de fusion, mais que la sécrétion est ici essentiellement régulée au niveau de l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique [Ca²⁺]_i. De plus, les résultats en perméabilisation sont plus reproductibles : ils varient beaucoup moins avec les cultures cellulaires que ceux obtenus en stimulant avec le Ba²⁺ ou l'ACh. Cela suggère encore que les conditions de culture peuvent fortement modifier la sensibilité des cellules à la stimulation en altérant la signalisation calcique au niveau de la membrane plasmique.

II.1.3.2. BON N13

II.1.3.2.a. Stimulation par l'ACh et le Ba²⁺

Taux de cellules positives

En sécrétion de population, nous avons vu que le clone N13 donnait de meilleurs résultats que les cellules de la lignée originelle. En TIRFM, les taux de cellules positives ont également été nettement supérieurs à ceux obtenus avec les cellules de la lignée originelle (Figure 17) :

- En stimulant les cellules du clone N13 avec l'ACh, le taux de cellules positives est passé de 20 à 60 %.
- Avec le Ba²⁺, le taux de cellules positives a augmenté de manière encore plus importante, passant de 30% à 85%.

Soit un taux de cellules positives qui a presque triplé dans les deux cas.

Du point de vue de la sécrétion, la population de cellules du clone N13 est beaucoup plus homogène que la lignée BON originelle. L'hétérogénéité de la lignée BON au niveau de la sécrétion aurait donc une origine génétique : cette lignée est en fait constituée de clones différents, répondant plus ou moins à la stimulation. Ce type d'hétérogénéité est fréquent dans les lignées dont le génome évolue au cours du temps.

Sécrétion en cellule individuelle

Si on considère seulement les cellules positives, stimulées à l'ACh ou au Ba^{2+} , la sécrétion en cellule individuelle peut varier fortement : parmi les GS visibles dans le champ évanescent, cela peut aller de quelques GS subissant l'exocytose jusqu'à dépasser une centaine d'événements par cellule.

Rappelons que c'est l'augmentation de la concentration locale en calcium cytoplasmique $[Ca^{2+}]_i$ qui normalement déclenche les dernières étapes de l'exocytose des GS : cette concentration doit atteindre un niveau suffisamment élevé et augmenter assez rapidement pour ne pas être immédiatement annulée par les systèmes de régulation de la cellule.

Or, dans le cas de la stimulation par l'ACh, les mécanismes aboutissant à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ à partir de stocks intracellulaires sont complexes. Par conséquent, tous les GS situés à la membrane plasmique ne verraient pas la même $[Ca^{2+}]_i$ et ne subiraient donc pas forcément l'exocytose.

Le mécanisme d'action du Ba^{2+} est plus complexe et moins connu dans les cellules BON. Comme nous l'avons déjà évoqué, d'après la littérature, l'exocytose serait induite par les ions Ba^{2+} directement ou par l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire ou provenant de stocks intracellulaires. Cette complexité pourrait expliquer la diversité des réponses.

Finalement, la sécrétion obtenue avec le Ba^{2+} peut être importante mais, de même qu'en sécrétion de population, les résultats restent encore soumis à des aléas : ils peuvent beaucoup varier en fonction des conditions de culture et de transfection des cellules.

Or, nous voulons obtenir une sécrétion la plus importante possible pour étudier les événements d'exocytose. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers des méthodes comme la perméabilisation par la digitonine.

II.1.3.2.b. Perméabilisation par la digitonine

Taux de cellules positives

La perméabilisation des cellules BON N13 par la digitonine en présence de calcium a permis d'obtenir un taux de cellules positives élevé (77% en moyenne).

Les cellules BON de la lignée originelle atteignent un taux de réponse presque aussi élevé, également dans le cas de la perméabilisation, avec 66% de cellules positives. L'effet de l'hétérogénéité génétique de la lignée originelle en termes de sécrétion est donc quasiment abolie quand on « court-circuite » la membrane plasmique. Cela laisse penser que cette hétérogénéité génétique s'exprime surtout au niveau de la régulation du Ca^{2+} cytoplasmique : dans les différents clones composant la lignée BON originelle, la chaîne des événements déclenchant l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ suite à une stimulation n'est pas aussi performante.

Enfin, ce taux élevé de cellules positives de 77% est proche de ceux obtenus avec les autres types de stimulation sur les cellules N13 (85% avec le Ba^{2+} , 60% avec l'ACh). On peut donc

en déduire que le clone N13 régule très efficacement le niveau de Ca^{2+} cytoplasmique pour déclencher la sécrétion suite à une stimulation.

Sécrétion en cellule individuelle

En perméabilisant les cellules du clone N13 par la digitonine en présence de Ca^{2+} , nous pensions pouvoir nous affranchir de tous les mécanismes de régulation et obtenir une sécrétion élevée en cellule individuelle.

Nous avons été surpris de constater qu'il y avait là encore une grande variabilité dans la réponse : alors que la concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ était pourtant la même dans tous les cas où la cellule était perméabilisée, certaines cellules ont présenté très peu de GS subissant l'exocytose, comme c'était le cas avec les stimulations par le Ba^{2+} ou l'ACh.

De nombreuses hypothèses peuvent expliquer cette hétérogénéité : i) une nouvelle hétérogénéité génétique existerait au niveau de l'appareil de sécrétion ; ii) l'exocytose pourrait impliquer des partenaires limitants, protéiques ou non, dont la disponibilité pourrait dépendre de l'état métabolique des cellules ; iii) enfin, il pourrait s'agir d'un artefact dû à la perméabilisation cellulaire. En effet, la digitonine est perfusée sur la face apicale des cellules et les événements d'exocytose pourraient donc se produire essentiellement sur cette face, plus accessible. Même si la cellule est perméabilisée à terme, l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pourrait ne pas être assez rapide et massive pour déclencher une sécrétion importante sur la face basale, d'où une grande variabilité des réponses. A l'appui de cette hypothèse, des expériences faites avec le marqueur Fluo-4 ont montré que la montée de Ca^{2+} cellulaire après une perméabilisation par la digitonine prenait, en moyenne, 10 s. Ainsi, sans éliminer les autres hypothèses, cette difficulté nous est apparue réelle.

II.1.3.3. Photolibération de « Ca^{2+} cagé »

Une autre manière d'induire la sécrétion des cellules, en déclenchant directement l'augmentation de la concentration en calcium cytoplasmique $[\text{Ca}^{2+}]_i$, est de l'engendrer directement dans le cytoplasme par photo-libération de « calcium cagé » préalablement introduit dans la cellule (voir I.3.1.1.b). Le premier intérêt de la méthode du « calcium cagé » est le même que celui de la perméabilisation : elle permet de s'affranchir des mécanismes de régulation du calcium au niveau de la membrane plasmique afin de déclencher la sécrétion.

Sous l'appellation générique de « calcium cagé », on désigne en fait un chélateur du Ca^{2+} qui peut être photolysé par un flash de lumière UV et libérer le calcium de manière quasi-instantanée et directement dans le cytoplasme de la cellule, déclenchant ainsi l'exocytose des GS. Différentes molécules de ce type ont été mises au point et utilisées pour étudier la sécrétion : le DMNP-EDTA appelé aussi DM-Nitrophen (Ellis-Davies et Kaplan 1988), le NP-EGTA (Ellis-Davies et Kaplan 1994), et enfin le DMNP-EGTA-4 (Ellis-Davies 1998).

C'est la première fois à notre connaissance que cette technique est associée à la microscopie TIRF. Seules les cellules N13 ont été utilisées pour cette approche. Des augmentations de Ca^{2+} sont induites par la photolyse du NP-EGTA- Ca^{2+} (chargé dans les cellules par incubation de l'acétoxyméthylester du NP-EGTA ou NP-EGTA-AM) au moyen de flashes UV successifs toutes les 6 ou 10 s (voir Matériels et méthodes). Chaque flash UV a une durée de l'ordre de 10 ms et provoque une augmentation brutale de calcium, en une durée inférieure à l'intervalle entre deux images (100 ms). Dans un premier temps, nous avons mesuré ces augmentations par imagerie calcique à l'aide de la sonde Fluo-4.

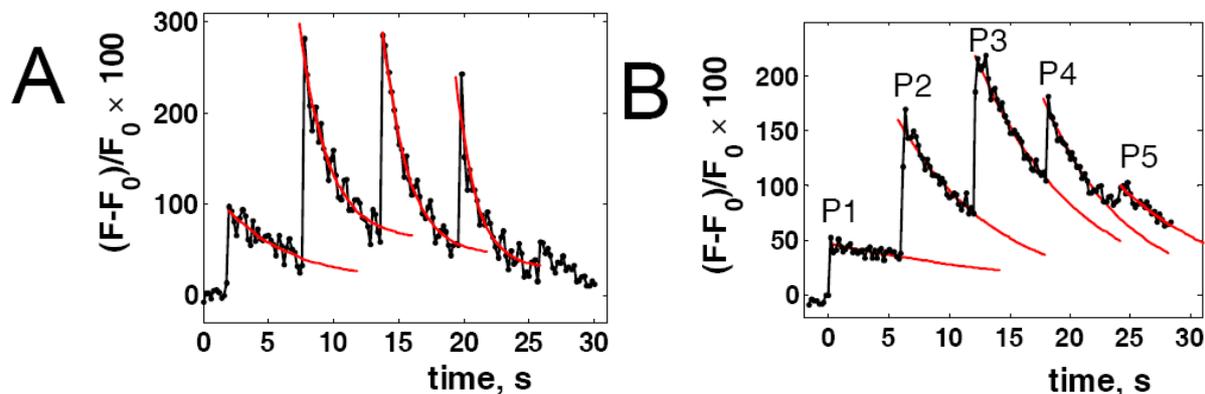


Figure 18 : Mesures de fluorescence du Fluo-4. Les cellules, co-incubées avec du NP-EGTA et du Fluo-4, sont soumises à des flashes UV toutes les 6 secondes. (A) Exemple de mesure provenant d'une seule cellule. Les modélisations des pics par des exponentielles permettent d'obtenir les temps caractéristiques suivants, pour les flashes 1 à 4 : 14.9 ± 7.0 s, 2.2 ± 0.8 s, 1.9 ± 0.3 s, et 1.5 ± 0.6 s respectivement. (B) Mesures de fluorescence du Fluo-4 moyennées sur 10 cellules. Les modélisations des pics de même qu'en A amènent les temps caractéristiques suivants pour les pics 1 à 5 : 19.4 ± 7.4 s, 8.3 ± 1.3 s, 8.1 ± 0.8 s, 6.7 ± 0.6 s, et 9.3 ± 1.6 s respectivement. Cette figure correspond à la figure S2 des matériels supplémentaires de l'article (Karatekin, Tran *et al.* 2008).

L'utilisation du Fluo-4 a également montré que, suivant l'état cellulaire suite à la transfection, le chargement en NP-EGTA-AM peut varier fortement suivant les cellules, entraînant parfois des montées de Ca^{2+} insuffisantes lors des flashes UV. Et si on observe bien une montée rapide du signal après les flashes UV, ceux-ci ne présentent pas tous la même efficacité pour libérer le Ca^{2+} : le premier flash UV provoque une augmentation très faible de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (augmentation d'intensité de fluorescence de l'ordre de 50%), tandis que les flashes suivants provoquent une montée en Ca^{2+} très variable (en général supérieure à 100%), avec un effet cumulatif (Figure 18).

L'inefficacité du 1^{er} flash UV pourrait s'expliquer par le fait que le Ca^{2+} libéré peut être recapté par les molécules de NP-EGTA non couplées au Ca^{2+} . Une autre interprétation serait que la cellule essaie de réguler le $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et recapture une partie du Ca^{2+} libéré dans les stocks intracellulaires.

Lorsque la technique a été appliquée aux cellules transfectées par le NPY-GFP et que leur exocytose a été suivie par TIRFM, de nombreux événements de sécrétion ont été détectés après les flashes UV, à l'exception du premier (Figure 19). Le taux de cellules positives atteint 67% (92 cellules sur 138), ce qui est comparable à celui obtenu en digitonine/ Ca^{2+} et avec le Ba^{2+} .

Cependant, la sécrétion en cellule individuelle reste très variable suivant les cellules (de 1 événement à 94 événements d'exocytose, montrant que l'hypothèse de l'homogénéité du Ca^{2+} intracellulaire n'est certainement pas seule en cause.

Ainsi, cette méthode ne permet pas de résoudre le problème de l'hétérogénéité de la réponse. Elle a aussi le défaut de ne pas contrôler la concentration en Ca^{2+} , du fait de la méthode de chargement des cellules par le NP-EGTA-AM (voir Matériels et méthodes). Mais, elle possède l'avantage par rapport à la perméabilisation de pouvoir dater exactement les événements d'exocytose par rapport à l'augmentation du calcium cytoplasmique. De plus, elle permet d'obtenir une sécrétion importante, autant que la perméabilisation par la digitonine et de manière plus reproductible. C'est pourquoi nous avons retenu préférentiellement ce mode de stimulation dans la suite de ce travail.

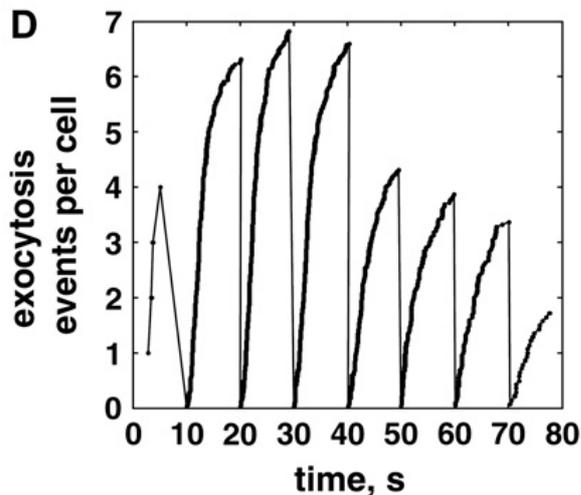


Figure 19 : Nombre moyen d'événements d'exocytose par flash UV (59 cellules). Huit flashes UV ont été appliqués à 10 s d'intervalle pour augmenter brutalement la concentration $[Ca^{2+}]_i$. La valeur $t = 0$ s marque le moment où le premier flash UV est appliqué. Les flashes UV causent chacun une décharge d'événements d'exocytose, mais avec des efficacités différentes. Le flash n°1 a seulement provoqué 4 événements de fusion dans une cellule. Sur la base d'une cellule, les premiers flashes UV (flashes 2 à 4) sont en moyenne environ deux fois plus efficaces que les derniers flashes (flashes 6 à 8). Cette figure correspond à la figure 1D de (Karatekin, Tran *et al.* 2008).

II.2. L'événement d'exocytose

Une fois que l'observation de l'événement d'exocytose a été optimisée, nous nous sommes intéressés à l'événement d'exocytose lui-même. Grâce à l'utilisation du clone BON N13 et à l'utilisation du calcium cagé, les événements d'exocytose sont observés avec une fréquence élevée. Après avoir revu les différents types d'événements d'exocytose, nous verrons comment l'article du *European Biophysical Journal* 2007 (Tran, Huet *et al.* 2007) propose une interprétation en termes d'exocytose séquentielle pour une bonne part d'entre eux. C'est à notre connaissance la première fois qu'une étude quantitative est menée en TIRFM sur ce sujet.

II.2.1. L'événement d'exocytose vu en TIRFM

II.2.1.1. L'événement d'exocytose « normal » : le « flash » d'exocytose

Les « flashes » d'exocytose représentent la majorité des événements d'exocytose observés (plus de 70% des cas, 1207 sur 1721 événements d'exocytose) avec les GS marqués au NPY-EGFP.

A la cadence d'acquisition de 10 Hz, un « flash » d'exocytose se décompose sur plusieurs images consécutives, pour une durée totale de 200-300 ms (Figure 20) :

- Avant le début de l'exocytose, on observe un spot fluorescent intense et immobile correspondant à un GS, vraisemblablement arrimé à la membrane.
- Au moment de l'exocytose, l'intensité de fluorescence du spot augmente brutalement, en une seule image, d'où l'impression d'un flash lumineux. Cela traduit le début de la libération dans le milieu extracellulaire du contenu du GS.

- Le spot lumineux se « désintègre » alors et on observe un « halo » fluorescent correspondant à la diffusion radiale du NPY-EGFP à partir du site d'exocytose vers le milieu extracellulaire. Cette diffusion du marqueur induit ensuite la disparition rapide et complète du spot de fluorescence.

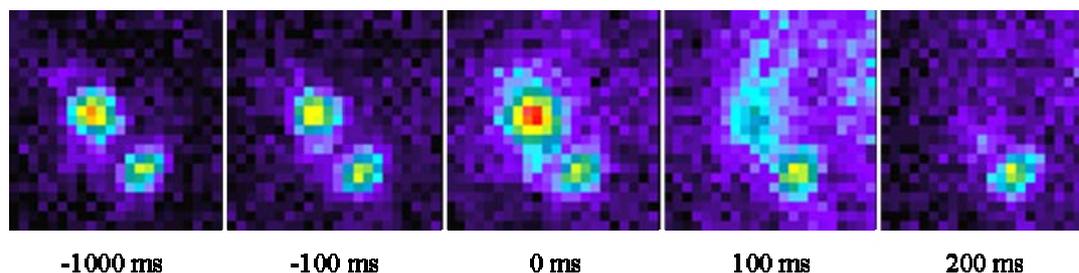


Figure 20 : Signature d'un événement d'exocytose « normal ». Séquence d'images en pseudo-couleurs montrant l'augmentation d'intensité et l'apparition d'un halo fluorescent associées à la fusion d'un granule de sécrétion avec la membrane plasmique (au temps $t = 0$ ms). La fluorescence disparaît ensuite rapidement du fait de la diffusion du marqueur dans le milieu extracellulaire (marquage NPY-GFP, $\delta = 100$ nm).

En pratique, l'augmentation de fluorescence n'est visible que dans environ un tiers des cas. On retiendra donc comme signature d'un événement d'exocytose « normal » :

- i) un GS visible à la membrane (image n-1),
- ii) la disparition brutale du GS (image n), accompagnée d'un
- iii) « halo » de fluorescence autour du site d'exocytose (image n+1) qui disparaît rapidement et complètement (en 1 ou 2 plans).

Cette signature est caractéristique des événements d'exocytose pour un marqueur intragranulaire de petite taille et a déjà été observée dans d'autres modèles cellulaires (Steyer, Horstmann *et al.* 1997 ; Steyer et Almers 2001 ; Ohara-Imaizumi, Nakamichi *et al.* 2002b ; An et Zenisek 2004). Mais elle n'est pas valable pour un marqueur de la membrane vésiculaire qui, après fusion, va diffuser dans la membrane cellulaire (Allersma, Wang *et al.* 2004).

Remarquons que la cadence d'acquisition doit être suffisante pour bien détecter les événements d'exocytose. En effet, à une cadence plus lente, le halo associé à l'événement d'exocytose peut ne pas être visible. On constate seulement la disparition d'un GS. Ce type d'événement est ambigu car il peut aussi correspondre au recul d'un GS hors du champ évanescent.

II.2.1.2. Autres types d'événements

D'autres types d'événements peuvent être observés après stimulation :

- De manière assez rare (<1% des cas), on observe des événements « lents » : il y a bien disparition d'un GS mais la diffusion du halo de fluorescence est plus lente que pour un « flash » d'exocytose et peut durer plus de 200 ms. On peut aussi observer l'augmentation de fluorescence d'un GS immobilisé à la membrane, mais au lieu d'avoir un « halo », on observe une décroissance très lente de la fluorescence, avec une durée de l'ordre de plusieurs secondes (Figure 21).

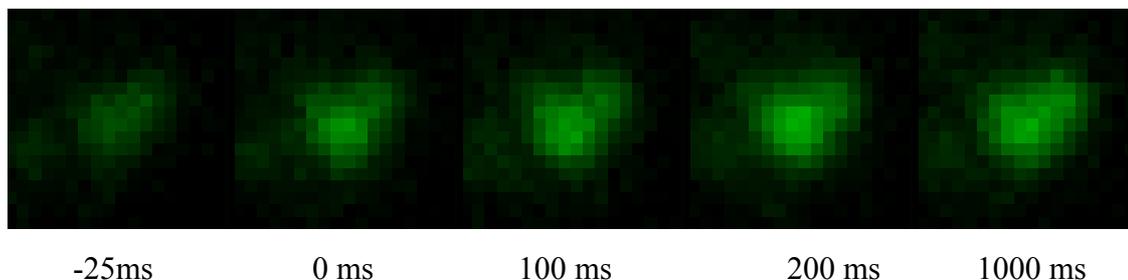


Figure 21 : Séquence d'images montrant un événement d'exocytose lent (cadence d'acquisition 40Hz)

- Après qu'une exocytose a eu lieu à l'endroit d'un spot fluorescent, il peut subsister un signal fluorescent résiduel à la même position que le spot fluorescent original (12% des cas, 213 événements sur 1721). Certains de ces signaux résiduels peuvent disparaître dans un deuxième temps, voire en trois ou quatre temps (Figure 22).

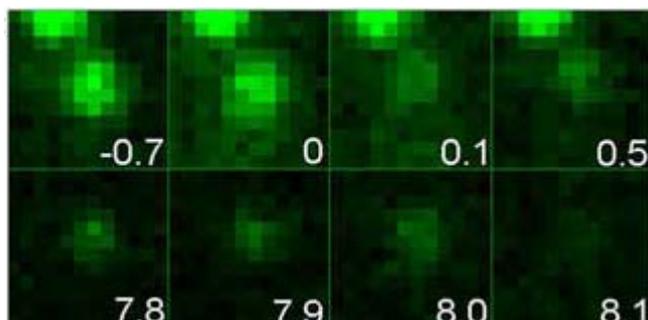


Figure 22 : Séquence d'images montrant la disparition d'un GS en deux étapes (correspondant à la figure 1C de l'article (Tran, Huet *et al.* 2007). Voir aussi le film n°1 dans les matériels supplémentaires de l'article.)

- De manière plus fréquente, on observe des « halos » de fluorescence, signe d'une exocytose, sans apercevoir les GS qui en sont à l'origine (Figure 1B de l'article). Ce type d'événement a donc été appelé événement « orphelin ». Parmi ces événements « orphelins », on distingue deux cas de figure : soit l'événement a lieu sur le bord de l'empreinte de la cellule, c'est-à-dire la zone où la cellule adhère sur la lamelle de verre (105 événements sur 1721, soit 6%), soit il a lieu à l'intérieur de l'empreinte de la cellule (196 événements sur 1721, soit 11%).

Les deux derniers types d'événements (orphelins et avec fluorescence résiduelle) ont déjà été observés dans les cellules chromaffines et PC12 (Taraska, Perrais *et al.* 2003 ; Allersma, Wang *et al.* 2004; Ma, Bindokas *et al.* 2004). Cependant, les mécanismes qui sont à leur origine sont controversés et loin d'être éclaircis. La persistance de forme des GS après exocytose donne un premier élément de compréhension de ces phénomènes

II.2.2. Persistance de forme

Lors de l'exocytose, après l'ouverture du pore de fusion, la membrane vésiculaire peut s'intégrer dans la membrane plasmique (fusion complète), mais elle peut aussi conserver sa forme (fusion partielle) (Sokac et Bement 2006).

Pour démontrer la persistance de forme dans les cellules BON, nous avons utilisé les mêmes méthodes que Ma *et al.* (Ma, Bindokas *et al.* 2004), en effectuant des expériences de double marquage du contenu des granules de sécrétion et du milieu extracellulaire. L'ajout du dextrane-TMRhod dans le milieu extracellulaire permet de mettre en évidence cette

persistance de forme, impossible à voir par la seule observation d'un marqueur intragranulaire.

On visualise à la fois les GS marqués au NPY-EGFP et le dextrane-TMRhod qui occupe l'espace verre-membrane cellulaire. Au moment de l'exocytose, s'il y a une persistance de forme du GS, le dextrane-TMRhod remplit la concavité créée. On voit alors simultanément la disparition d'un spot vert, correspondant à une exocytose, et l'apparition d'un signal rouge persistant au même endroit (**Figure 23**). Plusieurs événements de ce type ont été observés, avec des durées de vie de 5-15 s.

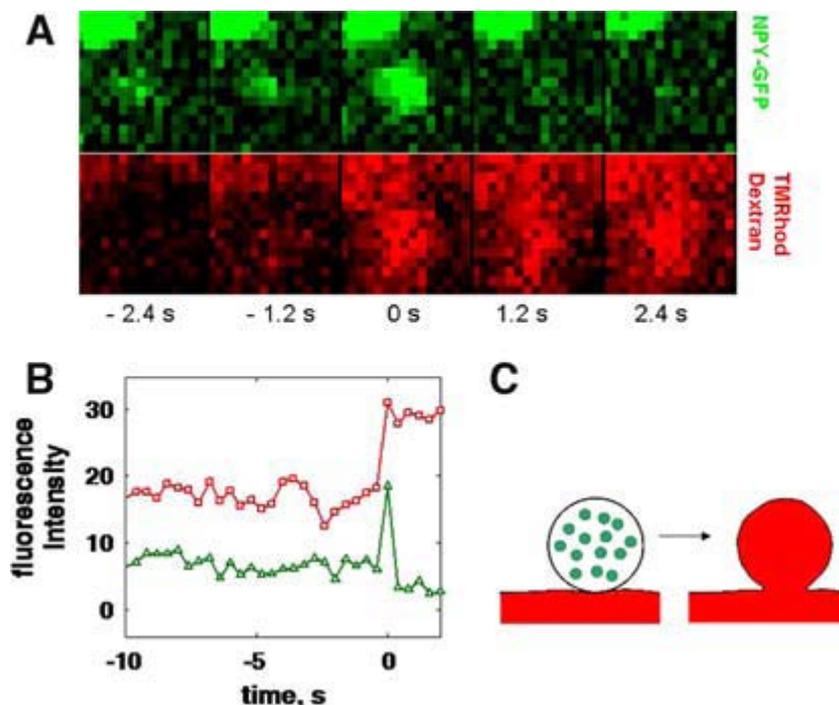


Figure 23 : Persistance de la concavité du GS après fusion (correspondant à la figure 2 de l'article (Tran, Huet *et al.* 2007)).

Cette méthode relativement simple a pour inconvénient de nécessiter une bonne adhérence de la cellule sur le verre pour minimiser l'espace verre-membrane cellulaire et maximiser le rapport signal à bruit d'une éventuelle concavité.

Observer une telle persistance de la forme du GS après fusion est étonnant quand les modèles obtenus à partir des données ampérométriques (Amatore, Bouret *et al.* 2000) suggèrent que l'expansion du pore devrait être irréversible et aboutir à un aplatissement complet de la membrane du GS dans la membrane plasmique. En effet, une fois le pore de fusion ouvert, l'intérieur du GS entre en communication avec le milieu extracellulaire ce qui permet des échanges d'ions. Ces phénomènes osmotiques provoquent le gonflement de la matrice intragranulaire ce qui entraîne une augmentation de la tension de la membrane du GS. Cette tension constitue une force qui est responsable de l'expansion du pore à moins que le pore de fusion ne se referme rapidement, avant le départ de l'expansion (*kiss-and-run*).

Du coup, pour expliquer la persistance de forme que nous avons observée, il faut envisager l'action d'autres forces s'opposant à l'expansion et empêchant de ce fait l'aplatissement du GS. Ainsi la chromogranine A, une protéine soluble très faiblement structurée et très abondante dans la matrice intragranulaire, pourrait-elle contribuer au maintien de la forme du GS en interagissant avec la membrane du GS par ses zones hydrophobes et en la retenant ainsi de l'intérieur. Alternativement, la polymérisation du cytosquelette d'actine autour du GS peut

s'opposer à l'expansion du pore en formant une sorte de gangue entourant le GS, d'où le nom de *kiss-and-coat* (Sokac et Bement 2006) donné à ce mécanisme. Cette gangue permettrait une expansion limitée du pore et le maintien d'une bonne sphéricité du GS.

Cependant, une conservation quasi-complète de la forme du GS après l'expansion du pore de fusion serait en contradiction avec le modèle d'Amatore *et al.* (Amatore, Bouret *et al.* 2000). Ces derniers postulent que le pore s'ouvre de façon irrépressible jusqu'à atteindre un diamètre environ égal à celui du GS, aucune force ne pouvant alors s'opposer à ce mouvement. Lorsque pore et GS présentent un diamètre égal, le gonflement devient inopérant sur la tension de la membrane. La matrice continue dès lors à gonfler à l'extérieur du GS et son gonflement ne fait plus augmenter la tension de la membrane. A partir de là, il est envisageable que la membrane du GS ne s'aplatisse pas mais maintienne cette forme hémisphérique grâce à l'intervention des forces citées *supra* qui deviendraient alors suffisantes.

Allersma *et al.* (Allersma, Wang *et al.* 2004) observent des anneaux qui correspondraient à l'image de la membrane de GS ne s'étant pas aplatie après l'exocytose et présentant une persistance de forme. La nature de cette forme, quasi hémisphérique, appuie les hypothèses faites par Amatore.

II.2.3. Événements de type lent

Les événements de type lent sont relativement rares et nous n'avons pas cherché à déterminer expérimentalement l'origine des ces événements. Des observations similaires ont été rapportées dans les cellules chromaffines, mais seulement pour des marqueurs comme tPA-EGFP, de taille plus importante que NPY-EGFP (Perrais, Kleppe *et al.* 2004).

Deux hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer l'augmentation brutale puis la diminution lente de l'intensité de fluorescence :

- soit le GS peut en partie garder sa forme après fusion comme nous venons de le voir. Une partie de son contenu protéique peut rester adhérente dans la concavité ou tout simplement être gênée dans sa sortie. Le contenu diffuse alors plus lentement vers le milieu extérieur.
- soit le GS se referme après s'être partiellement déchargée de son contenu protéique. La diminution lente de la fluorescence du contenu protéique restant (pour les marqueurs couplés à l'EGFP) serait due à la réacidification du GS

L'hypothèse de refermeture a été étudiée par différents auteurs. Elle peut être mise en évidence par des changements de pH (Holroyd, Lang *et al.* 2002 ; Taraska, Perrais *et al.* 2003 ; Perrais, Kleppe *et al.* 2004). La vitesse de diffusion avant refermeture diffère selon le marqueur granulaire : Acridine Orange, NPY-EGFP, tPA-EGFP.

Holroyd *et al.* (Holroyd, Lang *et al.* 2002) présentent des résultats compatibles avec les nôtres : ils ont observé sur des membranes de cellules PC12 une diffusion complète de l'acridine orange lors de l'exocytose alors que le NPY-EGFP peut parfois présenter une rétention. En revanche, Taraska *et al.* (Taraska, Perrais *et al.* 2003) ont observé en TIRF également dans les cellules PC12 une rétention avec tPA-EGFP mais pas avec NPY-EGFP.

La sortie des composés semble donc complexe, s'effectuant en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. La masse moléculaire semble être un facteur important, mais d'autres facteurs comme la charge, la nature de la membrane plasmique et de la matrice

extracellulaire peuvent aussi entrer en jeu. La dérive de la lignée PC12 originale pourrait expliquer des résultats contradictoires observés avec ce type cellulaire.

II.2.4. Exocytose séquentielle

II.2.4.1. Terminologie

Le phénomène d'exocytose séquentielle a d'abord été décrit sous différentes dénominations dans les mastocytes (Alvarez de Toledo et Fernandez 1990), les cellules éosinophiles (Scepek et Lindau 1993) et neutrophiles (Lollike, Lindau *et al.* 2002) par des mesures de capacité membranaire. Elle a récemment été suggérée dans les cellules chromaffines pour expliquer certains événements observables en ampérométrie à fibre de carbone (Amatore, Arbault *et al.* 2005), et observée en microscopie 2-photons par le groupe de Kasai dans les cellules acinaires pancréatiques (Nemoto, Kimura *et al.* 2001), β -pancréatiques (Takahashi, Hatakeyama *et al.* 2004), PC12 (Kishimoto, Liu *et al.* 2005) et chromaffines (Kishimoto, Kimura *et al.* 2006).

Remarquons que le terme d'exocytose ou fusion « séquentielle » (*sequential*) utilisé pour décrire le phénomène est univoque (il est ainsi employé par le groupe de Kasai et par (Allersma, Wang *et al.* 2004)). On trouve aussi le terme d'exocytose « cumulative » (*cumulative*) (Scepek et Lindau 1993 ; Lollike, Lindau *et al.* 2002) pour désigner le même processus.

En revanche, le sens du terme exocytose « composée » (*compound*) diffère selon les auteurs : il est employé par certains pour désigner l'exocytose séquentielle (Alvarez de Toledo et Fernandez 1990 ; Amatore, Arbault *et al.* 2005), par d'autres pour désigner l'exocytose multigranulaire (Scepek et Lindau 1993; Lollike, Lindau *et al.* 2002; Zenisek, Steyer *et al.* 2002), dans laquelle des GS peuvent fusionner entre eux dans le cytosol avant de fusionner avec la membrane plasmique.

II.2.4.2. Etendue de l'exocytose séquentielle

Une exocytose séquentielle comprend plusieurs étapes et fait intervenir au moins deux GS. Dans la suite, pour faciliter la compréhension, nous nommerons GS1 celui situé à la membrane plasmique et GS2 celui situé plus à distance de la membrane (Figure 24).

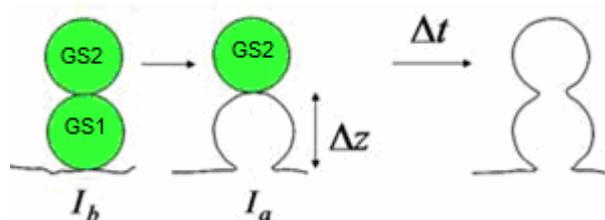


Figure 24 : Exocytose séquentielle (correspond à la figure 4C de l'article). I_b et I_a font référence à l'intensité de fluorescence d'un spot visualisé en TIRFM avant (*before*) et après (*after*) fusion respectivement. Le rapport de ces intensités permet le calcul de la hauteur du « saut virtuel », Δz , dans la direction z .

Dans un premier temps, le GS1 vient s'accrocher à la membrane. Le GS2 s'accroche alors sur son « dos » (*piggy-back*). Puis le GS1 fusionne avec la membrane cellulaire sans que le GS1 ne s'aplatisse complètement. Le GS1 est vidé de son contenu et seule reste la membrane qui persiste dans une forme proche de celle que présente le GS initialement : on parle de fantôme (*ghost*) de granule. Après un délai variable, le GS2 fusionne ensuite avec ce fantôme du GS1.

Il arrive que l'exocytose séquentielle fasse intervenir plus de deux granules et dans ce cas, un GS3 fusionne sur le fantôme du GS2 et ainsi de suite.

En TIRFM, nous avons observé certaines de ces étapes. L'accrochage du GS1 est signalé par l'apparition d'un spot lumineux. L'accrochage du GS2 voit la persistance de ce spot sans variation observable dans l'image. La fusion du GS1 donne lieu à l'observation de la signature caractéristique de l'événement d'exocytose « normal » (diminution brutale de l'intensité de fluorescence accompagnée d'un halo). Cependant, contrairement à celui-ci, un spot fluorescent résiduel trahit la présence du GS2 qui n'a pas encore fusionné. Et après l'exocytose de ce dernier, la fluorescence disparaît alors complètement.

Une autre interprétation possible d'une telle observation serait la décharge partielle d'un GS1 en plusieurs étapes. Afin d'exclure cette hypothèse, nous avons analysé les « trajectoires virtuelles » des GS1 subissant l'exocytose. Ces trajectoires montrent le recul « virtuel » associé à la diminution de fluorescence causée par la fusion de chaque GS1. La distribution des tailles de ces reculs correspond à celle des tailles de GS déterminées par microscopie électronique étant donné que la fluorescence libérée lors de l'exocytose est en rapport avec la taille du GS1. Dans le cas d'une décharge partielle, la distribution des tailles n'aurait pas été la même dans la mesure où seule une partie de la fluorescence du GS1 est libérée.

Les événements orphelins situés au bord de l'empreinte seraient à comprendre comme l'exocytose de GS situés sur la membrane latérale, hors du champ évanescent. Les événements orphelins situés à l'intérieur de l'empreinte cellulaire se présenteraient en revanche comme des événements séquentiels. Dans des cas rares, les expériences en TIRFM en double marquage ont en effet permis de constater la fusion d'un GS1 accompagnée de la persistance de sa forme et suivie d'un événement orphelin au même endroit. Cet événement orphelin correspond donc très probablement à la fusion séquentielle d'un GS2 sur le fantôme du GS1. Le GS2 n'est pas visible car situé hors du champ évanescent. Il s'ensuit que les événements orphelins vus en simple marquage pourraient être des fusions séquentielles même si la persistance de forme n'est pas observée.

Cependant en l'absence d'information sur la persistance de forme, ces événements pourraient être également interprétés comme l'exocytose de GS balistiques. Un GS balistique serait un GS qui accomplit les étapes de migration et d'accrochage tellement rapidement qu'on ne parvient pas à le détecter avant sa fusion avec la membrane cellulaire. Pour invalider cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences en TIRFM utilisant une profondeur plus importante (150 nm au lieu de 100nm) et le nombre d'événements orphelins a diminué de moitié tandis que celui d'événements avec fluorescence résiduelle a doublé. Ce résultat soutient l'interprétation selon laquelle les événements orphelins seraient des fusions séquentielles : la profondeur d'évanescence de 150 nm rend visible des GS situés plus profondément qui seraient des GS2 pouvant subir une fusion séquentielle. Une profondeur d'évanescence de 150 nm aurait pu permettre de détecter l'arrivée des GS balistiques sur quelques (1 ou 2) plans d'image avant leur fusion avec la membrane cellulaire, ce qui n'est pas le cas. Et en fait le nombre de spots n'augmente que très peu pas avec la profondeur d'évanescence, ce qui conduit à dire que les GS balistiques ne sont à l'origine que d'un nombre restreint d'événements orphelins.

Au final, si l'on ajoute le nombre d'événements avec fluorescence résiduelle à celui des événements orphelins, que ce soit à une profondeur d'évanescence de 100 ou 150 nm, près d'un quart des événements d'exocytose observés seraient des fusions séquentielles.

II.2.4.3. Difficultés de la détection

La fusion séquentielle a pour l'instant été peu étudiée par les méthodes optiques : les principaux travaux ont été effectués par le groupe de Kasai en microscopie 2-photons avec des marqueurs fluorescents extracellulaires (*Two-photon extracellular polar-tracer imaging* ou *TEP imaging*) dans différents types cellulaires. Alors que le TIRFM est aujourd'hui un des outils de choix pour l'étude de la sécrétion, on peut se demander pourquoi l'exocytose séquentielle a été si peu évoquée en TIRFM jusqu'à maintenant, alors que sa part est significative.

En effet, à notre connaissance, la seule étude en TIRFM qui ait évoqué cette possibilité date de 2004 : Allersma *et al.* (Allersma, Wang *et al.* 2004) ont stimulé des cellules chromaffines bovines avec un agoniste nicotinique et ont noté qu'approximativement 10% des événements d'exocytose se produisant à proximité (à moins d'un diamètre de GS) d'un événement précédent ne seraient pas dus au hasard. Ils ont alors suggéré la possibilité d'une exocytose séquentielle (*piggy-back*).

Le peu d'évocation de l'exocytose séquentielle en TIRFM dans la littérature peut s'expliquer par la difficulté à détecter les événements à fluorescence résiduelle. En effet, dans la plupart des montages de TIRFM commercialisés, la profondeur d'évanescence est très courte, de l'ordre de 50 nm, afin de maximiser le rapport signal à bruit. Les GS secondaires situés au-dessus des fantômes de GS ayant fusionnés seraient donc de ce fait invisibles. Or, nous avons pu les détecter dans le cadre de notre travail car notre montage à prisme permet de faire varier facilement la profondeur d'évanescence et que nous avons utilisé des profondeurs plus importantes, jusqu'à 150 nm. Les montages à excitation par l'objectif, plus répandus, sont généralement utilisés avec des profondeurs d'évanescence de l'ordre de 50 nm ce qui ne permet pas d'observer l'exocytose séquentielle ou du moins la fluorescence d'un éventuel granule secondaire à cheval sur le premier et donc situé plus profondément.

D'autre part, les persistances de fantômes de GS après exocytose ne peuvent être détectées avec le TIRFM qu'en employant d'autres marqueurs (Taraska, Perrais *et al.* 2003 ; Allersma, Wang *et al.* 2004) que ceux marquant habituellement le contenu vésiculaire. Nous avons pour notre part utilisé un marqueur extracellulaire imperméant comme celui utilisé par (Ma, Bindokas *et al.* 2004). Remarquons qu'il est aussi possible d'utiliser la microscopie à contraste interférentiel en réflexion (RICM) pour détecter des persistances de forme (Llobet, Beaumont *et al.* 2003).

Enfin, la difficulté majeure est liée à l'interprétation des événements orphelins et avec fluorescence résiduelle. Les événements orphelins ont souvent été interprétés comme des GS balistiques, tandis que les événements à fluorescence résiduelle ont été assimilés à des fusions transitoires et partielles.

II.3. Discussion

L'optimisation des cellules et stimulation pour maximiser la sécrétion a été nécessaire pour obtenir un maximum de données sur les événements d'exocytose et rendre possibles les statistiques. La majorité des données a été obtenue avec le clone BON N13 et en stimulant par photolibération de Ca^{2+} cagé.

C'est la première fois à notre connaissance que le phénomène d'exocytose séquentielle a pu être quantifié en utilisant le TIRFM. Sa proportion de 25% par rapport à la totalité des événements d'exocytose est aussi une surprise vu le peu de littérature à ce sujet en TIRFM.

Il est frappant qu'un GS fusionne avec un autre GS et non avec la membrane cellulaire. En effet, les GS possèdent des R-SNARE (v-SNARE) mais ne possèdent en principe pas de Q-SNARE (t-SNARE) qui leur permettraient de constituer des complexes SNARE nécessaires à leur fusion entre eux. Pour comprendre cette fusion homotypique entre deux GS, il faut envisager qu'après une exocytose suivie d'une persistance de forme d'un GS1, les Q-SNARE de la membrane cellulaire puissent se déplacer et gagner la membrane granulaire du GS1. Un tel déplacement a été observé avec SNAP-25 dans les cellules bêta-pancréatiques (Takahashi, Hatakeyama *et al.* 2004). Le GS1 présenterait ainsi des Q-SNARE et pourrait donc fusionner avec un GS2 qui présenterait, comme tout GS, des R-SNARE.

Il est par ailleurs étonnant qu'étant donné l'espace libre sur la membrane cellulaire, les GS effectuent des fusions homotypiques les uns derrière les autres plutôt que de fusionner de manière hétérotypique en des « places libres » de la membrane cellulaire. L'absence de Q-SNARE nécessaires à la fusion en ces endroits de la membrane expliquerait ce phénomène. En effet les Q-SNARE, comme la syntaxine, ne sont pas distribués de manière homogène sur la membrane mais concentrés sur certains microdomaines de la membrane, comme cela a été montré dans les cellules bêta-pancréatiques MIN6 (Ohara-Imaizumi, Nishiwaki *et al.* 2004a). La présence de sites actifs d'exocytose a été également suggérée dans les cellules chromaffines bovines (Allersma, Wang *et al.* 2004). Dans ces sites, dont le rayon est de l'ordre de la taille d'un GS, la probabilité d'avoir des événements d'exocytose consécutifs serait plus importante. Enfin, dans les neurones bipolaires de la rétine (Zenisek, Steyer *et al.* 2000), l'analyse de piles d'images obtenues en TIRFM a montré que l'exocytose des vésicules synaptiques s'effectue préférentiellement au niveau de zones actives du neurone. Celles-ci n'ont pas été identifiées par la présence d'agrégats de SNARE mais par celle de structures particulières appelées rubans synaptiques. Cependant, en dehors de ces zones actives, des fusions de vésicules synaptiques sont également observées.

Partie III

Méthodes de suivi et d'analyse des trajectoires 3D des granules de sécrétion

Huet S, Karatekin E, Tran VS, Fanget I, Cribier S, Henry JP.
Analysis of transient behavior in complex trajectories: application to secretory vesicle dynamics.

Biophysical Journal. 2006 Nov 1;91(9):3542-59

III. Méthodes de suivi et d'analyse des trajectoires 3D des granules de sécrétion

Nous avons vu dans la partie précédente comment la microscopie TIRF permet de détecter des événements individuels d'exocytose dans des cellules stimulées.

Notre objectif est maintenant de trouver un moyen de visualiser les déplacements des GS lors des différentes étapes préalables à la fusion et de les caractériser, en particulier ceux se produisant au voisinage de la membrane cellulaire de cellules BON.

Pour cela, nous avons tiré partie de l'avantage majeur de la microscopie TIRF par rapport aux autres méthodes d'étude de la sécrétion : la possibilité de suivre les trajectoires de GS individuels en temps réel, et ce dans les trois dimensions de l'espace.

Dans la description du phénomène de sécrétion, la microscopie TIRF permet donc d'obtenir des informations précieuses sur les mouvements des GS en particulier sur l'arrivée à la membrane cellulaire, l'accrochage et les mouvements à la membrane avant fusion.

De manière surprenante, la microscopie TIRF a été jusqu'à maintenant rarement utilisée pour l'obtention de trajectoires 3D. De ce point de vue, notre méthode exposée dans l'article du *Biophysical Journal* 2006 s'inspire de celle déjà utilisée par d'autres auteurs (Zenisek, Steyer *et al.* 2002).

En revanche, la méthode d'analyse des trajectoires complexes développée ensuite par Sébastien Huet est la première qui permette de détecter et de caractériser différents types de mouvements transitoires sur une même trajectoire de GS. Afin de développer les outils nécessaires à cette étude, nous avons d'abord travaillé dans des cellules au repos pour des raisons de simplicité.

Cette méthode a permis de mettre 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. Des hypothèses sur les environnements associés à ces mouvements ont pu être testées.

III.1. Méthode de suivi 3D des trajectoires des granules de sécrétion :

En utilisant la microscopie TIRF, nous avons obtenu des séquences d'image de cellules BON dont les GS ont été marqués par NPY-GFP.

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 individuelle à l'aide du logiciel Metamorph (Figure 25A, voir Matériels et méthodes de l'article).

Plusieurs travaux récents dans le domaine de la dynamique des GS ont restreint leurs analyses aux déplacements latéraux (x,y) des GS (Desnos, Schonn *et al.* 2003 ; Duncan, Greaves *et al.* 2003 ; Tsuboi, DaSilva Xavier *et al.* 2003 ; Ohara-Imazumi, Nishiwaki *et al.* 2004b). Cependant, plusieurs auteurs (Oheim et Stuhmer 2000 ; Johns, Levitan *et al.* 2001) ont montré que les caractéristiques des mouvements changent lorsque les GS approchent de la membrane plasmique, probablement à cause des modifications de l'environnement des GS. Par conséquent, l'étude des trajectoires 3D semble importante pour comprendre l'organisation dynamique de la région juxta-membranaire.

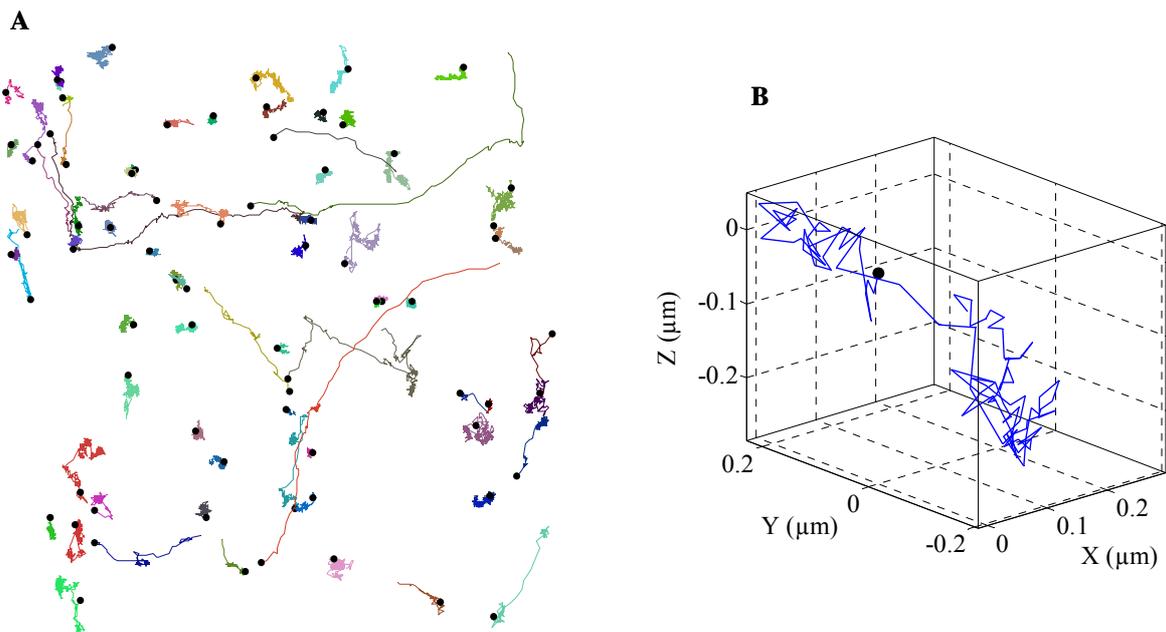


Figure 25 : Obtention des trajectoires tridimensionnelles. (A) Détermination des trajectoires des GS dans le plan de focalisation du microscope (x,y) par suivi de particule. Les points noirs marquent le début des trajectoires. Barre d'échelle : 2 µm. (B) Les mouvements selon l'axe orthogonal au plan 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.

C'est pourquoi, à partir de la mesure des variations d'intensité de fluorescence des GS, leurs déplacements suivant l'axe orthogonal au plan de focalisation (z) ont ensuite été calculés, en connaissant la profondeur d'évanescence utilisée (voir Matériels et Méthodes de l'article).

Les trajectoires tridimensionnelles ainsi obtenues (pour un exemple, voir Figure 25B) ont été analysées grâce à la méthode décrite dans la section III.2 intitulée « Méthode d'analyse des trajectoires complexes ».

Durant ma thèse, j'ai collaboré avec Sébastien Huet pour la mise au point de l'algorithme permettant le calcul des trajectoires à partir des séquences d'images. J'ai ensuite adapté cet algorithme à mes propres besoins, notamment en ce qui concerne le suivi de GS de très faible signal à bruit.

En effet, travailler dans les cellules au repos permet de suivre un grand nombre de GS présentant un rapport signal à bruit suffisant. En revanche, étudier dans des cellules stimulées uniquement les GS subissant l'exocytose restreint de fait le nombre de GS observables et impose parfois de suivre des GS de très faible rapport signal à bruit

Le problème provient principalement des GS qui peuvent passer à grande proximité d'autres GS sur leur trajectoire. Cela peut induire un mauvais ajustement gaussien du profil d'intensité et donner de faux mouvements en z. Or cela devient très gênant lorsque l'on cherche à détecter des mouvements en z à la limite de détection (mouvements de l'ordre de 20 nm pour une résolution d'environ 15 nm) comme nous le verrons dans la partie IV de cette thèse.

Afin de rendre l'algorithme moins sensible aux perturbations créées par d'éventuelles GS voisins, l'ajustement gaussien du profil d'intensité I_{fluo} du GS s'effectue avec une pondération plus forte pour les pixels centraux, alors qu'il n'est pas pondéré dans l'algorithme original (Figure 26B).

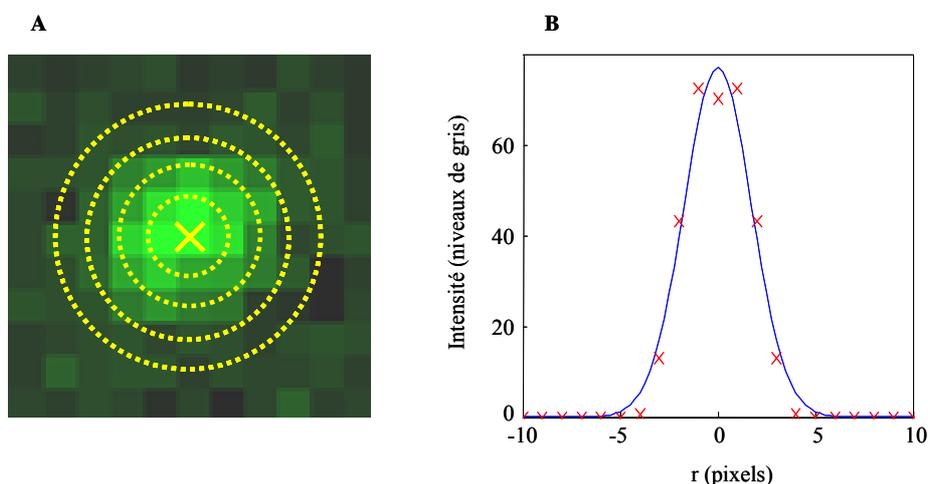


Figure 26 : Méthode d'évaluation de l'intensité des granules. (A) Mesure de l'intensité de fluorescence moyenne sur des cercles centrés sur la position du GS et dont le rayon r est égal à un nombre entier de pixel. (B) Courbe représentant les valeurs d'intensité de fluorescence obtenues en fonction de r après soustraction du fond (croix rouges). Cette courbe est ajustée par une fonction gaussienne (courbe bleue).

Ensuite, dans le but de réduire le rayon maximal r_{max} du profil d'intensité du GS (Figure 26A) pour qu'il ne prenne pas en compte la fluorescence d'un éventuel GS voisin, j'ai introduit la possibilité de modifier le seuil permettant de détecter l'intensité du fond I_{bg} au niveau du GS.

Enfin, un critère de qualité de l'ajustement gaussien (basé sur une mesure de χ^2 , voir Matériels et méthodes) a été mis en place afin de repérer rapidement si un mouvement en z détecté ne serait pas un artefact dû à un mauvais ajustement.

III.2. Méthode d'analyse des trajectoires complexes

L'observation des trajectoires tridimensionnelles des GS obtenues par microscopie TIRF montre qu'un GS peut présenter plusieurs types de mouvements sur une même trajectoire. Nous avons donc développé une méthode pour analyser de manière exhaustive les différents types de comportements transitoires qu'un GS suivi peut présenter, mais cette méthode est aussi utilisable avec tout type d'objet ayant une trajectoire complexe. Cette méthode ainsi que son application pour la caractérisation des mouvements des GS étant détaillés dans l'article du *Biophysical Journal* 2006, nous ne présenterons ici la méthode d'analyse mise au point que de manière succincte.

Quatre catégories de mouvement ont été définies pour caractériser la dynamique des GS (voir Figure 27 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 diffusif pour laquelle les GS décrivent un mouvement brownien,
- (4) la catégorie dirigée correspondant à un mouvement brownien auquel se superpose un déplacement dans une direction particulière.

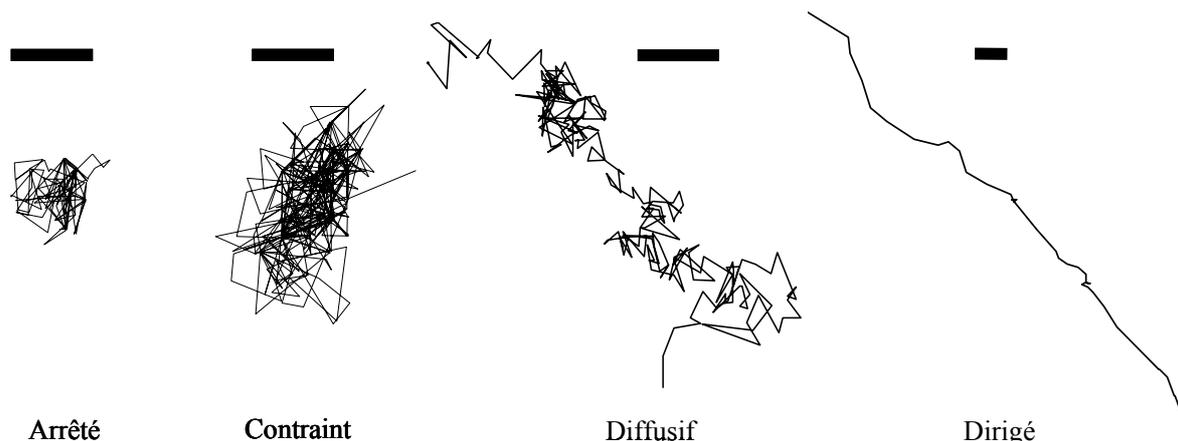


Figure 27 : Les quatre catégories de mouvement utilisées pour caractériser la dynamique des GS. Barre d'échelle : 100 nm.

Tout au long de la trajectoire d'un GS, trois paramètres sont calculés afin de détecter ces catégories de mouvements : (i) le coefficient de diffusion D , qui quantifie la mobilité des GS, (ii) le paramètre Dev , qui mesure la concavité de la courbe du déplacement quadratique moyen (MSD pour *mean square displacement*) en fonction du temps, et (iii) le paramètre $Asym$ qui mesure l'asymétrie de la trajectoire.

Chacun des ces paramètres permet de mettre en évidence un type de mouvement particulier.

- Ainsi grâce au coefficient de diffusion D , les périodes d'arrêt peuvent être détectées. Elles sont définies par un coefficient de diffusion inférieur à une valeur $D_{min}=1\times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, qui est proche de la limite de détection de notre méthode de suivi de particule individuelle ($0.1\times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$).

- Le paramètre *Dev* est utilisé pour repérer les mouvements de type contraint. Ceux-ci correspondant à une courbure négative du MSD, les périodes pour lesquelles *Dev* est inférieur à un certain seuil sont définies comme contraintes.
- Enfin, l'évaluation de l'asymétrie *Asym* indique les périodes dirigées, lorsque ce paramètre est supérieur à un certain seuil.

Etant donné que ces paramètres mesurent des déviations par rapport au mouvement brownien, les périodes de trajectoires restant non classifiées sont alors catégorisées comme diffusives. On voit donc combien est importante une définition précise des seuils pour chacun des paramètres *Asym* et *Dev* afin de bien distinguer les comportements non diffusifs et un mouvement brownien. De tels seuils ont été déterminés grâce à l'analyse du comportement de ces paramètres lorsqu'ils sont appliqués à des trajectoires browniennes simulées. Par ailleurs, les trois paramètres de classification sont calculés à l'aide d'une fenêtre d'analyse « glissante » dont la largeur est optimisée tout au long des trajectoires, afin de s'adapter au mieux à la durée des comportements transitoires non browniens que l'on cherche à détecter.

Appliquée aux trajectoires des GS dans la région juxta-membranaire, cette méthode d'analyse a montré une grande efficacité de détection et a permis une caractérisation précise et fiable des différents types de mouvements transitoires effectués par les GS. Une telle caractérisation des mouvements présente deux grands intérêts pour l'étude de l'exocytose régulée. D'une part, les mouvements observés par les GS étant le reflet de leurs interactions avec l'environnement, cela permet de mieux comprendre l'architecture de la région juxta-membranaire. D'autre part, grâce à l'analyse des transitions entre les différentes classes de mouvements, les différentes étapes par lesquelles passe un GS avant d'atteindre la membrane peuvent être déterminées.

III.3. Résultats

III.3.1. Dynamique des granules de sécrétion

L'analyse des trajectoires 3D a fourni un aperçu détaillé de la dynamique des GS dans les cellules BON. Cette analyse montre tout d'abord qu'environ la moitié des GS présentent des changements de comportement durant leur trajectoire dont la durée moyenne est d'une vingtaine de secondes. L'analyse des trajectoires 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 27) 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	8 ± 4 %
Contraint	35 ± 8 %
Dirigé	8 ± 2 %
Diffusif	49 ± 9 %
Total	7162 s

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.

Catégorie	Caractéristique	
Arrêt	Durée moyenne	$8,5 \pm 0,3$ s
Contraint	Durée moyenne	$20 \pm 2,1$ s
	"Rayon" de la cage, R	69 ± 10 nm
	Coefficient de diffusion du GS, D_{GS}	$(37 \pm 14) \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$
	Coefficient de diffusion de la cage, D_{cage}	$(2,3 \pm 0,8) \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$
Dirigé	Durée moyenne	$2,0 \pm 0,2$ s
	Vitesse de transport, v	$0,64 \pm 0,18 \mu\text{m}/\text{s}$
Diffusif	Durée moyenne	$10,3 \pm 0,6$ s
	Coefficient de diffusion, D	$(22 \pm 8) \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$

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

Pour plusieurs raisons évoquées dans l'article, les périodes d'arrêt et les mouvements de nature contrainte peuvent être englobées dans une même grande classe. En effet, un mouvement contraint est défini comme la diffusion dans une « cage » d'un rayon excédant de 69 nm celui d'un GS (dont le rayon est de l'ordre de 100-150 nm, soit un rayon total de cage de 170-220 nm ou un diamètre de cage d'environ 400 nm). Cette cage diffuse elle-même très lentement, avec un coefficient de diffusion de $2,3 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Tableau 2). Les GS ayant une constante de diffusion de $1 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ sont considérées comme immobiles. Puisque la cage diffuse avec une constante de même ordre de grandeur que celle des GS immobiles, nous avons considéré que les mouvements contraints et les périodes d'arrêt avaient la même origine. La seule différence est que les GS immobiles sont dans des cages trop petites pour être détectées expérimentalement.

Dans cette grande classe arrêtée/contrainte, les GS passent près de la moitié du temps. 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 et Almers 1999 ; Johns, Levitan *et al.* 2001 ; Manneville, Etienne-Manneville *et al.* 2003).

III.3.2. Organisation dynamique de la région juxta-membranaire

La méthode d'analyse des trajectoires complexes a permis de distinguer trois grandes classes de mouvements : la classe dirigée (D), la classe arrêtée/contrainte (C) et la classe diffusive ou brownienne (B). La suite du travail a été de déterminer l'origine de ces différentes classes de mouvements. Des hypothèses sur les environnements associés à ces classes de mouvements ont pu être testées dans les cellules BON au repos.

III.3.2.1. Classe dirigée

L'article propose que les mouvements dirigés reflètent des déplacements conduits par des moteurs moléculaires le long de microtubules, comme cela a été suggéré par des travaux précédents en microscopie TIRF dans d'autres types cellulaires (Wacker, Kaether *et al.* 1997 ; Varadi, Ainscow *et al.* 2002; Manneville, Etienne-Manneville *et al.* 2003). Plusieurs observations viennent appuyer cette hypothèse.

Tout d'abord, la vitesse moyenne de transport mesurée pour de tels mouvements ($\sim 0,6 \mu\text{m/s}$) correspond celles déjà mesurées pour des déplacements de GS le long de microtubules (Varadi, Ainscow *et al.* 2002; Manneville, Etienne-Manneville *et al.* 2003).

En outre, le nocodazole, une drogue dépolymérisant les microtubules, réduit de 50% de la proportion de temps passé dans la classe des mouvements dirigés et ainsi que la densité des microtubules à proximité de la membrane cellulaire, suggérant que la majorité des mouvements dirigés se produit très probablement le long de microtubules.

Par ailleurs, des expériences de double marquage effectuées par Sébastien Huet ont permis de confirmer cette hypothèse. En marquant à la fois le réseau de microtubules et les GS, il a été observé que la grande majorité des GS effectuant des mouvements dirigés se déplacent le long de microtubules.

III.3.2.2. Classe diffusive ou brownienne

Il a été démontré que les GS pouvaient se lier physiquement aux filaments d'actine (Desnos, Schonn *et al.* 2003) et qu'une diminution drastique de la mobilité des GS pouvait être induite en bloquant la dynamique du cortex d'actine (Lang, Wacker *et al.* 2000). Lang *et al.* ont suggéré que, dans les cellules PC12, l'apparent mouvement aléatoire des GS pouvait avoir pour origine la dynamique du cortex d'actine (Lang, Wacker *et al.* 2000).

Dans l'article, les mouvements diffusifs sont assimilés à des déplacements de GS liés à l'actine. Leurs mouvements ne leur seraient pas propres mais correspondraient à la dynamique du réseau d'actine. Cette hypothèse est corroborée par des expériences utilisant la latrunculine B, une drogue qui dépolymérise le réseau d'actine, sans que cela soit complètement probant.

Cette hypothèse a par ailleurs été confortée par d'autres expériences de Sébastien Huet. La jasplakinolide, une drogue qui stabilise les filaments d'actine, réduit ainsi d'environ 50% les mouvements diffusifs.

En outre, des expériences de double marquage ont permis de comparer les mouvements du cortex d'actine aux trajectoires décrites par les GS. Grâce à une méthode de corrélation d'image (Hebert, Costantino *et al.* 2005), on obtient d'une part la carte des vitesses de déplacement du cytosquelette d'actine, et d'autre part la carte des vitesses de déplacement des GS. En mesurant l'angle entre les vecteurs vitesse associés aux GS et ceux correspondant à l'actine et en représentant l'histogramme de distribution de ces angles, il a été montré qu'une proportion non négligeable de GS suit les déplacements du réseau d'actine. De plus, la vitesse de transport de ces GS est similaire à celle mesurée localement pour l'actine

Enfin, le coefficient de diffusion moyen calculé à partir des trajectoires tridimensionnelles des GS semblant fixés au cortex d'actine est proche du coefficient de diffusion caractérisant la classe diffusive. Cette dernière classe pourrait donc être associée aux GS fixés au cytosquelette d'actine.

III.3.2.3. Classe arrêtée/contrainte

Des études antérieures ont suggéré que la mobilité d'un GS peut devenir restreinte lorsqu'elle approche ou arrive à la membrane cellulaire (Steyer, Horstmann *et al.* 1997; Oheim et Stuhmer 2000 ; Johns, Levitan *et al.* 2001). Par suite, la classe arrêtée/contrainte pourrait correspondre à des GS situés au voisinage de la membrane ou accrochés à celle-ci. Cette proposition est argumentée dans l'article.

Si les GS arrêtés/contraints (C) sont des GS à la membrane cellulaire, alors on s'attend à un recul par rapport à la membrane cellulaire quand un GS passe de cette classe de mouvement à une autre (par exemple, $C \rightarrow B$), même dans les cellules au repos. C'est ce qui a effectivement été observé. De manière similaire, les transitions de périodes browniennes vers des périodes arrêtées/contraintes ($B \rightarrow C$) sont souvent accompagnées d'une approche vers la membrane cellulaire. En moyenne, l'amplitude de l'approche/recul est de 16 ± 9 nm.

Dans la troisième partie de cette thèse, cette hypothèse sera encore développée et confirmée sur des cellules stimulées.

III.3.2.4. Transitions entre classes

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. Ainsi avons-nous analysé les probabilités de transitions entre les trois classes de mouvements (Figure 28).

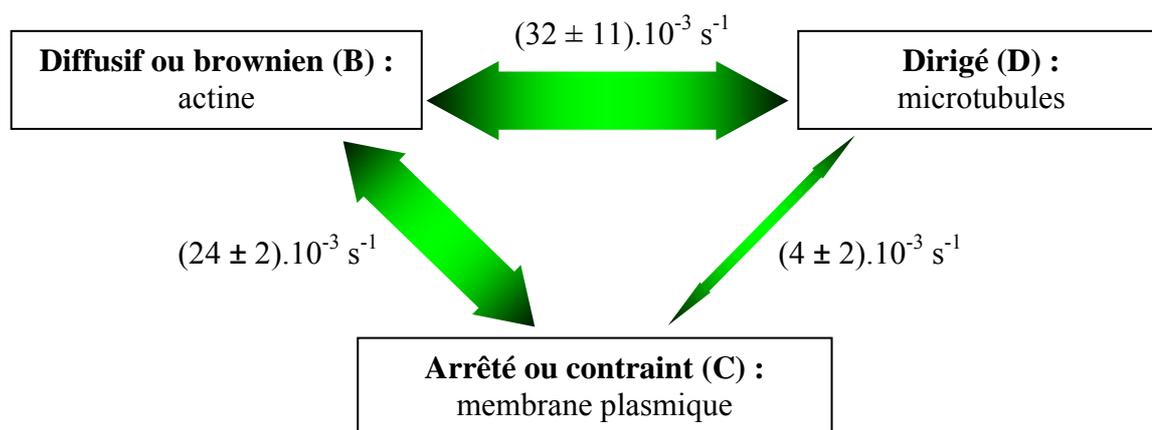


Figure 28 : Evaluation des taux de transitions entre les différentes classes de mouvement. Ces taux de transitions correspondent aux nombres de transitions par cellule et par seconde (528 GS issues de 6 cellules). L'incertitude sur chaque valeur correspond à l'erreur standard. Grâce aux résultats obtenus précédemment, chaque catégorie de mouvement peut être associée à un environnement granulaire spécifique.

Deux résultats importants sont à noter. Tout d'abord, il apparaît que les transitions entre ces classes sont largement réversibles, c'est-à-dire que le taux de transitions d'une classe à une autre est similaire dans les deux directions.

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. Ainsi, nous avons trouvé que la majorité des transitions s'effectue entre les classes brownienne B et dirigée D (53% de la totalité des transitions), ou entre la classe brownienne B et la classe arrêtée/contrainte C (41% de la totalité des transitions). Les transitions entre les classes dirigée D et arrêtée/contrainte C sont rares en comparaison (6% de la totalité des transitions).

III.3.2.5. Modèle de l'organisation dynamique juxta-membranaire

L'analyse des transitions entre les périodes de mouvements transitoires, combinée aux précédentes hypothèses, simples mais raisonnables, sur l'origine de chaque type de mouvement, permet de définir un modèle de déplacement des GS vers la membrane dans les cellules BON au repos (Figure 29) : grâce aux microtubules, les GS sont transportés dans la région juxta-membranaire. Même si l'extrémité des microtubules peut atteindre la membrane plasmique, les GS ne passent pas directement des microtubules à cette membrane mais doivent d'abord transiter par le cortex d'actine.

Les GS peuvent explorer de larges distances sur des courtes périodes de temps à proximité de la membrane cellulaire grâce au transport sur des rails de microtubules. D'après des observations effectuées par Sébastien Huet dans sa thèse, les microtubules dans les cellules BON semblent former un réseau dense (maille $\sim 1 \mu\text{m}$) et parallèle à la membrane cellulaire. Un GS en mouvement sur un microtubule peut se déplacer d'en moyenne $2 \text{ s} \times 0,64 \mu\text{m/s} \sim 1,3 \mu\text{m}$ (voir Tableau 2) avant de passer sur des filaments d'actine.

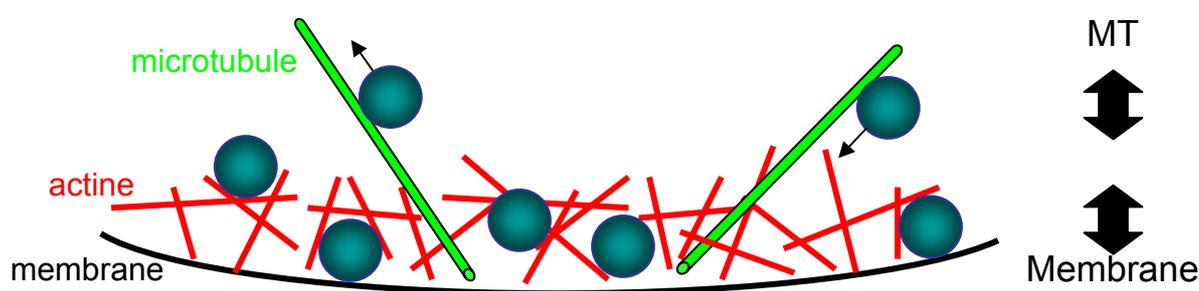


Figure 29 : Modèle de l'organisation juxta-membranaire dans les cellules BON au repos. Le départ ou l'arrivée des GS à la membrane plasmique implique un passage transitoire par le cortex d'actine.

Dans le cortex d'actine, un GS pourrait bouger de manière apparemment aléatoire avec un coefficient de diffusion moyen de $2,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ pendant une durée de $\sim 10 \text{ s}$, explorant ainsi une région de $\sim 300 \text{ nm}$.

Durant ce temps, si le GS rencontre un site d'accrochage sur la membrane cellulaire, elle peut s'y ancrer et devenir arrêtée/contrainte pendant 16s en moyenne. Si elle ne peut trouver de site d'accrochage, alors elle est susceptible de revenir sur les microtubules pour aller encore $\sim 1 \mu\text{m}$ plus loin et faire une autre tentative d'accrochage.

Dans partie suivante, nous reprendrons ce modèle et nous verrons que son application pose quelques problèmes dans les cellules stimulées.

III.4. Discussion

Cet article a montré comment la microscopie TIRF peut être utilisée afin de déterminer les trajectoires tridimensionnelles des GS. Cet avantage est en général peu exploité alors qu'il amène des informations importantes sur les mouvements des GS, mouvements qui varient beaucoup avec la proximité à la membrane plasmique. Pour la partie suivante, l'algorithme de suivi permettant de déterminer ces trajectoires a été modifié pour tenir compte des spécificités des GS subissant l'exocytose.

Par ailleurs, l'analyse des mouvements des GS a montré le caractère habituel des changements de comportement sur les trajectoires. Elle a justifié la nécessité d'une méthode de détection et de caractérisation de ces mouvements transitoires. Celle que nous avons développée est à la fois efficace et généralisable à d'autres systèmes biologiques, contrairement aux méthodes déjà existantes.

Bien qu'il soit l'objet d'un article méthodologique, ce travail a permis de tirer des conclusions intéressantes de biologie cellulaire et qui n'étaient pas forcément évidentes au départ.

Tout d'abord, cet article montre que les GS ayant des mouvements diffusifs ne sont pas libres dans le cytoplasme, dans la région juxta-membranaire de la cellule. En effet, si cela était le cas, des objets de cette taille dans un tel milieu devraient avoir des coefficients de diffusion plus élevés de plusieurs ordres de grandeurs. Les explications à ces faibles coefficients de diffusion sont soit que le milieu devient très visqueux dans cette région, ce qui est peu concevable, soit que les GS sont liés à d'autres éléments structuraux.

L'analyse des mouvements des GS a bien mis en évidence des mouvements de type diffusif, mais ceux-ci semblent liés aux mouvements de l'actine. Les expériences en double marquage ont montré que les GS ne se déplaçaient pas entre les mailles du réseau d'actine, mais avec les mêmes mouvements que ce dernier. A travers les mouvements diffusifs des GS, c'est donc vraisemblablement la dynamique brownienne de l'actine que l'on observe.

Il existe des liens moléculaires entre les GS et l'actine qui peuvent justifier cette hypothèse de travail. Au laboratoire, il a été montré que les GS pouvaient se lier à l'actine via un complexe faisant intervenir Rab27 (présent sur la membrane vésiculaire), MyRIP et la myosine Va ou VIIa (Desnos, Schonn *et al.* 2003), avec toutes les possibilités de régulation que cela offre.

Enfin, il est étonnant que les GS immobiles ou présentant un mouvement contraint correspondent seulement à des GS liés à la membrane cellulaire. En effet, les données physico-chimiques montrent que la membrane cellulaire n'est pas quelque chose de fixe.

Le mouvement contraint, défini plus haut comme la diffusion dans une « cage » d'un rayon excédant de 70 nm celui d'un GS, peut être interprété de deux manières. Un GS pourrait ainsi être attaché par un complexe moléculaire de 70 nm de long (l'équivalent d'une « laisse ») à un complexe immobile situé dans la membrane cellulaire (l'équivalent d'un « piquet »). Cependant le mouvement contraint pourrait aussi être dû à la diffusion latérale dans la membrane cellulaire d'un complexe d'ancrage auquel le GS serait directement lié.

La seconde interprétation fait penser au modèle proposé par Kusumi pour la diffusion de protéines membranaires (Fujiwara, Ritchie *et al.* 2002). D'après ce modèle, celle-ci est limitée par le cytosquelette juxta-membranaire qui est principalement composé de filaments d'actine. Cependant la maille du réseau de ce cytosquelette juxta-membranaire est respectivement de

52 et 200 nm pour les kératinocytes de la peau de fœtus de rat et les fibroblastes du foie de rats normaux, ce qui semble trop faible par rapport à la taille de la « cage » restreignant les mouvements de GS (de l'ordre de 400 nm).

Cette seconde interprétation se rapproche par ailleurs des résultats obtenus sur le mouvement des récepteurs glycinergiques dans les neurones inhibiteurs (pour une revue, voir (Choquet et Triller 2003)). Le suivi de particule individuelle a ainsi montré que ces récepteurs membranaires présentent des mouvements contraints dans les synapses du fait de la présence d'un échafaudage associant une protéine transmembranaire, la gephyrine, et le cytosquelette d'actine. Lors des phases de confinement de ces récepteurs, les coefficients latéraux sont juste inférieurs à $10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$, ce qui est comparable au coefficient de diffusion des GS dans les cages (environ $4 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$).

Dans le cas des GS, la restriction des mouvements pourrait avoir plusieurs origines. i) Il a ainsi été établi que les sites d'accrochage des GS à la membrane plasmique comportaient de larges microdomaines de syntaxine, dépendants du cholestérol (Lang, Bruns *et al.* 2001 ; Ohara-Imaizumi, Nishiwaki *et al.* 2004a), qui pourraient limiter la mobilité des GS. ii) Les Q-SNARE (t-SNARE) pourraient être liés au réseau d'actine, ce qui limiterait les mouvements des GS accrochés à ces Q-SNARE. iii) il est enfin possible que les filaments d'actine quittant le cytosquelette juxta-membranaire interagissent directement avec la membrane vésiculaire, renforçant ainsi le complexe d'accrochage (Steyer et Almers 1999 ; Johns, Levitan *et al.* 2001).

A l'heure actuelle, le manque d'information sur les molécules permettant l'accrochage des GS à la membrane cellulaire exclut toute spéculation plus poussée. Nous discuterons des différentes possibilités dans la partie IV de cette thèse.

Notons enfin que ces résultats ont été obtenus en étudiant les mouvements des GS dans la région corticale des cellules BON au repos. Des observations similaires ont été faites sur les cellules chromaffines (Steyer et Almers 1999; Oheim et Stuhmer 2000) et sur les cellules endothéliales (Manneville, Etienne-Manneville *et al.* 2003). Ces mouvements peuvent néanmoins être observés dans d'autres régions de la cellule, avec des causes différentes (Li, Xiong *et al.* 2004).

Dans la partie qui suit, dans des cellules stimulées, nous allons voir que les GS subissant l'exocytose et donc situés à la membrane ont des mouvements très restreints.

Partie IV

Différents états de liaison des vésicules de sécrétion à la membrane cellulaire : transition entre état accosté et état arrimé

Karatekin E, Tran VS, Huet S, Fanget I, Cribier S, Henry JP.
*A 20-nm step toward the cell membrane preceding exocytosis may
correspond to docking of tethered granules.-*
Biophysical Journal. 2008 Apr 1; 94(7):2891-905

IV. Différents états de liaison des granules de sécrétion à la membrane cellulaire : transition entre état accosté et état arrimé

La première partie a montré ce que la microscopie TIRF amène à la connaissance de l'exocytose. Les données obtenues sont complémentaires de celles fournies par l'ampérométrie ou les mesures de capacitance en *patch-clamp*.

Mais la microscopie TIRF donne des informations auxquelles ces deux techniques n'ont pas accès. En effet, le schéma du cycle de sécrétion suppose plusieurs étapes préalables à la fusion : accostage, arrimage et amorçage. Les études électrochimiques ou électrophysiologiques ont une excellente résolution temporelle et permettent des analyses fines de la cinétique de sécrétion mais ne permettent de déduire le rôle d'une protéine dans une de ces étapes que de manière indirecte.

Dans la deuxième partie, nous avons vu comment la microscopie TIRF permet de visualiser directement les événements précédant l'exocytose en étudiant les mouvements des GS vers la membrane et à la membrane.

Dans cette partie, afin de mettre en évidence les différentes étapes postulées, cette fois en condition stimulée, nous avons traité plus d'un millier d'événements d'exocytose et avons analysé deux types d'observations :

- d'une part, les trajectoires individuelles de GS subissant l'exocytose, obtenues en utilisant l'algorithme de suivi étudié dans la partie précédente.
- d'autre part, les cinétiques de sécrétion, obtenues en resituant dans le temps l'ensemble de tous les événements individuels d'exocytose (plus d'un millier) consécutifs à une stimulation avec le Ca^{2+} cagé.

IV.1. Accrochage des granules de sécrétion à la membrane

Dans la partie précédente, les études ont été faites sur des cellules au repos et nous avons postulé que les GS à mouvements contraint ou arrêtés étaient des GS accrochés à la membrane cellulaire.

Dans l'article du *Biophysical Journal* 2008, nous avons proposé une autre manière de tester cette hypothèse, en présence de Ca^{2+} pour induire la sécrétion et en restreignant l'étude à la sous-population des GS fusionnantes.

IV.1.1. Variation de D_{xy} lors de l'accrochage

Des cellules BON de la lignée N13 ont été stimulées par photolibération de Ca^{2+} cagé. 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.

En effet, les GS subissant l'exocytose présentent un avantage majeur. Puisque la fusion se produit à la membrane cellulaire, cela permet de définir leurs altitudes $z=0$ au moment de la fusion ($t=0$) et de calculer toutes leurs altitudes $z(t)$ par rapport à cette référence.

Un premier résultat important de l'article montre que l'arrivée d'un GS à la membrane correspond à une immobilisation latérale. Le coefficient de diffusion en 2 dimensions D_{xy} d'un GS diminue en moyenne d'un facteur 9-10 (figure 2A de l'article) lorsqu'il atteint la membrane cellulaire.

Un GS arrivant à la membrane plasmique passe donc par 2 régimes :

- un régime à coefficient de diffusion D_{xy} élevé
- un régime à bas coefficient de diffusion D_{xy} avant fusion

IV.1.2. Régime à bas D_{xy}

Pour analyser le comportement des GS entre leur arrivée à la membrane et la fusion, nous nous sommes intéressés aux GS résidants, c'est-à-dire aux GS dont la distance à la membrane cellulaire n'excède jamais les 50 nm durant la totalité de leur trajectoire (voir IV.2.1 ci-dessous). La caractérisation des mouvements de ces GS résidants a été effectuée grâce à la méthode d'analyse des trajectoires décrite dans la partie III. Sébastien Huet a ainsi déterminé la proportion de temps passé par ces GS dans chacune des quatre catégories de mouvement (Tableau 3 extrait de la thèse de Sébastien Huet (Huet 2006)).

Catégorie	Proportion de temps
Arrêt	$31 \pm 8 \%$
Contraint	$54 \pm 6 \%$
Dirigé	$1 \pm 1 \%$
Diffusif	$15 \pm 6 \%$

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. (65 GS, issus de 23 cellules, acquisitions à 10 Hz, $\delta = 100$ nm)

L'analyse montre que les GS résidants ont majoritairement des périodes d'arrêt ou des mouvements contraints. Pour des raisons déjà évoquées (voir III.3.1), ces deux catégories peuvent être réunies dans une même grande classe arrêtée/contrainte, dans laquelle les GS résidants passent donc 85% de leur temps. En comparaison, pour l'ensemble des GS situés dans la région juxta-membranaire dans les cellules au repos, la proportion de mouvements restreints est seulement de 44% (voir Tableau 1).

Ainsi les GS résidants ont-ils essentiellement des mouvements très restreints avant fusion. Or d'après la définition des GS résidants, ceux-ci sont probablement des GS accrochés à la membrane cellulaire, même si on ne peut exclure des décrochements ponctuels. Par conséquent, la fraction élevée de mouvements contraints et de périodes d'arrêt observée sur la sous-population des GS résidants est là encore en faveur de l'hypothèse selon laquelle ces types de mouvement caractérisent plus généralement les GS accrochés à la membrane.

Différents auteurs ont aussi montré que les mouvements à la membrane avant exocytose sont extrêmement limités (Steyer et Almers 1999 ; Oheim et Stuhmer 2000 ; Allersma, Bittner *et al.* 2006) et sensibles à l'ATP (Allersma, Bittner *et al.* 2006) ou au Ca^{2+} (Becherer, Moser *et al.* 2003).

Nous avons par ailleurs observé des GS résidants passant d'un site d'accrochage à un autre, distants de moins d'un diamètre de GS. Quelques rares mouvements dirigés, pouvant être attribués à des GS se déplaçant le long de microtubules proches et parallèles à la membrane cellulaire, ont aussi été observés. Cette hypothèse est appuyée par les observations qu'a faites Sébastien Huet au cours de sa thèse (Huet 2006) : dans les cellules BON, de nombreux microtubules sont tangents à la membrane.

L'origine des mouvements diffusifs observés à proximité de la membrane reste mystérieuse. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : i) tout d'abord, comme proposé dans la partie précédente, une diffusion latérale des points d'ancrage dans la membrane ; ii) une hypothèse plus vraisemblable est que ces GS ne soient pas ancrés et que leur diffusion résulte des mouvements de l'actine à proximité de la membrane.

IV.2. Distinction entre arrivants et résidants

IV.2.1. Définitions

Le suivi des altitudes en z des GS subissant l'exocytose a permis de mettre en évidence deux types de comportement parmi ces GS.

Arrivants

Les GS les plus intéressants, malheureusement minoritaires, sont ceux pour lesquels on peut observer l'ensemble des étapes se déroulant à la membrane plasmique : arrivée, accrochage et fusion, tout cela en condition stimulée (augmentation de la concentration en Ca^{2+} provoquée par une perméabilisation à la digitonine ou par une photolibération de Ca^{2+} cagé).

Ils arrivent à la membrane durant la période de stimulation, explorant des altitudes z supérieures à 100 nm avant de fusionner avec la membrane, et sont nommés « arrivants » (voir Figure 30B pour un exemple).

Résidants

Pour la majorité des GS subissant l'exocytose, l'arrivée à la membrane plasmique ne se produit pas durant la stimulation. Ils sont déjà très proches de la membrane plasmique avant le 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 les 50 nm ($z < 50$ nm) durant la totalité de leur trajectoire (20-30 s) avant exocytose, sont dits « résidants » (Figure 30A).

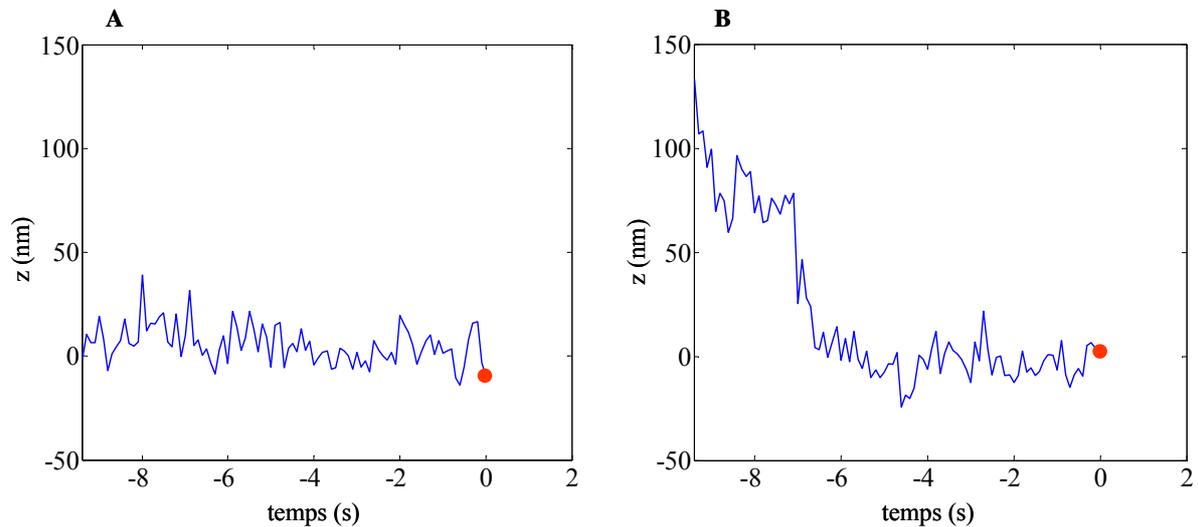


Figure 30 : Les deux types de comportements décrits par les GS avant leur fusion avec la membrane plasmique. Exemples d'un GS résidant (A) et d'un GS arrivant (B). L'origine des temps coïncide avec l'instant de la fusion (marquée par le point rouge). L'altitude de référence ($z = 0$) correspond à l'altitude moyenne des GS au cours de la dernière seconde précédant l'exocytose. Acquisitions à 10 Hz, $\delta = 100$ nm.

Ce premier critère proposé par l'article, basé sur les altitudes en z explorées durant la stimulation, permet de bien distinguer les deux populations. L'article propose un deuxième critère pour définir les résidants : seuls les GS observés pendant plus de 11 s à la membrane sont homologués dans cette classe. Cette valeur représente le temps de vie moyen à la membrane d'un GS arrivant. En effet, un GS résidant à la membrane pendant une durée inférieure pourrait être un GS arrivé à la membrane juste avant le début de l'observation.

Au final, avec ces critères restrictifs, un quart des GS suivis ayant subi une exocytose n'a pas été retenu pour nos analyses mais le nombre des événements restants reste suffisant (de l'ordre de 500). La majeure partie des événements d'exocytose éliminés correspond à des GS arrivant à la membrane d'une altitude intermédiaire, comprise entre 50 et 100 nm, et, de manière minoritaire, à des GS à la membrane depuis moins de 10 s, qui restent difficiles à classer.

Dans les cellules BON, la majorité des GS qui fusionnent sont des résidants (51% des GS suivis ayant subi une exocytose, contre 23% pour les arrivants, soit respectivement 69 % et 31 % des GS classifiés).

Comparée à celles effectuées dans d'autres types cellulaires, notre description de ces deux classes de GS est plus précise et plus détaillée que celles décrites dans les cellules chromaffines (Steyer, Horstmann *et al.* 1997 ; Oheim, Loerke *et al.* 1999), mais les observations de base sont similaires. Nous retrouvons des statistiques proches de celles d'Allersma *et al.* (Allersma, Wang *et al.* 2004) qui ont observé que les GS qui fusionnent sont majoritairement (70%) des résidants, avec un temps de vie à la membrane supérieur à 12 s. En revanche, notre description diffère de celle faite dans les neurones (Zenisek, Steyer *et al.* 2000), où les arrivants proviennent de structures proches (voir IV.3.3 ci-dessous). Dans les cellules PC12, l'exocytose a été décrite comme provenant principalement de GS mobiles, qui pourraient représenter la classe des arrivants (Han, Ng *et al.* 1999). Enfin, de manière intéressante dans les cellules β -pancréatiques, les proportions des GS arrivants et résidants fusionnant avec la membrane dépendent du type de stimulation, KCl ou glucose (Ohara-Imaizumi, Nakamichi *et al.* 2002b).

IV.2.2. Mouvements des granules de sécrétion arrivants avant accrochage à la membrane

Dans le présent article, environ la moitié des arrivants à la membrane semblent s'approcher avec des mouvements de type dirigé (Figure 3A de l'article). De tels mouvements juste avant l'accrochage à la membrane ont déjà été décrits (Steyer, Horstmann *et al.* 1997 ; Steyer et Almers 1999 ; Oheim et Stuhmer 2000).

Ces résultats contrastent avec les résultats obtenus dans la partie précédente (Huet, Karatekin *et al.* 2006) où nous avons proposé que les mouvements d'arrivée soient majoritairement de type diffusif. L'analyse des trajectoires décrites par les GS dans des cellules BON au repos a montré que les transitions entre une période de mouvement dirigé (correspondant à un déplacement le long des microtubules avec une vitesse moyenne de 0,6 $\mu\text{m/s}$) 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 : parmi les transitions vers des périodes d'arrêt ou de mouvement contraint, seulement 13% proviennent de mouvements dirigés.

Cependant, les vitesses des mouvements dirigés mesurées ici sont faibles selon l'axe z (< 100 nm/s pour la plupart) (Figure 3B de l'article), inférieures à celles mesurées dans la partie précédente pour différents types d'organites se déplaçant le long des microtubules ($\sim \mu\text{m/s}$) 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).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence. Dans le présent article, nous décrivons l'accrochage d'un GS arrivant à un site d'exocytose en présence d'une concentration élevée de Ca^{2+} . Ce processus pourrait être différent de celui observé dans les conditions de repos. De plus, un mouvement dirigé le long de l'axe z n'exclut pas que le mouvement 3D associé puisse être de type diffusif.

Alternativement, les mouvements de type dirigés observés dans cette partie pourraient être conduits pas des moteurs différents de ceux intervenant dans les cellules au repos. Les arrivants atteignant la membrane avec des vitesses inférieures à 0,6 $\mu\text{m/s}$ pourraient être conduits par des moteurs comme la myosine V ou, indirectement, par des mouvements du réseau d'actine induits par la myosine II, réseau auquel les GS sont liés (Neco, Giner *et al.* 2003 ; Rose, Lejen *et al.* 2003 ; Rudolf, Kogel *et al.* 2003 ; Ivarsson, Jing *et al.* 2005 ; Varadi, Tsuboi *et al.* 2005 ; Desnos, Huet *et al.* 2007).

IV.2.3. Temps de vie caractéristique à la membrane

Pour les GS arrivants, le temps de vie passé à la membrane cellulaire à Ca^{2+} élevé avant fusion semble répondre à un processus stochastique. En effet, d'après la figure 3C de l'article, la courbe du nombre d'arrivants « survivants » en fonction du temps de vie à la membrane est bien modélisée par une simple exponentielle décroissante (cinétique d'ordre un, de temps caractéristique ~ 11 s), suggérant qu'il s'agit d'une population homogène. Or ce temps de vie est également, par définition, la durée nécessaire à l'amorçage. Nos résultats concordent avec la durée moyenne d'amorçage de ~ 10 s que les méthodes électrophysiologiques ont permis de déterminer pour les GS dans les cellules chromaffines bovines (Xu, Binz *et al.* 1998).

En revanche, nos conclusions diffèrent de celles d'Allersma *et al.* (Allersma, Wang *et al.* 2004) qui proposent que la population des arrivants soit hétérogène. Par exemple, ils

distinguent, parmi les arrivants, des GS présents à la membrane entre 0,3 s et 2 s avant de fusionner (8% des GS subissant l'exocytose) ainsi que des GS qui fusionnent si rapidement qu'on ne peut pas détecter leur arrêt à la membrane (22%). Ces derniers sont visibles dans le champ évanescent moins de 300 ms avant la fusion et ont été définis comme des GS balistiques. Notre analyse suggère plutôt que ces événements sont ce que nous avons appelé des événements orphelins et nous avons attribué leur origine à une exocytose séquentielle (voir II.2.4). Notre hypothèse est qu'il n'existe pas de différence de nature entre les arrivants.

Remarquons que ce temps de vie caractéristique à la membrane est relativement long. Dans le cas des arrivants, le temps caractéristique à la membrane est de 11 s. Pour les résidants, des fusions sont observées jusqu'à 60 s après l'élévation de la concentration en Ca^{2+} . Il peut paraître surprenant qu'il puisse y avoir des GS qui passent des temps aussi longs à la membrane avant de subir l'exocytose, alors même que la concentration en Ca^{2+} est élevée. Pour qu'un GS puisse subir l'exocytose, la condition d'être à la membrane et à Ca^{2+} élevé est donc nécessaire mais pas suffisante, suggérant l'existence d'étapes de régulation.

L'idée d'une cinétique contrôlée par des étapes de régulation est aussi en accord avec l'absence de temps de latence sur la courbe 3C de l'article : des GS peuvent fusionner presque immédiatement dès leur arrivée à la membrane. Il n'y a pas de temps minimum détectable entre l'arrivée à la membrane et la fusion. Or ici, pour des GS arrivants devant effectuer à la membrane toute une série d'opérations nécessaires à la fusion (accrochage à la membrane, amorçage afin d'acquérir la compétence à la fusion), il est intéressant de constater que le temps minimum peut être extrêmement court, inférieur à notre résolution temporelle (100 ms).

Ces étapes de contrôle, que l'on peut appeler étapes d'amorçage, sont-elles détectables en microscopie TIRF ?

IV.3. Transition axiale

Un résultat important et original de l'article est l'observation d'une transition axiale de 21 nm en moyenne vers la membrane (Figure 5 de l'article) à haut Ca^{2+} effectuée par un GS avant de subir l'exocytose.

IV.3.1. La transition a-t-elle une réalité physique ?

Comme la taille de cette transition est très proche du pouvoir de résolution du TIRF, il a fallu mettre en place des critères de qualité pour nous assurer de la réalité de la transition observée.

- Tout d'abord le tracé de la demi-largeur à mi-hauteur σ de l'ajustement gaussien en fonction du temps permet de détecter si une variation brutale de z peut correspondre au passage d'un GS voisin juste à proximité du GS considéré. Si un GS voisin est pris en compte dans l'ajustement, il provoque un élargissement brutal de l'ajustement. Par ailleurs, l'ajustement devient moins bon ce qui peut se détecter par une détérioration du Chi^2 (voir Matériels et méthodes).
- Ensuite le tracé du bruit de fond en fonction du temps, obtenu en soustrayant la trajectoire non bruitée (obtenue par un filtrage médian) à la trajectoire en z originale, permet de vérifier si la taille d'une transition est significative au moment de la transition.

- La modélisation de la transition par une fonction de « saut » (Figure 5C de l'article) a également permis d'avoir une détection plus objective de la transition, même si au final les résultats obtenus sont peu différents de ceux obtenus par détection manuelle.

Un argument *a posteriori* est que si les transitions détectées ne correspondaient pas à un mouvement réel mais n'étaient en réalité que du bruit, la distribution des tailles de transition ne serait pas celle obtenue sur la figure 5E de l'article, mais présenterait beaucoup plus d'occurrences dans les faibles valeurs, dues à des faux positifs.

IV.3.2. La transition a-t-elle une réalité biologique ?

Même si l'augmentation d'intensité de fluorescence d'un GS avant exocytose est réelle, elle pourrait avoir d'autres origines que la transition axiale avancée par l'article. En particulier l'augmentation de pH consécutive à l'ouverture du pore de fusion pourrait provoquer une augmentation de la fluorescence de l'EGFP.

L'article donne trois arguments suggérant que la variation de pH n'est pas à l'origine de nos observations.

- Les transitions correspondant à des changements de pH devraient être plus importantes que celles que nous observons.
- La durée de vie de l'état arrimé correspondrait à celle des pieds observés en ampérométrie à fibre de carbone. Sur les cellules BON, cette durée est beaucoup plus courte que les temps que nous observons entre la transition et la fusion.
- La distribution des tailles de transition est indépendante de la profondeur d'évanescence, contrairement à ce qui serait attendu pour un changement de pH et la variation de fluorescence concomitante.

IV.3.3. Est-ce une observation originale ?

On peut se demander pourquoi cette transition, si elle existe réellement, n'a pas encore été observée par d'autres. En fait, une transition axiale similaire à la nôtre a été décrite dans les neurones bipolaires de la rétine de poisson rouge (Zenisek, Steyer *et al.* 2000). Une dépolarisation de la membrane cellulaire induit l'exocytose rapide de vésicules synaptiques résidentes suivie par celle d'arrivantes. Ces dernières sont immobilisées à courte distance de la membrane cellulaire, formant comme un *pool* de réserve. Suite à une stimulation électrique, elles effectuent un déplacement axial vers la membrane plasmique avant de subir l'exocytose 250 ms plus tard. De manière intéressante, la distance moyenne est de 20 +/- 4 nm.

Cependant cette transition axiale a été attribuée à l'existence de structures en rubans, présentes spécifiquement dans ces neurones au niveau de zones actives. Ces rubans permettent de stocker des vésicules synaptiques à proximité de la membrane, maintenant les arrivantes en réserve. Dans des conditions cellulaires différentes, en l'absence de structure en rubans, nous avons observé également une transition du même ordre.

IV.3.4. Est-ce une étape obligatoire vers la fusion ?

La fréquence de ces observations est assez élevée : 40% des GS effectuent une transition. Ce n'est donc pas un événement isolé. L'article pose même comme hypothèse qu'il s'agit d'une étape obligatoire avant la fusion, c'est-à-dire que tous les GS doivent subir cette transition, en s'appuyant sur plusieurs arguments :

- le fait que l'on observe une population de GS où la transition n'est pas détectable peut être dû à des raisons géométriques, les transitions inférieures à 20 nm n'étant pas détectées
- les GS effectuant une transition sont observés avec la même fréquence parmi les arrivants ou les résidants
- les cinétiques de survie sont à peu près identiques entre les GS effectuant une transition et ceux qui n'en effectuent pas, ainsi qu'entre arrivants et résidants (voir IV.5.3).

IV.3.5. Est-elle dépendante de la concentration en Ca^{2+} ?

Dans l'article, deux temps caractéristiques ont été introduits. Le temps t_1 , séparant le flash UV de la transition, et le temps t_2 séparant la transition de la fusion (figure 5A de l'article).

Nos travaux préliminaires dans l'article montrent que :

- t_1 est dépendant de $[Ca^{2+}]_i$
- t_2 ne semble pas dépendre de $[Ca^{2+}]_i$ dans les conditions de nos expériences en Ca^{2+} cagé (avec une valeur caractéristique de 3,3 s), ce qui est une grande différence par rapport ce qui est observé dans les cellules chromaffines.

Néanmoins, ces résultats sont à nuancer. D'une part, les observations ont été effectuées en Ca^{2+} non contrôlé. En effet, la méthode de chargement des cellules en Ca^{2+} cagé (NP-EGTA- Ca^{2+}) que nous avons utilisée ne permet pas de contrôler le Ca^{2+} libéré. Les essais de mesure de Ca^{2+} que nous avons effectués ne sont que des évaluations grossières. Dans un premier temps, j'avais essayé d'évaluer la concentration en $[Ca^{2+}]_i$ cytosolique suite à la photolibération de Ca^{2+} cagé au moyen d'un marqueur calcique fluorescent, le Fluo-4. Mais ces observations, bien qu'effectuées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour stimuler la sécrétion, n'ont pu être faites dans les mêmes cellules, et surtout, ne donnaient que des variations relatives de concentrations. En effet, les mesures absolues de concentration en Ca^{2+} sont très difficiles à mettre en œuvre et demandent un lourd investissement en matériel et en temps. Une avancée significative a été faite par Erdem Karatekin utilisant une sonde ratiométrique. Ces mesures ont indiqué que, dans nos conditions expérimentales, la concentration en Ca^{2+} atteinte était de l'ordre du micromolaire (voir Matériels supplémentaires de l'article). Les rapports de concentrations en Ca^{2+} évoqués dans l'article sont surtout basés sur un argument indirect, à savoir le fait que le nombre d'événements d'exocytose pour les flashes UV tardifs est deux fois moins important que pour les flashes UV précoces, ce qui correspond à une concentration en Ca^{2+} estimée respectivement à environ 0,5 μ M et 1 μ M.

Un point surprenant de ces expériences est l'indépendance vis-à-vis du Ca^{2+} de t_2 (pour des concentrations en Ca^{2+} de l'ordre du μ M). Cela suggérerait qu'une fois la transition faite, le système n'a plus de dépendance vis-à-vis du Ca^{2+} . Néanmoins, ce résultat surprenant par rapport aux données du laboratoire d'E. Neher sur les cellules chromaffines n'exclut pas une dépendance possible de t_2 à bas Ca^{2+} , dans la zone de concentration encore plus faible.

IV.4. Modèle

IV.4.1.1. Rappel du modèle de la sécrétion dans les cellules BON

L'ensemble des résultats conduit à proposer le modèle suivant (Figure 31).

Considérons d'abord les GS déjà accrochés à la membrane, à Ca^{2+} élevé. Rappelons que le terme « accroché » est générique : il ne précise pas le mode de liaison à la membrane. L'observation de la transition peut s'expliquer en postulant qu'il existe deux modes d'accrochage du GS à la membrane cellulaire

- un premier état, non compétent pour la fusion, dans lequel les GS sont distants d'environ 20 nm de la membrane (liaison lâche), qu'on peut appeler « accosté » et noter T_2 (avec T comme *tethered*), avant la transition
- un deuxième état compétent pour la fusion, où les GS sont plus proches de la membrane cellulaire (liaison plus forte), qu'on peut appeler « arrimé » ou D comme *docked*.

La transition de 20 nm observée est le passage entre l'état accosté (T_2) et l'état arrimé (D). Cette transition de T_2 vers D, que nous appelons arrimage, mène invariablement à la fusion (F). Et, si l'on admet que tous les GS passent par la transition, la fusion n'est donc pas directement permise depuis l'état T_2 .

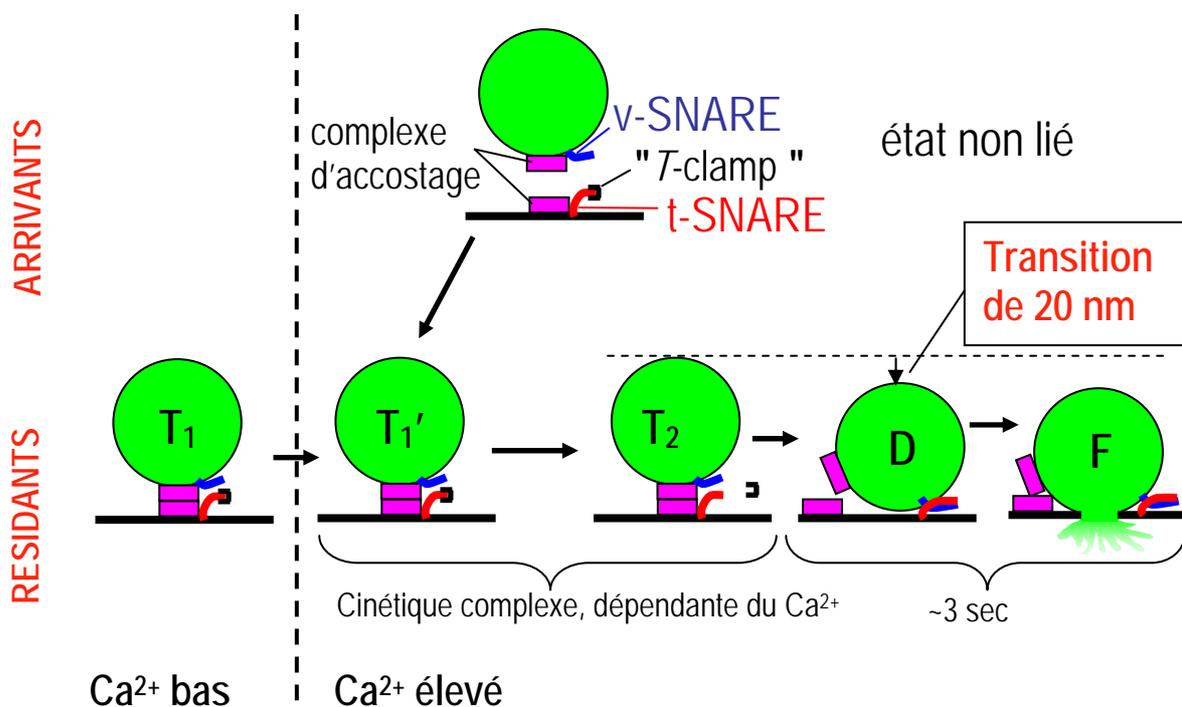


Figure 31 : Modèle dérivé des travaux de l'article. T1 : état accosté avec *clamp* (« frein » enclenché) à $[Ca^{2+}]_i$ bas. T1' : état similaire à $[Ca^{2+}]_i$ élevé, T2 : état accosté sans *clamp* (« frein » levé) à $[Ca^{2+}]_i$ élevé. D : état arrimé à $[Ca^{2+}]_i$ toujours élevé. F : fusion. (Adapté de la figure 9 de l'article).

Considérons maintenant les GS résidents et arrivants dans le cadre de ce modèle. Un GS résident est déjà accroché à la membrane plasmique avant d'effectuer la transition. Mais avant stimulation, aucune fusion ne se produit, ce qui peut s'expliquer par l'existence d'un contrôle négatif sur l'état T, un *T-clamp*, empêchant les GS de passer dans l'état D. L'état clampé est figuré T_1 à haute concentration de Ca^{2+} et T_1' à haute concentration de Ca^{2+} . La stimulation favorisant une transition rapide de T vers D, la libération du *T-clamp* serait donc causée par une élévation du niveau de Ca^{2+} cytoplasmique. C'est le passage de l'état T_1' à l'état T_2 .

Une fois l'arrimage effectué (D), la fusion (F) se produit alors dans un délai relativement rapide, avec une cinétique exponentielle, de temps caractéristique 3,3 s, et indépendante du Ca^{2+} , du moins dans la gamme de concentration étudiée.

Dans le cas des GS arrivants, ceux-ci passent d'abord par une étape d'accostage à haute concentration de Ca^{2+} (T_1') avant d'effectuer la transition.

Ils suivent une cinétique de sécrétion (temps séparant la montée de Ca^{2+} et la fusion vésiculaire) similaire à celle des GS résidants. Ceci suggère qu'ils doivent passer par les mêmes étapes, c'est-à-dire $T_2 \rightarrow D \rightarrow F$, et que l'étape supplémentaire d'accostage qui précède est très rapide par rapport aux autres étapes.

IV.4.1.2. Discussion

L'appellation de GS amorcés (*primed*) est couramment utilisée dans la littérature pour décrire des GS compétents pour la fusion (voir I.1.2.4). Nous avons vu que cette étape d'amorçage recouvre des choses très différentes selon la technique utilisée. L'aspect nouveau de notre travail est d'introduire une variation de distance détectable dans la transition entre ces états.

Des travaux récents utilisant la microscopie TIRF ont aussi suggéré l'existence de deux états d'accrochage des GS dans les cellules chromaffines au repos. Ces conclusions ne reposent pas sur une observation directe des changements des distances par rapport à la membrane plasmique. Pour distinguer les deux états, le principal argument de Toonen *et al.* (Toonen, Kochubey *et al.* 2006) se base sur l'existence de trois temps de résidence des GS dans le champ évanescant. Le plus court ($t < 1$ s) caractérise les GS « visiteurs » non retenus, tandis que les GS faiblement attachés (*weakly tethered*) et fortement attachés (*strongly tethered*) ont des temps de résidences de 1-10 s et > 10 s, respectivement. Concernant ce dernier état, l'analyse de l'autocorrélation des mouvements des GS indique l'existence de puissantes forces d'accrochage. Les GS appartenant aux deux états attachés sont supposés être accrochés à la membrane (via Munc18-1), mais on ne peut exclure qu'ils puissent aussi être liés au cytosquelette. Il est tentant de spéculer que l'arrimage que nous avons observé dans les cellules BON soit analogue à la transition entre l'état faiblement attaché et l'état fortement attaché, proposée par Toonen *et al.* comme étant l'amorçage. Notons que notre définition de l'état D (*docked*) est différente de celle utilisée par Toonen *et al.* qui utilisent ce terme de manière générique pour désigner l'accrochage (morphologique) à la membrane plasmique.

Dans une publication indépendante, Nofal *et al.* ((Nofal, Becherer *et al.* 2007) ont utilisé l'analyse des mouvements en x,y de GS à la membrane et des mesures de diamètre de cage pour distinguer deux états d'accrochage à la membrane : accrochés et non amorcés (*unprimed docked*), ou accrochés et amorcés (*primed docked*). La transition entre ces deux états pourrait là encore être analogue à la nôtre. Le *docking* désigne là encore l'accrochage à la membrane plasmique au sens large.

IV.5. Cinétiques de sécrétion

IV.5.1. Modèle des pools cinétiques de Neher

Les études électrophysiologiques montrent que la sécrétion d'hormones par les cellules neuroendocrines se déroule suivant une cinétique complexe (voir I.3.1.1.b). Les travaux de l'équipe de Neher sur les cellules chromaffines (Voets, Neher *et al.* 1999; Ashery, Varoqueaux *et al.* 2000; Voets 2000) (pour une revue, voir (Becherer et Rettig 2006)) ont permis de dégager un modèle affiné comprenant quatre populations (*pools*) (Figure 32A) :

- deux populations de GS supposés accrochés (*docked*) à la membrane et amorcés (*primed*), c'est-à-dire compétents pour la fusion (SRP *Slowly Releasable Pool* et RRP *Readily Releasable Pool*), qui correspondent à la phase rapide de la sécrétion
- une population de GS aussi supposés accrochés à la membrane ou proche de la membrane mais non amorcés, qui doivent passer par des étapes d'amorçage avant de pouvoir fusionner (UPP *Unprimed Pool*) : ces GS sont associés à la phase lente de la sécrétion;
- enfin, un dépôt de GS de réserve (DP *Depot Pool*), à distance de la membrane plasmique, permettant de repeupler les populations précédentes après une sécrétion.

Une augmentation brutale de $[Ca^{2+}]_i$ par photolibération de Ca^{2+} cagé déclenche une sécrétion immédiate et massive des GS à partir des populations RRP et SRP, puis à partir des GS de la population UPP qui doivent repeupler les populations RRP et SRP, et enfin à partir du DP. Cela aboutit à une cinétique globale complexe (Figure 32B), modélisable par 3 exponentielles correspondant chacune à une des populations. Les *pools* RRP et SRP de la phase rapide sont vidés avec des temps caractéristiques d'environ 15-30 ms et 150-300 ms, respectivement (Voets 2000).

IV.5.2. Différences expérimentales entre les approches

Avant de pouvoir comparer nos résultats avec ceux de l'équipe de Neher, il convient d'en souligner les différences expérimentales. Nous avons utilisé le même type d'approche qu'eux : stimulation de la sécrétion par photolibération de Ca^{2+} cagé, analyse des courbes de cinétique de sécrétion obtenues en remplaçant dans le temps les événements d'exocytose détectés en TIRF (voir II.2.1). Cependant, la résolution temporelle de la microscopie TIRF (~100 ms) est faible en comparaison de celle obtenue grâce à des techniques d'électrophysiologie (~1 ms). Cette méthode d'imagerie est donc mal adaptée à l'étude de la phase rapide de la cinétique de libération d'hormones. Par exemple, elle ne nous permettrait pas de distinguer les populations RRP et SRP dans les cellules chromaffines. Par ailleurs, le contrôle du niveau de Ca^{2+} doit encore être amélioré dans notre montage. Enfin, nous avons utilisé des cellules de type différent.

Malgré tout, la microscopie TIRF donne des informations supplémentaires d'ordre spatial : elle permet d'étudier les mouvements des GS et de voir des transitions non visibles en électrophysiologie. En particulier, grâce au TIRF, nous avons observé que tous les GS résidants à la membrane ne subissaient pas l'exocytose pas simple élévation de la concentration en Ca^{2+} mais qu'il existait d'autres mécanismes de contrôle à la membrane. Ces contrôles ne sont pas spécifiques aux cellules BON mais existent aussi dans les cellules chromaffines (Becherer, Moser *et al.* 2003).

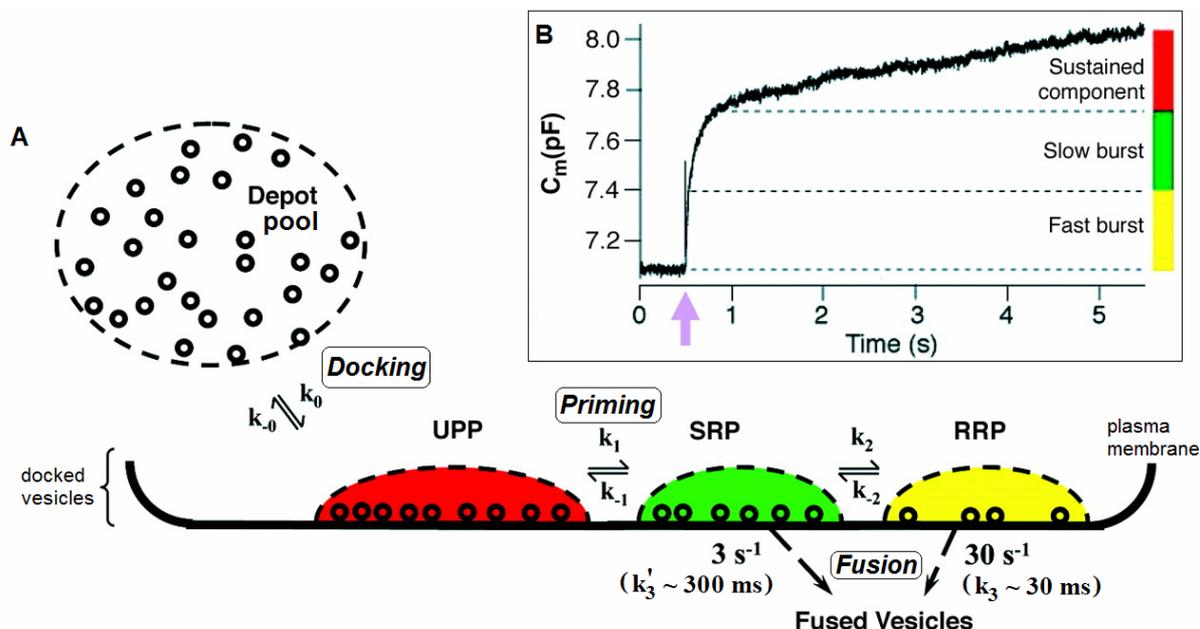


Figure 32 : Modèles des pools cinétiques de Neher. (A) Les GS sont décrits dans quatre états différents. Les GS du *pool* de réserve (*Depot Pool*) (environ 2000) entrent dans le *pool* non amorcé (*Unprimed Pool* ou UPP) au moment de leur accrochage à la membrane. Un total de 850 GS morphologiquement accrochés (observés en microscopie électronique) se subdivise entre ce *pool* non amorcé UPP (environ 650 GS) et un *pool* amorcé libérable. Ce dernier se subdivise à nouveau entre un *pool* lentement libérable (*Slowly Releasable Pool* ou SRP) et un *pool* rapidement libérable (*Rapidly Releasable Pool* ou RRP) (composés chacun d'environ 100 GS). L'amorçage est défini fonctionnellement, dans le sens où un GS est dit amorcé, s'il peut fusionner environ dans la seconde suivant une élévation de $[Ca^{2+}]$. Les GS sont supposés être dans l'un des deux états amorcés s'ils ont des complexes SNARE au moins partiellement assemblés. (B) Courbe représentative de capacité membranaire, observée lorsque qu'un flash de lumière UV (voir flèche mauve) cause une augmentation brutale du $[Ca^{2+}]$ cytosolique d'un niveau basal d'environ 300 nM à 20 μ M. La capacité membranaire augmente proportionnellement au nombre de GS qui fusionnent avec la membrane plasmique. La modélisation de la courbe fait apparaître trois composantes cinétiques distinctes nommées décharge rapide (*fast burst*), décharge lente (*slow burst*) et composante soutenue (*sustained component*). Le code couleur attribue les parties de la courbe à la fusion des GS du RRP (jaune) ou du SRP (vert), ou à un amorçage lent (suivi d'une libération immédiate) de GS précédemment non amorcés (rouge). Adapté de (Rettig et Neher 2002).

IV.5.3. Comparaison des cinétiques de sécrétion

L'analyse des cinétiques obtenues avec les cellules BON montre une différence marquante par rapport à celui proposé par Neher dans les cellules chromaffines. D'après la figure 1C de l'article (Figure 33), après chaque photolibération de Ca^{2+} cagé, on observe une cinétique de sécrétion qui n'est pas exponentielle mais sigmoïdale : la courbe de sécrétion cumulée présente une concavité au démarrage. Cela est encore plus visible si on regarde le nombre d'événements en fonction du temps (voir l'encart). Cette courbe représente en quelque sorte la dérivée de la précédente, et montre que le taux de sécrétion n'atteint son maximum qu'après un délai d'environ deux secondes après l'élévation de la concentration en Ca^{2+} .

Ce résultat montre qu'à la différence des cellules chromaffines, il n'y a pas ou très peu de phase rapide dans les cellules BON. De plus, cet aspect sigmoïdal de la cinétique s'explique vraisemblablement par l'existence d'une étape non productive (c'est-à-dire qui ne mène pas à la fusion) conformément à la transition $T \rightarrow D$ décrite dans l'article.

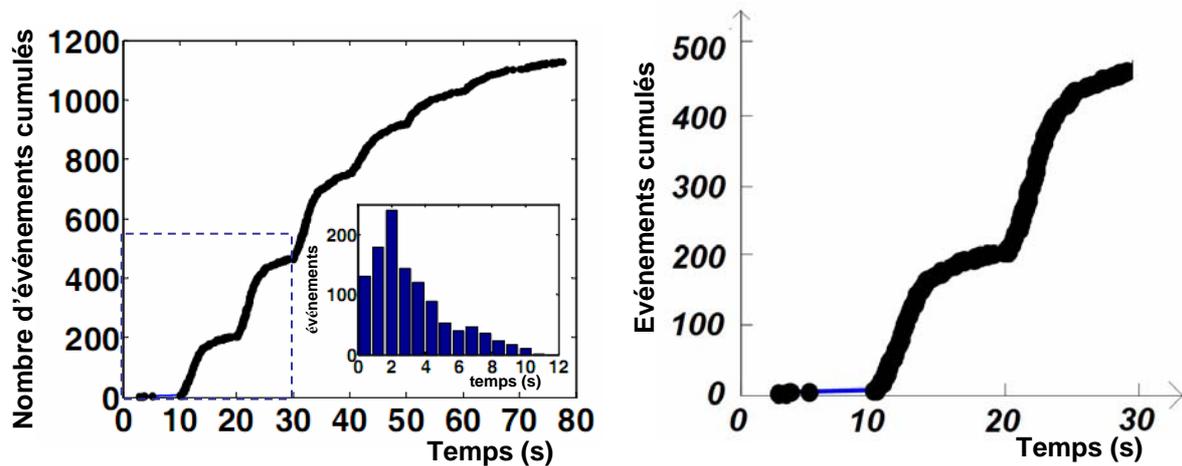


Figure 33 (correspondant à la figure 1C de l'article), agrandie à droite pour les 30 premières secondes. **Nombre d'événements d'exocytose cumulés en fonction du temps** provenant de 59 cellules stimulées dans les expériences utilisant le Ca^{2+} cagé, dans lesquelles huit flashes UV ont été appliqués à 10 s d'intervalle pour augmenter brutalement la concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$. L'encart montre le nombre d'événements d'exocytose en fonction du temps après qu'un flash UV est appliqué, en combinant les données provenant de tous les flashes UV (1138 événements). Les barres de l'histogramme ont une largeur de 0,8 s. Le taux maximal d'exocytose est atteint ~ 2 s après un flash UV.

Remarquons en passant qu'aucune différence significative n'est observable entre les cinétiques de sécrétion des GS effectuant une transition axiale et de ceux qui n'en effectuent pas (Figure 34A) : elles présentent un même aspect sigmoïdal. Cela vient en soutien du modèle de l'article qui considère qu'en réalité tous les GS doivent passer par une étape non productive, la transition $T \rightarrow D$, avant de fusionner et que l'absence de transition axiale observable peut s'expliquer par un problème de détection (40% de transitions détectées).

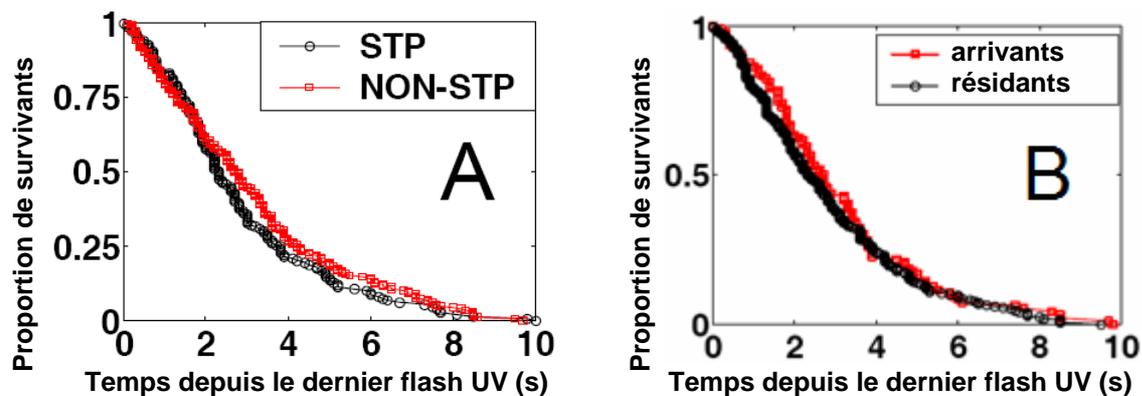


Figure 34 : courbes cinétiques de survie. Ces courbes sont équivalentes à des fonctions de densité de probabilité à fusionner (non normalisées). **(A)** Comparaison des cinétiques de fusion entre les GS effectuant une transition axiale (STP) et ceux n'en effectuant pas (NON-STP). Les courbes montrent les proportions de GS STP (cercles noirs) et de GS NON-STP (carrés rouges) qui n'ont pas encore fusionné au temps t depuis le dernier flash UV. **(B)** Comparaison des cinétiques de fusion entre les GS arrivants et les GS résidants. Les courbes correspondent aux proportions de GS arrivants (carrés rouges) et de GS résidants (cercles noirs) qui n'ont pas encore fusionné au temps t depuis le dernier flash UV. (Figures correspondant aux figures 8A et 4C de l'article).

Les cinétiques de sécrétion des GS arrivants et résidants après un flash UV (Figure 34B) sont quasiment superposables et présentent toutes deux un aspect sigmoïdal. Elles ont donc vraisemblablement une même étape non productive à franchir. Cela est un bon argument en faveur du modèle de l'article qui propose que les GS arrivants et les résidants doivent toutes effectuer une transition axiale avant de pouvoir fusionner.

IV.5.4. Interprétation des différences

Des études faites dans d'autres types cellulaires ont montré l'existence d'une sécrétion lente des GS à cœur dense dans les cellules PC12 et les cellules β -pancréatiques stimulées par le glucose (Kasai 1999 ; Martin 2003). Par sécrétion lente, nous entendons que la sécrétion cumulée exprimée en fonction du temps n'apparaît pas sous la forme d'une exponentielle, mais d'une courbe de type sigmoïdale.

Deux interprétations sont possibles : i) soit les deux systèmes de sécrétion, cellules BON et cellules chromaffines, fonctionnent de manière différente, avec des acteurs moléculaires différents ; ii) soit les systèmes sont les mêmes : les GS passent alors par les mêmes étapes mais avec des régulations différentes. L'amorçage *Unprimed* \rightarrow *Primed* dans les cellules chromaffines pourrait alors correspondre en partie à l'arrimage T \rightarrow D dans les cellules BON.

Dans les cellules chromaffines, les phases lente et rapide de la sécrétion seraient dues respectivement à l'existence à bas Ca^{2+} (300 nM) de GS à la fois dans les états T et D. En revanche, dans les cellules BON, la sécrétion ne comporte pas de phase rapide. Cela correspondrait au fait qu'à bas Ca^{2+} , aucun GS ne se trouve dans l'état D. Tous les GS sont bloqués dans l'état T.

Ces différences pourraient s'expliquer par une dépendance différente de la transition T \rightarrow D à la concentration de Ca^{2+} : dans les cellules chromaffines, les GS seraient capables d'effectuer la transition T \rightarrow D même à bas Ca^{2+} , alors que dans les cellules BON, le contrôle de la transition par le Ca^{2+} serait plus strict, celle-ci ne pouvant s'effectuer qu'à Ca^{2+} élevé (0.5-1 μM).

La transition D \rightarrow F est clairement contrôlée par le Ca^{2+} dans les cellules chromaffines : les GS amorcés dans l'état D fusionnent dès l'élévation de Ca^{2+} (20 μM). Au contraire, dans les cellules BON, il est difficile de mettre en évidence la dépendance au Ca^{2+} de la transition D \rightarrow F, puisque le Ca^{2+} est aussi nécessaire pour effectuer la transition T \rightarrow D.

Pour tester cette hypothèse, un ester de phorbol comme le PMA pourrait être utilisé pour provoquer la transition T \rightarrow D à bas Ca^{2+} , comme cela est suggéré par (Nofal, Becherer *et al.* 2007). On pourrait alors voir si l'existence de GS amorcés bloqués dans l'état D est possible et mettre en évidence la dépendance vis-à-vis du Ca^{2+} de la transition D \rightarrow F.

IV.6. Recherche des acteurs moléculaires impliqués dans l'accostage et l'arrimage

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation des étapes d'accostage et d'arrimage, il faudra chercher à déterminer la nature des protéines à l'origine de ces deux modes de liaison à la membrane. Quelles espèces moléculaires peuvent être impliquées dans l'accostage et l'arrimage des GS à la membrane plasmique, et dans la transition entre ces deux états ?

En l'absence de données moléculaires sur les cellules BON, nous ne pourrions raisonner que comparativement aux cellules chromaffines. Très peu d'espèces moléculaires ont été formellement impliquées dans les étapes d'accostage et d'arrimage. Le complexe SNARE par sa spécificité et par sa forte affinité pourrait participer aux étapes d'accostage et d'arrimage. Néanmoins, l'observation par microscopie électronique de cellules (neurones) traitées par les neurotoxines clostridiales (qui coupent le complexe SNARE) montre que des systèmes

indépendants en amont des SNARE sont capables d'immobiliser les GS à proximité de la membrane cellulaire (Hunt, Bommert *et al.* 1994). Ces systèmes ne sont pas identifiés.

Une première hypothèse de recherche serait donc qu'il y ait des acteurs différents pour chacune de ces deux étapes. Le complexe SNARE serait bien l'acteur principal de l'étape d'arrimage, tandis que l'étape d'accostage impliquerait en amont un autre système protéique qui pourrait, selon certains auteurs, être l'exocyste (voir I.1.2.3). L'arrimage correspondrait alors à la dissociation du complexe exocyste pour former le complexe SNARE. Une fois le complexe SNARE au moins partiellement assemblé, celui-ci rapprocherait les membranes vésiculaire et cellulaire jusqu'à ce que seulement quelques nm les séparent (Sutton, Fasshauer *et al.* 1998). Le passage d'un GS d'un état accosté grâce au complexe exocyste à un état arrimé par les SNARE se traduirait donc par un rapprochement des membranes de l'ordre de la taille de l'exocyste, soit quelques dizaines de nm, ce qui est compatible avec la transition que nous avons observée.

Des résultats impliquant RalA (voir I.1.2.3) pointaient déjà un rôle possible de l'exocyste dans l'accrochage des vésicules synaptiques à la membrane plasmique (Polzin, Shipitsin *et al.* 2002), mais la microscopie TIRF en a récemment fourni un argument plus direct (Tsuboi, Ravier *et al.* 2005). En effet, dans des cellules pancréatiques où ont été exprimés des mutants *trans*-dominants négatifs de sous-unités de l'exocyste, un effet inhibiteur a été constaté sur la sécrétion des GS accrochés ainsi que sur l'accrochage des GS à la membrane cellulaire.

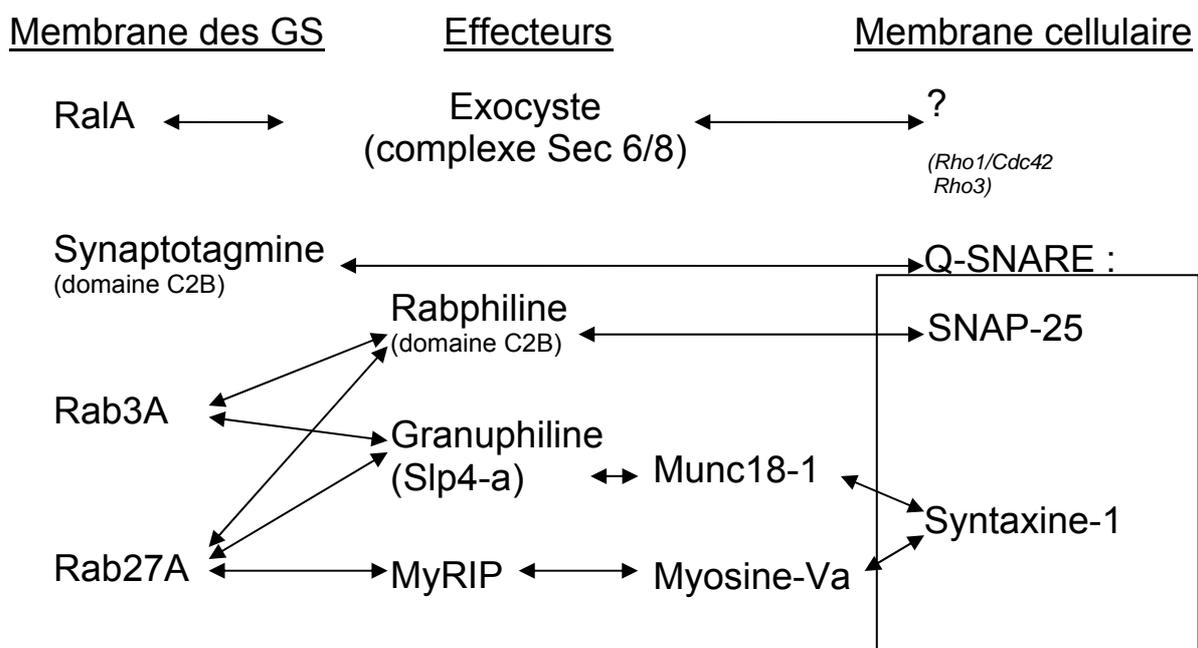


Figure 35 : Schéma représentant les différents acteurs possibles impliqués dans l'accostage des GS à la membrane cellulaire chez les mammifères (en italique : données chez la levure, en l'absence de données chez le mammifère).

Une deuxième hypothèse serait que les Q-SNARE (t-SNARE) jouent également un rôle dans l'accostage des GS à la membrane plasmique. En effet, des publications récentes montrent que les Q-SNARE et d'autres protéines solubles peuvent interagir avec des composants de la membrane des GS (Figure 35).

In vitro, les Q-SNARE sont capables d'interagir avec le domaine C2B de la synaptotagmine (présente sur la membrane vésiculaire) (Rickman, Jimenez *et al.* 2006). Toutefois, cette liaison serait trop courte pour correspondre à la taille d'environ 20 nm de la transition que

nous avons observée. Pour que cette condition soit remplie, il faudrait que les interactions fassent intervenir un assemblage de plusieurs protéines.

Une voie mieux étudiée impliquerait les GTPases monomériques de la famille Rab (sous leur forme active liant le GTP) présentes à la membrane des GS. En particulier Rab3 et Rab27 ((Takai, Sasaki *et al.* 2001) ; (Zerial et McBride 2001) ; (Desnos, Schonn *et al.* 2003)), déjà étudiées au laboratoire, pourraient intervenir dans l'accostage des GS à la membrane plasmique. Il a ainsi été montré dans les cellules PC12 que l'inhibition de leur expression par interférence ARN diminuait le nombre de GS accrochés à la membrane (Tsuboi et Fukuda 2006a).

L'accrochage de Rab3/Rab27 à la membrane cellulaire pourrait se faire *via* différentes possibilités : i) SNAP-25 peut se lier au domaine C2B de la Rabphiline (Tsuboi et Fukuda 2005), elle-même capable de se lier aux GS via Rab3A ou Rab27A dans les cellules PC12. Cette liaison au domaine C2B est nécessaire à l'accrochage des GS à la membrane (Tsuboi, Kanno *et al.* 2007) ; ii) la liaison de la syntaxine-1a à la Myosine-Va permet de réguler l'exocytose dans les cellules chromaffines (Watanabe, Nomura *et al.* 2005). Par ailleurs, la myosine-Va est capable de se lier aux GS via MyRIP et Rab27A (Desnos, Schonn *et al.* 2003); iii) enfin, le complexe syntaxine-1a/Munc-18-1 est capable d'interagir avec la granophiline (appelée aussi Slp-4), elle-même pouvant se lier à Rab3A ou Rab27A (Toonen, Kochubey *et al.* 2006 ; Tsuboi et Fukuda 2006b; Gulyas-Kovacs, de Wit *et al.* 2007).

Les Q-SNARE pourraient donc intervenir à la fois dans l'accostage et dans l'arrimage. L'accostage serait le résultat d'un pré-complexe faisant intervenir un Q-SNARE et d'autres acteurs reliés au GS. Par suite, l'arrimage correspondrait à un changement de ligand des Q-SNARE entre les membranes cellulaire et vésiculaire, pour former des complexes avec les R-SNARE et permettre le rapprochement des deux membranes.

Une dernière hypothèse serait que l'accostage implique le cytosquelette d'actine, effectuant un pontage entre les GS et la membrane plasmique (Gasman, Chasserot-Golaz *et al.* 2004). Dans cette hypothèse, l'arrimage correspondrait à une transition des GS depuis le cytosquelette d'actine jusqu'aux Q-SNARE.

Ces différentes hypothèses pourront être testées simplement dans les cellules BON en perturbant le système par l'expression de mutants *trans*-dominants négatifs ou par inhibition au moyen de la technique d'interférence ARN (ARNi). En particulier, pour tester le rôle du complexe exocyste, il s'agira d'empêcher sa formation, soit en exprimant un mutant *trans*-dominant négatif d'une des huit sous-unités du complexe (de même que (Tsuboi, Ravier *et al.* 2005)), soit en inhibant l'expression de cette sous-unité par ARNi. Par rapport à Tsuboi *et al.*, en plus des effets sur l'accostage ou la sécrétion, nous observerons d'éventuels effets sur la transition T→D. De même, le rôle de RalA pourra être étudié.

IV.7. Conclusion

L'exocytose régulée des GS se présente comme une succession d'étapes complexes. Parmi celles-ci, on s'accorde à définir l'amorçage comme l'étape au cours de laquelle le GS devient compétent pour la fusion. Mais quand on entre dans les détails, il apparaît vite qu'il est autant de descriptions que de méthodes existantes. Finalement, ce que cette étape regroupe reste flou et les mécanismes derrière l'amorçage sont encore mal connus.

Mon travail sur les cellules BON apporte à son tour sa description. Celle-ci a été obtenue par microscopie TIRF et grâce à des stimulations par photo-libération de Ca^{2+} cagé. Cette technique m'a demandé tout un travail d'implémentation et d'ajustement du montage ainsi qu'une nécessaire optimisation des conditions de chargement des cellules en Ca^{2+} cagé. Enfin, cette nouvelle description s'appuie aussi sur nos nombreuses analyses de trajectoires de GS avant fusion (> 300) obtenues à partir de la détection de plus d'un millier d'événements d'exocytose que j'ai laborieusement catalogués. Grâce à ce travail, l'existence d'une transition axiale de 20 nm avant fusion a été mise en évidence, que nous avons appelée « arrimage » et qui pourrait représenter une des étapes de l'amorçage.

Ces observations et analyses ont donné lieu à l'élaboration d'un modèle valable pour les différents types de cellules à sécrétion lente. Ce modèle reste cependant généralisable aux cellules à sécrétion rapide, comme les cellules chromaffines, pour peu qu'une certaine latitude soit introduite quant à la sensibilité à la concentration en $[\text{Ca}^{2+}]$ du frein (*clamp*) et à sa localisation.

Enfin, afin de mieux situer notre description par rapport à celles existantes, et par suite de justifier notre modèle, il convient à présent d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans les étapes d'accostage et d'arrimage.

Partie V

Conclusion générale et perspectives

V. Conclusion générale et perspectives

Mon travail s'inscrit dans la ligne des études utilisant les méthodes optiques pour étudier la sécrétion, développées au cours des dix dernières années. Ces travaux ont complètement modifiés notre vision de ce phénomène complexe en permettant l'accès à l'événement unique, la fusion d'un seul GS, dans un contexte cellulaire.

Au laboratoire, la voie choisie a été la microscopie TIRF. Le microscope que j'ai utilisé a été assemblé par notre équipe, en collaboration avec Sophie Cribier. De ce fait, nous avons bénéficié d'un certain nombre d'avantages sur les équipes concurrentes. La possibilité de choisir l'épaisseur d'évanescence, en faisant varier simplement et précisément l'angle d'incidence du faisceau d'excitation, nous a permis d'effectuer des investigations plus profondes de la couche corticale (avec $\delta=200$ nm). Et grâce à la comparaison d'expériences effectuées à des profondeurs d'évanescence différentes, nous avons également pu analyser les événements orphelins et prouver leur relation avec l'exocytose séquentielle. De plus, c'est la première fois à notre connaissance que la technique du Ca^{2+} cagé a été utilisée en combinaison avec le TIRFM. Cependant, une faiblesse de notre approche est l'absence de contrôle de la concentration en Ca^{2+} , nécessaire pour une interprétation précise des résultats. Ce défaut a été amélioré grâce à Erdem Karatekin.

Pour continuer les études, il serait nécessaire de faire évoluer le dispositif. En effet, notre caméra CCD actuelle réalise des acquisitions limitées en pratique à 10 Hz afin d'obtenir un rapport signal à bruit suffisant pour des observations sur une région couvrant une cellule entière. Des caméras plus rapides permettraient une meilleure détection des comportements transitoires des GS sur leurs trajectoires. De plus, le dispositif mécanique utilisé pour suivre les doubles marquages est limité à des cadences de l'ordre du Hertz. Là encore, des matériels plus performants existent qui permettraient des mesures plus rapides. Par ailleurs, la différence entre sécrétion apicale et basale a été observée très récemment par ampérométrie dans les cellules chromaffines (Amatore, Arbault *et al.* 2007) grâce au développement d'électrodes plates et transparentes sur lesquelles les cellules peuvent être cultivées. Cette technique ouvre la porte à un couplage entre l'ampérométrie et le TIRFM qui permettrait, sur le même événement d'exocytose observé à la membrane basale, d'avoir les deux types d'observation, avec leurs cinétiques propres. La membrane cellulaire basale pourrait être ainsi observée simultanément par ampérométrie et TIRFM.

Le modèle cellulaire retenu a été les cellules BON. Ce choix a été judicieux sur le plan technique, répondant à nos espérances : adhérence sur le verre, gros GS, transfection, malgré un certain nombre de difficultés non anticipées (difficulté de stimulation). Mais, il a aussi été judicieux sur le plan théorique car ces cellules se sont révélées différentes des chromaffines, forçant la réflexion. Les GS des cellules BON présentent en effet une plus grande mobilité que ceux des cellules chromaffines, ce qui a facilité l'étude des mouvements dirigés et diffusifs de manière quantitative. En outre, les cellules BON ne possédant pas de phase rapide dans la sécrétion, cela nous a poussés à développer un modèle cinétique différent, mais qui permettrait d'interpréter de manière unifiée les connaissances sur les sécrétions lentes et rapides dans différents types cellulaires.

Cependant, une difficulté de l'emploi d'un nouveau modèle est l'absence de connaissances moléculaires. Pour continuer ces travaux, il faudra entamer des études de caractérisation des acteurs déjà présents dans les chromaffines : SNARE, synaptotagmine, ... Cela permettra de comprendre les différences entre les deux types cellulaires.

Je crois que trois points principaux ont été établis dans ce travail, qui modifient la vision classique de l'exocytose. Le premier est l'abondance du phénomène d'exocytose séquentielle. Ce phénomène n'est pas nouveau, mais sa fréquence ne me semblait pas avoir été anticipée. Les questions que pose cette observation ont été discutées : fusion homotypique, points « chauds » de fusion sur la membrane cellulaire. Pour continuer cette étude, il faudra développer des études spatiales plus poussées des sites de fusion : accumulation des images (comme Almers sur les neurones (Zenisek, Steyer *et al.* 2000)) et comparaison de la position des sites de fusion avec la composition de la membrane.

Le second point provient de l'analyse des mouvements des GS. Le suivi des GS conduit à reconnaître que, dans la zone corticale analysée, les changements de comportement sont nombreux et ceci a permis de proposer un modèle décrivant la stratégie de recherche des sites d'exocytose par les GS. Les bases moléculaires de ces changements de comportement ont été analysées en détail par Sébastien Huet dans sa thèse (Huet 2006). Un certain nombre de points sont encore à analyser. En particulier, une différence a été notée entre les observations dans les cellules au repos et les cellules stimulées : dans les premières, l'accostage semble se faire en suivant un mouvement diffusif alors qu'après stimulation, la majorité des accostages procède par des mouvements dirigés. Il serait bon de comparer les mouvements décrits dans des cellules au repos à ceux observables à Ca^{2+} élevé. De la même manière, les transitions axiales ont été observées après stimulation. Existent-elles dans les cellules au repos ? Pour cela, il faudrait analyser les mouvements selon la direction z des GS présents à la membrane dans ces cellules. Une autre analyse intéressante serait le suivi des mouvements en x,y des vésicules attachées à la membrane en cellule stimulées : certaines données de la littérature (Becherer, Moser *et al.* 2003) suggèrent que les GS se déplacent vers les canaux ioniques, et, dans notre étude, nous avons noté des déplacements avant fusion, qu'il serait bon d'analyser à la lumière de cette observation.

Le troisième point fort de notre travail, le plus original, est la détection de la transition axiale de 20 nm avant fusion. L'hypothèse selon laquelle cette transition serait générale avant la fusion nous conduit à un modèle de fusion originale. Bien évidemment, tout cet ensemble prendrait beaucoup plus de force si les acteurs moléculaires impliqués étaient identifiés. La discussion de la troisième partie suggère des mécanismes possibles. Il faudrait maintenant appliquer les méthodes de la biologie cellulaire pour obtenir des arguments plus précis : peptides, mutants *trans*-dominants et inhibition par ARNi.

En conclusion, nos travaux montrent clairement combien féconde est l'interface physique biologie appliquée à une question difficile de biologie cellulaire.

Partie VI

Matériels et méthodes

VI. MATERIELS ET METHODES

VI.1. Biologie cellulaire

VI.1.1. Cellules

VI.1.1.1. Lignée BON originelle

La lignée carcinoïde humaine BON originelle (« *wild-type* », WT) nous a été gracieusement fournie par C.M. Townsend (University of Texas Medical Branch, Galveston, TX).

VI.1.1.2. Clone BON « N13 »

Le clone BON N13 a été généré dans notre laboratoire à partir de la lignée BON originelle par Bruno Gasnier pour une autre étude (Herzog, Bellenchi *et al.* 2001) en tant que contrôle négatif, en lui faisant exprimer de manière stable un plasmide vide pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Des clichés de ces cellules obtenus en microscopies électronique, de fluorescence et TIRF sont présentés dans les matériels supplémentaires de l'article (Karatekin, Tran *et al.* 2008).

VI.1.2. Culture cellulaire

Les cellules BON (WT ou N13) sont cultivées à une densité de $2 \cdot 10^5$ à $4 \cdot 10^5$ 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.

VI.1.3. Construction plasmidique

Afin d'étudier en microscopie TIRF l'exocytose des GS au sein des cellules BON, ces organites ont été marqués à l'aide d'une protéine chimérique fluorescente : la NPY-EGFP. Cette protéine correspond à la fusion entre le neuropeptide Y (NPY) humain et la *Enhanced Green Fluorescent Protein*. NPY est un peptide normalement présent à l'intérieur des GS des cellules chromaffines, et NPY-EGFP a été utilisé comme un marqueur des GS dans les cellules PC12 (Lang, Wacker *et al.* 1997 ; Holroyd, Lang *et al.* 2002 ; Taraska, Perrais *et al.* 2003) et les cellules chromaffines (Steyer et Almers 2001 ; Perrais, Kleppe *et al.* 2004). La construction plasmidique utilisée a été gracieusement fournie par W. Almers (*Oregon Health Sciences University, Portland, OR*) et possède les caractéristiques suivantes :

Nom de la construction plasmidique	Insert	Vecteur
NPY-EGFP	Pro-NPY humain	pEGFPC-N1 (Clontech)

La transfection des cellules BON avec ce plasmide induit l'expression de NPY-EGFP qui va marquer spécifiquement la lumière des GS en s'accumulant à l'intérieur de ces organites.

VI.1.4. Transfection par électroporation

La transfection des cellules s'effectue par électroporation. Les cellules sont d'abord 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 μ l 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 40.10⁶ cellules par mL.

Les cellules sont ensuite mélangées à l'ADN plasmidique à transférer (entre 2,5 et 10 μ g d'ADN pour 50 μ l de la suspension cellulaire) et déposées entre les électrodes d'un électroporateur PS10 (Jouan, *Thermo Electron Corporation, Woburn, MA*). 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 (P50G-1.5-14-F, *MatTek Cultureware, Ashland, MA*), à une densité d'environ 5.10⁴ cellules/cm².

VI.1.5. Conditions d'observation en microscopie TIRF

Les cellules sont observées entre 48h et 72h après l'électroporation. Ce délai permet une expression transitoire suffisante de NPY-EGFP à l'intérieur des granules de sécrétion ainsi qu'une bonne adhérence des cellules sur les lamelles. 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) (sauf dans le cas des expériences de perméabilisation à la digitonine dans lesquelles le milieu est à base de glutamate de potassium, voir VI.3.3). Les cellules sont alors observées pendant environ une heure à une température ambiante de 31-33°C.

VI.2. Observations en microscopie TIRF

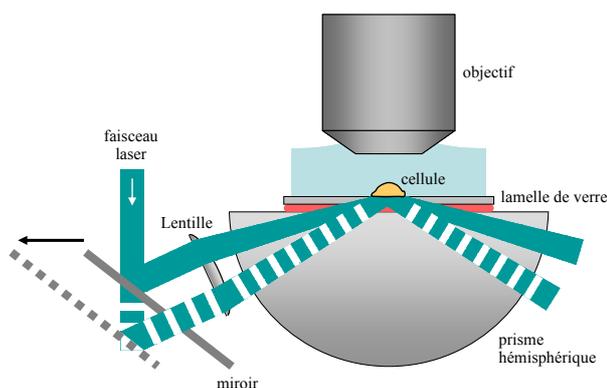
VI.2.1. Le montage de microscopie TIRF

Notre montage de TIRFM, décrit dans l'article du *Biophysical Journal* 2006 (Huet, Karatekin *et al.* 2006), appartient à la catégorie des montages à prisme. L'une des spécificités intéressantes de ce montage est la possibilité de faire varier la profondeur de pénétration de l'onde évanescente, permettant ainsi d'observer des phénomènes localisés à plus ou moins grande distance de la membrane cellulaire. (Figure 36). Le montage autorise également des observations en épifluorescence et en lumière blanche, simultanément avec les observations en évanescente. Pour les observations en lumière blanche, le prisme hémisphérique joue alors le rôle de condenseur.

VI.2.2. Calibration de l'épaisseur d'évanescence

En cours d'observation, le réglage de l'épaisseur d'évanescence se fait simplement en plaçant le miroir du montage (Figure 36) à des positions déterminées à l'avance lors d'une calibration. A chaque position du miroir correspond un angle d'incidence (voir VI.2.2.2). Cet angle permet alors de calculer l'épaisseur d'évanescence δ de manière théorique grâce à l'équation (1) (voir I.4.1). Cependant, l'indice de réfraction du milieu cellulaire, nécessaire à cette évaluation, n'est pas défini avec précision. Cet indice doit donc d'abord être déterminé, ce qui se fait grâce à une mesure expérimentale de l'épaisseur d'évanescence.

Figure 36 : 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.



VI.2.2.1. Mesure de l'épaisseur d'évanescence

Le principe de cette mesure est donné dans les matériels et méthodes de l'article du *Biophysical Journal* 2006 (Huet, Karatekin *et al.* 2006) (voir également Figure 37 ci-dessous). Un exemple de mesure est donné dans la figure 1 des matériels supplémentaires du même article. Cette méthode associée à la détermination de l'angle d'incidence du faisceau laser au niveau de l'interface verre/cellule (voir VI.2.2.2 ci-dessous), a permis de déduire la valeur de l'indice de réfraction moyen des cellules à partir de l'équation (1). Cet indice, mesuré pour les cellules COS-7, est égal à $1,37 \pm 0,01$ (l'incertitude correspond à la déviation standard) et nous avons considéré que cette valeur d'indice était également valable dans le cas des cellules BON.

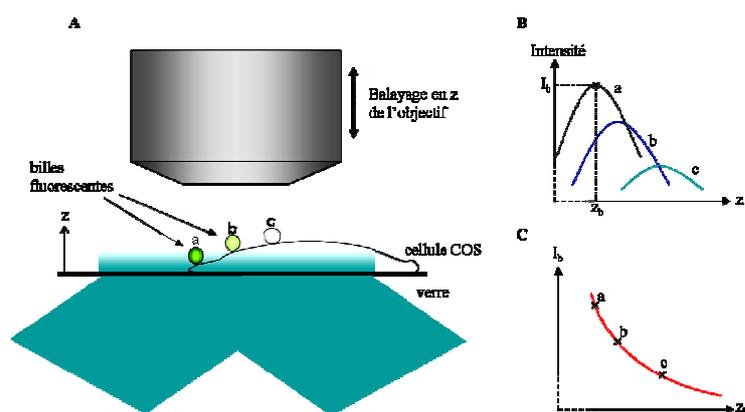


Figure 37 : Principe de la méthode de mesure de l'épaisseur d'évanescence. (A) Des billes fluorescentes sont déposées à la surface de cellules COS-7 et éclairées par l'onde évanescente dont on cherche à évaluer la profondeur de pénétration. Une série d'images de ces billes dans différents plans de focalisation est réalisée grâce au déplacement de l'objectif suivant l'axe z . (B) A partir de cette séquence d'images, 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.

VI.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 i , 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 38, 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 38), il est donc possible d'accéder à la valeur de l'angle d'incidence.

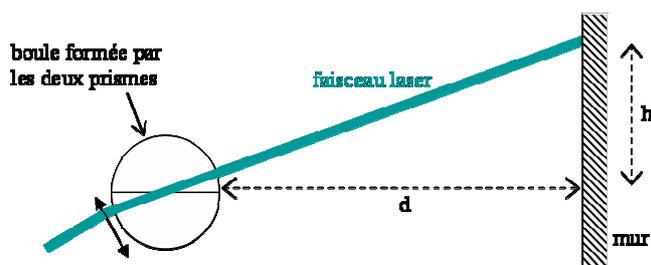


Figure 38 : Méthode de mesure de l'angle d'incidence du faisceau laser au niveau de l'interface verre/cellule. L'association des deux prismes hémisphériques permet de former une « boule » complète. Au lieu d'être réfléchi au niveau de l'interface plane du premier prisme, le faisceau laser traverse donc cette boule et vient frapper l'un des murs de la pièce où se trouve le microscope. L'angle d'incidence i peut alors être déduit de la mesure de d et h .

Toutefois, les prismes hémisphériques utilisés n'étant pas des demi-boules entières¹, le faisceau laser subit une légère déviation au moment de la traversée de la seconde interface verre/air (Figure 39). 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 39) :

$$\theta = \left(\frac{\pi}{2} - i\right) - (n-1) \frac{2a-e}{R} \sin(i) \quad (2)$$

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 $0,5^\circ$.

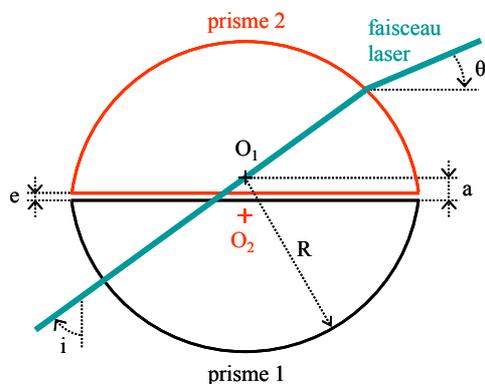


Figure 39 : Déviation du faisceau laser lors de la traversée des deux prismes. Les points O_1 et O_2 correspondent aux centres des deux prismes. $R = 22,1$ mm, $a = 0,2$ mm, e (épaisseur d'huile optique entre les deux prismes) est négligeable. Les prismes sont en verre BK7 d'indice optique $n = 1,52$.

¹ 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.

VI.2.3. Observations en simple marquage

Pour l'étude des dernières étapes de l'exocytose en TIRFM, la profondeur d'évanescence choisie est de 100 nm ou 150 nm suivant les expériences. Ces valeurs sont un compromis qui permet à la fois d'obtenir un rapport signal à bruit suffisant et de limiter la diffusion de l'onde évanescente. En effet, si cette dernière condition n'est pas remplie, la profondeur d'évanescence réelle est beaucoup plus importante que la profondeur théorique (Rohrbach 2000), ce qui fausse les calculs de déplacement selon la direction axiale (axe z).

Sur chaque lamelle sont sélectionnées les cellules qui sont les mieux adhérentes, avec des granules de sécrétion suffisamment nombreux et bien visibles en TIRFM, et également suffisamment mobiles, signe de « bonne santé » de la cellule.

La cadence d'acquisition varie de 2 à 40 Hz suivant les expériences. La plupart des acquisitions en TIRFM ont été effectuées en mode continu (*stream acquisition*) à une cadence de 10 Hz. Le mode continu permet d'identifier avec le moins d'ambiguïté possible les événements d'exocytose en ne ratant aucun élément de leur « signature » (voir II.2.1.1) tandis que la cadence de 10 Hz offre un compromis satisfaisant entre une résolution temporelle convenable et un rapport signal à bruit suffisant. Pour minimiser le photoblanchiment des fluorophores, la puissance du laser est atténuée à ~ 1 mW et ‘

Une acquisition en TIRFM d'une durée d'au moins 10 s est tout d'abord effectuée sur une cellule au repos, sans aucune perfusion ou alors en perfusant (voir VI.3.1) une solution identique au milieu dans lequel baignent les cellules. Cela permet de vérifier qu'il n'y a pas d'événement d'exocytose avant stimulation. On effectue ensuite une deuxième acquisition sur la cellule stimulée (voir VI.3). Dans le cas d'une perfusion (VI.3.1), la solution de stimulation correspond à celle du bain, additionnée du sécrétagogue voulu. L'enregistrement démarre avec le début de la perfusion, qui dure en général 20 s, puis se poursuit après l'arrêt de la perfusion jusqu'à une durée totale de 1 à 2 min. Ainsi sont observées et stimulées environ une dizaine de cellules par lamelle, pour une durée totale d'environ une heure par lamelle.

VI.2.4. Observations en double marquage

VI.2.4.1. Adaptation du montage

Le montage de TIRF utilisé a été adapté afin de réaliser des observations en double marquage sur cellules vivantes à l'aide de fluorophores émettant dans le vert (EGFP) et dans le rouge (voir VI.2.4.2 ci-dessous). 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 40, 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. Avec un tel système, l'acquisition est réalisée alternativement 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.

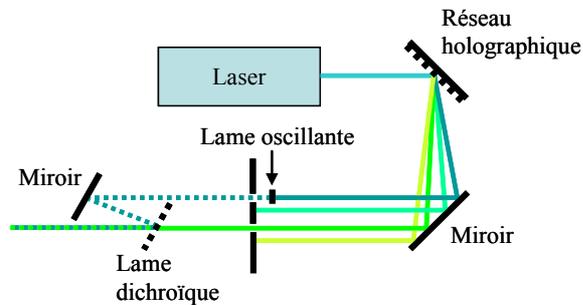


Figure 40 : Montage de sélection de la raie laser. Les différentes raies émises par la laser sont séparées spatialement à l'aide d'un réseau holographique. Les faisceaux à 488 et 512 nm passent ensuite à travers deux trous de sélection puis sont recombinaés spatialement. Une lame oscillante permet de sélectionner l'une des deux raies.

VI.2.4.2. Observation de la persistance de forme des GS après exocytose

Pour les expériences en double marquage montrant la persistance de forme des GS après exocytose, nous avons utilisé un marqueur rouge et non perméant placé dans le milieu extracellulaire, en l'occurrence un dextrane couplé à la rhodamine : le dextrane-tétraméthylrhodamine (*TMR-dextran*). Les matériels et méthodes de ces expériences sont décrits dans l'article de l'*European Biophysical Journal* 2007 (Tran, Huet *et al.* 2007).

VI.3. Stimulation de cellules individuelles

Les cellules individuelles ont été stimulées de différentes façons. Parmi elles, la perfusion permet de stimuler la cellule avec différents types de sécrétagogues, physiologiques ou non (K^+ , ACh, Ba^{2+} , ...), et également de perméabiliser la cellule en présence de Ca^{2+} , afin de provoquer l'exocytose.

VI.3.1. Dispositif de perfusion

VI.3.1.1. Matériel

Pour stimuler l'exocytose en perfusant des solutions dans le voisinage immédiat des cellules, j'ai utilisé un capillaire de quartz (*ALA Scientific Instruments QMM-4 Quartz Micromanifold*, diamètre interne 100 μm) relié à un système d'injection pneumatique (*ALA Scientific Instruments BPS-4PP*). Jusqu'à quatre types de solutions différentes peuvent ainsi être perfusées sur la cellule, simultanément ou à tour de rôle. Le capillaire ou « pointe » de stimulation est monté sur un micromanipulateur (*You Ltd*) permettant des mouvements dans les trois directions de l'espace ainsi que dans l'axe du capillaire de stimulation. Ce micromanipulateur permet également un enlèvement et un remplacement rapide de la pointe au même endroit lors du changement de lamelle.

VI.3.1.2. Positionnement de la pointe et calibration du débit

La stimulation doit être efficace et strictement contrôlée sur le plan spatial et temporel. J'ai effectué des réglages en utilisant une solution colorée au *Fast Green* et un objectif de faible puissance (10x) pour visualiser en lumière blanche la zone perfusée. En stage de master, des expériences préliminaires m'avaient permis de déterminer le placement de la pointe et la pression nécessaire à une injection efficace de sécrétagogue. Cette pression, qui s'élève à 2 kPa ($\sim 0,1 \mu L/s$), est réglée à l'aide du régulateur de pression PR-10 (*ALA Scientific*).

La pointe de perfusion doit être placée en bord de champ du microscope (objectif 60x) (Figure 41), sans quoi elle masque une grande partie du champ d'observation et provoque une

fluorescence parasite venant de la pointe elle-même, ce qui gêne la recherche des cellules transfectées sur la lamelle. Par ailleurs, on peut avoir un phénomène de réflexion totale « frustrée », lorsque la pointe touche l'interface au niveau du point d'impact du laser (« tache d'évanescence ») à l'interface verre-eau et joue alors le rôle de guide de lumière.

Cet éloignement de la pointe par rapport à la cellule qu'on veut stimuler pose problème car la solution de stimulation est en partie diluée et un champ plus important est ainsi perfusé. Mais l'inconvénient majeur est d'abord que la pointe n'est pas toujours bien orientée et ne perfuse pas toujours bien la cellule. Un contrôle visuel est donc nécessaire pour être sûr que le flux de la solution de stimulation est bien dirigé sur la cellule. Pour vérifier cela, on effectue quelques giclées de solution de bain avant d'utiliser la solution de stimulation : pour peu que les cellules ne soient pas complètement aplaties sur le verre, on peut voir leur membrane bouger sous l'effet du flux. On peut aussi regarder si d'éventuels débris cellulaires (mortalité due à la transfection) situés à proximité sont chassés par le flux.

Effectuer ces giclées permet aussi de vérifier si la pointe de stimulation n'est pas bouchée par une bulle de gaz. En effet, du fait que les solutions de stimulation sont conservées au frais et que les expériences sont effectuées à 31-33°C, des bulles apparaissent progressivement dans le capillaire et peuvent le boucher. Ce problème peut être minimisé par un chauffage et un dégazage préalable des solutions. Enfin, si la cellule est mal adhérente, ces giclées permettent de la décoller de suite, en évitant ainsi une perte de temps et des acquisitions inutiles si la cellule venait à se décoller en cours de stimulation.

VI.3.1.3. Aspiration

Parmi les difficultés rencontrées, le démarrage de la perfusion introduit un flou dans l'image à certains moments (plus fréquemment avec la digitonine) mais pas systématiquement. Ce problème n'est pas visible avec des capillaires plus fins et pourrait être dû à des écoulements turbulents (au sens hydrodynamique) qui seraient provoqués par des amas de cellules situés sur le trajet du flux, en amont ou en aval de la cellule cible. J'ai donc mis en place une aspiration pour que le flux de stimulation soit le plus laminaire possible. Le capillaire d'aspiration est un cône de pipette *Eppendorf*, également monté sur un micromanipulateur, relié à une pompe péristaltique. Le micromanipulateur permet de placer le capillaire d'aspiration à une position diamétralement opposée à la pointe de stimulation par rapport à la cellule cible. (Figure 41). Le positionnement de l'aspiration a été optimisé à nouveau à l'aide du colorant *Fast Green*. En définitive, cette aspiration a effectivement permis de réduire considérablement le nombre de flous dus à la stimulation.

Un des autres avantages de cette aspiration est de limiter au mieux l'étendue de la stimulation aux cellules situées dans le champ d'observation de l'objectif 60x. Ainsi peut-on stimuler indépendamment plusieurs cellules individuelles par lamelle. Cette aspiration autorise également des stimulations répétées entrecoupées de périodes de repos, puisqu'elle évacue complètement la solution de stimulation au voisinage de la cellule entre chaque stimulation. Le seul inconvénient est que le capillaire d'aspiration a un encombrement qui lui permet de passer tout juste sous l'objectif 60x.

VI.3.1.4. Commutateur

Une dernière difficulté est liée à la déformation des cellules sous l'effet du flux. Si on observe les cellules au repos sans perfusion et que l'on perfuse seulement lors de la stimulation, la séquence acquise sous stimulation n'est plus tout à fait comparable à la séquence au repos car la position des GS peut être modifiée par la déformation. Une solution est de faire une

acquisition au repos aussi sous perfusion, en perfusant la solution de bain, puis d'échanger en cours d'acquisition la solution de bain par celle de stimulation. Le changement entre les solutions est réalisé manuellement au moyen des interrupteurs du contrôleur BPS-4C (*ALA Scientific*). Cela impose de fermer le premier interrupteur en même temps qu'on ouvre le deuxième. Même avec la meilleure dextérité, un léger flou est introduit au moment du changement. On ne peut donc suivre un même GS sans interruption, en passant de la condition au repos à la condition stimulée.

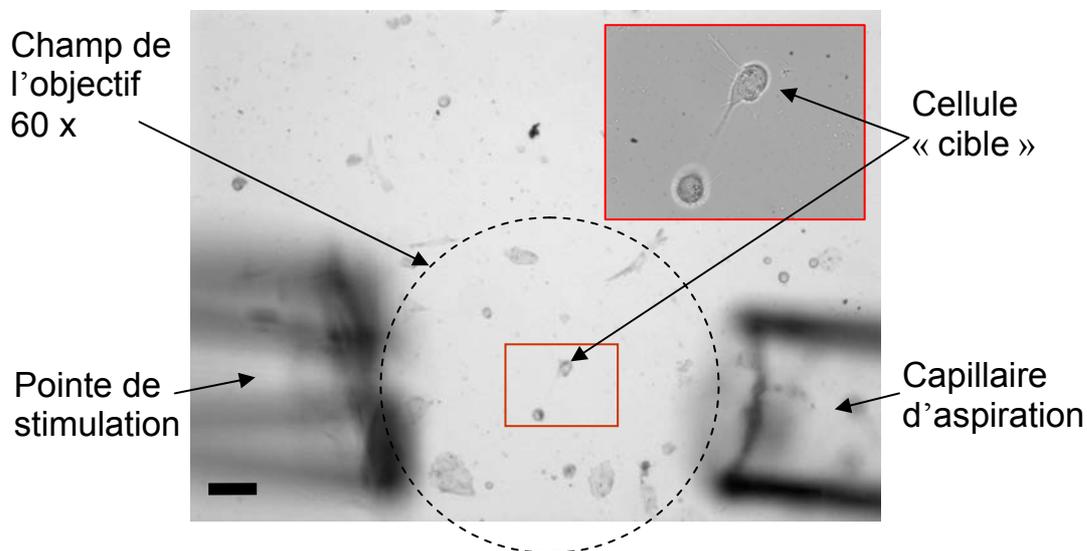


Figure 41 : Observation d'une cellule et du dispositif de perfusion avec l'objectif 10x (barre 100 μm). Le cercle en pointillé représente le champ de l'objectif 60x. En encart, la cellule cible observée avec l'objectif 60x.

Pour pallier cela, nous avons mis au point (avec l'aide de M. Bernard Clairjeau, électronicien de l'IBPC) une commande de commutation qui permet de passer quasi-instantanément de la perfusion de la solution de bain à la solution stimulée puis, après une durée de stimulation déterminée, de revenir à la solution de bain, tout cela en ne perturbant quasiment pas le flux. Le boîtier de contrôle mis au point se branche sur deux des entrées BNC du contrôleur BPS-4C. Ces entrées, compatibles TTL, permettent de contrôler l'ouverture ou la fermeture des deux valves correspondantes. Le boîtier de contrôle, en envoyant des signaux TTL opposés aux deux valves, permet donc l'ouverture de l'une (solution de stimulation) simultanément à la fermeture de l'autre (solution de bain), par simple pression d'un bouton. Une minuterie intégrée permet de repasser à l'état initial au bout d'un temps réglable.

VI.3.2. Solutions de stimulations

VI.3.2.1. Ba²⁺

Locke Ba²⁺ (Glucose 5,6 mM, Cl⁻ 157,8 mM, Na⁺ 157,8 mM, K⁺ 5,5 mM, Hepes 15 mM (pH 7,4), Ba²⁺ 3,7 mM)

VI.3.2.2. Ach

Locke supplémenté en Ca²⁺, Mg²⁺ et ACh (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, ACh 100 μM)

VI.3.3. Perméabilisation à la digitonine en présence de Ca^{2+}

La digitonine est un détergent non-ionique stéroïdien (stéroïde glycoside), extrait des graines de *Digitalis purpurea*. Elle interagit spécifiquement avec le cholestérol et autres beta-hydroxystéroïdes non-conjugués dans les membranes, augmentant ainsi la perméabilité des membranes cellulaires aux ions inorganiques, métabolites, et enzymes sans changement global des structures cellulaires. Comme le rapport molaire cholestérol/phospholipides de la membrane plasmique est beaucoup plus important que celui des membranes des organelles, de faibles concentrations de digitonine (10-100 $\mu\text{g/mL}$) augmentent sélectivement la perméabilité de la membrane plasmique (Takahashi, Camacho *et al.* 1999).

La perméabilisation de cellules à la digitonine en présence de Ca^{2+} est décrite dans les matériels et méthodes de l'article du *Biophysical Journal* 2008 (Karatekin, Tran *et al.* 2008). Cette perméabilisation est également effectuée par perfusion. Cependant cette méthode présente quelques particularités par rapport aux stimulations précédentes qui doivent être soulignées.

VI.3.3.1. Solutions de bain et de stimulation

Le milieu dans lequel s'effectue la perméabilisation à la digitonine n'est pas du Locke, mais un milieu riche en glutamate et en ion potassium K^+ , plus proche de la composition du cytosol. Habituellement, la perméabilisation s'effectue dans un bain ne contenant pas de Ca^{2+} , celui-ci étant apporté par la solution de stimulation. Mais pour éviter des effets de dilution pouvant diminuer la réponse sécrétrice et pour obtenir une montée de Ca^{2+} cytosolique la plus rapide possible, nous avons incorporé directement dans le bain du Ca^{2+} libre (30 μM), ainsi que de l'ATP et du GTP. Or, dans les cellules chromaffines, un tel milieu est susceptible de dépolariser la membrane plasmique et d'entraîner un influx de calcium extracellulaire déclenchant l'exocytose (Graham, Fisher *et al.* 2000). Nous avons donc vérifié auparavant qu'en l'absence de digitonine, ni le Ca^{2+} , ni le glutamate et surtout, ni le K^+ ne déclenchaient la sécrétion dans les cellules BON. La stimulation par perméabilisation est enfin effectuée en perfusant localement la cellule avec la même solution que le bain, additionnée de 20 μM de digitonine.

VI.3.3.2. Optimisation des conditions de perfusion

Avec le capillaire *Micromanifold* à une pression de 2 kPa, la durée de la stimulation est de 20 s, qui est la durée moyenne pour perméabiliser la membrane dans nos conditions expérimentales. Pour déterminer cette durée et la pressions, j'ai d'abord employé le colorant *Fast Green* en le perfusant sur la cellule comme précédemment. Son entrée dans le cytosol de la cellule permet de déterminer une perméabilisation. Cependant, la couleur est très peu visible au début et la durée minimale nécessaire est donc difficile à appréhender. J'ai donc effectué un marquage des cellules avec de la *GFP* cytosolique. Le début de la perméabilisation est cette fois détectée par une fuite de la *GFP* à l'extérieur de la cellule et la diminution de fluorescence au niveau de la cellule est mesurable.

VI.3.3.3. Vitesse de montée du Ca^{2+}

Cependant, cette méthode n'indique pas à quelle vitesse la concentration intracellulaire en calcium $[\text{Ca}^{2+}]_i$ augmente quand la cellule est perméabilisée par la digitonine. Cette vitesse de montée du Ca^{2+} a été mise en évidence par imagerie calcique au moyen du marqueur calcique fluorescent Fluo-4 (voir VI.3.4). On retrouve que la cellule commence à être perméabilisée au

bout de 20 s en moyenne. Le calcium pénètre alors dans la cellule et la fluorescence du Fluo-4 cytosolique augmente brutalement en 1 à 2 secondes.

VI.3.3.4. Capillaires de verre étirés

Pour réduire la durée nécessaire à la perméabilisation (et de fait la durée d'acquisition et le photoblanchiment des fluorophores), j'ai également essayé d'utiliser des capillaires de verre étiré. Leur diamètre beaucoup plus faible (diamètre interne 10 μm) permet de perfuser la digitonine véritablement au contact de la cellule, ce qui augmente l'efficacité de la perméabilisation étant donné que la solution ne subit plus de dilution. Cela élimine aussi les risques de mauvaise orientation du flux possibles avec le *Micromanifold*. Enfin, le faible volume de ces capillaires empêchait la formation de bulles pouvant boucher l'orifice en cours d'expériences.

Malheureusement, je me suis alors heurté à d'autres problèmes qui empêchaient de contrôler la stimulation avec précision dans le temps. L'étireuse du laboratoire, assez vétuste, ne fabriquait pas des capillaires de verre étirés de façon bien reproductible. Le diamètre d'ouverture de chaque capillaire était variable et il fallait adapter la pression et le temps de perméabilisation à chaque nouveau capillaire, sous peine de vider le contenu des capillaires d'un coup. Par ailleurs, ces capillaires n'ont pu être utilisés avec l'injecteur *Eppendorf Transjector* normalement adapté pour cela, avec un système de compensation en pression pour éviter les fuites. La connexion au dispositif d'injection *ALA BPS-4* a posé des problèmes de surpression et de fuites. Une injection manuelle au moyen d'une seringue a minimisé ces fuites, mais la durée de perfusion était alors mal contrôlée. Tous ces problèmes m'ont finalement poussé à abandonner cette solution.

VI.3.3.5. Autres perméabilisations possibles

L'inconvénient de la perméabilisation à la digitonine est que les pores formés par la digitonine sont de taille non négligeable et ne sont donc pas spécifiques du Ca^{2+} : ils laissent sortir, en même temps que le Ca^{2+} entre, des protéines cytosoliques dont certaines sont nécessaires à l'exocytose, provoquant au bout de plusieurs dizaines de minutes une incapacité à sécréter. Ce phénomène appelé *rundown* a été décrit par Sarafian *et al.* (Sarafian, Aunis *et al.* 1987). Cette perte peut être plus ou moins importante suivant la façon dont la cellule a été perméabilisée. L'effet du *rundown* a été étudié dans les cellules BON. Pour cela, j'ai séparé la perméabilisation à la digitonine de la stimulation par le Ca^{2+} . Les résultats indiquent que des événements d'exocytose se produisent toujours 40 à 60 s après la perméabilisation et que le *rundown* peut alors encore être négligé.

En vue de faire des pores plus petits, j'ai utilisé l'alpha-toxine, une autre molécule permettant de perméabiliser la membrane plasmique, mais aucun événement d'exocytose n'a pu être observé en TIRFM. L'imagerie calcique a montré que, dans les conditions utilisées alors, l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire était trop lente sur la membrane basale pour induire l'exocytose, peut être du fait d'une régulation du Ca^{2+} par la cellule.

J'ai aussi essayé d'utiliser l'ionomycine, un ionophore spécifique du calcium. Malgré de bons résultats en sécrétion de population, les premiers résultats en cellule unique n'ont pas été concluants et j'ai préféré y renoncer temporairement pour cette étude. Pour autant, ses avantages indéniables sur la digitonine ont conduit Isabelle Fanget à poursuivre les tentatives. Ainsi a-t-elle réussi à déclencher la sécrétion en cellule unique avec des concentrations en ionomycine de 5 ou 10 μM en présence de 2,5 mM Ca^{2+} .

VI.3.4. Imagerie calcique par le Fluo-4

L'imagerie calcique à l'aide du marqueur fluorescent Fluo-4, de couleur verte, a été utilisée pour évaluer les variations relatives de $[Ca^{2+}]_i$ lors des expériences de perméabilisation à la digitonine (voir VI.3.3) ou des expériences de photolibération de Ca^{2+} cagé (voir VI.3.5). Ces expériences n'ont pu être effectuées en même temps que l'observation des GS marqués au NPY-EGFP. Elles ont donc été réalisées dans des cellules sans GS marqués mais en conservant les mêmes conditions d'observation et de stimulation.

L'utilisation du Fluo-4 est décrite dans les matériels et méthodes supplémentaires de l'article du *Biophysical Journal* 2008 (Karatekin, Tran *et al.* 2008). En bref, il est introduit dans les cellules sous une forme perméante Fluo-4-AM (acétoxyméthyl ester) capable de traverser la membrane cellulaire. Il est ensuite clivé dans le cytosol par les estérases cellulaires et devient alors capable de lier le Ca^{2+} (constante d'affinité ~ 345 nM). A la concentration basale en Ca^{2+} dans le cytoplasme, le Fluo-4 n'est pas ou très peu fluorescent, alors qu'en présence de calcium élevé (~ 1 μ M), il devient fortement fluorescent. La fluorescence du Fluo-4 augmente linéairement avec la concentration en Ca^{2+} dans la gamme considérée. On peut considérer que l'augmentation de l'intensité de fluorescence du Fluo-4 correspond à une augmentation équivalente en Ca^{2+} si on néglige le photoblanchiment et si la sonde n'est pas saturée.

VI.3.5. Photolibération de calcium

Le dispositif permettant d'induire la photolibération de Ca^{2+} cagé est décrit dans les matériels et méthodes de l'article du *Biophysical Journal* 2008 (Karatekin, Tran *et al.* 2008). Remarquons que comme la lampe UV au xénon était couplée au système d'illumination par épifluorescence présent sur le microscope, remplaçant la lampe au mercure, une observation des GS par épifluorescence n'était plus possible. Les cellules transfectées avec NPY-EGFP sont donc d'abord repérées en prenant une profondeur d'évanescence très importante, avant de se régler à nouveau sur 100 ou 150 nm.

VI.3.5.1. Avantages et inconvénients du NP-EGTA-AM.

Plusieurs méthodes sont possibles pour introduire le Ca^{2+} cagé dans les cellules : dans les expériences d'électrophysiologie effectuées par le groupe de Neher, du NP-EGTA- Ca^{2+} est amené directement dans le cytosol par la pipette de *patch-clamp* (voir I.3.1.1.a Figure 9A). Le volume de la pipette étant très grand comparé à celui de la cellule, la concentration en NP-EGTA- Ca^{2+} pré-flash UV dans la cellule est environ égale à celle dans la pipette. Il est aussi possible d'introduire le NP-EGTA- Ca^{2+} par microinjection. La concentration en NP-EGTA- Ca^{2+} pré-flash UV peut alors être calculée d'après le volume injecté et le volume cellulaire estimé. Le patch-clamp n'est pas utilisé au laboratoire et la micro-injection a posé plusieurs problèmes techniques : il fallait micro-injecter les cellules transfectées, sans les décoller. La micro-injection (au moyen d'un *Eppendorf Transjector*) était effectuée sur un autre poste que celui de TIRF imposant donc de repérer les cellules par un colorant. Enfin, la quantité de NP-EGTA introduite est limitée par le volume de solution pouvant être micro-injecté sans nuire à la cellule. Je me suis donc tourné vers une autre méthode qui présente l'avantage d'une grande simplicité et permet d'introduire le Ca^{2+} cagé dans toutes les cellules d'une lamelle en une seule fois.

Dans les expériences que j'ai effectuées, les cellules ont été incubées dans un milieu contenant une forme perméante du NP-EGTA (NP-EGTA acétoxyméthyl ester ou NP-EGTA-AM) à une concentration de 30 μ M. Cette forme peut traverser la membrane cellulaire pour être ensuite clivée dans le cytoplasme par des estérases cellulaires. C'est seulement là qu'elle

devient capable de piéger le Ca^{2+} cytoplasmique. Comme la cellule va faire en sorte de maintenir sa concentration en Ca^{2+} cytoplasmique constante, les molécules de NP-EGTA vont progressivement toutes se lier à du Ca^{2+} et la concentration en complexes NP-EGTA- Ca^{2+} va augmenter. Le temps nécessaire pour former ces complexes de Ca^{2+} cagé dépend alors de la concentration en Ca^{2+} cytosolique et de la capacité de la cellule à réguler cette concentration. Après une heure d'incubation, on obtient alors une réserve de Ca^{2+} pouvant théoriquement atteindre plusieurs dizaines de μM et susceptible d'être libérée dans le cytoplasme pour déclencher l'exocytose. En réalité, étant donné les nombreuses étapes, la charge en NP-EGTA peut être bien inférieure à $30 \mu\text{M}$ et la concentration en Ca^{2+} libéré n'est pas contrôlable et reste inconnue. C'est pourquoi nous avons entrepris des mesures de cette concentration par imagerie calcique.

VI.3.5.2. Imagerie calcique

J'ai d'abord effectué des mesures des variations relatives de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lors des flashes UV à l'aide de la sonde Fluo-4 (voir II.1.3.3, VI.3.4 et la Figure S2 des Matériels et méthodes supplémentaires de l'article du *Biophysical Journal* 2008 (Karatekin, Tran *et al.* 2008)).

L'imagerie calcique a montré qu'il n'est pas possible de libérer le calcium au moyen d'un unique pulse de lumière UV. C'est pourquoi j'ai finalement induit la photo-libération de Ca^{2+} dans le cytoplasme par une série de 6 ou 8 pulses de lumière UV, espacés de 6 ou 10 s.

L'avantage du Ca^{2+} cagé est le contrôle temporel de la stimulation, sans commune mesure avec une stimulation par perfusion. En revanche, le niveau de la concentration en Ca^{2+} est ici moins bien contrôlé qu'avec la perméabilisation à la digitonine en présence de Ca^{2+} , où la concentration est fixée par la concentration extracellulaire.

Des mesures de la concentration absolue en Ca^{2+} ont par la suite été effectuées par Erdem Karatekin à l'aide de la sonde ratiométrique Fura-2 (voir Matériels et méthodes supplémentaires de l'article du *Biophysical Journal* 2008 (Karatekin, Tran *et al.* 2008) et figure S3).

VI.4. Détection des événements d'exocytose

VI.4.1. Difficultés de l'analyse des images

La détection des événements d'exocytose est une procédure qui n'a pas pu être automatisée. En effet, la diversité de types d'événements (voir II.2.1) et les différences d'intensité de fluorescence des vésicules rend difficile l'établissement d'un critère objectif. Un critère basé sur l'intensité, comme une diminution soudaine de l'intensité d'un pixel, introduirait beaucoup de faux positifs. La définition d'un seuil ne permettrait pas de distinguer le recul d'un GS d'un mouvement latéral par exemple. Cette détection des événements d'exocytose a donc été effectuée manuellement.

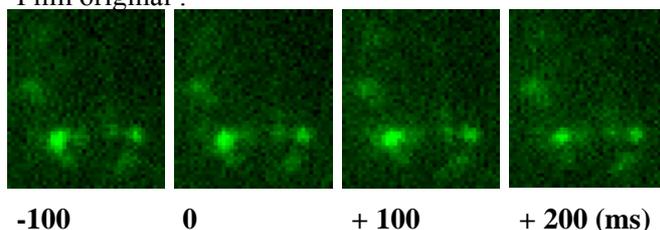
Cependant, lorsque les événements sont concomitants ou de faible rapport signal à bruit (dans des zones denses en GS par exemple), leur détection est délicate. En stimulant par perfusion de sécrétagogue ou d'agent perméabilisant, le nombre d'événements d'exocytose n'est pas encore trop élevé et il est encore possible de les détecter dans leur intégralité en regardant simplement à l'œil le film image par image et en les identifiant par leur signature, moyennant un peu de concentration. En revanche, la stimulation par photolibération de calcium cagé

complicque nettement les choses. En premier lieu, certains événements de fusion peuvent débiter au moment même du flash UV et n'être détectés qu'avec un plan de retard lors du halo. Ensuite, cette technique de stimulation multiplie la probabilité d'avoir des événements de fusion simultanés et donc le risque d'en rater lors de la détection. Par ailleurs, les cellules BON présentent beaucoup de GS observables, parfois très regroupés et parfois très mobiles. Il devient alors assez difficile de détecter un GS qui fusionne au milieu d'un amas de GS ou à côté d'un GS plus « brillant », sans se laisser non plus attirer par les GS les plus mobiles ou par d'autres événements de fusion déjà détectés se produisant à peu près au même moment.

Pour minimiser les oublis, je me suis donc aidé de la visualisation du film différence en parallèle avec le film original (voir Matériels et méthodes de l'article de l'*European Biophysical Journal* 2007 (Tran, Huet *et al.* 2007)). Ce film différence permet d'éliminer tous les GS restés immobiles et de mettre en évidence les diminutions d'intensité : on sélectionne ainsi uniquement les disparitions de GS (reculs ou exocytose) ou les mouvements rapides de GS parallèlement à la membrane. A une cadence de 10 Hz et pour des événements d'exocytose dont le déroulement est visible sur un à trois plans (voir II.2.1.1), le film différence permettant une détection optimale de ces événements est celui obtenu en soustrayant deux plans consécutifs $\{f_j - f_{j+1}\}$.

Trois cas de figure se présentent alors : (i) dans le cas des mouvements rapides, on voit un déplacement d'un spot brillant sur fond noir ; (ii) dans le cas des disparitions (sortie hors du champ d'évanescence ou exocytose), on voit l'apparition soudaine d'un spot lumineux sur fond noir qui disparaît après un ou deux plans ; enfin, (iii) dans le cas d'un événement d'exocytose, la disparition s'accompagne d'un « halo » autour du spot, ce qui permet de pointer rapidement les positions de possibles événements d'exocytose (Figure 42). La soustraction des images est effectuée soit avec le logiciel Metamorph (*Universal Imaging, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA*), soit avec le logiciel libre ImageJ (Wayne Rasband) dans la version WCIF contenant le plugin « *Delta F down* » (Tony Collins, *Wright Cell Imaging Facility, University Health Network Research, Toronto, ON, Canada*. www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/). Un réglage du contraste et un seuillage en intensité sont ajustés en permanence sur le film différence afin de mettre en évidence les pixels les plus lumineux. Le film différence reste cependant assez bruité et il est donc nécessaire de contrôler en parallèle (à l'aide du plugin ImageJ « *Sync Windows* ») sur le film original qu'on retrouve bien la signature d'un événement d'exocytose à l'endroit pointé.

Film original :



Film différence :

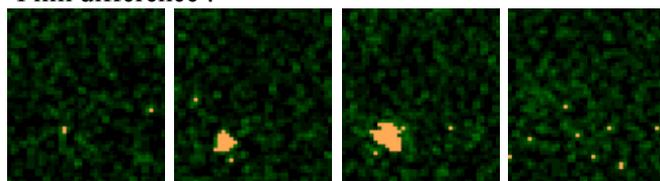


Figure 42 : Visualisation en parallèle du film original et du film différence pour la détection des événements d'exocytose. Un événement très difficilement détectable à l'œil sur le film original peut ainsi être détecté.

La position et le numéro de plan de chaque événement d'exocytose pointé sur le film original sont enregistrés dans un fichier à l'aide du *plugin* d'ImageJ « *Point Picker* » (Philippe Thévenaz, *Biomedical Imaging Group, Swiss Federal Institute of Technology* Lausanne, Suisse). Ce *plugin* offre l'avantage par rapport à la détection sous Metamorph de pouvoir ajouter des points en respectant toujours l'ordre chronologique (numéro de plan), alors que Metamorph utilise une numérotation fixe des régions d'intérêt qui indique seulement l'ordre de pointage. Un autre avantage est qu'au moment de repasser le film, ce *plugin* affiche en temps réel les positions des événements d'exocytose par des croix et permet de voir si l'on n'a rien oublié. Le fichier obtenu est enfin importé dans un tableur (*Excel, Microsoft, Redmond, WA, USA*) afin de noter le type de chaque événement d'exocytose. L'importation dans un tableur permet également de formater les informations spatiales avant de les enregistrer² dans un fichier de régions d'intérêt (.rgn) lisible par Metamorph. La superposition de régions d'intérêt indique alors d'éventuelles zones actives d'exocytose.

VI.4.2. Discussion sur le repérage du moment de la fusion

Dans une pile d'image, le plan situé juste avant la fusion est défini à l'œil comme celui précédant une augmentation significative de l'intensité de fluorescence ou du diamètre apparent³ du GS (halo) (voir II.2.1). On observe aussi parfois directement une diminution de l'intensité de fluorescence si la cadence d'acquisition est trop lente ou si le GS a un rapport signal à bruit trop faible. Ce repérage d'abord visuel, subjectif, est ensuite confirmé lors du calcul de l'intensité des GS (voir VI.5.1.2). La demi-largeur à mi-hauteur, notée σ , de l'ajustement gaussien calculée fournit un critère précieux. Le plan situé avant fusion peut alors être défini comme celui précédant la variation brutale de cette grandeur. En général, le moment détecté visuellement coïncide avec celui détecté par la demi-largeur à mi-hauteur σ mais l'écart peut être d'un voire deux plans. L'erreur peut être encore plus importante si l'augmentation d'intensité de fluorescence du GS ne précède pas immédiatement la disparition complète du spot. En effet, cette augmentation pourrait être interprétée non seulement comme le début d'un événement d'exocytose de type lent mais aussi comme le rapprochement du GS à la membrane plasmique juste avant la fusion (voir VI.5.2). Ces événements sont difficilement discernables à l'œil mais peuvent l'être grâce à la demi-largeur à mi-hauteur σ .

Le moment précis du début de l'exocytose est important à apprécier car il sert de référence aux mouvements du GS se produisant juste avant la fusion. S'il est pris trop tôt, le mouvement sera tronqué et on risque de manquer d'éventuels mouvements dans les tous derniers plans. S'il est pris trop tard, on risque de considérer des mouvements du GS avant fusion qui ne sont pas réels. Une cause possible de « faux mouvements », latéraux cette fois, est que la diffusion des fluorophores dans le milieu extracellulaire peut s'orienter dans une direction donnée à cause d'« obstacles » se trouvant dans ce milieu.

² Une formule de calcul Excel rajoute les éléments de texte nécessaires au fichier .rgn, au format suivant : « 0 forme_des_régions, 1 couleur, 2 coordonnées_haut_gauche, 3 _?_?, 4 _?, 5 _?, 6 nombre_de_points_si_région_en_ligne largeur hauteur, 7 numéro_de_région ». Supposons les coordonnées du centre du GS stockées dans les cellules A1 et B1, le numéro de région stocké dans C1, et prenons l'exemple d'un carré rouge de 5 pixels, la formule est alors : « =0 1, 1 255, 2 "&A1-2&" "&B1-2&", 3 0 0, 4 0, 5 1, 6 2 5 5, 7 "&C1&" ». Pour (x,y)=(19,20) et numéro_de_région=1, on obtient « 0 1, 1 255, 2 17 18, 3 0 0, 4 0, 5 1, 6 2 5 5, 7 1 ». Les valeurs des cellules obtenues sont enfin copiées-collées dans un fichier texte.

³ La taille apparente du GS, en fait due à la diffraction, semble artificiellement s'élargir à cause de l'augmentation de l'intensité de fluorescence lors de la fusion, lorsque le réglage du contraste de l'image reste constant.

VI.4.3. Type de résultats obtenus

On peut ainsi donner plusieurs résultats concernant la sécrétion en cellule individuelle. Tout d'abord, on considère qu'une cellule répond positivement à la stimulation lorsqu'elle produit au moins un événement d'exocytose après le début de la stimulation. On définit ainsi un taux de cellules positives par rapport au nombre total de cellules observées et stimulées. Ensuite, pour chaque cellule positive, on peut compter le nombre total d'événements d'exocytose pendant un temps donné après le début de la stimulation. Enfin, le tracé du nombre de ces événements cumulé en fonction du temps donne une cinétique de sécrétion du même type que celles qu'on peut obtenir par électrophysiologie ou ampérométrie à fibre de carbone.

VI.5. Analyse des trajectoires des granules de sécrétion

VI.5.1. Obtention des trajectoires tridimensionnelles

VI.5.1.1. Suivi des granules en 2D 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 à l'aide du module semi-automatique de suivi de particule individuelle intégré au logiciel Metamorph (voir les détails dans les matériels et méthodes de l'article du *Biophysical Journal* 2006 (Huet, Karatekin *et al.* 2006)).

Pour les cellules présentant un bruit de fond important, il peut être utile de réaliser une soustraction de ce bruit avant de faire le suivi des GS. Une pile d'images correspondant au « bruit de fond local » est obtenue en appliquant au film original un filtrage médian, avec une fenêtre de 20x20 pixels. Cette pile d'images est ensuite soustraite du film original pixel par pixel. Notons que le film filtré obtenu ne sert que pour le suivi bidimensionnel des GS, le suivi tridimensionnel s'effectuant toujours sur le film original.

Dans le cas où le GS effectue des reculs au cours de sa trajectoire, son rapport signal à bruit peut devenir très faible, ce qui nécessite un « découpage » de la trajectoire. Dans chacune des portions de trajectoire, on ajuste le seuil d'intensité définissant les pixels du GS, utilisé pour le calcul du barycentre du GS, afin que le GS conserve une forme de « spot ». Ce « seuillage dynamique » est aussi utilisé pour continuer de suivre la fluorescence résiduelle après l'exocytose de certains GS (voir matériels et méthodes de l'article de l'*European Biophysical Journal* 2007 (Tran, Huet *et al.* 2007)).

VI.5.1.2. Evaluation des mouvements des granules suivant l'axe z orthogonal au plan de focalisation

Afin de calculer l'intensité des GS, les films obtenus sous Metavue ou Metamorph sont d'abord convertis en piles d'images au format standard TIFF 16 bits, grâce au logiciel libre ImageJ (Wayne Rasband). Tous les calculs ultérieurs sont effectués avec le logiciel MATLAB (*The MathWorks, Natick, MA*) grâce à des algorithmes que nous avons programmés nous-mêmes au laboratoire.

La méthode permettant d'obtenir les déplacements axiaux d'un GS à partir de son intensité est détaillé dans les matériels et méthodes de l'article du *Biophysical Journal* 2006 (Huet, Karatekin *et al.* 2006)). Cette méthode est rappelée dans les matériels et méthodes de l'article *Biophysical Journal* 2008 (Karatekin, Tran *et al.* 2008), à la différence que le calcul ne donne plus seulement des déplacements axiaux mais une distance par rapport à la membrane. Les GS fusionnant avec la membrane plasmique offrent en effet l'avantage de pouvoir définir leur altitude $z = 0$ juste avant la fusion.

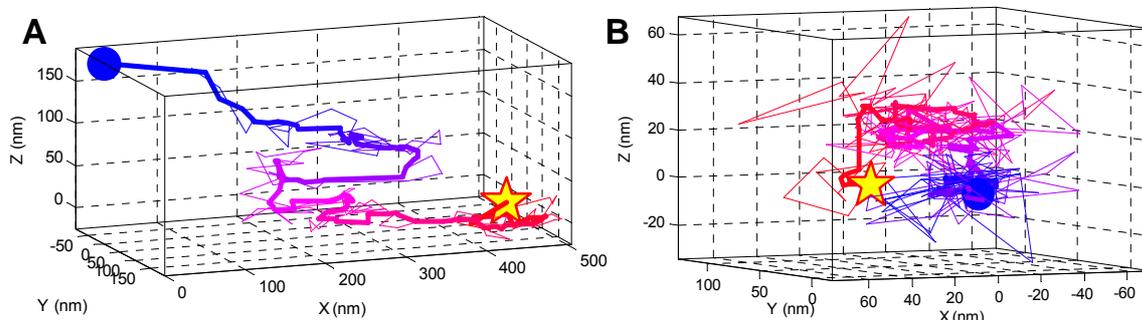


Figure 43 : (A) Trajectoire tridimensionnelle d'un GS arrivant à la membrane avant de fusionner (étoile). (B) Trajectoire d'un GS résidant qui fusionne avec la membrane après avoir effectué une transition. Le début de la trajectoire est tracé en bleu et marqué par une boule, et la couleur tend vers le rouge au fur et à mesure de l'approche de la fusion. Les traits fins correspondent aux valeurs brutes calculées, les traits gras correspondent à la trajectoire après application d'un filtre médian « glissant » (taille de fenêtre = 9 points).

VI.5.1.2.a. Évaluation de la précision et validation de la méthode de suivi tridimensionnel

La précision de notre méthode de suivi tridimensionnel des GS a été évaluée par Sébastien Huet grâce à des billes fluorescentes immobilisées sur une lamelle (voir Matériels et méthodes de l'article du *Biophysical Journal* 2006 (Huet, Karatekin *et al.* 2006)). Pour une profondeur d'évanescence de 200 nm, l'incertitude sur la position de ces billes a été évaluée à 16 ± 3 nm suivant les axes x et y et à 15 ± 3 nm suivant l'axe z . La précision de notre méthode de suivi tridimensionnel est donc identique suivant les axes x , y et z .

La validation de 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 , a été effectuée par Sébastien Huet en appliquant cette méthode à l'étude de la dynamique de billes fluorescentes plongées dans un milieu visqueux (voir Matériels et méthodes de l'article du *Biophysical Journal* 2006 (Huet, Karatekin *et al.* 2006)).

VI.5.1.2.b. Adaptations de l'algorithme de suivi tridimensionnel pour les GS de faible rapport signal à bruit

L'algorithme de suivi tridimensionnel a été adapté pour le suivi de GS de très faible signal à bruit. Des réglages additionnels ont été ajoutés pour diminuer si nécessaire l'influence de GS voisins. Par ailleurs, des variables supplémentaires sont calculées comme critères de qualité du suivi en z afin de valider les transitions axiales détectées (voir VI.5.2 ci-dessous).

i/ Réglage de la sensibilité de l'ajustement

J'ai introduit la possibilité de pondérer l'ajustement gaussien afin de donner un poids plus important aux pixels centraux ($r = 0$ à 3). Un poids empirique de 8 leur a été fixé⁴ après différents essais successifs, au lieu de 1 pour les pixels latéraux ($r > 3$). L'ajustement est de ce fait moins sensible à des valeurs plus élevées des pixels latéraux qui pourraient être dues à un autre GS passant à proximité de celui étudié (Figure 44).

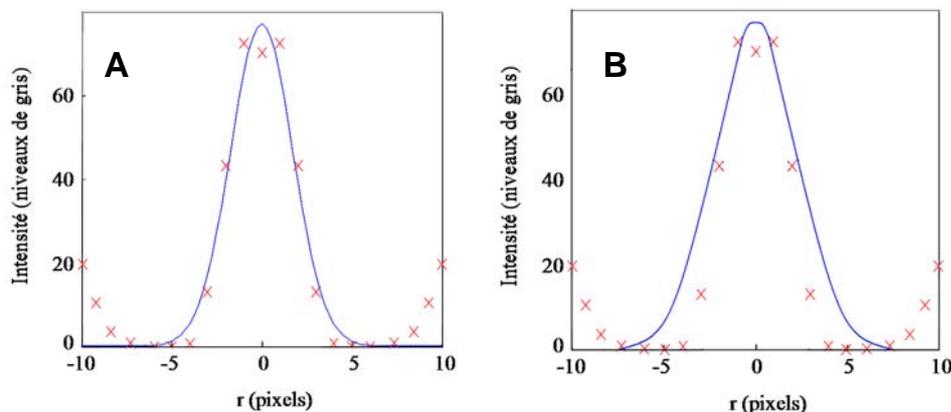


Figure 44 : Exemple de profil d'intensité (croix rouges) obtenu pour un GS situé au centre ($r=0$) et un GS voisin situé à $r>10$. (A) Un ajustement (courbe bleue) pondéré plus fortement sur les pixels centraux est moins sensible à la présence du GS voisin. (B) Un ajustement (courbe bleue) non pondéré subit un léger élargissement dû au GS voisin, ce qui induit une intensité calculée plus importante quand le GS voisin arrive à proximité, et donc un faux rapprochement en z (et inversement un faux recul lorsque le GS voisin s'éloigne).

En outre, le profil d'intensité est calculé, en s'éloignant à partir du pixel central, tant que l'écart d'intensité entre deux pixels consécutifs dépasse un certain seuil : cela signifie que l'on se trouve encore dans le pic de la gaussienne et non sur les bords. Une fois l'écart inférieur au seuil défini, on considère que l'intensité est à peu près constante et que l'on se trouve sur les bords de la gaussienne. La valeur de l'intensité au rayon maximal r_{\max} atteint à ce moment sert à définir l'intensité du bruit de fond local I_{bg} qui sera soustrait de la gaussienne $I_{fit}(r)$. Là encore, un problème apparaît lorsqu'un GS se trouve dans le voisinage de celui étudié. Le profil d'intensité risque de « remonter » pour les pixels latéraux avant d'avoir pu atteindre le seuil défini. Dans l'exemple de la Figure 44 ci-dessus, l'écart entre les pixels à $r = 5$ et $r = 6$ est supérieur au seuil fixé par défaut (1 unité de niveau de gris) et le profil continue d'être calculé jusqu'à une valeur de $r_{\max} > 6$. L'augmentation de ce seuil peut permettre d'arrêter le calcul du profil d'intensité à $r = 6$. J'ai donc également modifié l'algorithme de suivi pour augmenter ce seuil si nécessaire.

Une telle augmentation se traduit finalement par une valeur de bruit de fond local un peu plus élevée et par conséquent par une intensité I du GS calculée plus faible. Celle-ci correspond en effet à l'aire située sous l'ajustement gaussien, calculée par le produit : $I_{ves}(t) = I_0(t) \cdot \sigma(t)$, où I_0 est la valeur maximale de l'ajustement gaussien après soustraction du bruit de fond local et σ sa demi-largeur à mi-hauteur, ces deux paramètres diminuant un peu. Comme l'augmentation du seuil provoque une diminution globale et comparable sur toutes les intensités calculées, cela n'a quasiment aucune influence sur le calcul de z puisqu'il fait intervenir le rapport de deux intensités. A l'usage, la pondération majorée des pixels centraux a donné des résultats très satisfaisants et quasiment toujours été utilisée, tandis que l'augmentation du seuil n'a servi que dans quelques cas rares où un GS voisin passait à très grande proximité.

⁴ Chaque cercle de rayon r , permettant le calcul de chacun des points du profil d'intensité, balaye un certain nombre de pixels. Si le GS est exactement centré sur un pixel (ce qui n'est pas le cas puisqu'il est calculé comme un barycentre), le nombre de pixels balayés par ces cercles est, pour des valeurs de r croissantes : 1, 8, 16, 24, 32, 40, ... Des essais de pondération par ces nombres n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

Notons qu'une méthode plus perfectionnée pour évaluer le bruit de fond local a été mise au point par *Perrais et al.* (Perrais, Kleppe *et al.* 2004). Cette méthode utilise entre autres deux ajustements gaussiens pour tenir compte d'un GS voisin. L'inconvénient de cette méthode est son coût en termes de temps et de puissance de calcul et le gain qu'elle apporte ne nous a pas semblé suffisant pour l'implémenter dans notre algorithme de suivi tridimensionnel.

ii / Critères de qualité du suivi en z

L'algorithme initial de suivi en z donne accès aux variables $I_0(t)$, $\sigma(t)$, $I(t)$ permettant le calcul de $z(t)$. La demi-largeur à mi-hauteur $\sigma(t)$ de l'ajustement gaussien donne déjà un bon critère de qualité de l'ajustement, car il doit rester à peu près constant tant que le GS n'a pas fusionné ou du moins n'est pas sorti du champ évanescent (Figure 45A). Cependant, l'absence de variation significative de $\sigma(t)$ n'assure pas totalement que l'ajustement est bon. Etant donné que les distances en z que nous cherchons à mesurer sont à la limite de résolution de la technique (environ 15 nm, voir VI.5.1.2.a), il fallait s'assurer au mieux de la qualité des ajustements à chaque fois qu'un déplacement de cet ordre était détecté. L'ajout d'une variable numérique mesurant la qualité de l'ajustement m'a semblé nécessaire pour éviter un long travail de vérification de l'ajustement « à l'œil » à chaque mouvement en z potentiellement intéressant.

Un telle variable est donnée par le *Chi2* de l'ajustement, calculé pour chaque instant t. Dans notre cas, le *Chi2* est calculé à partir de la somme des écarts quadratiques entre les points du profil d'intensité expérimental $I_{exp}(r)$ et les points de l'ajustement théorique (ici la gaussienne) $I_{fit}(r) = I_0 \cdot \exp[-(r/\sigma)^2]$. Cette somme est normalisée par la variance des points expérimentaux $V(r)$ calculée à partir des 100 points situés sur le cercle de rayon r ($r \geq 1$) :

$$\text{pour } r \geq 1 : I_{exp}(r) = \frac{1}{100} \sum_{i=1}^{100} I_{exp,i}(r), \text{ d'où}$$

$$\text{pour } r \geq 1 : V(r) = \frac{1}{100} \sum_{i=1}^{100} I_{exp,i}(r)^2 - \left(I_{exp}(r) \right)^2 = \frac{1}{100} \sum_{i=1}^{100} I_{exp,i}(r)^2 - \left(\frac{1}{100} \sum_{i=1}^{100} I_{exp,i}(r) \right)^2$$

Dans le cas particulier du point central, la variance $V(r=0)$ est approximée par la racine carrée de $I_{exp}(r=0)$.

Cette somme des écarts quadratiques normalisés est enfin normalisée par rapport au nombre de degrés de libertés, c'est-à-dire le nombre de points à ajuster auquel on soustrait le nombre de paramètres à ajuster (ici I_0 et σ). Finalement, on obtient donc :

$$Chi2 = \frac{1}{(r_{max} + 1) - 2} \sum_{r=0}^{r_{max}} \frac{(I_{exp}(r) - I_{fit}(r))^2}{V(r)}$$

Etant donné le caractère particulier du point central, j'ai aussi calculé un *Chi2* modifié qui ne tient pas compte de ce point :

$$Chi2^* = \frac{1}{r_{max} - 2} \sum_{r=1}^{r_{max}} \frac{(I_{exp}(r) - I_{fit}(r))^2}{V(r)}$$

En pratique, le *Chi2* était très bruité et peu utilisable, c'est donc *Chi2** qui a été retenu comme critère. Un bon ajustement donne un *Chi2** $\ll 1$, de l'ordre de 0,1 (Figure 45A).

iii / Résolution en z

Nous avons vu ci-dessus (voir VI.5.1.2.a) que la précision du suivi a été évalué à environ 15 nm. Cependant cette valeur a été calculée pour une profondeur d'évanescence de 200 nm et pour des objets dont le rapport signal à bruit était en moyenne de 14. Or, Dans le cas du suivi des GS avant exocytose, la profondeur d'évanescence est généralement de 100 nm et les rapports signal à bruit sont en moyenne plus faibles que 14, avec de grandes variations d'un GS à l'autre. D'où l'idée d'évaluer le « bruit » sur la trajectoire en z, ce qui donne en quelque sorte la résolution en z.

La valeur du 1^{er} point du MSD_z, noté MSD_z(dt) où dt est l'intervalle de temps entre deux plans, peut aider à donner une première estimation de ce bruit sur toute la trajectoire. Ce premier point du MSD_z correspond à la moyenne des carrés des fluctuations en z entre 2 plans consécutifs, soit $\langle [z(t+dt)-z(t)]^2 \rangle$.

Comme $MSD_z(dt) = 2.D_z.dt + 2.\sigma_z^2$, σ_z étant l'écart type sur z, et D_z coefficient de diffusion selon l'axe z, on a en première approximation : $MSD_z(dt) \approx 2.\sigma_z^2$. L'écart type sur z est donc donné par : $\sigma_z \approx \sqrt{(MSD_z(dt)/2)}$. Remarquons que le calcul pour l'erreur en (x,y) est similaire : si r est une distance dans le plan (x,y), $\sigma_r \approx \sqrt{(MSD_{xy}(dt)/2)}$.

En définitive ce calcul revient à peu près à réaliser une « moyenne quadratique » des valeurs

de z(t) :
$$\sigma_z \approx \sqrt{\frac{1}{N} \sum [z(t+dt) - z(t)]^2}$$
 où N est le nombre de termes de la somme.

Pour estimer la résolution en z au moment précis de la transition, le tracé du bruit de fond en fonction du temps est obtenu en soustrayant la trajectoire « non bruitée » (obtenue par un filtrage médian « glissant » de largeur 9) à la trajectoire en z originale. Un filtre médian « glissant » donne des résultats plus satisfaisants qu'une moyenne « glissante », car il permet de mieux conserver les variations abruptes (ce qui permet de ne pas surestimer le bruit à ces moments-là) tout en lissant la courbe le reste du temps. La valeur absolue de cette grandeur est également tracée. Ces courbes présentent des valeurs nulles car le filtrage médian peut « épouser » la trajectoire en z initiale en certains points. Une moyenne quadratique sur une fenêtre glissante de 5 points est donc effectuée pour éliminer de tels points (Figure 45C).

VI.5.2. Détection des transitions axiales

La détection des transitions axiales selon l'axe z (*step*) des GS avant fusion est détaillée dans les matériels et méthodes de l'article du *Biophysical Journal* 2008 (Karatekin, Tran *et al.* 2008), en particulier la caractérisation du moment de la transition par une méthode manuelle (Figure 45B) ou un ajustement par une fonction de saut. Quelle que soit la méthode utilisée, les critères de qualité définis ci-dessus (voir VI.5.1.2.b), à savoir la demi-largeur à mi-hauteur σ et le *Chi2* de l'ajustement gaussien ainsi que le bruit de fond au moment de l'augmentation de fluorescence, permettent de s'assurer de la réalité physique de la transition (voir IV.3.1), c'est-à-dire qu'elle est bien due à un rapprochement du GS de la membrane plasmique (Figure 45).

- la demi-largeur à mi-hauteur σ et le *Chi2* permettent d'éliminer des augmentations d'intensité de fluorescence d'un GS due à un autre GS voisin. Par ailleurs, pour les transitions très proches du moment de la fusion du GS, ces critères permettent de dire si l'augmentation n'est pas due au début de la fusion. σ ne doit pas varier et le *Chi2* doit rester faible pour que la transition soit valide.
- L'évaluation du bruit de fond permet de voir si la transition est vraiment significative.

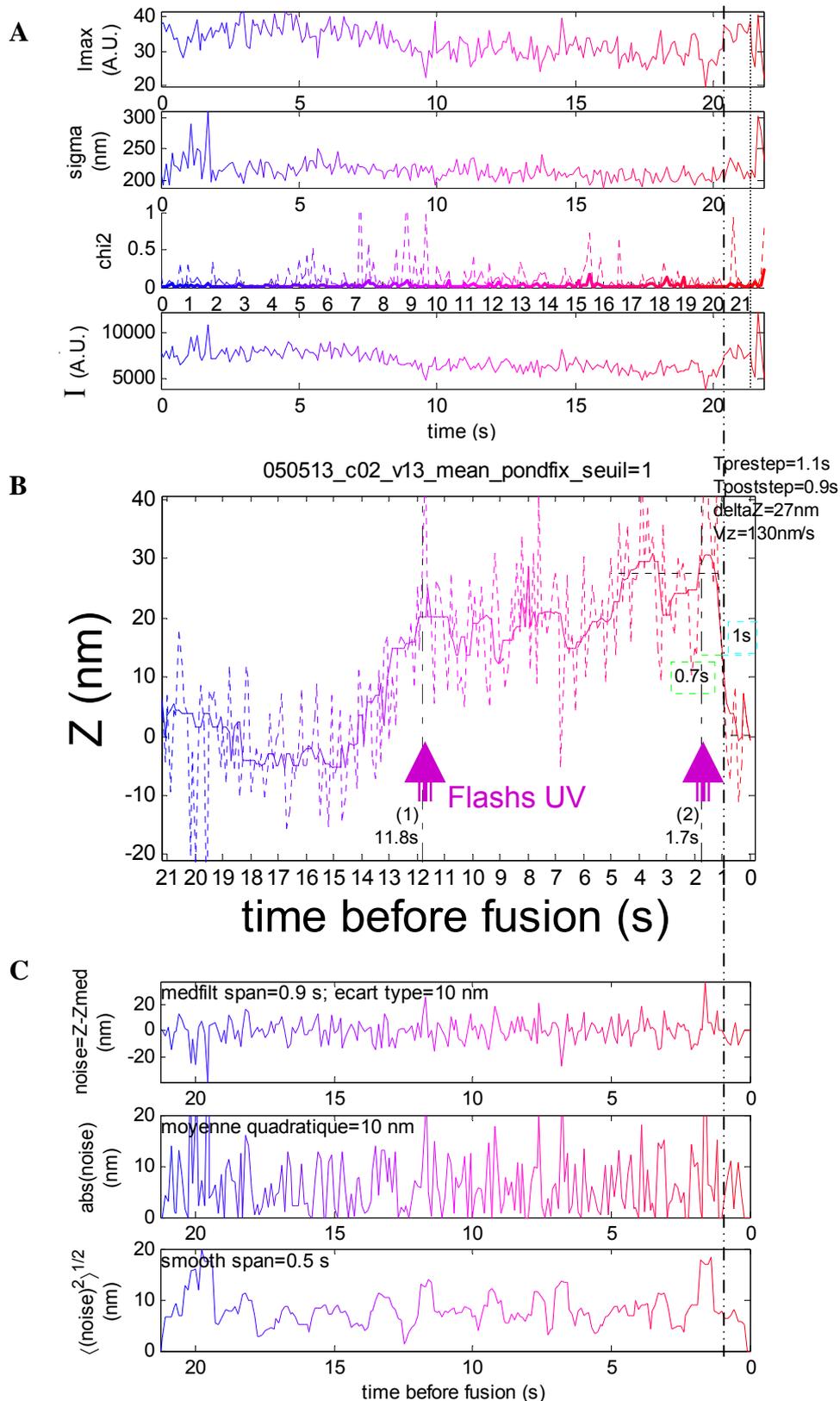


Figure 45 : exemple de détection d'une transition axiale sur le GS de la Figure 43B. (A) Paramètres issus de l'ajustement gaussien, permettant de calculer l'intensité I du GS et de pointer le moment de la fusion. (B) Trajectoire selon l'axe z , calculée à partir de l'intensité I en (A) et tronquée après le moment de la fusion. La trajectoire brute est en pointillés et la trajectoire filtrée (filtre médian glissant 9 points) en trait plein. Les temps sont donnés relativement à l'instant de la fusion. Le 2^{ème} flash UV (flèche violette) provoque une fusion 1,7 s plus tard. Précédant la fusion d'1 s, une transition axiale de 27 nm est détectée. La visualisation des différents critères de qualités (σ , χ^2 , bruit,...) à cet instant (barre verticale en pointillés) permet de valider cette transition. (C) Evaluation de la résolution en z .

Enfin, une dernière mise à jour de l'algorithme de suivi permet d'afficher la position des flashes UV sur la trajectoire $z(t)$ pour ne pas tenir compte des « sauts » de fluorescence provoqués à ces moments-là. Par ailleurs, un filtrage médian (*median*) sur une fenêtre glissante (taille de la fenêtre = 9) facilite la visualisation en éliminant le bruit sans « gommer » les déplacements indicatifs comme le ferait un lissage par moyenne glissante (*smooth*).

VI.5.3. Calcul des coefficients de diffusion D_{xy} à partir des trajectoires 2D 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 calcul de ce MSD est détaillé dans les résultats de l'article du *Biophysical Journal* 2006 (Huet, Karatekin *et al.* 2006)). Le calcul du coefficient de diffusion à deux dimensions D_{xy} est donné dans les matériels et méthodes de l'article du *Biophysical Journal* 2008 (Karatekin, Tran *et al.* 2008). Le coefficient de diffusion D_{xy} est calculé sur l'intégralité de la trajectoire ou sur des portions définies manuellement par l'utilisateur.

VI.5.4. Calcul des « trajectoires virtuelles » pour l'étude de l'exocytose séquentielle

Comme leur nom l'indique, les « trajectoires virtuelles » ne correspondent pas à des déplacements réels. Elles montrent le recul « virtuel » associé à la diminution de fluorescence causée par la fusion de chaque GS. Cependant le calcul, basé sur l'intensité des GS, est du même type que celui utilisé pour un déplacement réel (voir VI.5.1.2). Ce calcul est détaillé dans les matériels et méthodes de l'article de l'*European Biophysical Journal* 2007 (Tran, Huet *et al.* 2007).

VI.6. Mesure de la sécrétion de [³H]5-HT sur population de cellules

Les mesures de la sécrétion sur population de cellules décrites dans ce manuscrit de thèse utilisent le protocole suivant (rappelé succinctement dans les matériels et méthodes supplémentaires de l'article du *Biophysical Journal* 2008 (Karatekin, Tran *et al.* 2008)) que je n'ai pas appliqué personnellement.

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 [³H]5-HT (5-20 Ci/mmol, Amersham Biosciences, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ). 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 100 µM, baryum 3,7 mM, ionomycine 10 µM...), 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 sont perméabilisées 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 dans les cellules est déterminée par comptage de la radioactivité par scintillation. Enfin, les résultats de sécrétion sont exprimés en pourcentage de la radioactivité

VII. Annexes

VII.1. Abréviations

GS : granule de sécrétion

VS : vésicule synaptique

TIRF : *total internal reflection fluorescence*

TIRFM : *total internal reflection fluorescence microscopy*

NGF : *nerve growth 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

MyRIP: *myosin VIIa and Rab interacting protein*

tPA : tissue plasminogen activator

ARNi : interférence ARN

VII.2. Article paru dans *Annals of New York Academy of Sciences* (2004) « Serotonin Secretion by Human Carcinoid BON Cells »

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

Annals of New-York Academy of Sciences (2004) 1014:179–188

([#]contributions égales à ce travail)

VII.3. Références bibliographiques

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K et Walter P (2002). Molecular biology of the cell, Garland Science.
- Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Alvarez de Toledo G et Lindau M. *The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry*. Nature, 1997, **389**(6650): p. 509-12.
- Ales E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M et Alvarez de Toledo G. *High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism*. Nat Cell Biol, 1999, **1**(1): p. 40-4.
- Allersma MW, Bittner MA, Axelrod D et Holz RW. *Motion matters: secretory granule motion adjacent to the plasma membrane and exocytosis*. Mol Biol Cell, 2006, **17**(5): p. 2424-38.
- Allersma MW, Wang L, Axelrod D et Holz RW. *Visualization of regulated exocytosis with a granule-membrane probe using total internal reflection microscopy*. Mol Biol Cell, 2004, **15**(10): p. 4658-68.
- Alvarez de Toledo G, Fernandez-Chacon R et Fernandez JM. *Release of secretory products during transient vesicle fusion*. Nature, 1993, **363**(6429): p. 554-8.
- Alvarez de Toledo G et Fernandez JM. *Compound versus multigranular exocytosis in peritoneal mast cells*. J Gen Physiol, 1990, **95**(3): p. 397-409.
- Amatore C, Arbault S, Bonifas I, Bouret Y, Erard M, Ewing AG et Sombers LA. *Correlation between vesicle quantal size and fusion pore release in chromaffin cell exocytosis*. Biophys J, 2005, **88**(6): p. 4411-20.
- Amatore C, Arbault S, Lemaitre F et Verchier Y. *Comparison of apex and bottom secretion efficiency at chromaffin cells as measured by amperometry*. Biophys Chem, 2007, **127**(3): p. 165-71.
- Amatore C, Bouret Y, Travis ER et Wightman RM. *Interplay between membrane dynamics, diffusion and swelling pressure governs individual vesicular exocytotic events during release of adrenaline by chromaffin cells*. Biochimie, 2000, **82**(5 SU -): p. 481-496.
- An S et Zenisek D. *Regulation of exocytosis in neurons and neuroendocrine cells*. Curr Opin Neurobiol, 2004, **14**(5): p. 522-30.
- Andrews HK, Zhang YQ, Trotta N et Broadie K. *Drosophila sec10 is required for hormone secretion but not general exocytosis or neurotransmission*. Traffic, 2002, **3**(12): p. 906-21.
- Aravanis AM, Pyle JL et Tsien RW. *Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity*. Nature, 2003, **423**(6940): p. 643-7.
- Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N et Rettig J. *Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells*. Embo J, 2000, **19**(14): p. 3586-96.
- Becherer U, Moser T, Stuhmer W et Oheim M. *Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles*. Nat Neurosci, 2003, **6**(8): p. 846-53.
- Becherer U, Pasche M, Nofal S, Hof D, Matti U et Rettig J. *Quantifying exocytosis by combination of membrane capacitance measurements and total internal reflection fluorescence microscopy in chromaffin cells*. PLoS ONE, 2007, **2**: p. e505.
- Becherer U et Rettig J. *Vesicle pools, docking, priming, and release*. Cell Tissue Res, 2006, **326**(2): p. 393-407.
- Betz WJ et Bewick GS. *Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction*. Science, 1992, **255**(5041): p. 200-3.

- Bittner MA et Holz RW. *Kinetic analysis of secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells reveals distinct components*. J Biol Chem, 1992, **267**(23): p. 16219-25.
- Bonifacino JS et Glick BS. *The mechanisms of vesicle budding and fusion*. Cell, 2004, **116**(2): p. 153-66.
- Brandhorst D, Zwillig D, Rizzoli SO, Lippert U, Lang T et Jahn R. *Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006.
- Brunger AT. *Structural insights into the molecular mechanism of Ca(2+)-dependent exocytosis*. Curr Opin Neurobiol, 2000, **10**(3): p. 293-302.
- Burgoyne RD et Morgan A. *Secretory granule exocytosis*. Physiol Rev, 2003, **83**(2): p. 581-632.
- Burke NV, Han W, Li D, Takimoto K, Watkins SC et Levitan ES. *Neuronal peptide release is limited by secretory granule mobility*. Neuron, 1997, **19**(5): p. 1095-102.
- Chernomordik LV et Kozlov MM. *Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps*. Cell, 2005, **123**(3): p. 375-82.
- Choquet D et Triller A. *The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane*. Nat Rev Neurosci, 2003, **4**(4): p. 251-65.
- Chow RH, von Ruden L et Neher E. *Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells*. Nature, 1992, **356**(6364): p. 60-3.
- Cordonnier MN, Dauzonne D, Louvard D et Coudrier E. *Actin filaments and myosin I alpha cooperate with microtubules for the movement of lysosomes*. Mol Biol Cell, 2001, **12**(12): p. 4013-29.
- Denk W, Strickler JH et Webb WW. *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science, 1990, **248**(4951): p. 73-6.
- Desnos C, Huet S, Fanget I, Chapuis C, Bottiger C, Racine V, Sibarita JB, Henry JP et Darchen F. *Myosin va mediates docking of secretory granules at the plasma membrane*. J Neurosci, 2007, **27**(39): p. 10636-45.
- Desnos C, Schonn JS, Huet S, Tran VS, El-Amraoui A, Raposo G, Fanget I, Chapuis C, Menasche G, De Saint Basile G, Petit C, Cribier S, Henry JP et Darchen F. *Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites*. J Cell Biol, 2003, **163**(3): p. 559-70.
- Duncan RR, Greaves J, Wiegand UK, Matskevich I, Bodammer G, Apps DK, Shipston MJ et Chow RH. *Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age*. Nature, 2003, **422**(6928): p. 176-80.
- Dunn LA et Holz RW. *Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells*. J Biol Chem, 1983, **258**(8): p. 4989-93.
- Eliasson L, Renstrom E, Ding WG, Proks P et Rorsman P. *Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca(2+)-induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells*. J Physiol, 1997, **503** (Pt 2): p. 399-412.
- Ellis-Davies GC. *Synthesis of photosensitive EGTA derivatives*. Tetrahedron Letters, 1998, **39**(9): p. 953-956.
- Ellis-Davies GC et Kaplan JH. *A New Class of Photolabile Chelators for the Rapid Release of Divalent Cations: Generation of Caged Ca and Caged Mg*. J Org Chem, 1988, **53**(9): p. 1966-1969.
- Ellis-Davies GC et Kaplan JH. *Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca²⁺ with high affinity and releases it rapidly upon photolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, **91**(1): p. 187-91.
- Evers BM, Townsend CM, Jr., Upp JR, Allen E, Hurlbut SC, Kim SW, Rajaraman S, Singh P, Reubi JC et Thompson JC. *Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth*. Gastroenterology, 1991, **101**(2): p. 303-11.

- Fasshauer D, Antonin W, Margittai M, Pabst S et Jahn R. *Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties.* J Biol Chem, 1999, **274**(22): p. 15440-6.
- Fenwick EM, Fajdiga PB, Howe NB et Livett BG. *Functional and morphological characterization of isolated bovine adrenal medullary cells.* J Cell Biol, 1978, **76**(1): p. 12-30.
- Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K et Kusumi A. *Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane.* J Cell Biol, 2002, **157**(6): p. 1071-81.
- Galli T et Paumet F. *Du trafic dans les neurones.* Pour la Science, 2002(302): p. 66-73.
- Gasman S, Chasserot-Golaz S, Malacombe M, Way M et Bader MF. *Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments.* Mol Biol Cell, 2004, **15**(2): p. 520-31.
- Graf R, Rietdorf J et Zimmermann T. *Live cell spinning disk microscopy.* Adv Biochem Eng Biotechnol, 2005, **95**: p. 57-75.
- Graham ME, Fisher RJ et Burgoyne RD. *Measurement of exocytosis by amperometry in adrenal chromaffin cells: effects of clostridial neurotoxins and activation of protein kinase C on fusion pore kinetics.* Biochimie, 2000, **82**(5): p. 469-79.
- Greene LA et Tischler AS. *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1976, **73**(7): p. 2424-8.
- Gross SP, Tuma MC, Deacon SW, Serpinskaya AS, Reilein AR et Gelfand VI. *Interactions and regulation of molecular motors in Xenopus melanophores.* J Cell Biol, 2002, **156**(5): p. 855-65.
- Gulyas-Kovacs A, de Wit H, Milosevic I, Kochubey O, Toonen R, Klingauf J, Verhage M et Sorensen JB. *Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming.* J Neurosci, 2007, **27**(32): p. 8676-86.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B et Sigworth FJ. *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.* Pflugers Arch, 1981, **391**(2): p. 85-100.
- Han W, Ng YK, Axelrod D et Levitan ES. *Neuropeptide release by efficient recruitment of diffusing cytoplasmic secretory vesicles.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, **96**(25): p. 14577-82.
- Han X, Wang CT, Bai J, Chapman ER et Jackson MB. *Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca²⁺-triggered exocytosis.* Science, 2004, **304**(5668): p. 289-92.
- Hay JC et Martin TF. *Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins.* J Cell Biol, 1992, **119**(1): p. 139-51.
- Hebert B, Costantino S et Wiseman PW. *Spatiotemporal Image Correlation Spectroscopy (STICS) Theory, Verification, and Application to Protein Velocity Mapping in Living CHO Cells.* Biophys J, 2005, **88**(5): p. 3601-14.
- Heidelberger R, Heinemann C, Neher E et Matthews G. *Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal.* Nature, 1994, **371**(6497): p. 513-5.
- Heinemann C, Chow RH, Neher E et Zucker RS. *Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca²⁺.* Biophys J, 1994, **67**(6): p. 2546-57.
- Henry JP, Sagne C, Bedet C et Gasnier B. *The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain.* Neurochem Int, 1998, **32**(3): p. 227-46.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B et El Mestikawy S. *The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons.* J Neurosci, 2001, **21**(22): p. RC181.

- Holroyd P, Lang T, Wenzel D, De Camilli P et Jahn R. *Imaging direct, dynamin-dependent recapture of fusing secretory granules on plasma membrane lawns from PC12 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, **99**(26): p. 16806-11.
- Holz RW, Bittner MA, Peppers SC, Senter RA et Eberhard DA. *MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis*. J Biol Chem, 1989, **264**(10): p. 5412-9.
- Hsu SC, Hazuka CD, Foletti DL et Scheller RH. *Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex*. Trends Cell Biol, 1999, **9**(4): p. 150-3.
- Hsu SC, Hazuka CD, Roth R, Foletti DL, Heuser J et Scheller RH. *Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments*. Neuron, 1998, **20**(6): p. 1111-22.
- Hsu SC, TerBush D, Abraham M et Guo W. *The exocyst complex in polarized exocytosis*. Int Rev Cytol, 2004, **233**: p. 243-65.
- Huet S (2006). Analyse des mouvements des granules de sécrétion à proximité de la membrane plasmique par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente. Thesis, Biophysics, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.
- Huet S, Karatekin E, Tran VS, Fanget I, Cribier S et Henry JP. *Analysis of transient behavior in complex trajectories: application to secretory vesicle dynamics*. Biophys J, 2006, **91**(9): p. 3542-59.
- Humeau Y, Doussau F, Grant NJ et Poulain B. *How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release**. Biochimie, 2000, **82**(5 SU -): p. 427-446.
- Hunt JM, Bommert K, Charlton MP, Kistner A, Habermann E, Augustine GJ et Betz H. *A post-docking role for synaptobrevin in synaptic vesicle fusion*. Neuron, 1994, **12**(6): p. 1269-79.
- Ivarsson R, Jing X, Waselle L, Regazzi R et Renstrom E. *Myosin 5a controls insulin granule recruitment during late-phase secretion*. Traffic, 2005, **6**(11): p. 1027-35.
- Jahn R, Lang T et Sudhof TC. *Membrane fusion*. Cell, 2003, **112**(4): p. 519-33.
- Johns LM, Levitan ES, Shelden EA, Holz RW et Axelrod D. *Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells*. J Cell Biol, 2001, **153**(1): p. 177-90.
- Karatekin E, Tran VS, Huet S, Fanget I, Cribier S et Henry JP. *A 20-nm step toward the cell membrane preceding exocytosis may correspond to docking of tethered granules*. Biophys J, 2008, **94**(7): p. 2891-905.
- Kasai H. *Comparative biology of Ca²⁺-dependent exocytosis: implications of kinetic diversity for secretory function*. Trends Neurosci, 1999, **22**(2): p. 88-93.
- Kishimoto T, Kimura R, Liu TT, Nemoto T, Takahashi N et Kasai H. *Vacuolar sequential exocytosis of large dense-core vesicles in adrenal medulla*. Embo J, 2006, **25**(4): p. 673-82.
- Kishimoto T, Liu TT, Hatakeyama H, Nemoto T, Takahashi N et Kasai H. *Sequential compound exocytosis of large dense-core vesicles in PC12 cells studied with TEPIQ (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification) analysis*. J Physiol, 2005, **568**(Pt 3): p. 905-15.
- Klenchin VA et Martin TFJ. *Priming in exocytosis: Attaining fusion-competence after vesicle docking*. Biochimie, 2000, **82**(5 SU -): p. 399-407.
- Koh TW et Bellen HJ. *Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release*. Trends Neurosci, 2003, **26**(8): p. 413-22.
- Kopell WN et Westhead EW. *Osmotic pressures of solutions of ATP and catecholamines relating to storage in chromaffin granules*. J Biol Chem, 1982, **257**(10): p. 5707-10.

- Kusumi A, Sako Y et Yamamoto M. *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, 1993, **65**(5): p. 2021-40.
- Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P, Thiele C et Jahn R. *SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis.* Embo J, 2001, **20**(9): p. 2202-13.
- Lang T, Wacker I, Steyer J, Kaether C, Wunderlich I, Soldati T, Gerdes HH et Almers W. *Ca²⁺-triggered peptide secretion in single cells imaged with green fluorescent protein and evanescent-wave microscopy.* Neuron, 1997, **18**(6): p. 857-63.
- Lang T, Wacker I, Wunderlich I, Rohrbach A, Giese G, Soldati T et Almers W. *Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells.* Biophys J, 2000, **78**(6): p. 2863-77.
- Li DD, Xiong J, Qu AL et Xu T. *Three-dimensional tracking of single secretory granules in live PC12 cells.* Biophys J, 2004, **87**(3): p. 1991-2001.
- Livett BG. *Adrenal medullary chromaffin cells in vitro.* Physiol Rev, 1984, **64**(4): p. 1103-61.
- Llobet A, Beaumont V et Lagnado L. *Real-time measurement of exocytosis and endocytosis using interference of light.* Neuron, 2003, **40**(6): p. 1075-86.
- Lollike K, Lindau M, Calafat J et Borregaard N. *Compound exocytosis of granules in human neutrophils.* J Leukoc Biol, 2002, **71**(6): p. 973-80.
- Ma L, Bindokas VP, Kuznetsov A, Rhodes C, Hays L, Edwardson JM, Ueda K, Steiner DF et Philipson LH. *Direct imaging shows that insulin granule exocytosis occurs by complete vesicle fusion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004.
- Maiti S, Shear JB, Williams RM, Zipfel WR et Webb WW. *Measuring serotonin distribution in live cells with three-photon excitation.* Science, 1997, **275**(5299): p. 530-2.
- Manneville JB, Etienne-Manneville S, Skehel P, Carter T, Ogden D et Ferenczi M. *Interaction of the actin cytoskeleton with microtubules regulates secretory organelle movement near the plasma membrane in human endothelial cells.* J Cell Sci, 2003, **116**(Pt 19): p. 3927-38.
- Mark BL, Jilkina O et Bhullar RP. *Association of Ral GTP-binding protein with human platelet dense granules.* Biochem Biophys Res Commun, 1996, **225**(1): p. 40-6.
- Martin TF. *Tuning exocytosis for speed: fast and slow modes.* Biochim Biophys Acta, 2003, **1641**(2-3): p. 157-65.
- Mayer A. *Membrane fusion in eukaryotic cells.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2002, **18**: p. 289-314.
- Melia TJ, Weber T, McNew JA, Fisher LE, Johnston RJ, Parlati F, Mahal LK, Sollner TH et Rothman JE. *Regulation of membrane fusion by the membrane-proximal coil of the t-SNARE during zippering of SNAREpins.* J Cell Biol, 2002, **158**(5): p. 929-40.
- Morgan A et Burgoyne RD. *Exo1 and Exo2 proteins stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells.* Nature, 1992, **355**(6363): p. 833-6.
- Moskalenko S, Henry DO, Rosse C, Mirey G, Camonis JH et White MA. *The exocyst is a Ral effector complex.* Nat Cell Biol, 2002, **4**(1): p. 66-72.
- Murthy M, Garza D, Scheller RH et Schwarz TL. *Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists.* Neuron, 2003, **37**(3): p. 433-47.
- Nagy G, Kim JH, Pang ZP, Matti U, Rettig J, Sudhof TC et Sorensen JB. *Different effects on fast exocytosis induced by synaptotagmin 1 and 2 isoforms and abundance but not by phosphorylation.* J Neurosci, 2006, **26**(2): p. 632-43.

- Nakata T et Hirokawa N. *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, 1992, **12**(6): p. 2186-97.
- Neco P, Gil A, Del Mar Frances M, Viniegra S et Gutierrez LM. *The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion.* Biochem J, 2002, **368**(Pt 2): p. 405-13.
- Neco P, Giner D, del Mar Frances M, Viniegra S et Gutierrez LM. *Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells.* Eur J Neurosci, 2003, **18**(4): p. 733-42.
- Neco P, Giner D, Viniegra S, Borges R, Villarroel A et Gutierrez LM. *New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin cells.* J Biol Chem, 2004, **279**(26): p. 27450-7.
- Neher E et Marty A. *Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1982, **79**(21): p. 6712-6.
- Neher E et Zucker RS. *Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells.* Neuron, 1993, **10**(1): p. 21-30.
- Nemoto T, Kimura R, Ito K, Tachikawa A, Miyashita Y, Iino M et Kasai H. *Sequential-replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini.* Nat Cell Biol, 2001, **3**(3): p. 253-8.
- Ng YK, Lu X, Gulacsi A, Han W, Saxton MJ et Levitan ES. *Unexpected Mobility Variation among Individual Secretory Vesicles Produces an Apparent Refractory Neuropeptide Pool.* Biophys J, 2003, **84**(6): p. 4127-34.
- Ng YK, Lu X et Levitan ES. *Physical mobilization of secretory vesicles facilitates neuropeptide release by nerve growth factor-differentiated PC12 cells.* J Physiol, 2002a, **542**(Pt 2): p. 395-402.
- Ng YK, Lu X, Watkins SC, Ellis-Davies GC et Levitan ES. *Nerve growth factor-induced differentiation changes the cellular organization of regulated Peptide release by PC12 cells.* J Neurosci, 2002b, **22**(10): p. 3890-7.
- Nofal S, Becherer U, Hof D, Matti U et Rettig J. *Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility.* J Neurosci, 2007, **27**(6): p. 1386-95.
- Novick P et Guo W. *Ras family therapy: Rab, Rho and Ral talk to the exocyst.* Trends Cell Biol, 2002, **12**(6): p. 247-9.
- Novick P, Medkova M, Dong G, Hutagalung A, Reinisch K et Grosshans B. *Interactions between Rabs, tethers, SNAREs and their regulators in exocytosis.* Biochem Soc Trans, 2006, **34**(Pt 5): p. 683-6.
- Ohara-Imaizumi M, Nakamichi Y, Nishiwaki C et Nagamatsu S. *Transduction of MIN6 beta cells with TAT-syntaxin SNARE motif inhibits insulin exocytosis in biphasic insulin release in a distinct mechanism analyzed by evanescent wave microscopy.* J Biol Chem, 2002a, **277**(52): p. 50805-11.
- Ohara-Imaizumi M, Nakamichi Y, Tanaka T, Ishida H et Nagamatsu S. *Imaging exocytosis of single insulin secretory granules with evanescent wave microscopy: distinct behavior of granule motion in biphasic insulin release.* J Biol Chem, 2002b, **277**(6): p. 3805-8.
- Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Kikuta T, Kumakura K, Nakamichi Y et Nagamatsu S. *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, 2004a, **279**(9): p. 8403-8.
- Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Kikuta T, Nagai S, Nakamichi Y et Nagamatsu S. *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, 2004b, **381**(Pt 1): p. 13-8.

- Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Kikuta T, Nagai S et Nagamatsu S. *Correlation of syntaxin-1 and SNAP-25 clusters with docking and fusion of insulin granules analysed by total internal reflection fluorescence microscopy*. Diabetologia, 2004c.
- Oheim M. *Imaging transmitter release. II. A practical guide to evanescent-wave imaging*. Lasers Med Sci, 2001, **16**(3): p. 159-70.
- Oheim M, Loerke D, Stuhmer W et Chow RH. *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, 1998, **27**(2): p. 83-98.
- Oheim M, Loerke D, Stuhmer W et Chow RH. *Multiple stimulation-dependent processes regulate the size of the releasable pool of vesicles*. Eur Biophys J, 1999, **28**(2): p. 91-101.
- Oheim M et Stuhmer W. *Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex*. Eur Biophys J, 2000, **29**(2): p. 67-89.
- Parekh D, Ishizuka J, Townsend CM, Jr., Haber B, Beauchamp RD, Karp G, Kim SW, Rajaraman S, Greeley G, Jr. et Thompson JC. *Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion*. Pancreas, 1994, **9**(1): p. 83-90.
- Parsons TD, Coorsen JR, Horstmann H et Almers W. *Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells*. Neuron, 1995, **15**(5): p. 1085-96.
- Pawley JB (1996). Handbook of Biological Confocal Microscopy. New York, Plenum Press.
- Perrais D, Kleppe I, Taraska J et Almers W. *Recapture after exocytosis causes differential retention of protein in granules of bovine chromaffin cells*. J Physiol, 2004.
- Peters C, Bayer MJ, Buhler S, Andersen JS, Mann M et Mayer A. *Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion*. Nature, 2001, **409**(6820): p. 581-8.
- Polzin A, Shipitsin M, Goi T, Feig LA et Turner TJ. *Ral-GTPase influences the regulation of the readily releasable pool of synaptic vesicles*. Mol Cell Biol, 2002, **22**(6): p. 1714-22.
- Rettig J et Neher E. *Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis*. Science, 2002, **298**(5594): p. 781-5.
- Rickman C, Jimenez JL, Graham ME, Archer DA, Soloviev M, Burgoyne RD et Davletov B. *Conserved pre-fusion protein assembly in regulated exocytosis*. Mol Biol Cell, 2006, **17**(1): p. 283-94.
- Rohrbach A. *Observing secretory granules with a multiangle evanescent wave microscope*. Biophys J, 2000, **78**(5): p. 2641-54.
- Rose SD, Lejen T, Casaletti L, Larson RE, Pene TD et Trifaro JM. *Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion*. J Neurochem, 2003, **85**(2): p. 287-98.
- Rudolf R, Kogel T, Kuznetsov SA, Salm T, Schlicker O, Hellwig A, Hammer JA, 3rd et Gerdes HH. *Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells*. J Cell Sci, 2003, **116**(Pt 7): p. 1339-48.
- Rudolf R, Salm T, Rustom A et Gerdes HH. *Dynamics of immature secretory granules: role of cytoskeletal elements during transport, cortical restriction, and F-actin-dependent tethering*. Mol Biol Cell, 2001, **12**(5): p. 1353-65.
- Ryan TA, Reuter H et Smith SJ. *Optical detection of a quantal presynaptic membrane turnover*. Nature, 1997, **388**(6641): p. 478-82.
- Ryan TA, Reuter H, Wendland B, Schweizer FE, Tsien RW et Smith SJ. *The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons*. Neuron, 1993, **11**(4): p. 713-24.

- Sarafian T, Aunis D et Bader MF. *Loss of proteins from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells essential for exocytosis*. J Biol Chem, 1987, **262**(34): p. 16671-6.
- Scepek S et Lindau M. *Focal exocytosis by eosinophils--compound exocytosis and cumulative fusion*. Embo J, 1993, **12**(5): p. 1811-7.
- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR et Montecucco C. *Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin*. Nature, 1992, **359**(6398): p. 832-5.
- Silverman MA, Johnson S, Gurkins D, Farmer M, Lochner JE, Rosa P et Scalettar BA. *Mechanisms of transport and exocytosis of dense-core granules containing tissue plasminogen activator in developing hippocampal neurons*. J Neurosci, 2005, **25**(12): p. 3095-106.
- Sokac AM et Bement WM. *Kiss-and-coat and compartment mixing: coupling exocytosis to signal generation and local actin assembly*. Mol Biol Cell, 2006, **17**(4): p. 1495-502.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH et Rothman JE. *A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion*. Cell, 1993, **75**(3): p. 409-18.
- Sorensen JB, Nagy G, Varoqueaux F, Nehring RB, Brose N, Wilson MC et Neher E. *Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23*. Cell, 2003, **114**(1): p. 75-86.
- Sorensen JB, Wiederhold K, Muller EM, Milosevic I, Nagy G, de Groot BL, Grubmuller H et Fasshauer D. *Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles*. Embo J, 2006.
- Steyer JA et Almers W. *Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy*. Biophys J, 1999, **76**(4): p. 2262-71.
- Steyer JA et Almers W. *A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, **2**(4): p. 268-75.
- Steyer JA, Horstmann H et Almers W. *Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells*. Nature, 1997, **388**(6641): p. 474-8.
- Sudhof TC. *The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions*. Nature, 1995, **375**(6533): p. 645-53.
- Sudhof TC. *The synaptic vesicle cycle*. Annu Rev Neurosci, 2004, **27**: p. 509-47.
- Sudhof TC. *Membrane fusion as a team effort*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, **104**(34): p. 13541-2.
- Sugihara K, Asano S, Tanaka K, Iwamatsu A, Okawa K et Ohta Y. *The exocyst complex binds the small GTPase RalA to mediate filopodia formation*. Nat Cell Biol, 2002, **4**(1): p. 73-8.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R et Brunger AT. *Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution*. Nature, 1998, **395**(6700): p. 347-53.
- Takahashi A, Camacho P, Lechleiter JD et Herman B. *Measurement of intracellular calcium*. Physiol Rev, 1999, **79**(4): p. 1089-125.
- Takahashi N, Hatakeyama H, Okado H, Miwa A, Kishimoto T, Kojima T, Abe T et Kasai H. *Sequential exocytosis of insulin granules is associated with redistribution of SNAP25*. J Cell Biol, 2004, **165**(2): p. 255-62.
- Takahashi N, Kishimoto T, Nemoto T, Kadowaki T et Kasai H. *Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet*. Science, 2002, **297**(5585): p. 1349-52.
- Takai Y, Sasaki T et Matozaki T. *Small GTP-binding proteins*. Physiol Rev, 2001, **81**(1): p. 153-208.

- Taraska JW et Almers W. *Bilayers merge even when exocytosis is transient*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, **101**(23): p. 8780-5.
- Taraska JW, Perrais D, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S et Almers W. *Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, **100**(4): p. 2070-5.
- Toonen RF, Kochubey O, de Wit H, Gulyas-Kovacs A, Konijnenburg B, Sorensen JB, Klingauf J et Verhage M. *Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane*. Embo J, 2006, **25**(16): p. 3725-37.
- Tooze SA, Martens GJ et Huttner WB. *Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE*. Trends Cell Biol, 2001, **11**(3): p. 116-22.
- Tran VS, Huet S, Fanget I, Cribier S, Henry JP et Karatekin E. *Characterization of sequential exocytosis in a human neuroendocrine cell line using evanescent wave microscopy and "virtual trajectory" analysis*. Eur Biophys J, 2007.
- Tran VS, Marion-Audibert AM, Karatekin E, Huet S, Cribier S, Guillaumie K, Chapuis C, Desnos C, Darchen F et Henry JP. *Serotonin secretion by human carcinoid BON cells*. Ann N Y Acad Sci, 2004, **1014**: p. 179-88.
- Trifaro J-M, Rose SD, Lejen T et Elzagallaai A. *Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis*. Biochimie, 2000, **82**(4 SU -): p. 339-352.
- Tsuboi T, DaSilva Xavier G, Leclerc I et Rutter GA. *5' AMP-activated protein kinase controls insulin-containing secretory vesicle dynamics*. J Biol Chem, 2003.
- Tsuboi T et Fukuda M. *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, 2005, **280**(47): p. 39253-9.
- Tsuboi T et Fukuda M. *Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells*. J Cell Sci, 2006a, **119**(Pt 11): p. 2196-203.
- Tsuboi T et Fukuda M. *The Slp4-a linker domain controls exocytosis through interaction with Munc18-1/syntaxin-1a complex*. Mol Biol Cell, 2006b, **17**(5): p. 2101-12.
- Tsuboi T, Kanno E et Fukuda M. *The polybasic sequence in the C2B domain of rabphilin is required for the vesicle docking step in PC12 cells*. J Neurochem, 2007, **100**(3): p. 770-9.
- Tsuboi T, McMahon HT et Rutter GA. *Mechanisms of Dense Core Vesicle Recapture following "Kiss and Run" ("Cavicapture") Exocytosis in Insulin-secreting Cells*. J Biol Chem, 2004, **279**(45): p. 47115-24.
- Tsuboi T, Ravier MA, Xie H, Ewart MA, Gould GW, Baldwin SA et Rutter GA. *Mammalian exocyst complex is required for the docking step of insulin vesicle exocytosis*. J Biol Chem, 2005, **280**(27): p. 25565-70.
- Tsuboi T et Rutter GA. *Multiple Forms of "Kiss-and-Run" Exocytosis Revealed by Evanescent Wave Microscopy*. Curr Biol, 2003, **13**(7): p. 563-7.
- Tsuboi T, Zhao C, Terakawa S et Rutter GA. *Simultaneous evanescent wave imaging of insulin vesicle membrane and cargo during a single exocytotic event*. Curr Biol, 2000, **10**(20): p. 1307-10.
- Ungermann C et Langosch D. *Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing*. J Cell Sci, 2005, **118**(Pt 17): p. 3819-28.
- Varadi A, Ainscow EK, Allan VJ et Rutter GA. *Involvement of conventional kinesin in glucose-stimulated secretory granule movements and exocytosis in clonal pancreatic beta-cells*. J Cell Sci, 2002, **115**(Pt 21): p. 4177-89.
- Varadi A, Tsuboi T, Johnson-Cadwell LI, Allan VJ et Rutter GA. *Kinesin I and cytoplasmic dynein orchestrate glucose-stimulated insulin-containing vesicle movements in clonal MIN6 beta-cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003, **311**(2): p. 272-82.

- Varadi A, Tsuboi T et Rutter GA. *Myosin Va Transports Dense Core Secretory Vesicles in Pancreatic MIN6 β -Cells*. *Mol Biol Cell*, 2005, **16**(6): p. 2670-80.
- Videen JS, Mezger MS, Chang YM et O'Connor DT. *Calcium and catecholamine interactions with adrenal chromogranins. Comparison of driving forces in binding and aggregation*. *J Biol Chem*, 1992, **267**(5): p. 3066-73.
- Voets T. *Dissection of three Ca^{2+} -dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices*. *Neuron*, 2000, **28**(2): p. 537-45.
- Voets T, Neher E et Moser T. *Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices*. *Neuron*, 1999, **23**(3): p. 607-15.
- Voets T, Toonen RF, Brian EC, de Wit H, Moser T, Rettig J, Sudhof TC, Neher E et Verhage M. *Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking*. *Neuron*, 2001, **31**(4): p. 581-91.
- Wacker I, Kaether C, Kromer A, Migala A, Almers W et Gerdes HH. *Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein*. *J Cell Sci*, 1997, **110** (Pt 13): p. 1453-63.
- Watanabe M, Nomura K, Ohyama A, Ishikawa R, Komiya Y, Hosaka K, Yamauchi E, Taniguchi H, Sasakawa N, Kumakura K, Ushiki T, Sato O, Ikebe M et Igarashi M. *Myosin-Va Regulates Exocytosis through the Submicromolar Ca^{2+} -dependent Binding of Syntaxin-1A*. *Mol Biol Cell*, 2005.
- White JG, Squirrell JM et Eliceiri KW. *Applying multiphoton imaging to the study of membrane dynamics in living cells*. *Traffic*, 2001, **2**(11): p. 775-80.
- Wiegand UK, Duncan RR, Greaves J, Chow RH, Shipston MJ et Apps DK. *Red, yellow, green go!--A novel tool for microscopic segregation of secretory vesicle pools according to their age*. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31**(Pt 4): p. 851-6.
- Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Jr. et Viveros OH. *Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, **88**(23): p. 10754-8.
- Wu XS, Rao K, Zhang H, Wang F, Sellers JR, Matesic LE, Copeland NG, Jenkins NA et Hammer JA, 3rd. *Identification of an organelle receptor for myosin-Va*. *Nat Cell Biol*, 2002, **4**(4): p. 271-8.
- Wyart C, Ybert C, Bourdieu L, Herr C, Prinz C et Chatenay D. *Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces*. *J Neurosci Methods*, 2002, **117**(2): p. 123-31.
- Xu T, Binz T, Niemann H et Neher E. *Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity*. *Nat Neurosci*, 1998, **1**(3): p. 192-200.
- Xu T, Rammner B, Margittai M, Artalejo AR, Neher E et Jahn R. *Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis*. *Cell*, 1999, **99**(7): p. 713-22.
- Zenisek D, Steyer JA et Almers W. *Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones*. *Nature*, 2000, **406**(6798): p. 849-54.
- Zenisek D, Steyer JA, Feldman ME et Almers W. *A membrane marker leaves synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells*. *Neuron*, 2002, **35**(6): p. 1085-97.
- Zerial M et McBride H. *Rab proteins as membrane organizers*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, **2**(2): p. 107-17.
- Zimmerberg J, Curran M, Cohen FS et Brodwick M. *Simultaneous electrical and optical measurements show that membrane fusion precedes secretory granule swelling during exocytosis of beige mouse mast cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, **84**(6): p. 1585-9.

Résumé

La sécrétion régulée d'hormones est un processus décomposable en plusieurs étapes : migration des granules de sécrétion (GS) vers la membrane plasmique (MP), accostage et arrimage des GS à la MP, exocytose ou fusion des GS avec la MP permettant la libération du contenu des GS dans le milieu extracellulaire.

Bien que très utiles, les méthodes électrophysiologiques et électrochimiques ne donnent d'informations ni sur la localisation ou les mouvements des GS avant fusion, ni sur le devenir de la membrane des GS après fusion. Plusieurs techniques d'imagerie *in vivo* cherchent à répondre à ces questions. La mieux adaptée est la microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente (TIRFM) qui permet d'observer les mouvements de GS individuels à proximité immédiate de la MP. Nous avons appliqué cette approche à l'étude de la sécrétion des cellules BON (lignée dérivée d'un carcinome). Leur stimulation a été faite par la technique du Ca cagé, appliquée pour la première fois en microscopie TIRF.

Après exocytose, nous avons observé et quantifié le phénomène de persistance de la forme d'une partie des GS, ainsi que l'exocytose séquentielle de GS situés plus à distance de la MP. De manière surprenante, l'exocytose séquentielle représente ~25% des événements d'exocytose. L'analyse détaillée des trajectoires en 3 dimensions des GS avant leur fusion nous a montré qu'environ 40% des GS effectuent une transition de 20 nm vers la MP, puis fusionnent dans un délai de ~3 s. Cette observation originale de la transition entre l'accostage et l'arrimage des GS pourrait être la traduction d'évènements moléculaires impliqués dans l'amorçage des GS, nécessaire à la fusion.

Abstract

Regulated secretion of neuroendocrine cells is a multi-step process involving translocation of secretory granules (SG) toward the plasma membrane (PM), tethering and docking of SG at the PM, exocytosis or fusion of SG membrane with PM, leading to the release of SG contents to the extracellular medium.

Electrophysiological and electrochemical methods are useful, but they cannot give information about localization or movement of SG before fusion and about the fate of the SG membrane after fusion. Many *in vivo* imaging techniques try to answer these questions. The most suited one is TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) that allows observation of single SG and of their movements in the area just beneath the PM, with evanescence depth ranging from 50 to 300 nm. We have applied this approach to the study of the secretion of BON cells (a cell line derived of a carcinoma). Cells were stimulated by the caged Ca technique, applied for the first time to TIRF microscopy.

Using these techniques, we observed fusions which were not accompanied by the flattening of the SG membrane. These empty membranes became targets for sequential fusions with deeper lying vesicles. Overall, ~25% of all exocytotic events occurred via sequential fusion. We also analysed in detail 3D-trajectories of SG shortly before their fusion. We reported that about 40% of SG underwent a 20-nm step toward the PM before fusing ~3 s later. This new observation, the first direct visualization of the transition between tethered and docked states at the PM, might correspond to molecular events involved in the priming steps required for the maturation of SG before fusion.