



Rôle de la phospholipase D1 dans le trafic membranaire : implication dans le développement neuronal et l'exocytose régulée

Mohamed Raafet Ammar

► To cite this version:

Mohamed Raafet Ammar. Rôle de la phospholipase D1 dans le trafic membranaire : implication dans le développement neuronal et l'exocytose régulée. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ030 . tel-00998047

HAL Id: tel-00998047

<https://theses.hal.science/tel-00998047>

Submitted on 30 May 2014

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.

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline: ***Science du vivant***

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

Par

Mohamed-Raafet AMMAR

**Rôle de la phospholipase D1 dans le trafic membranaire:
Implication dans le développement neuronal
et l'exocytose régulée**

Soutenue **Lundi le 16 septembre 2013**, devant la commission d'examen:

Pr. Jean-Luc Olivier
Dr. Thierry Galli
Dr. Michael Reber
Pr. Jamel Chelly
Dr. Yann Humeau
Dr. Nicolas Vitale

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

« A tous ceux qui portent en eux les soucis de l'innovation, la soif du savoir et la volonté du changement »

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait le grand honneur d'accepter de juger ce travail :

- **Pr. Jamel Chelly**
- **Pr. Jean-Luc Olivier**
- **Dr. Michael Reber**
- **Dr. Thierry Galli**
- **Dr. Yann Humeau**

A mon directeur de thèse **Dr. Nicolas Vitale** :

Je profite de cette occasion pour exprimer mes sincères remerciements pour ta bienveillance et pour ta confiance. Je voudrais t'exprimer ma grande admiration pour tes qualités humaines. Merci pour tout.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe Neurosecrétion/Neuroendocrine pour leur aide :

Dr. Marie France Bader, pour m'avoir accueillie dans son Institut

Dr. Stéphane Gasman, pour ses conseils et sa bonne humeur

Dr. Stéphane Ory, pour les discussions scientifiques et un grand merci pour le soutien et l'initiation au TIRF.

Dr. Nancy Grant, pour les discussions scientifiques.

Dr. Sylvette Chasserot-Golaz, pour son cours d'initiation à la microscopie confocale.

Un grand merci pour **Tam** et **Valou** pour leur assistance technique

De même, Merci **Gaby** pour les commandes

Merci aux étudiant(e)s : Seb, Nawel, Pauline et Marion.

Je tiens également à adresser mes remerciements pour l'équipe de l'animalerie :

Sophie, Mohamed et **Laurence**.

DEDICACE

A mon père Ahmed

A ma mère Najet

Je profite de cette occasion pour vous exprimer l'immense amour que je vous porte, la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

J'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours.

A mon frère « **Ali** » et ma sœur « **Rim** »

A ma sœur Rihab et sa famille « Rachid », « Chaima » et « Amir »

Je vous souhaite la réussite dans votre vie.

A ma femme Dalila

Je te dédie ce travail pour ta patience et le soutien dont tu as fait preuve pendant toute la durée de cette thèse. Et j'en profite pour t'exprimer mon grand amour et ma grande fierté.

*Je vous aime **TOUTES** et **TOUS***

A l'âme de mon grand père **ALI AMMAR**
Je ne t'oublierai jamais

TABLES DES MATIERES

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES ABBREVIATIONS	8
Le développement neuronal	12
I. Introduction.....	12
II. Le développement neuronal	13
1. Chronologie de l'établissement de la polarité des neurones en culture	14
2. Bases moléculaires de la croissance neuritique	15
3. Le cône de croissance.....	16
3.1. Structure du cône de croissance	17
3.2. Organisation et dynamique du cytosquelette au sein du cône de croissance....	18
3.3. Le cytosquelette d'actine	19
3.4. La dynamique de l'actine	19
3.5. Les microtubules	20
4. Mécanismes de la progression du cône	21
III. La croissance neuritique et le trafic membranaire	22
1. Origine des vésicules impliquées dans l'expansion membranaire.....	23
2. Identité des vésicules précurseurs plasmalemmales ou PPV.....	24
3. Implication de Ti-VAMP ou VAMP7 dans la croissance neuritique.....	25
4. Biogénèse des vésicules à partir du réseau transgolgien.....	26
5. Le trafic membranaire du réseau transgolgien vers la membrane plasmique.....	27
IV. Mécanismes moléculaires du trafic membranaire	28
1. L'exocytose.....	28
1.1. Les différentes étapes de l'exocytose.....	29
1.1.1.L'arrimage des vésicules (Tethering and Docking)	29
1.1.2.L'amorçage de la fusion membranaire (Priming)	30

1.1.3.	La fusion membranaire (Triggering)	31
1.2.	Dynamique de la membrane au cours de la formation du pore de fusion.....	33
1.3.	L'étape initiale de la fusion membranaire	34
1.4.	La formation des intermédiaires d'hémifusion	35
1.5.	Notion de la courbure membranaire induite par les lipides lors de la fusion	35
2.	L'endocytose	38
2.1.	L'endocytose dépendante de la clathrine ou clathrin-mediated endocytosis (CME)	38
2.2.	Les autres types d'endocytose	40
2.3.	L'endocytose compensatrice	41
V.	Les neurotrophines : rôle de leur l'internalisation	41
1.	Implication du système endolysosomal dans le contrôle de la signalisation des neurotrophines.....	44
2.	La transmission du signal de la membrane plasmique vers le corps cellulaire.....	44
3.	La régulation de la voie ERK1/2 par le signalosome	45
4.	L'identité du signalosome	47
VI.	Le développement dendritique et la formation des épines	47
1.	Le développement dendritique	47
2.	Les épines dendritiques.....	48
2.1.	Origine et formation des épines dendritiques au cours de développement	50
3.	Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'initiation et l'élongation d'un filopode dendritique	51
3.1.	Le contrôle du développement et le remodelage des épines par la dynamique de l'actine	53
3.2.	Le contrôle du développement et le remodelage des épines par la famille des RhoGTPases	53
3.3.	Implication du trafic membranaire dans la formation des épines	55
3.4.	Implication d'Arf6 dans le développement neuronal	56

La Phospholipase D.....	58
I. Clonage et identification des PLDs animales	59
II. Structure primaire de la PLD1	60
1. Les deux domaines HKD ou domaines catalytiques (régions CRII et CRIV)	60
2. Les régions conservées CRI et CRIII (Conserved Region III ou motif IYIENQFF)	61
3. Le domaine PH.....	62
4. Le domaine PX	62
4.1. Rôle du domaine PX dans l'interaction de la PLD1 avec les phospholipides	62
4.2. Rôle du domaine PX dans l'interaction de la PLD1 avec les protéines.....	64
III. Localisation subcellulaire de la PLD1.....	64
IV. Les domaines impliqués dans la localisation subcellulaire de la PLD1.....	66
V. Régulation de l'activité de la PLD1	67
1. Régulation de la PLD1 par la PKC	68
2. Régulation de la PLD1 par la kinase RSK2	70
3. Régulation de la PLD1 par d'autres protéines kinases	71
4. Régulation de la PLD1 par les GTPases	72
4.1. Rôles majeurs des protéines GTPases monomériques.....	72
4.2. GTPases monomériques et activité PLD1	72
5. Inhibition de l'activité PLD1 par des protéines du trafic membranaire	74
VI. Rôles cellulaires de la PLD1 et de son produit le PA.....	74
1. Implication de la PLD1 dans le trafic vésiculaire et l'exocytose	74
1.1. Régulation de l'activité de la PLD1 pendant l'exocytose.....	76
1.2. Dynamique et fonction du PA pendant de l'exocytose.....	78
2. Implication de la PLD1 dans la signalisation cellulaire	79
2.1. Régulation de l'activité de PI4P5K.....	80
2.2. Régulation des voies MAPK et mTOR/S6K par le PA	80
VII. Expression de la PLD1 dans le système nerveux	82

VIII. Rôle de la PLD1 dans la croissance neuritique	82
1. Régulation de l'activité de la PLD1 pendant la croissance neuritique et le développement neuronal	84
2. Les limites des outils utilisés pour étudier la fonction des PLDs	85
IX. Le modèle murin <i>Pld1</i>^{-/-}	85
RESULTATS	88
I. Article 1	88
La kinase RSK2 responsable du syndrome de Coffin-Lowry régule la croissance neuritique via la phosphorylation de la PLD1 conduisant à la synthèse d'acide phosphatidique	88
II. Article 2	93
Caractérisation des voies de signalisation impliquant RSK2 et la PLD1 dans le développement neuronal induit par les neurotrophines	93
1. Le BDNF stimule l'activité PLD dans les neurones en culture	94
2. Diminution de l'activation de la voie ERK1/2-RSK2-CREB et mTOR-S6K induite par BDNF en absence de PLD1 dans les neurones corticaux en culture	96
3. La surexpression de PLD1 induit une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2, RSK2 et CREB	101
4. Colocalisation de PLD1, RSK2 et ERK1/2 au niveau de structures vésiculaires	104
5. BDNF induit la formation d'un complexe entre PEA15, ERK1/2, RSK2 et PLD1	105
5. Localisation endosomale de PLD1 et d'ERK1/2	106
6. Discussion	109
DISCUSSION GENERALE	114
I. Rôle de la PLD1 dans la croissance neuritique : Implication de la kinase RSK2 dans la régulation de la PLD1 au cours de l'exocytose des vésicules Ti-VAMP	116
1. Implication de PLD1 dans la croissance neuritique	117
2. Implication de RSK2 dans la croissance neuritique	118

3. Régulation de l'activité de PLD1 par RSK2 au cours de la croissance neuritique	119
II. Régulation du développement de l'arborisation dendritique et la maturation des épines dendritique par PLD1	120
1. Rôle de PLD1 dans la régulation des voies ERK1/2-RSK2-CREB et mTOR/p70S6K	120
2. Rôle de PLD1 dans la régulation développement de l'arborisation dendritique	121
3. Rôle de PLD1 dans la maturation des épines dendritique	122
III. Un lien potentiel entre PLD1 et ERK1/2 lors l'arrimage vésiculaire et l'exocytose	123
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	125
ANNEXES	128
I. Article 3	128
The V-ATPase membrane domain is a sensor of granular pH that controls the exocytotic machinery.....	128
II. Revue 1.....	128
The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 and neurosecretion...	128
III. Revue 2.....	128
LIPIDS IN REGULATED EXOCYTOSIS: WHAT ARE THEY DOING?	128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	129

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Développement in vivo des neurones corticaux.	13
Figure 2: Les différentes étapes du développement neuronal in vitro.	15
Figure 3: Structure et organisation du cytosquelette au sein du cône de croissance.	18
Figure 4: Illustration des différentes étapes de la progression du cône de croissance.	22
Figure 5: Image en microscopie électronique d'un cône de croissance de la corde spinale du rat en culture.	25
Figure 6: Représentation schématique de protéines majeures de l'exocytose et de la structure du complexe SNARE neuronal.	30
Figure 7: L'exocytose des vésicules de stockage de Glut4 (GSV).	32
Figure 8: Représentation schématique de la fusion membranaire induite par le complexe SNARE.	33
Figure 9: La géométrie des lipides et leur fonction dans la formation du pore de fusion.	37
Figure 10: Les principales voies d'endocytose.	38
Figure 11: Les étapes de la CME .	39
Figure 12: Les voies de signalisation induites par BDNF/TrKB.	42
Figure 13: La régulation des fonctions neuronales par les mécanismes de signalisation du NGF.	43
Figure 14: Représentation schématique du rôle majeur du système endosomal.	44
Figure 15: Le système endosome / lysosome ou endolysosomal.	46
Figure 16: Illustration de la morphologie générale d'une épine mature ainsi que l'organisation du cytosquelette dans cette structure.	49
Figure 17: les différentes morphologies d'une épine dendritique.	50
Figure 18: Illustration des différentes étapes de formation d'une épine mature.	52
Figure 19: Structure primaire de la PLD1	60
Figure 20: Modèle de la structure du domaine PX de la PLD1.	63
Figure 21: Alignement du domaine PX de PLD.	64
Figure 22: Modèle proposé de la régulation de PLD1 par Arf6 et ARNO lors d'exocytose.	77
Figure 23: Modèle proposé pour le rôle fusiogénique du PA lors de l'exocytose.	79
Figure 24: Modèle de la régulation de l'expression de PLD1 via les voies de signalisation MAPK et PI3K-NFkB sous le contrôle de PA.	81
Figure 25: Expression de la PLD1 dans l'hippocampe de rat au cours du développement.	83
Figure 26: Stratégie de génération de la souris Pld1-/-.	86
Figure 27: Expression de la PLD1 dans le cortex au cours du développement embryonnaire.	89

Figure 28: Expression de PLD1 et de RSK2 au cours du développement des neurones corticaux en culture.	89
Figure 29: Réduction de la croissance neuritique induite par le NGF des cellules PC12 traitées par des inhibiteurs de PLD ou de RSK.	91
Figure 30: Organisation des microtubules au niveau des cônes de croissance des neurones Pld1+/+ et Pld1-/-.	92
Figure 31: Régulation de l'activité PLD par le BDNF.	95
Figure 32: Implication de la PLD1 dans le maintien de la phosphorylation d'ERK1/2 induite par le BDNF.	97
Figure 33: Implication de la PLD1 dans la phosphorylation de RSK2 induite par le BDNF.	97
Figure 34: Implication de la PLD1 dans la régulation de l'activité de CREB et mTOR.	98
Figure 35: Réduction du taux de phospho-ERK1/2 cytosolique et de phospho-CREB nucléaire des neurones traités par le BDNF en absence de la PLD1.	99
Figure 36: Augmentation de taux de phospho-ERK1/2 dans les neurones surexprimant PLD1-GFP.	100
Figure 37: Augmentation du taux de phospho-CREB nucléaire dans les neurones surexprimant PLD1-GFP.	102
Figure 38: Augmentation de l'activation de la voie MAPK (ERK1/2-RSK2-CREB) dans les cellules PC12 surexprimants PLD1-GFP et traitées par le NGF.	103
Figure 39: Réduction de phospho-CREB nucléaire induite par NGF dans les cellules PC12 surexprimants Spo20-GFP.	104
Figure 40: Colocalisation vésiculaire partielle entre PLD1-GFP, phospho-ERK1/2 et HA-RSK2.	105
Figure 41: Représentation des principaux domaines de PEA15, ainsi que des sites de liaison d'ERK1/2, de PLD1 et de RSK2.	105
Figure 42: Le BDNF induit la formation d'un complexe protéique contenant ERK1/2, RSK2, PLD1 et PEA15.	106
Figure 43: Localisation endosomale de PLD1-GFP.	107
Figure 44: Localisation endosomale de PLD1, d'ERK1/2, RSK2 et de PEA15.	108
Figure 45: Colocalisation membranaire et endosomale de PLD1-GFP et de phospho-ERK1/2 induite par le NGF.	109
Figure 46: Réduction de nombre des vésicules arrimées à la membrane plasmique en absence de PLD1.	124
Figure 47: Modèle de l'implication de la PLD1 dans le développement neuronal.	125
Figure 48: PLD1, un centre organisateur des voies impliquées dans le développement neuronal.	126

LISTE DES ABBREVIATIONS

LISTE DES ABBREVIATIONS

AA	Acide aminé
Actine-F	Actine filamenteuse
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AG	Acide gras
AKT	Proteine Kinase B
AMPA	2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-yl)
AMPK	AMP-activated pretein kinase
ANTH	AP180 N-Terminal Homology domain
AP1	Adaptator protein 1
AP180	Synaptosomal-associated protein, 91kDa
APP	Amyloid precursor protein
APPL1	Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1
Arf6	ADP-ribosylation factor 6
Arg	Argenine
ARN	Acide ribonucléique
ARNO	ARF nucleotide-binding site opener
Arp2/3	Actin Related Protein 2/3 Complex
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATP	Adenosine triphosphate
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bFGF	Fibroblast growth factor 2 (basic)
BI-D1870	2-[(3,5-difluoro-4-hydroxyphenyl)amino]-7-8-dihydro-5,7dimethyl-8(3-methylbutyl)-6(5H)-pteridone
βPIX	Pak-interacting exchange facto
C2A, C2B	Calcium domain A/B
Cay93	N-[(1S)-2-[4-(5-Chloro-2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-piperidiny]-1-methylethyl-2-naphthalenecarboxamide
CBD	Calmoduline binding doamin
CCP	Clathrin-coated pits
CCV	Clathrin-coated vesicles
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CDP138	Cell division cycle 42
CLS	Coffin-Lowry syndrom
CME	Clathrin mediated endocytosis
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
COP	Coatomer protein
CREB	cAMP responsive element binding protein
CRI-IV	Conserved region I-IV
Cys	Cysteine
DAG	Diacylglycerol
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma
DIV	Day in vitro
Dock2	Dedicator of cytokinesis 2
E14-18	Embryonic day

EAAC1	Excitatory amino-acid carrier 1
EE	Early endosome
EEA1	Early endosome antigen 1
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ENTH	Epsin N-terminal homology domain
Eps15	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15
ERK1/2	Extracellular Signal-Related Kinase 1/2
FAK	Focal Adhesion Kinase-Related
FCHo	FCH Domain Only Protein
FIPI	N-[2-[4-(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-piperidinyl]ethyl]-5-fluoro-1H-indole-2-carboxamide
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
FRB	FKBP12-Rapamycin Binding
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GAP	GTPase activiting protein
GAP43	Growth associated protein 43
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDP	Guanisine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GGA	Golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein
GKAP	Guanylate kinase-associated protein
GluR1	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1
Glut-4	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4
GM130	Golgin A2
GSV	Glut-4 storage vesicle
GTP	Guanisine triphosphate
H3	Histone 3
His	Histidine
Hsc70	Hsp90-Organizing Protein
I-BAR	inverse-BAR
IGF-1	Insulin growth factor-1
Kb	kilobase
Kcat	Constant catalytique
kDa	Kilodalton
KSR	Kinase suppressor of ras 1
L1	L1 cell adhesion molecule
LC3	Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Gamma
LE	Late endosome
LP	Leading process
LPAT	Lysophosphatidic acid acyltransferase
LPC	Lysophosphatidylcholine
LTD	Long terme depression
LTP	Long terme potentiation
Lys	Lysine
MAGUK	Membrane-associated guanylate kinase
MAP2	Microtubule-associated protein 2
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MT	Microtubules
mTOR	Mammalian target of rapamycin (serine/threonine kinase)
mTORC1/2	mTOR complex 1/2
Munc	Mammalian uncoordinated
MVB	Multivesicular body
N3/4	Neurotrophin 3/4
nAChR	Cholinergic receptor, nicotinic
NFκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NGF	Nueronal growth factor
NMDA	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate
NR1	N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
OPHN1	Oliophrenin-1
P0	Postnatale 0
p70-S6K ou S6K	Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide
P75 ^{NTR}	Nerve growth factor receptor
PA	Acide phosphatidique
PAK1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanamine
PEA15	Proein enriched in astrocyte 15
PH domain	Pleckstrin homology domain
Phe	Phenalanine
PI	Phosphoinositides
PI3,4,5P3 ou PIP3	Phosphoinositide 3,4,5 triphosphate
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PI3P	Phosphoinositide 3 phosphate
PI4P5K ou PIP5K	Phosphoinositide-5-kinase
PI5P	Phosphoinositide 5 phosphate
PIP2	Phosphoinositide 4,5 diphosphate
PKC	Protéine kinase C
PKN α/β	Protein kinase N1
PLA ₂	Phospholipase A2
PLC γ	Phospholipase c gamma
PLD1/2	Phospholipase D1/2
PMA	Phorbol myristate acetate
PPV	Plasmalemmal precursor vesicle
PS	Phosphatidylserine
PS1	Prenisilin-1
PX domain	Phox domain
RE	Recycling endosome
REST/NRFS	RE1-Silencing Transcription factor
RGG1/2	Rice heterotrimeric G-protein gamma subunits 1/2
Rheb	Ras homolog enriched in brain
ROCK	Rho-associated protein kinase
RPS6KA3	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3
RSK2	Ribosomal S6 kinase 2
RT-PCR	Reverse trasncriptase-PCR

SCAMP2	Secretory Carrier-Associated Membrane Protein 2
Ser	Serine
SM	Sphingomyline
SNAP25	Synaptosomal-associated protein, 25kDa
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor
SPR	Surface plasmon resonance
STXBP4	Syntaxin binding protein 4
TCR	T cell receptor
TGN	Trans-Golgi-network
Thr	Thréonine
TIRF	Total internal reflection fluorescence
Ti-VAMP	Tetanus neurotoxin insensitive VAMP
TMR	Transmembrane
TP	Trailing process
tPA	Tissu plasmoden activator
TrKA	Tropomyosin-Related Kinase A
TrKB	Tropomyosin-Related Kinase B
Trp	Tryptophane
TUG tether	Tether containing UBX domain for GLUT4
Tyr	Tyrosine
VAMP2	Vesicle associated membrane protein 2
VWF	Von Willebrand factor
VZ	Zone ventriculaire

INTRODUCTION

LE DEVELOPPEMENT NEURONAL

Le développement neuronal

I. Introduction

Le cerveau humain est souvent représenté comme une entité qui contrôle et qui coordonne le fonctionnement des différentes parties de l'organisme et ceci via ses projections vers les différents organes. Ces projections, les nerfs ou le groupe des axones, assurent la communication entre le cerveau et les organes. D'un autre côté, au sein du cerveau les neurones des différentes régions interagissent également entre eux permettant une communication au sein et entre ces régions. Cette communication est médiée par l'activité intrinsèque des neurones qui projettent leurs axones vers ces organes ou vers les neurones cibles. Les neurones communiquent au travers des contacts établis par leurs prolongements. Ces prolongements assurent l'intégration, l'émission et la propagation des signaux électriques. La transmission de l'information d'un neurone à un autre est produite au niveau de la zone de contact entre les deux partenaires. Cette connexion est représentée par un élément structural appelé la synapse. Cette structure est formée par deux éléments morphologiquement et fonctionnellement différents, les éléments pré et postsynaptique, séparés par la fente synaptique. L'élément présynaptique assure, en réponse à un potentiel d'action, la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique par exocytose. Ensuite l'élément postsynaptique intègre l'information déclenchée par la présynapse via l'activation des voies de signalisation cellulaire en amont de récepteurs activés par les neurotransmetteurs. La nature des neurotransmetteurs libérés définit la réponse neuronale, soit excitatrice dans le cas des neurones glutaminergiques ou inhibitrice pour les neurones GABAergiques. L'élément postsynaptique des synapses excitatrices se caractérise par la présence d'une région sous membranaire dense aux électrons : la densité postsynaptique (PSD), où sont ancrés les récepteurs au glutamate postsynaptique (Oswald and Sigrist, 2009). Cette structure est supportée par les épines dendritiques, qui sont des expansions latérales à tête ovoïde reliées aux branches dendritiques. Cette organisation architecturale et fonctionnelle est cruciale pour le bon fonctionnement du système nerveux.

II. Le développement neuronal

Au cours de leur développement, *in vivo* ou *in vitro*, les cellules précurseurs neuroépithéliales subissent plusieurs processus de maturation avant de devenir des neurones fonctionnels (Figure 1). Ces processus permettent à la cellule précurseur d'acquérir tout d'abord une polarisation axone-dendrite et ensuite d'établir des contacts synaptiques ou « synaptogenèse » entre l'élément pré et postsynaptique. Le neurone est composée d'un corps cellulaire ou soma d'où partent deux types de prolongements distincts : i) les dendrites et ses ramifications ou arborisation (considéré comme la partie réceptrice du neurone), ii) L'axone et ses prolongements

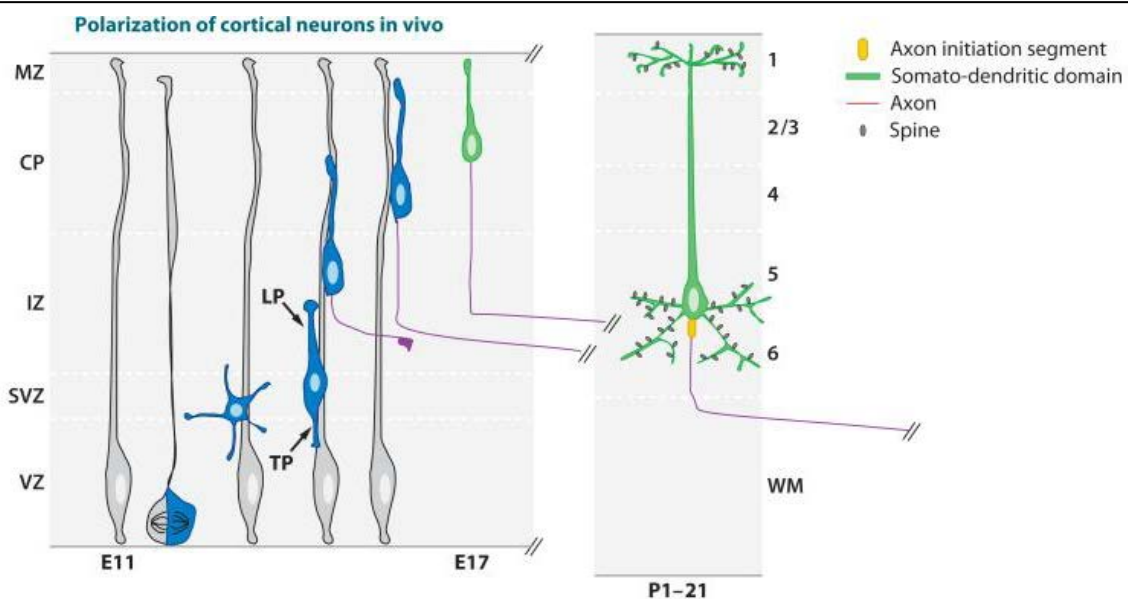


Figure 1: Développement *in vivo* des neurones corticaux. Les neurones émergent à partir de l'épithélium prolifératif couvrant la zone ventriculaire (VZ). A partir de cette zone, les neurones nouveau-nés migrent vers leurs destination finale selon deux modes, soit radiale, selon une trajectoire perpendiculaire à la VZ grâce aux fibres des cellules gliales radiales, ou tangentielle, selon une trajectoire parallèle à la VZ. Durant cette migration, les neurones peuvent alterner entre les deux modes de migration. Dans le cortex, les neurones pyramidaux suivent une migration radiale alors que les neurones GABAergique ou les interneurons suivent une longue migration tangentielle. Le neurone pyramidal présente une locomotion en 3 étapes synchronisées. Au début la cellule forme un front de migration ou *Leading processes* (LP), ressemblant au cône de croissance et qui explore le microenvironnement, puis le noyau transloque vers ce front « Nucléokinèse » et le processus se termine par la rétraction de l'arrière de la cellule ou *trailing process* (TP), qui produit le mouvement de la cellule. Durant leur migration ces cellules se polarisent pour former leurs futurs axones et dendrites.

ou ramifications latérales nommées collatérales représentant la partie qui transmet le signal vers une autre cellule. Ces deux structures cellulaires jouent un rôle fondamental dans les fonctions neuronales puisqu'elles permettent l'intégration et la

transmission du signal électrique. L'établissement de la polarité neuronale est étroitement lié à des modifications du cytosquelette constitué d'actine, de microtubules (MT) et des filaments intermédiaires. L'augmentation de la taille de la cellule nécessaire à ce développement est accompagnée par un apport membranaire important à la surface cellulaire qui est assuré par les voies du trafic membranaire intracellulaire.

Les dendrites et l'axone sont différents l'un de l'autre par leur morphologie, la composition en protéines et organelles, la structure du cytosquelette et leur fonction. En effet, les dendrites sont fonctionnellement spécialisées dans la réception du signal alors que l'axone assure sa transmission et sa propagation via la libération des neurotransmetteurs. Morphologiquement, l'axone est typiquement long et mince avec un diamètre uniforme alors que les dendrites sont plus courtes et plus épaisses et leurs diamètres s'amenuisent au fur et à mesure qu'ils s'éloignent du soma. Ultrastructuralement, les dendrites contiennent des ribosomes, du réticulum endoplasmique et le complexe golgien, alors que l'axone est dépourvu de ces structures (Craig and Banker, 1994). Ces deux extensions diffèrent aussi par les protéines associées aux MT, qui les stabilisent et assurent leurs assemblages. L'axone contient la protéine Tau, alors que les dendrites contiennent MAP2 (Microtubule-associated protein 2, (Goedert et al., 1991). Les dendrites matures ont des MT orientés dans les deux sens, alors que dans l'axone, l'extrémité (+) des MT est orientée vers la membrane plasmique d'où le sens de la croissance axonale (Balaratnasingam et al., 2011). La phosphoprotéine GAP-43 par exemple est localisée, au cours du développement neuronal, dans l'axone et dans son cône et pas dans les dendrites (Goslin et al., 1988).

1. Chronologie de l'établissement de la polarité des neurones en culture

Dotti et al., (1988) ont rapporté pour la première fois la chronologie des changements morphologiques et de la polarisation des neurones d'hippocampe en culture. Ils ont montré qu'au cours de leur développement les neurones de l'hippocampe en culture passent par cinq stades majeurs de développement pendant lesquels ils acquièrent leurs morphologies finales pour aboutir à leurs maturations fonctionnelles (Figure 2).

Ainsi, peu après la mise en culture, les cellules commencent à développer des lamellipodes autour du corps cellulaire (Stade 1). La deuxième phase de développement est marquée par la perte des lamellipodes et la formation des neurites (Stade 2), qui contiennent un réseau de microtubules orientés parallèlement, alors que les lamellipodes contiennent majoritairement des filaments d'actine et parfois des microtubules non orientés. Après 1 à 2 jours en culture (DIV), la majorité des cellules présentent une morphologie asymétrique caractérisée par un seul et un long prolongement ou axone qui fait en moyenne entre 80-100 μm de longueur et plusieurs prolongements (en moyenne 4,9 prolongements) plus courts que l'axone (Stade 3). A ce stade, ces prolongements courts ou dendrites mesurent en moyenne 10-15 μm de longueur (Dotti et al., 1988). Au bout de 7 DIV, l'axone mesure environ 300 μm et émet des ramifications. En revanche, les dendrites qui commencent à s'allonger à partir de 5 DIV, font en moyenne 75 μm à 7 DIV (Stade 4). Au cours des 4 premiers jours de culture, l'axone s'accroît 5 fois plus rapidement que les dendrites (60 $\mu\text{m}/\text{jour}$; Dotti et al., 1988). Le stade 5 n'implique pas un changement de la polarité, mais il représente la maturation continue de l'arborisation axonale et dendritique, incluant le branchement dendritique, la formation des épines dendritiques et la synaptogenèse (Fletcher et al., 1991) (Craig and Banker, 1994).

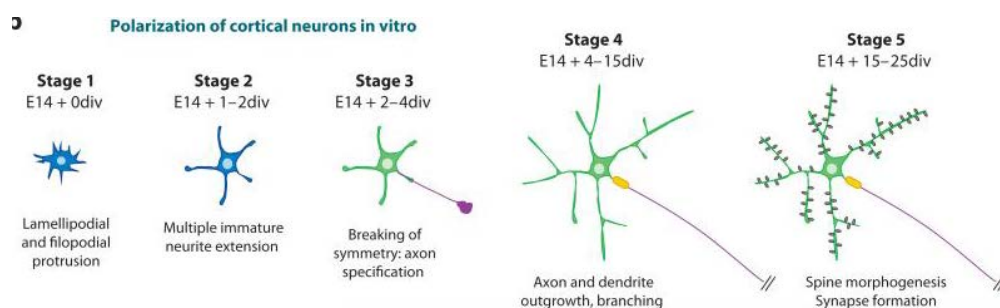


Figure 2: Les différentes étapes du développement neuronal *in vitro*.

2. Bases moléculaires de la croissance neuritique

Au cours de son développement, le neurite alterne entre deux phénomènes dynamiques : l'extension et la rétraction. Ces deux phénomènes sont contrôlés par des signaux extracellulaires positifs et négatifs, respectivement. Ces signaux

diffusent tout au long des neurites pour réguler le comportement des filaments d'actine et des microtubules et influencer le transport des vésicules cargos.

L'extension du neurite est contrôlée par quatre mécanismes : i) l'augmentation de la dynamique des filaments d'actine ii) la stimulation de la formation de microtubules iii) l'augmentation de la surface de la membrane plasmique par le recrutement et la fusion de vésicule avec la membrane plasmique iv) l'augmentation locale des molécules de la signalisation cellulaire et de leurs récepteurs.

La rétraction fait elle aussi appel aux mécanismes qui régulent la dynamique du cytosquelette et le trafic au niveau de la membrane plasmique, principalement via l'internalisation de la membrane par endocytose. Ces processus se déroulent essentiellement au niveau du cône de croissance. Cette structure est le site actif du recyclage membranaire (Diefenbach et al., 1999), et elle joue un rôle central dans le guidage axonal (Mueller, 1999).

3. Le cône de croissance

Le cône de croissance a été décrit pour la première fois par Ramon Y Cajal en 1890 comme « Une concentration du protoplasme sous une forme canonique dotée d'un mouvement amiboïde. D'un point de vue fonctionnelle, il peut être considéré comme une sorte de béliet 'battering ram', doté d'une sensibilité chimique magnifique, avec des mouvements amiboïdes rapides et avec une certaine force impulsive, grâce à laquelle il est en mesure d'avancer et surmonter les obstacles rencontrés sur son chemin jusqu'à ce qu'il arrive à sa destination» (Levine and Marcillo, 2008, Levine et al., 2008). En 1907, Ross Harrison a confirmé l'existence de cette structure motile en utilisant pour la première fois des neurones d'embryon de grenouille *R. pipiens in vivo*. Il a décrit le développement neuronal comme suit : Les expériences ont montré que le développement d'un neurone est basé sur deux phénomènes : i) La formation du nerf primitif via l'extension du protoplasme neuroblastique en filament, ii) La formation des « neurofibrillae » ou cytosquelette dans ces filaments (Keshishian, 2004). Avec les connaissances et les techniques dont nous disposons aujourd'hui, l'acuité de ces premières observations ne laisse pas de nous surprendre.

Le cône de croissance est donc cette structure amiboïde située au bout de l'axone en croissance et qui est spécialisé dans l'élongation et le guidage du neurite, de l'axone ou de la dendrite en croissance. Les cônes de croissance de l'axone et des dendrites se ressemblent morphologiquement et fonctionnellement, à l'exception de la présence des polyribosomes dans le cas des dendrites (Miller and Peters, 1981, Miller, 1988).

Le cône de croissance est capable d'explorer son entourage et de répondre à des signaux environnementaux variés. Il est responsable de la génération des forces, grâce au remodelage de son cytosquelette, nécessaires à sa progression et donc à l'élongation axonale (Lamoureux et al., 1997). Il contient principalement deux composants du cytosquelette, les filaments d'actine ou actine-F et le microtubules (MT) (Dent and Gertler, 2003). La grande dynamique de cette structure et le décodage des informations extracellulaires lui permettent de trouver son chemin et sa cible avec une précision impressionnante. Ce sont les molécules d'adhésion qui assurent le guidage du cône. Ces molécules peuvent être présentées soit par les cellules avoisinantes, comme les molécules transmembranaires d'adhésion cellulaire ou CAM (Maness and Schachner, 2007) ou par la matrice extracellulaire, comme les laminines et les fibronectines (Evans et al., 2007). En fait, ces molécules fournissent la surface nécessaire pour l'adhésion des récepteurs du cône et elles activent aussi la signalisation cellulaire utilisée par la machinerie du guidage axonal. D'autres molécules inhibent l'adhésion du cône induisant ainsi sa rétraction, comme les éphrines par exemple (Guan and Rao, 2003).

3.1. Structure du cône de croissance

Le cône consiste en un prolongement protoplasmique contenant la majorité des organelles et des régions périphériques minces et motiles. Ces extensions périphériques peuvent prendre soit i) la forme de filopodes qui sont des structures longues et fines ressemblant à des projections minces sous forme de doigts, ou ii) la forme des lamellipodes qui correspondent à de larges extensions membranaires. Ces deux extensions sont riches en filament d'actine. Les filaments d'actine forment un réseau polygonal complexe directement en dessous de l'ensemble de la membrane plasmique du cône de croissance et ils représentent pratiquement le seul

constituant des filopodes et des lamellipodes (Bunge, 1973, Yamada and Wessells, 1973). La dynamique de ces deux structures est assurée par un flux de filaments d'actine et des protéines associées (Bray and Chapman, 1985).

La distribution différentielle de ces deux composants majeurs du cytosquelette au sein du cône permet de définir ou distinguer trois régions différentes. En effet, le cône de croissance est caractérisé par un domaine central (C) riche en microtubules (MT), un autre domaine périphérique (P) constitué de lamellipodes et de filopodes et qui est riche en filaments d'actine, et pour finir une zone dite de transition (T) qui est située entre ces deux domaines (Figure 3).

En plus de son cytosquelette, le cône de croissance contient différentes structures membranaires comme le réticulum irrégulier, des vésicules claires, des vacuoles, des vésicules recouvertes, des vésicules à cœur dense, des mitochondries et des structures lysosomales (Tennyson, 1970) (Del Cerro et al., 1968).

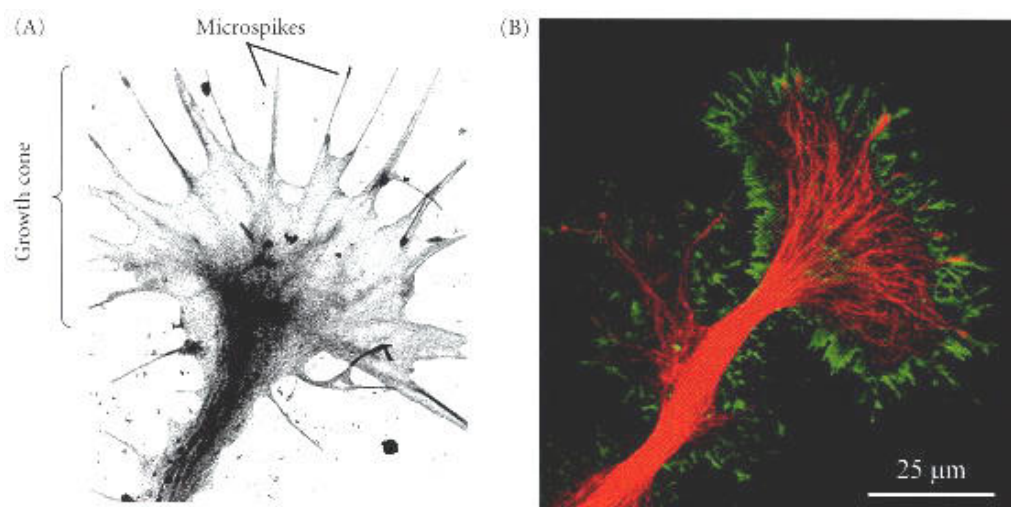


Figure 3: Structure et organisation du cytosquelette au sein du cône de croissance.
L'actine est en vert et les microtubules en rouge.

3.2. Organisation et dynamique du cytosquelette au sein du cône de croissance

Pour sa mobilité, le cône de croissance engage son cytosquelette en réponse aux signaux extracellulaires. Ces signaux agissent sur la dynamique des microtubules et de l'actine au niveau du cône. La polymérisation de l'actine et des microtubules est

indispensable pour la croissance neuritique et le guidage du cône de croissance (Letourneau and Ressler, 1984, Lowery and Van Vactor, 2009). Certaines études ont montré que la dépolymérisation des microtubules, par la colchicine, n'affecte pas immédiatement les filopodes mais induit une rétraction de l'axone (Yamada and Wessells, 1971). En revanche, la dépolymérisation de l'actine-F, avec la cytochalasine B, induit la rétraction des filopodes du cône et l'arrêt de l'extension axonale (Yamada et al., 1970). Plus tard, d'autres études ont montré que la dépolymérisation de l'actine-F n'affecte pas l'extension axonale, mais en revanche, elle cause une croissance mal orientée (Lafont et al., 1993, Dent and Kalil, 2001). Ceci suggère bien que le cytosquelette d'actine assure la morphologie du cône et son guidage, alors que les microtubules sont essentiels pour la structure de l'axone et son élongation.

3.3. Le cytosquelette d'actine

Il se présente sous forme de microfilament ou filaments d'actine (actine-F pour actine filamenteuse). Ces filaments sont des polymères hélicoïdaux, résultant de la polymérisation de monomères d'actine ou l'actine globulaires (Actine-G). Les neurones contiennent les isoformes non musculaires : l'actine β et γ (Choo and Bray, 1978).

3.4. La dynamique de l'actine

L'actine-F est un polymère polarisé puisqu'il possède une extrémité à croissance rapide (extrémité '+' ou « barbed end) et une extrémité à croissance lente, qui est le siège préférentiel de la perte de monomères d'actine monomérique ou actine-G (extrémité '-' ou pointed end). Les filaments d'actine sont composés de monomères d'actine couplés à l'ATP ou l'ADP. L'hydrolyse de l'ATP en ADP est irréversible et joue un rôle dans le désassemblage des filaments d'actine. La croissance de microfilament d'actine est caractérisée en partie par un mécanisme de tapis roulant (treadmilling) correspondant à l'addition au niveau de l'extrémité (+) de monomères issus de la dépolymérisation de l'extrémité (-). Les monomères actine-ADP sont dissociés lentement au niveau de l'extrémité (-), tandis que les monomères actine-

ATP sont associés au niveau de l'extrémité (+). L'hydrolyse de l'ATP est essentielle pour maintenir le processus de « treadmilling » (Fujiwara et al., 2002). La dynamique de cette structure (polymérisation, stabilité et destruction) est hautement régulée pendant chaque stade de la progression du cône. Dans le cône, l'extrémité (+) est orienté vers la membrane plasmique, alors que l'extrémité (-) est orientée vers la zone de transition T (Dent and Gertler, 2003)

Le cytosquelette d'actine est hautement dynamique dans le domaine périphérique (P) et la zone de transition (T), où il est constamment réorganisé, alors qu'au niveau du domaine central l'actine est plus stable. Les filaments d'actine sont assemblés à l'extrémité distale des filopodes et des lamellipodes. Ils sont transportés d'une manière rétrograde vers la zone (T) où ils sont recyclés et désassemblés (Lin and Forscher, 1995, Schaefer et al., 2002). Ce transport rétrograde vers la zone (T) est assuré par la protéine moteur myosine II. C'est dans cette zone que les molécules de la myosine II forment un arc contractile avec l'actine (Medeiros et al., 2006). Le flux rétrograde de l'actine dans le cône ainsi que la polymérisation en tapis roulant permettent ainsi de fournir la force nécessaire à l'avancée du cône (Burnette et al., 2008).

3.5. Les microtubules

Les microtubules ont des structures protéiques de forme cylindrique polarisées. Ils présentent une extrémité dite « moins » et d'une extrémité dite « plus » orientée vers la périphérie de la cellule. L'extrémité plus est nommée ainsi car elle présente une vitesse d'assemblage des dimères de tubulines plus élevée. Ils sont composés de dimères de tubuline assemblés en un réseau linéaire. Ces dimères de tubuline sont formés d'unités hétérodimériques de tubuline α et β . Ces dimères sont capables de s'autoassocier longitudinalement pour former dans un premier temps un protofilament ; ces derniers s'associant ensuite de manière hélicoïdale pour former un microtubule. L'association de chaque dimère est dépendante de la liaison du GTP (Carlier, 1982). Entre 11-15 protofilaments qui formeront la paroi de MT donnent naissance à une structure tubulaire de 25 nm de diamètre (Ludueno, 1998).

Au niveau du cône de croissance, les MT du domaine P agissent comme des senseurs du guidage, alors que ceux du domaine C sont impliqués dans l'orientation du cône (Gordon-Weeks, 2004). Les MT servent aussi comme un support au transport axonal antérograde et rétrograde rapides.

Pour finir, les MT interagissent aussi avec l'actine. Cette interaction semble contrôler la localisation des MT et leurs dynamiques (Lowery and Van Vactor, 2009, Dent et al., 2011, Suter and Miller, 2011).

4. Mécanismes de la progression du cône

Le cône progresse selon trois stades morphologiquement distincts. Ces stades sont nommés : i) protrusion, ii) engorgement et iii) consolidation (Dent and Gertler, 2003). L'alternance entre ces trois stades supporte l'élongation axonale. La protrusion est produite par l'élongation des filopodes et des lamellipodes, probablement via la polymérisation des filaments d'actine. En effet, les récepteurs membranaires du cône lient les molécules d'adhésion, formant ainsi un complexe agissant comme un embrayage moléculaire (molecular clutch). Ce complexe assure le couplage entre le flux rétrograde d'actine et les récepteurs. Ce couplage stabilise les filaments d'actine et réduit le flux rétrograde d'actine entraînant ainsi une augmentation de l'élongation axonale. Les filopodes semblent être impliqués dans cette étape. En effet, ils fonctionnent comme un point d'attachement au substrat d'adhésion et ils produisent la force nécessaire pour la progression du cône (Chan and Odde, 2008). L'engorgement se produit quand les faisceaux d'actine disparaissent entre le site d'adhésion et le domaine (C). Ensuite, l'arc de l'actine-F dans la zone (T) s'oriente vers le site d'adhésion ou le sens de la croissance, suivie par une invasion des MT du domaine (C) vers le domaine (P) soutenue par l'arc d'actine-F. Cette progression sera consolidée par la formation d'un nouveau segment axonal stabilisé par les MT. En général, l'actine du cône fournit la force nécessaire à sa progression, alors que les MT permettent de stabiliser le cône et de le faire tourner. Les interactions entre les filaments d'actine et les microtubules sont indispensables à la mobilité du cône de croissance (Lowery and Van Vactor, 2009)(Figure 4).

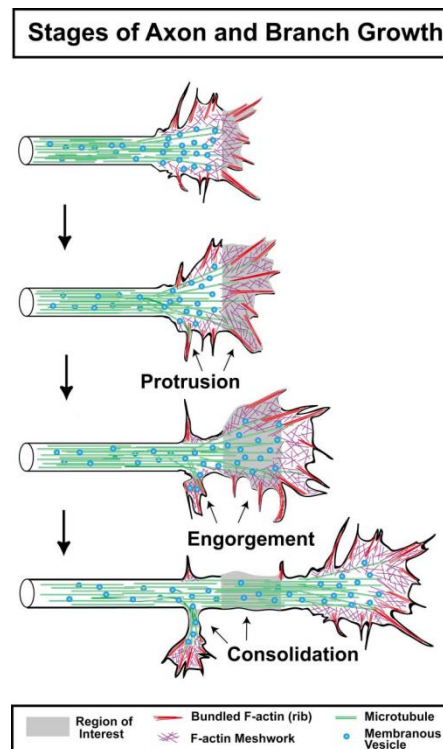


Figure 4: Illustration des différentes étapes de la progression du cône de croissance.

III. La croissance neuritique et le trafic membranaire

Le changement morphologique du neurone au cours de son développement est accompagné par des changements de la surface membranaire assurés par deux mécanismes moléculaires du trafic membranaire différents : l'exocytose et l'endocytose. Ces deux mécanismes sont fortement régulés et assurent un transport intracellulaire directionnel des composants membranaires (Sann et al., 2009). En effet, au cours de sa croissance, l'axone ou le neurite s'étendent sur de longues distances vers leurs cibles synaptiques. L'élongation de l'axone nécessite une augmentation de la surface membranaire supportée par le transport vésiculaire antérograde, du corps cellulaire vers l'extrémité distale du neurite nommée le cône de croissance (Pfenninger et al., 2003, Chernyshova et al., 2011). L'expansion de la surface membranaire de neurite se produit préférentiellement au niveau de ce cône (Sabo and McAllister, 2003). L'exocytose ou la fusion membranaire assure donc l'apport de membrane et ainsi l'expansion de la surface cellulaire qui soutient l'élongation neuritique vers le signal attractif. En revanche, l'endocytose est impliquée dans la rétraction de neurite et le collapse du cône de croissance qui sont accompagnés par une réduction de la surface membranaire suite à l'élimination de

membrane au niveau du cône par l'internalisation de membrane (Fournier et al., 2000, Journey et al., 2002, Kolpak et al., 2009).

En plus de la croissance neuritique, le trafic membranaire joue également un rôle important au cours de la navigation du cône de croissance ou le guidage axonal. Ce guidage est régulé principalement par des signaux calciques contrôlant ainsi plusieurs voies moléculaires et cellulaires, telles que la polymérisation/dépolymérisation de l'actine et le trafic membranaire (Tojima, 2012).

1. Origine des vésicules impliquées dans l'expansion membranaire

L'apport membranaire est assuré par des vésicules, originaire du réseau transgolgien (TGN) nommées les vésicules précurseurs plasmalemmales (PPV). Ces vésicules sont transportées du corps cellulaire vers le cône de croissance grâce aux microtubules (Letourneau et al., 1987). Le transport de ces vésicules semble être régulé puisque les facteurs neurotrophiques, BDNF ou NGF, induisent un transport rapide des vésicules contenant le récepteur à l'IGF vers le cône de croissance des neurones en culture ou des cellules PC12, respectivement (Mascotti et al., 1997) (Pfenninger et al., 2003). L'exocytose et l'intégration de ces PPV est Ca^{2+} dépendante et leurs identités moléculaires sont distinctes de celles des vésicules synaptiques (Lockerbie et al., 1991).

L'implication du trafic membranaire postgolgien dans l'extension neuritique a été démontrée en étudiant l'effet de la Bréfeldine A, toxine fongique qui bloque le trafic postgolgien et qui inhibe la croissance neuritique des neurones hippocampiques en culture (Jareb and Banker, 1997). Pfenninger et al., (2003) ont montré que L'IGF-1 stimule la croissance neuritique via l'intégration des PPV à la membrane plasmique du cône de croissance, alors que le BDNF intervient indirectement dans ce processus par la stimulation de l'accumulation de la sous unité β_{gc} du récepteur à l'IGF à la membrane plasmique du cône de croissance. Ils ont montré également que l'IGF-1 induit son effet via l'activation de la voie PI3K/Akt, puisque l'incubation des neurones d'hippocampe en culture avec un inhibiteur de la PI3K (LY-294002 ou la Wortmannin) inhibe l'intégration des PPV à la membrane plasmique du cône de croissance (Laurino et al., 2005). La PI3K semble intervenir dans ce processus via

l'activation de la Rho-GTPase TC10 et induire ainsi le recrutement du complexe exocyste à la membrane plasmique, via la sous unité Exo70, pour induire *in fine* la formation de l'axone et sa croissance (Dupraz et al., 2009). En accord avec ces résultats, l'implication du complexe exocyste dans la croissance neuritique a été mise en évidence dans d'autres études (Hazuka et al., 1999, Vega and Hsu, 2001) (Murthy et al., 2003). Un autre mécanisme régulant l'exocytose des PPV a été démontré récemment par Cotrufo et al., (2011). En effet, le facteur de chémoattraction Netrin-1 stimule l'exocytose de ces vésicules via l'interaction de son récepteur DCC avec la syntaxine-1 et Ti-VAMP/VAMP7, permettant ainsi au cône de croissance de croître vers sa cible, la source de Netrin-1 (Cotrufo et al., 2011).

2. Identité des vésicules précurseurs plasmalemmales ou PPV

Le fait que la neurotoxine tétanique, qui clive VAMP2, n'affecte pas la croissance neuritique, contrairement aux neurotoxines botuliques A et C, qui clivent respectivement, SNAP25 et les syntaxines 1-4 (Igarashi et al., 1996) (Grosse et al., 1999), suggère que la voie du trafic membranaire impliquée dans la croissance neuritique est différente de celle impliquée dans la neurotransmission. En effet, la syntaxine 3 contrôle la croissance neuritique dans les cellules PC12 stimulées par le NGF et dans les neurones (Darios et al., 2006). D'autre part, ces auteurs ont montré également que le NGF induit l'interaction entre la syntaxine 3 et la SNAP25 ; ce qui permet l'exocytose et l'expansion membranaire (Darios and Davletov, 2006).

D'autres protéines impliquées dans le trafic membranaire ont été identifiées comme régulateurs de la croissance neuritique, notamment la synaptotagmine VII (Arantes and Andrews, 2006), la syntaxine 13 (Hirling et al., 2000), Arf6 et son régulateur ARNO (Hernandez-Deviez et al., 2004) et les protéines Rab (D'Adamo et al., 1998, Nakazawa et al., 2012).

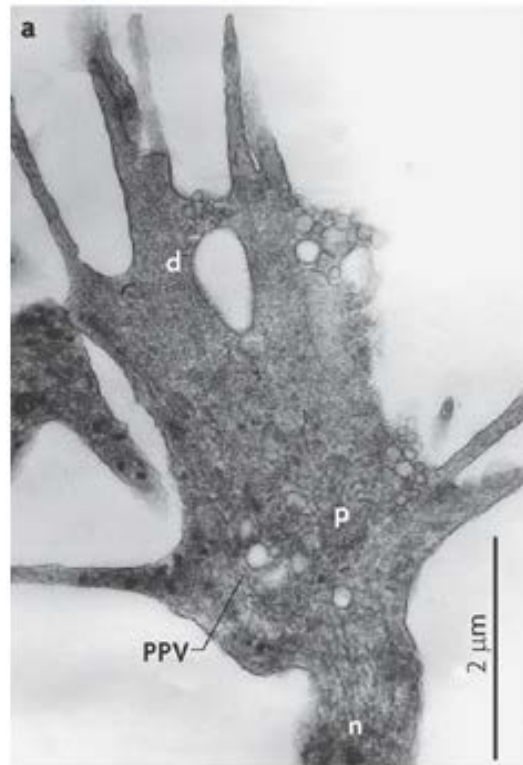


Figure 5: Image en microscopie électronique d'un cône de croissance de la corde spinale du rat en culture. Cette image illustre l'enrichissement de cette structure en vésicules larges, claires et polymorphique, d'un diamètre d'environ 150 nm.

3. Implication de Ti-VAMP ou VAMP7 dans la croissance neuritique

La protéine Ti-VAMP, pour *tetanus toxin insensitive VAMP* ou VAMP7, semble jouer un rôle capital dans la croissance neuritique, en accord avec l'absence d'effet de cette toxine sur ce processus. En effet, les travaux du groupe du Thierry Galli ont montré que la voie du trafic membranaire médiée par Ti-VAMP est essentielle pour la différenciation neuronale et la croissance neuritique des cellules PC12 induite par le NGF ou par la Staurosporine. En effet les travaux de ce groupe ont montré que : i) l'extinction de Ti-VAMP réduit la croissance neuritique de 25% dans les cellules PC12 et inhibe la croissance axonale (Alberts et al., 2003) et ii) la surexpression de Ti-VAMP délétée de son domaine amino-terminal favorise la croissance neuritique et axonale (Martinez-Arca et al., 2001). L'activité de Ti-VAMP semble être inhibée par son domaine amino-terminal « Longin domain » puisque la surexpression de ce domaine inhibe i) la croissance neuritique dans les cellules PC12 stimulées par la Staurosporine (Martinez-Arca et al., 2001) et ii) la différenciation des neurones hypocampiques en culture (Alberts et al., 2003). A noter que l'effet de ce domaine est plus important sur la croissance de l'axone que sur celle des dendrites. De plus, ce

domaine semble être impliqué au cours du développement précoce puisque la surexpression de ce domaine à 1DIV inhibe plus la croissance que s'il est surexprimé à 4DIV. Ti-VAMP est impliquée dans le trafic d'un sous type de vésicules impliquées dans le transport du transporteur de glutamate EAAC1 à la membrane plasmique, mais pas des vésicules impliquées dans le transport de la sous unité GluR1 du récepteur AMPA (Martinez-Arca et al., 2001). Il semble que Ti-VAMP soit aussi impliquée dans le recyclage de la molécule d'adhésion L1 entre la membrane plasmique et les endosomes tardifs, où Ti-VAMP colocalise avec la syntaxine 7 au cours de la croissance (Alberts et al., 2003). L'expression de L1 à la surface cellulaire est essentielle pour la croissance neuritique et l'adhésion (Dahme et al., 1997). L'exocytose des PPVs dépendante de Ti-VAMP est aussi activée par les laminines de la matrice extracellulaire via un mécanisme dépendant de l'activation de FAK, src et du complexe Arp2/3 via les intégrines qui sont des récepteurs d'adhésion cellulaire (Gupton and Gertler, 2010).

Un autre type vésiculaire qui assure l'expansion membranaire a été identifié pour la première fois dans une lignée des cellules PC12 non sécrétrices, exprimant le facteur de transcription REST/NRFS. Cette structure, nommée l'enlargeosome, correspond à des vésicules de petites tailles contenant comme marqueur la protéine v-SNARE, VAMP4 (D'Alessandro et al., 2010, Racchetti et al., 2010, Schulte et al., 2010). L'exocytose de ces vésicules est contrôlé par la RhoGTPase Rac1. En effet, l'activation de la voie Rac1 induit une croissance neuritique rapide, au bout d'une 1 à 2 heures, alors que la voie classique, induite par le NGF, demande au mois 2 jours pour induire la croissance neuritique, suggérant ainsi que Ti-VAMP contrôlerait une croissance classique lente induite par le NGF, alors que VAMP4 contrôlerait une croissance rapide induite par Rac1 (D'Alessandro et al., 2010, Schulte et al., 2010).

4. Biogénèse des vésicules à partir du réseau transgolgien

La naissance de vésicules se fait en général à partir de membrane progressivement recouverte de protéines dite « de manteau ». Trois différents types de protéines de manteau ont été identifiées et caractérisées en détail : COPI, COPII et la clathrine. Les vésicules impliquées dans le transport intra-golgien sont formées par les coatomers COPI et II. COPI est impliqué dans le transport entre le Golgi et le RE et

entre les citernes golgiennes, alors que COPII assure le transport du RE vers le Golgi. L'assemblage du coatomer COPI, formé de sept sous unités $\alpha, \beta, \beta', \gamma, \delta, \epsilon$ et ζ -COP, est assuré par Arf1 (Martinez-Alonso et al., 2013). La PLD1 semble être impliquée dans le bourgeonnement des vésicules à partir de la membrane TGN, d'une manière dépendante d'Arf1 (Chen et al., 1997). Cette implication de PLD1 reflète probablement le recrutement de la sous unité β -COP du complexe COPI par l'acide phosphatidique (PA) produit à la membrane via la PLD1 (Ktistakis et al., 1996).

La clathrine, qui représente la deuxième famille de protéines de manteau, est principalement impliquée dans le bourgeonnement des vésicules à partir de la membrane du TGN et dans l'internalisation/endocytose d'un récepteur et de son ligand à la membrane plasmique (partie détaillée en bas). Les clathrines sont des protéines solubles et leur assemblage nécessite le soutien d'autres protéines : les protéines adaptatrices ou 'Adaptor Protein' (AP). Chez l'homme, il existe 4 AP (1-4), AP2 agit strictement à la membrane plasmique, où il est recruté suite à la synthèse de PIP2 stimulée par Arf6. Le recrutement d'AP2 induit l'assemblage de clathrines à la membrane plasmique nécessaire à l'endocytose (Figure 11). En revanche, AP1, 3 et 4 agissent au niveau du TGN et des endosomes. Arf1 recrute AP1, GGA ou *Golgi-localized-ear-containing ARF-binding proteins* et la clathrine à la membrane transgolgienne (Wenndy, 2011). Le complexe ainsi formé permet l'invagination et la formation de vésicules recouvertes de clathrine ou *Clathrin-Coated Vesicles* (CCV). Ce sont ces vésicules qui seront impliquées dans le transport membranaire du réseau transgolgien vers la membrane plasmique ou le système endo-lysosomal (Lippincott-Schwartz, 2011).

5. Le trafic membranaire du réseau transgolgien vers la membrane plasmique

Le trafic membranaire assure le transport et la communication entre les différents compartiments cellulaires. Ce transport est effectué par l'intermédiaire des vésicules membranaires porteuses ou *Carrier vesicles*. Ce trafic assure la livraison des protéines et des lipides, dans le but de maintenir l'identité des organelles intracellulaires. Le golgi représente le centre stratégique du trafic cellulaire. Il est caractérisé par ces empilements en citernes qui assurent la réception des protéines

cargos du réticulum endoplasmique (RE) et la livraison des constituants membranaires (protéines et lipides), en route vers la membrane plasmique ou le système endo-lysosomal par l'intermédiaire de vésicules. D'une manière générale, la vésicule est formée au niveau du golgi à partir d'un compartiment membranaire donneur avec l'aide d'une machinerie protéique spécialisée. Cette machinerie est formée par des protéines dites protéines de manteau et ses adaptateurs qui assureront l'assemblage de ce complexe protéique (voir chapitre précédent). Le rôle principale de ce complexe est i) d'assurer la détection et la déformation ou l'invagination de la membrane, ii) l'induction de la courbure membranaire, iii) la fission et la formation de la vésicule et à la fin iv) il permettra de spécifier la destination des vésicules. Atteignant sa destination finale, la vésicule fusionnera avec le compartiment receveur. Cette fusion est assurée par une machinerie moléculaire formée essentiellement par la famille des protéines SNAREs et de leurs protéines accessoires (Voir figure 8 et chapitre exocytose). Il est intéressant de noter que plus récemment un rôle des lipides dans l'exocytose de ces vésicules issues du Golgi a été suggéré dans différents types cellulaires et notamment dans les cellules neuroendocrine. Ainsi, des changements dans la composition lipidique au niveau des sites d'exocytose ou d'endocytose ont été mis en évidence (pour revue voir : Ammar et al., 2013b). D'autre part, les lipides peuvent jouer un rôle dans le recrutement de protéines impliquées dans le trafic membranaire ou des protéines de la signalisation (Vitale, 2010).

IV. Mécanismes moléculaires du trafic membranaire

1. L'exocytose

C'est le mécanisme moléculaire utilisé par les cellules pour assurer la fusion entre deux compartiments membranaires. Ce mécanisme nécessite l'intervention de plusieurs protéines, principalement les protéines SNARE et de leurs protéines accessoires, qui représentent la machinerie minimale de l'exocytose (Figure 6 avec l'exemple des SNAREs neuronales). En plus de ces protéines, les lipides membranaires jouent également un rôle déterminant dans ce processus et ceci via leurs capacités à interagir avec certaines protéines et donc à les recruter et/ou les

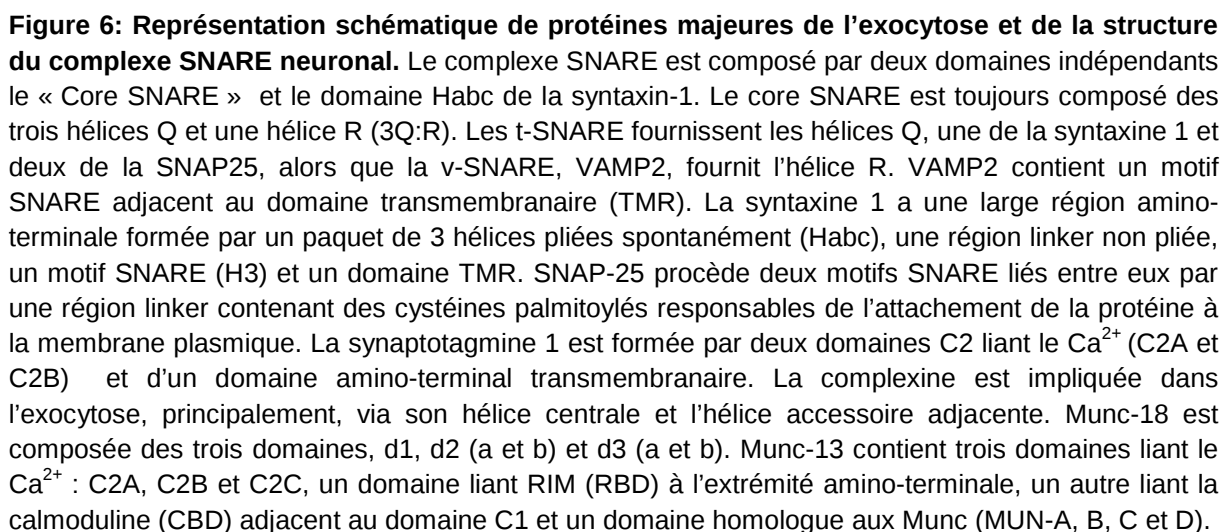
activer mais aussi par leur aptitude à induire des déformations membranaires grâce à leurs propriétés géométriques (Ammar et al., 2013b).

1.1. Les différentes étapes de l'exocytose

Avant de fusionner avec la membrane plasmique, une vésicule subit certaines étapes de maturation au cours desquelles elle acquière les propriétés nécessaires à la fusion membranaire.

1.1.1. L'arrimage des vésicules (Tethering and Docking)

C'est le contact physique initial entre la membrane vésiculaire et la membrane plasmique. Il est important pour la libération rapide de contenu vésiculaire. Ce contact est assuré, essentiellement, par les protéines d'accrochage et les protéines Rab-GTPase. Deux classes de protéines d'accrochage ont été identifiées : les protéines longues possédant des domaines Coiled-Coil et les multi-complexes (exemple : le complexe exocyste). Ces protéines d'accrochage lient les Rab et les protéines SNAREs. L'interaction des vésicules avec les Rab activées assure leur transport tout au long du cytosquelette et facilite ainsi leurs recrutement au niveau des sites d'exocytose (voir l'exemple GLUT4 Figure 7) (Cai et al., 2007, Brocker et al., 2010). L'arrimage des vésicules est également contrôlé par l'actine subcorticale, qui formerait une barrière physique empêchant le premier contact entre la vésicule et la membrane. La destruction de l'actine subcorticale par la latrunculine A augmente l'exocytose dans les cellules chromaffines (Trifaro, 2002) et dans les cellules β pancréatiques (Tomas et al., 2006). Il semble aussi que la protéine accessoire du complexe SNARE Munc-18 agisse sur l'actine subcorticale, pour favoriser l'arrimage des vésicules (Toonen et al., 2006, de Wit, 2010).



Cette étape reflète les processus moléculaires et cellulaires mais aussi membranaire (réorganisation de la composition lipidique de la membrane) qui rendent la vésicule apte à la fusion induite par une stimulation (Klenchin and Martin, 2000). Ces processus impliquent essentiellement les protéines SNAREs et leurs régulateurs :

Munc-18, Munc-13, et la Complexine (Martin, 2003), mais aussi des lipases et des inositol-kinases (Ammar et al., 2013b).

Cette étape est fortement dépendante de l'ATP. En effet, il semble que l'ATP est utilisé par la PIP5-Kinase pour produire le PIP2 au niveau des sites d'exocytose (Hay et al., 1995). De même, l'ATP pourrait être aussi utilisée par NSF dans l'étape nécessaire au désassemblage du complexe SNARE *en cis* converti en SNARE libres ou SNARE *en trans*. Ces molécules SNAREs libres pourront ainsi former un nouveau complexe *cis* (Sugita, 2008).

1.1.3. La fusion membranaire (Triggering)

En fonction du type cellulaire, la fusion membranaire est déclenchée soit par l'augmentation intracellulaire de $[Ca^{2+}]$ (Pang and Sudhof, 2010), d'AMPC (Szaszak et al., 2008), l'activation de protéines kinases (Zeniou-Meyer et al., 2008, Jewell et al., 2011) ou par un changement du potentiel membranaire (Zeniou-Meyer et al., 2007).

Dans les neurones, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]$ intracellulaire est détectée par la synaptotagmine (Segovia et al., 2010) ou Doc-2 (Friedrich et al., 2010), qui vont permettre de déclencher la fusion dépendante des protéines SNAREs. L'énergie nécessaire à la fusion membranaire semble être fournie en partie par le superenroulement des domaines SNAREs (Figure 8). Cette étape est régulée par plusieurs protéines qui agissent directement sur les protéines SNAREs comme Munc-18a (Fisher et al., 2001, Jorgacevski et al., 2011), la Complexine (An et al., 2010) ou d'autres protéines qui affecteront l'ouverture du pore de fusion comme la sous unité V0 de la V-ATPase (El Far and Seagar, 2011).

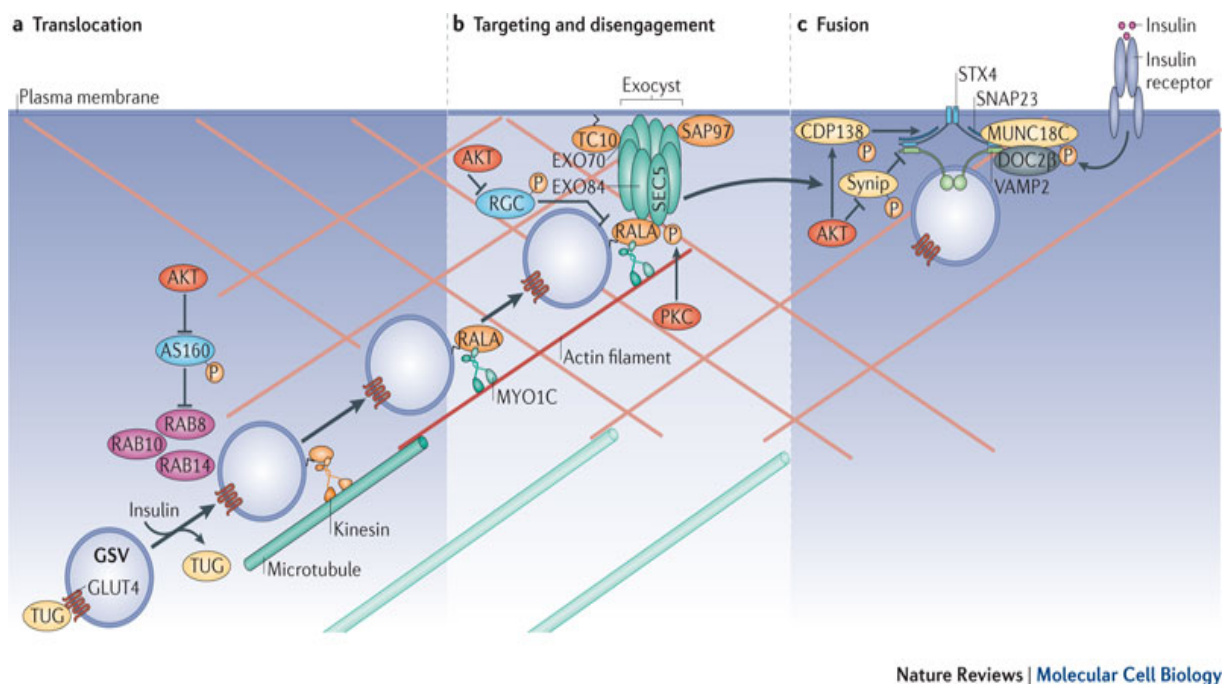


Figure 7: L'exocytose des vésicules de stockage de Glut4 (GSV). En absence d'insuline, la majorité de Glut4 est distribuée entre les endosomes, le réseau transgolgien, les vésicules de stockage de Glut4 (GSV), tandis que moins de 5% se trouve à la membrane plasmique. En réponse à une stimulation à l'insuline, le taux de Glut4 à la membrane plasmique augmente suite à l'exocytose des GSV. Ce processus se passe en trois étapes: i) Translocation de GSV suite à l'activation de la voie PI3K-AKT par le récepteur à l'insuline activé. AKT phosphoryle AS160 et inhibe son activité GAP, ce qui active les protéines Rab8, 10 et 14. L'insuline inhibe aussi l'interaction entre Glut4 et TUG ou *Tether containing UBX domain for Glut4-Ubiquitin like1*, impliquée dans la rétention des GSV à la région périnucléaire via son interaction avec Glut4, permettant ainsi aux GSV d'être transportées à la périphérie cellulaire grâce aux microtubules. Ce transport est facilité par l'interaction entre la protéine moteur MYO1C et la GTPase Ral-A vésiculaire. A la périphérie cellulaire, le mouvement des GSV est contrôlé par l'actine subcorticale. ii) L'attachement de GSV à la membrane plasmique est assurée par le complexe exocyste. En effet, l'insuline stimule l'interaction entre la Rho-GTPase TC10, et la sous unité du complexe exocyste EXO70 favorisant la formation du complexe. L'interaction de GSV avec ce complexe est gouvernée par Sec5 et Ral-A dont l'activité est régulée par RGG1 et RGG2 sous la dépendance d'AKT. Après l'attachement de la vésicule à la membrane plasmique, le désassemblage du complexe exocyste est induit par la phosphorylation de RalA par la PKC. iii) La fusion de GSV avec la membrane plasmique gouvernée par le complexe SNARE comprenant VAMP2, syntaxine 4 et SNAP23. L'assemblage du complexe SNARE est contrôlé par l'insuline. En effet, le récepteur à l'insuline catalyse la phosphorylation de Munc18-C sur les résidus Tyr219/521, favorisant ainsi son interaction avec Doc2β, impliquée dans l'augmentation de la courbure membranaire (Martens, 2010). L'interaction entre Doc2β et Munc-18 empêche ainsi l'inhibition de la syntaxine 4 par la Munc18-C. L'insuline inhibe aussi l'interaction inhibitrice de la syntaxine 4 avec la Synip (STXBP4) et la tomosyne (SYNBP5). AKT phosphoryle et recrute la CDP138 ou *uncharacterized 138 kDa C2 domain-containing phosphoprotein* à la membrane plasmique pour promouvoir la fusion de la GSV (Leto and Saltiel, 2012).

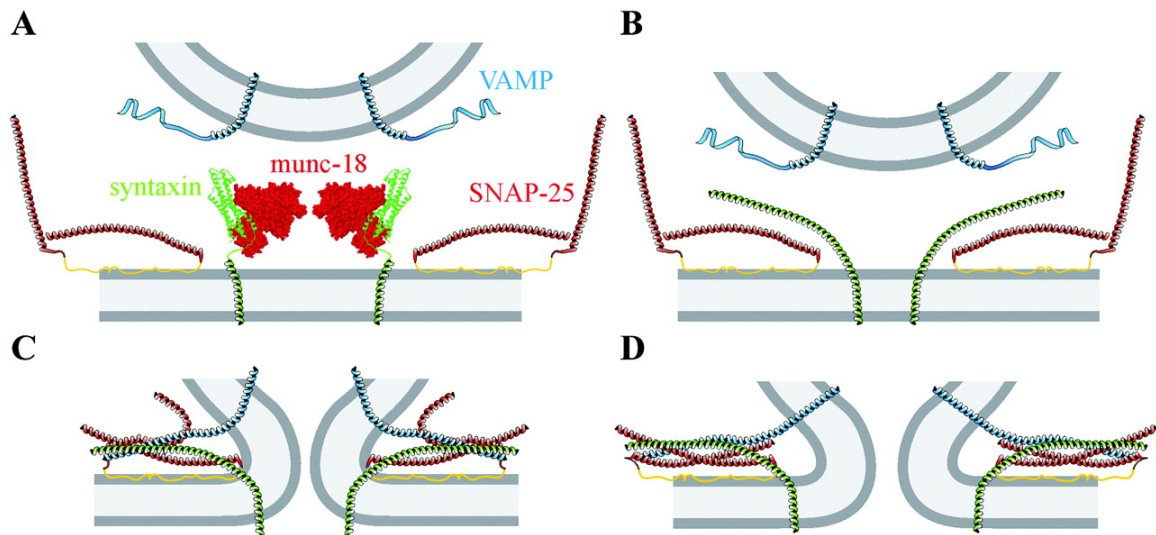


Figure 8: Représentation schématisée de la fusion membranaire induite par le complexe SNARE. Munc-18 lie la syntaxine-1 et masque son site d'interaction avec les autres protéines SNARE (A). La stimulation de l'exocytose induit la dissociation de Munc18 et syntaxine-1. Cette dernière adoptera alors une conformation favorisant l'interaction avec les autres protéines du complexe SNARE, via leurs motifs SNARE formant ainsi un domaine *coiled-coil* (B-C). La formation du complexe SNARE initie le rapprochement des deux membranes et puis la formation du pore de fusion et la fusion membranaire dépendante de l'énergie fournie par ce complexe (C-D).

1.2. Dynamique de la membrane au cours de la formation du pore de fusion

La nature du pore de fusion a été sujet à d'intenses controverses, notamment entre sa nature protéique ou lipidique. La nature purement protéique du pore de fusion, comme cela avait été suggéré par des travaux sur la V-ATPase ne semble plus être soutenue par beaucoup d'arguments expérimentaux. D'un autre côté, l'existence d'un pore de fusion d'un diamètre (d'une conductance) stable pendant plusieurs ms, dans les cellules chromaffines par exemple, soutient un modèle dans lequel des protéines régulent la dynamique du pore sans forcément constituer physiquement le pore lui-même. Il est à noter cependant que les travaux récents du groupe de Montecucco portant sur le mécanisme d'action des neurotoxines laissent entrevoir l'implication d'une rosette de complexe SNARE qui constituerait en partie le pore de fusion (Pantano and Montecucco, 2013).

D'un autre côté, l'implication des lipides dans la dynamique du pore de fusion est supportée par de nombreuses données. En effet, certaines études ont montré qu'il y a un transfert de lipides : i) au cours de l'oscillation ou *flickering* du pore (Monck et al., 1990), ii) avant l'ouverture du pore (Takahashi et al., 2002) et iii) avant la diffusion

des protéines vésiculaires dans la membrane plasmique (Taraska and Almers, 2004). De plus, des études ont montré également que la cinétique de l'exocytose est profondément affectée par la composition lipidique de la membrane (Ammar et al., 2013b).

La fusion membranaire peut être elle-même divisée en trois étapes : i) le contact initial, ii) la formation des intermédiaires d'hémifusion et iii) l'ouverture du pore de fusion (Cohen and Melikyan, 2004, McMahon et al., 2010). Des expériences de simulations moléculaires dynamiques ont suggéré que le processus d'hémifusion et l'ouverture du pore de fusion sont des processus très rapides après l'initiation ou la formation du contact initial, alors que la formation du contact initial prend plus de temps (Fuhrmans et al., 2009).

1.3. L'étape initiale de la fusion membranaire

Le contact initial entre la vésicule et la membrane plasmique pourrait être induit 40-100 ms avant la fusion membranaire (Allersma et al., 2004). Pour que les deux membranes fusionnent, il faut en particulier avoir un contact physique entre elles. En général la distance entre les deux membranes doit être de l'ordre de 2-3 nm pour permettre l'hydratation complète de la bicouche lipidique (Smirnova et al., 2010). Ce rôle est joué par les protéines d'attachement ou *Tethering*, comprenant les protéines Rab, la myosine V, les microtubules et la F-actine (Jahn et al., 2003, Yu and Hughson, 2010, Haucke et al., 2011). Ces différents facteurs assurent la sélectivité de l'événement de fusion. Une autre barrière de sélectivité est représentée par l'actine subcorticale et les protéines membranaires. En effet, 50% de la surface de la membrane plasmique est couverte par des protéines associées à la membrane et le réseau de l'actine subcorticale (Chen et al., 2008, Kusumi et al., 2011) et ceci empêche l'accès des vésicules à la membrane permettant un autre niveau de régulation de l'exocytose et des sites de la fusion, qui doit par nature être limité dans le temps et l'espace.

Un autre facteur qui pourrait affecter la formation du contact initial est la courbure de la membrane vésiculaire. En effet, les vésicules de petite taille, ont une courbure plus

importante que celle de grande taille et forment donc plus rapidement et aisément le contact avec la membrane plasmique (Kasai et al., 2012).

1.4. La formation des intermédiaires d'hémifusion

Suite à la formation du contact initial entre les deux membranes, une connexion lipidique locale entre les monocouches lipidiques proximales est formée à partir du point du contact. Cet intermédiaire de fusion est appelé tige de la fusion ou *stalk intermediate*. C'est à partir de cette tige que se formera le diaphragme et le pore de fusion (McMahon et al., 2010). Le passage par une étape intermédiaire est plus favorable que la fusion directe, car le premier processus consomme moins d'énergie (Chen et al., 2008). La formation de la tige de fusion a été identifiée comme une étape intermédiaire centrale de l'hémifusion. La formation de la tige nécessite une déformation élastique complexe de la bicouche membranaire, y compris leur courbure, l'écartement des chaînes d'acide gras des lipides et leurs inclinaisons en respectant la surface de la membrane (McMahon et al., 2010). Ceci garantit une énergie élastique minimale.

Le stade suivant après la formation de la tige de fusion est l'expansion radiale permettant la formation d'un diaphragme d'hémifusion, qui représente un segment de double couche unique limité par une jonction de trois doubles couches. Comme pour la tige de fusion les bords du diaphragme d'hémifusion sont formés par une bicouche lipidique courbée.

1.5. Notion de la courbure membranaire induite par les lipides lors de la fusion

La bicouche membranaire est caractérisée par une distribution asymétrique des lipides de part et d'autre de la membrane. La majorité des lipides structuraux de la membrane des cellules eucaryotes sont les glycérophospholipides, dont le PA est l'élément de base. Ces glycérophospholipides sont formés par un groupement glycérol, d'un groupement phosphate H_3PO_4 et deux acides gras (AG) caractérisés par une chaîne longue ($\geq 14C$), avec le plus souvent un AG insaturé en position 2.

Par exemple, la membrane synaptique est enrichie en AG insaturés, tel que l'acide arachidonique.

On peut distinguer 4 classes différentes de phospholipides, selon leurs groupements alcool : i) les phosphatidylsérines (PS), ii) les phosphatidyléthanolamines (PE), iii) les phosphatidylcholines (PC) et iv) les phosphatidylinositols (PI). Dans la membrane synaptique on trouve environ 10% PC, 20% PS, 60% PE, 5% PI et 15% de sphingomyélines (SM) (Davletov and Montecucco, 2010). La forme moléculaire ou géométrique des phospholipides au sein de la bicouche lipidique est déterminée par la compatibilité entre la taille de la tête polaire et celle de la queue hydrophobe. Si les deux sont complètement compatibles le phospholipide a une forme cylindrique. Sinon il a une forme conique, quand la queue est plus large que la tête et dans le cas inverse, il a une forme de cône inverse (Voir Figure 9). La PC et la SM sont larges et cylindriques et n'entraînent pas de courbure, alors que la PE, le cholestérol, les acides gras et le PA ont une forme conique qui entraîne une courbure négative de la membrane. En revanche, la LPC et le PIP2 ont une forme conique inverse et favorisent donc une courbure positive.

Selon le modèle de la tige de fusion, la formation de l'intermédiaire d'hémifusion est favorisée par les lipides induisant une courbure négative, alors que les lipides induisant une courbure positive inhibent ce processus (Gaudin, 2000, Chen et al., 2008)). Des données expérimentales renforcent l'idée que la fusion membranaire dépend de la présence de certaines lipides. En effets ces données ont montré que les trois étapes de la formation et l'ouverture du pore de fusion sont facilitées par l'augmentation de la courbure et la tension membranaire. L'ouverture du pore de fusion et sa croissance dépendent énormément de cette tension membranaire, qui est induite par le stress élastique de la courbure membranaire plasmique ou vésiculaire. L'énergie élastique de la courbure de l'intermédiaire d'hémifusion dépend fortement de la forme effective des lipides composant la bicouche membranaire proximale. Ainsi les lipides qui ont une tête polaire relativement petite, ont une forme conique, prédite pour correspondre à la configuration de la tige de fusion (Chernomordik and Kozlov, 2003). En accord avec ce modèle, la PE potentialise l'hémifusion entre les bicouches lipidiques (Chernomordik and Kozlov, 2003). A l'inverse, les molécules avec une tête relativement grande, comme la PC, perturbent

la tige de fusion et le diaphragme d'hémifusion inhibant ainsi l'hémifusion (Chernomordik and Kozlov, 2003). En revanche, la LPC ou d'autres molécules avec une forme en cône inverse favorise la formation du pore de fusion quand ils sont insérés à la bicouche externe (Chernomordik et al., 1997, Grote et al., 2000).

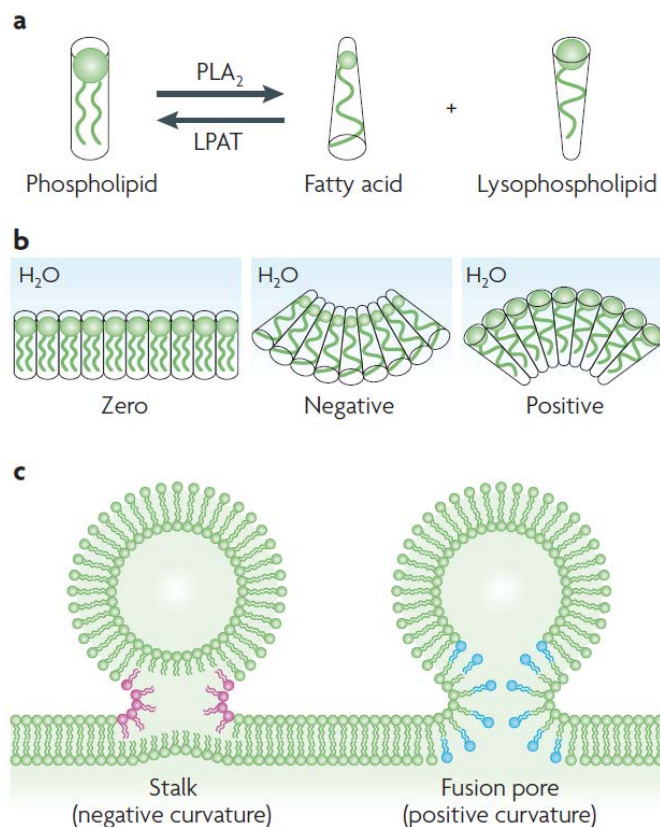


Figure 9: La géométrie des lipides et leur fonction dans la formation du pore de fusion. La phospholipase A2 (PLA₂) convertie les phospholipides en AG conique et en lysophospholipide, de forme conique inverse. En revanche, la *lysophosphatidyl-acyltransferase* (LPAT) catalyse la réaction inverse. (b) Effet de la géométrie de lipides sur la courbure membranaire. Dans un milieu aqueux les lipides cylindriques forment une bicouche plane, alors que les lipides de forme conique ou conique inverse forment une courbure spontanée négative ou positive, respectivement. (c) Implication des lipides dans la fusion membranaire et la formation du pore de fusion. En rouge les phospholipides de forme conique et en bleu ceux de forme conique inverse. La formation de l'intermédiaire de fusion nécessite la formation transitoire d'une monocouche courbée négativement, qui est facilitée par une accumulation locale de lipides coniques, tels que le DAG, le PA et le PE. Ultérieurement, la tige s'élargi pour générer le pore de fusion, ce qui implique la génération d'une monocouche courbée positivement, favorisée par la présence des lipides conique inverse tels que les lysophospholipides et les phosphatidylinositides (Adapté de (Piomelli et al., 2007)).

En résumé, les lipides de forme conique dans la couche interne de la membrane favoriseront une courbure négative et la fusion alors que ceux de forme conique inverse empêcheraient ce phénomène (Figure 9). En revanche, lorsque ces derniers sont dans la membrane externe, ils favoriseront la fusion et l'exocytose. Des

modulations dans le niveau de ces différents lipides semblent avoir lieu au niveau même des sites d'exocytose et elle semblent contrôler notamment par des phospholipases (Ammar et al., 2013b).

2. L'endocytose

L'endocytose représente l'ensemble des processus impliqués dans l'internalisation à l'intérieur de la cellule à partir de la membrane plasmique. Il existe différents types d'endocytose dont l'une est dépendante de la clathrine et d'autres indépendantes de la clathrine, comme l'endocytose dépendante de la cavoline, la macropinocytose et même la phagocytose (Figure 10)(Bohdanowicz et al., 2013).

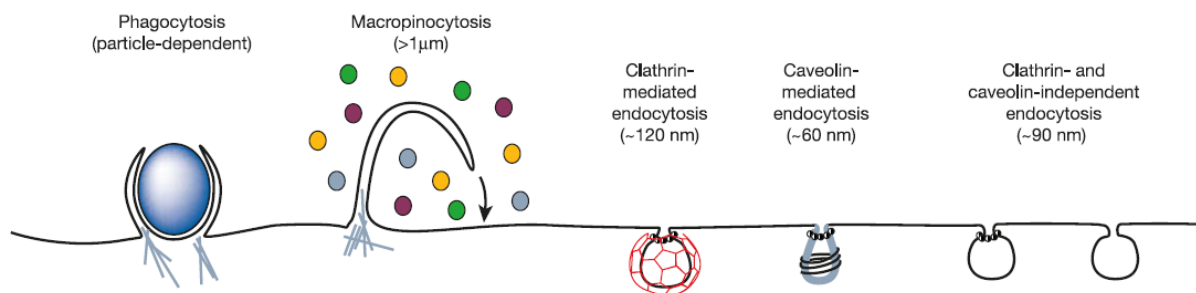


Figure 10: Les principales voies d'endocytose.

Adapté (Conner and Schmid, 2003)

2.1. L'endocytose dépendante de la clathrine ou clathrin-mediated endocytosis (CME)

Ce mécanisme permet l'internalisation d'une variété de composants membranaires. Parmi eux, on retrouve les récepteurs transmembranaires couplés à leurs ligands. La membrane ainsi internalisée est acheminée vers le système endo-lysosomal ou le Golgi. L'invagination/internalisation d'une partie de la membrane plasmique est fortement dépendante du lipide PIP2 (Antonescu et al., 2011) qui est synthétisé par la phosphoinositide 4-phosphate 5 kinase (PI4P5K), elle-même activée par Arf6 (Krauss et al., 2003). La PI4P5K est aussi activée par le PA suggérant que ce lipide puisse également jouer un rôle dans l'endocytose (Jenkins et al., 1994, Antonescu et al., 2010). Cette dépendance au PIP2 est expliquée par le fait que plusieurs protéines impliquées dans la formation des puits recouverts en clathrines ou *Clathrin*-

Coated Pits (CCP) ont un domaine de liaison au PIP2 (Figure 11). On peut citer par exemple, FCHo ou *membrane-sculpting F-BAR domain-containing Fer/Cip4 homology domain-only*, via son domaine F-BAR (Henne et al., 2010), l'epsine et AP180 via leurs domaines ENTH et ANTH, respectivement (Hom et al., 2007), l'endophiline et l'amphiphysine via leurs domaine BAR (Peter et al., 2004) et la dynamine via son domaine PH (Achiriloaie et al., 1999) et AP2 qui lie le PIP2 et la clathrine (Collins et al., 2002).

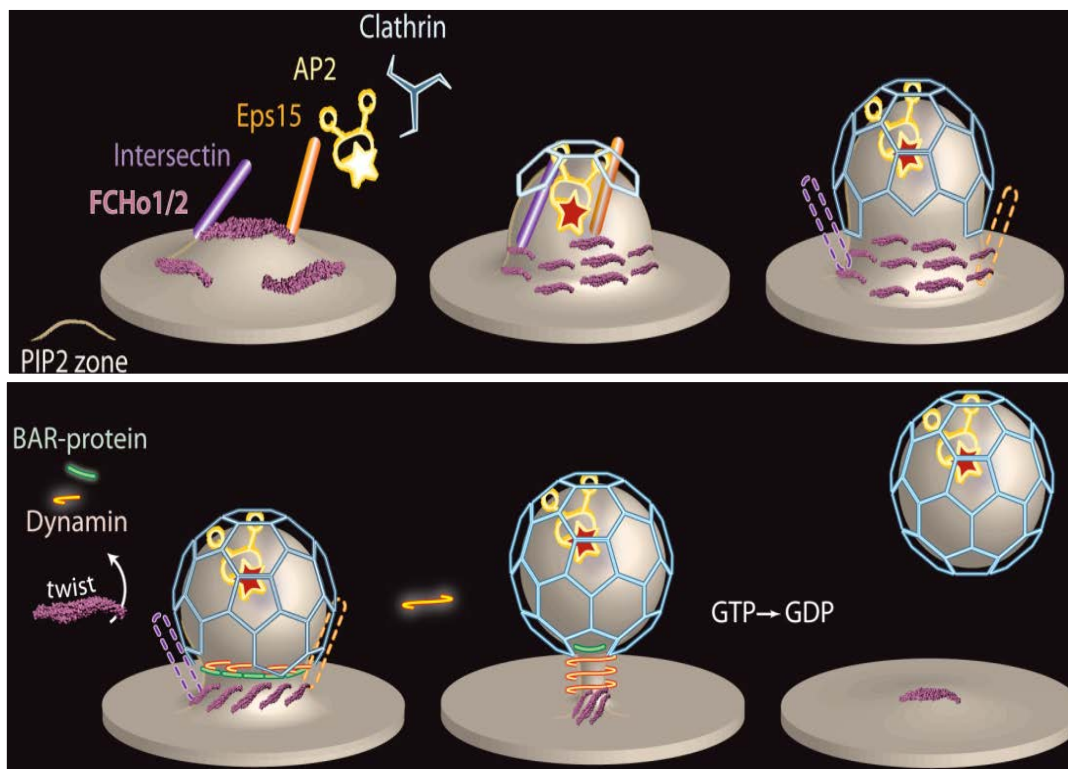


Figure 11: Les étapes de la CME : Nucléation, sélection des cargos, assemblage du manteau, scission et uncoating. Les facteurs de nucléation se lient à la membrane et induisent le bourgeonnement de la partie à internaliser. Les protéines FCHo lient la membrane, grâce aux domaines riches en PIP2, où le puit recouvert de clathrine ou *clathrin-coated pits* (CCP) sera formé. Puis, cette protéine recrute Eps15 et l'intersectine. Ce complexe induira la courbure initiale ou l'invagination. Puis, Eps15 et l'intersectine recrutent AP2, qui à son tour engagera les complexes trimériques de clathrine ou Triskèles. Le réseau de clathrine ainsi formé sert à stabiliser la courbure positive par l'interaction avec des protéines contenant un domaine BAR telles que l'endophiline et l'amphiphysine. Ces protéines recrutent la GTPase dynamine qui induit la scission de la vésicule. Après séparation de la membrane plasmique, la vésicule internalisée se débarrasse de son manteau protéique ou *uncoating* par l'intervention de la protéine ATPase Hsc70 et son cofacteur l'auxiline, alors que la phosphatase synaptojanine 1 permet la libération des protéines adaptateurs via l'hydrolyse de PIP2 (Figure adaptée d'Henne et al., 2010).

2.2. Les autres types d'endocytose

D'autres types d'endocytose outre que celle dépendante de la clathrine ont par la suite été identifiés. On peut citer l'endocytose dépendante de la caveoline, l'endocytose dépendante de la flotilline ou d'Arf6, la phagocytose et la macropinocytose (Figure 10)(Bohdanowicz et al., 2013).

L'endocytose médiée par les caveolines est initiée par la formation de structures en forme de flasque ou *caveolar*. Ces structures sont formées par l'assemblage de caveolines. Ces sont des protéines intégrées à la membrane via une liaison directe au cholestérol membranaire. Il existe trois isoformes : caveoline 1-3 (Kumari et al., 2010). Ce processus est responsable de l'internalisation de divers ligands comme l'albumine, les facteurs de motilité autocrine ou *autocrine motility factor*, les toxines tétanique et cholérique et certains virus (Kumari et al., 2010).

L'endocytose médiée par Arf6 ou la flotilline est indépendante de clathrine et de la dynamine (Naslavsky et al., 2003, Glebov et al., 2006). Le mode d'action de ces deux processus est encore mal connu à ce jour.

La phagocytose est un processus d'internalisation médié par de récepteurs, indépendant de la clathrine et qui nécessite la polymérisation du cytosquelette d'actine, l'activité de la PI3K et les GTPases de la famille Rho et Arf (Flannagan et al., 2012). Il s'agit d'un processus très rapide, initié suite à l'engagement d'un récepteur à la surface cellulaire des cellules spécialisées, telles que les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritique, ou des cellules non spécialisées telles que les fibroblastes ou les cellules épithéliales (Bohdanowicz et al., 2013). L'engagement du récepteur fait suite à l'interaction avec un agent pathogène, un débris cellulaire ou même une particule de latex. Ceci déclenche la signalisation cellulaire qui conduit à la formation de pseudopodes entourant progressivement la particule à internaliser.

La macropinocytose correspond à la formation de vésicules hétérogènes de grande taille (0.2-5 μm) ou macropinosomes. C'est un mécanisme indépendant de clathrine qui est initié par le *ruffling* membranaire. D'une manière générale, la macropinocytose se présente comme des extensions de membrane qui basculent

l'une vers l'autre et qui sont pliées sur la membrane plasmique. Ces extensions fusionnent et créent ainsi une grande vacuole remplie de liquide qui sera internalisée à partir de la surface membranaire.

2.3. L'endocytose compensatrice

Les mesures de capacitance membranaire sur les neurones (Llobet et al., 2011), les cellules chromaffines (Smith and Neher, 1997) ou d'autres cellules endocrines (Eliasson et al., 1996) ont permis de mettre en évidence deux mécanismes d'internalisation membranaire rapides après l'exocytose. Ces processus assurent le maintien d'une surface cellulaire constante (Henkel et al., 2001, Dernick et al., 2003) et le recyclage des composants vésiculaires (Sampo et al., 2003). L'un est nommé « endocytose compensatrice », car elle permet d'internaliser approximativement la même quantité de membrane fusionnée et l'autre nommée « excès de récupération », puisqu'il y a une internalisation de plus de membrane que celle qui a fusionné (Barg and Machado, 2008).

L'internalisation des composants vésiculaires pourrait être rapide ou lent et ceci dépend probablement du type cellulaire et du processus d'endocytose compensatrice impliqué. L'endocytose rapide est indépendante de clathrine, mais elle requière la dynamine 1 (Graham et al., 2002). Cette endocytose rapide peut se dérouler selon les processus dits de « cavi-capture » et de « kiss and run » (Barg and Machado, 2008). En revanche, l'endocytose compensatrice lente fait appel à l'endocytose dépendante de la clathrine (Barg and Machado, 2008).

V. Les neurotrophines : rôle de leur internalisation

Les neurotrophines forment une famille de facteurs neurotrophiques comprenant le NGF ou *Nerve Growth Factor*, le BDNF ou *Brain-Derived neurotrophic Factor* et les NT3 et 4 ou *Neurotrophin3/4*. Cette famille de facteurs neurotrophiques régule différents aspects moléculaires, cellulaires et morphologiques des neurones tels que la différenciation, la survie et la plasticité neuronale (Huang and Reichardt, 2001, Ascano et al., 2012, Harrington and Ginty, 2013). Ces facteurs induisent leurs fonctions via la liaison et l'activation de leurs récepteurs transmembranaires TrK ou

Tropomyosin-related Kinase. Le BDNF lie principalement le TrK-B (Figure 12), alors que le NGF lie le TrK-A. Le BDNF et le NGF lient également le p75^{NTR} ou p75 *neurotrophin receptor* (Rodriguez-Tebar et al., 1990). La transduction de la voie de signalisation via ces récepteurs est différente de celle induite par d'autres facteurs de croissance. En effet, les neurotrophines lient leurs récepteurs appropriés au niveau des terminaisons synaptiques. Puis le complexe récepteur/ligand ainsi formé est transporté vers le corps cellulaire pour induire l'expression de certains gènes (Howe and Mobley, 2005). Ce transport rétrograde est assuré par les endosomes de signalisation ou *Signalling endosomes* (*signalosomes*).

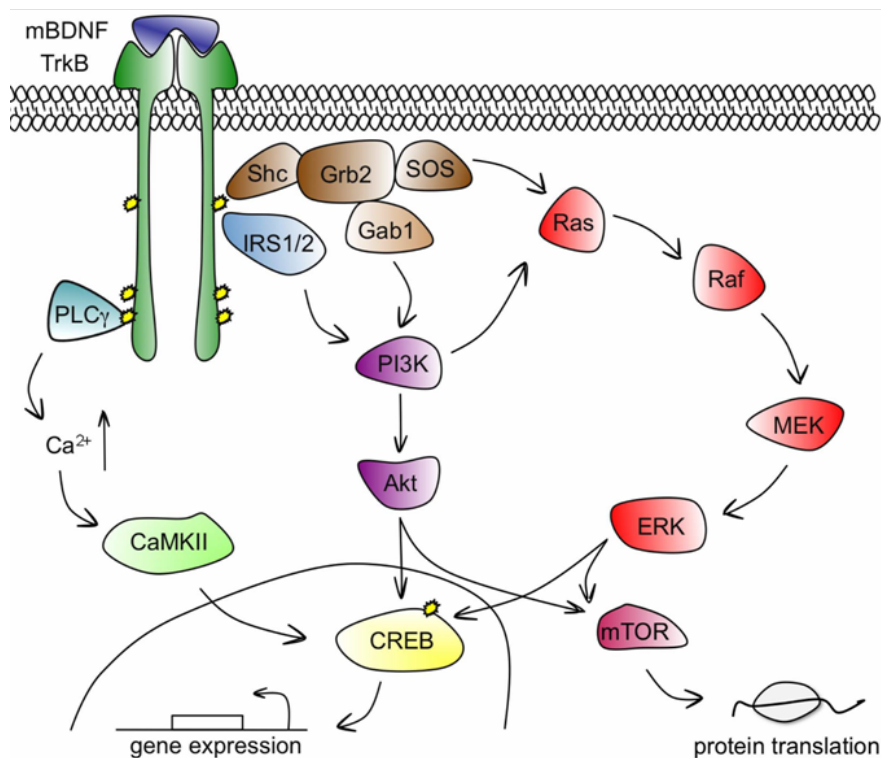


Figure 12: Les voies de signalisation induites par BDNF/TrKB. Les neurotrophines et dans notre cas le BDNF et son récepteur TrKB induisent leurs effets cellulaires via l'activation de trois voies de signalisation différentes, à savoir, PI3K, PLC γ et la voie MAPK (Chao, 2003, Reichardt, 2006).

La propagation de la signalisation induite par les neurotrophines, des terminaisons synaptiques vers le corps cellulaire, est essentielle pour le maintien de l'intégrité du système nerveux au cours de développement (Zweifel et al., 2005). Les neurotrophines agissent localement, au niveau du cône de croissance, régulant ainsi sa motilité et sa croissance, mais ils peuvent agir aussi loin de leur site d'induction, tel qu'au niveau du corps cellulaire, régulant ainsi la survie cellulaire et l'expression

génétique (Thoenen and Barde, 1980). En effet, il a été démontré que les neurotrophines activent la famille de Rho-GTPase qui contrôle l'organisation du cytosquelette et la mobilité du cône de croissance (Yuan et al., 2003). De même, le NGF, transporté de manière rétrograde, induit la phosphorylation de CREB dans le corps cellulaire (Riccio et al., 1997). D'ailleurs CREB est un régulateur connu de l'expression de gènes nécessaires pour la croissance axonale (Lonze and Ginty, 2002) et indispensable à la plasticité synaptique (Figure 13) (Lonze and Ginty, 2002, Ascano et al., 2012).

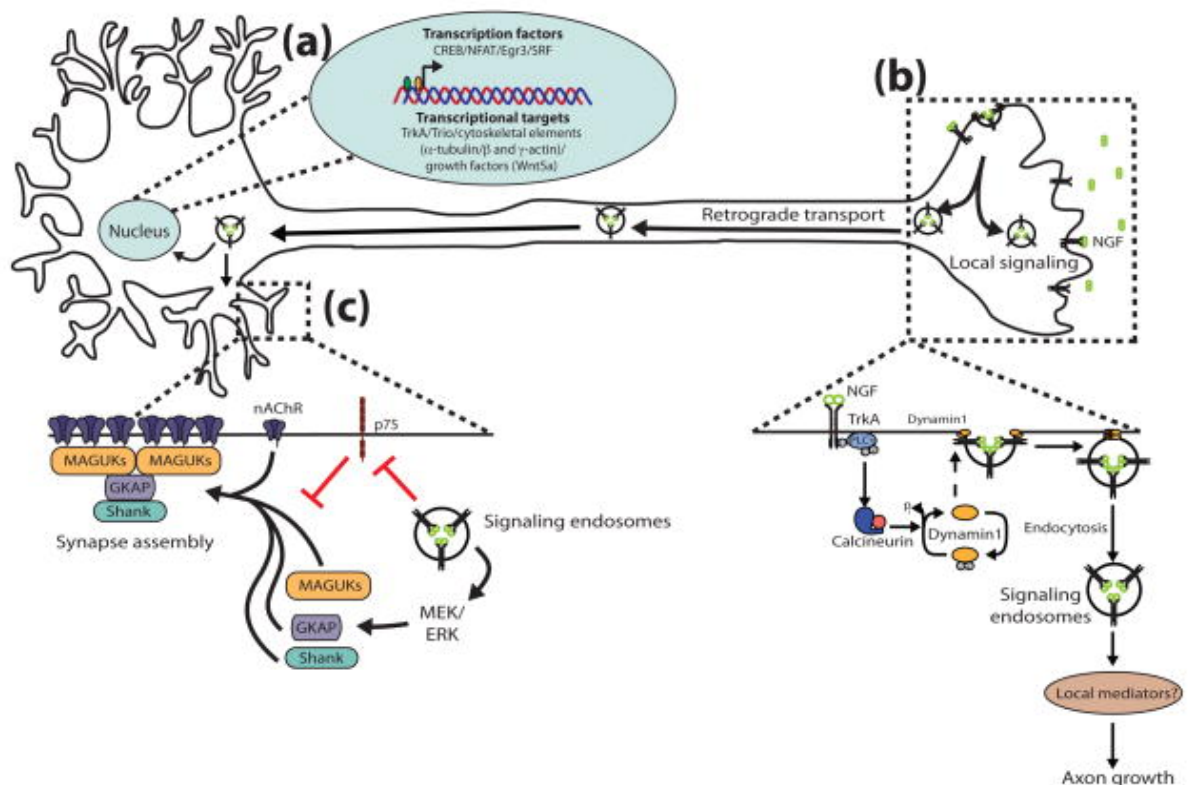


Figure 13: La régulation des fonctions neuronales par les mécanismes de signalisation du NGF. (a) L'action nucléaire du NGF : le signalosome assure le transport rétrograde du complexe TrkA/NGF du cône de croissance vers le soma cellulaire, où le NGF pourrait induire l'expression de gènes cibles essentiels à la croissance axonale et la formation des synapses, via l'activation de facteurs de transcription, tel que CREB. (b) Endocytose et signalisation locale au niveau du cône de croissance induite par le complexe TrkA/NGF. L'interaction du NGF avec son récepteur induit une signalisation locale, par exemple ici l'activation de la Phospholipase C-γ (PLCγ), de la calcineurine et de la dynamine 1. Cette voie de signalisation induit l'internalisation du complexe par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. (c) Le complexe peut aussi agir au niveau des dendrites, où il régule la dynamique du récepteur à l'acétylcholine (nAChR) et ceci via l'induction de la voie MEK/ERK1/2 et l'intervention de composants de la densité postsynaptique, tels que Shank, GKAP et MAGUKs. Adapté (Ascano et al., 2012).

1. Implication du système endolysosomal dans le contrôle de la signalisation des neurotrophines

L'endosome de signalisation contrôle la transduction du signal via deux mécanismes : la dégradation du complexe récepteur/ligand par son passage dans le compartiment lysosomal conduisant à l'atténuation du signal, ou le maintien du complexe dans le compartiment endosomal, assurant ainsi la propagation et le maintien du signal, via un transport dépendant de microtubules (Figure 14).

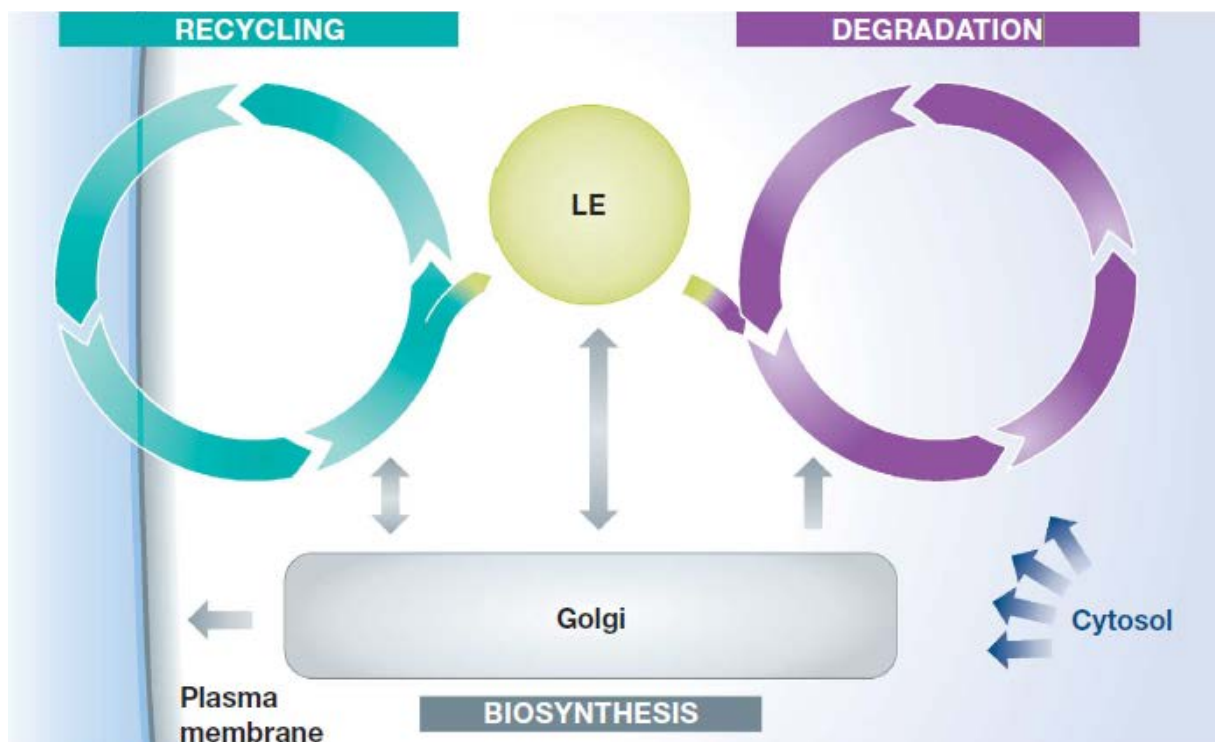


Figure 14: Représentation schématique du rôle majeur du système endosomal. Les composants membranaires originaires de la membrane plasmique ou des organelles cytoplasmiques passent par le système endosomal pour assurer leur tri cellulaire. L'endosome assure le passage soit par : i) la voie de recyclage (*recycling*) permettant le maintien des composants, tel que le récepteur membranaire, ou ii) la voie de dégradation (*degradation*) via la fusion avec les lysosomes.

2. La transmission du signal de la membrane plasmique vers le corps cellulaire

Suite à la formation du complexe neurotrophine/TrK à la membrane plasmique, le complexe est internalisé via l'endocytose clathrine-dépendante (Grimes et al., 1997) ou par endocytose indépendante de la clathrine, tels que l'endocytose à caveoline ou la pinocytose dépendante de la protéine *Pincher* ou *pincher-mediated macropinocytosis* (Beattie et al., 2000, Howe et al., 2001, Valdez et al., 2005). Cette

internalisation du complexe est importante pour apporter le récepteur activé à proximité des compartiments cellulaires autres que la membrane plasmique, comme le noyau pour y induire la transcription de certains gènes (York et al., 2000, Delcroix et al., 2003). Après l'internalisation et au cours de son acheminement, le complexe localisé dans le compartiment endosomal, recrute et active des intermédiaires de signalisation comme la protéine Shc (Delcroix et al., 2003, Ye et al., 2003).

L'internalisation de ce complexe joue un rôle crucial pour induire l'effet des neurotrophines. Par exemple, il a été démontré que l'internalisation du récepteur TrKA est essentielle pour la différenciation des cellules PC12 (Zhang et al., 2000a, Geetha et al., 2005). Ces cellules neuroendocrines expriment à la fois TrKA et p75, et suite à leur stimulation par le NGF, elles se différencient et acquièrent certaines propriétés neuronales comme le développement de neurites et l'expression de différents neurotransmetteurs. En effet, il a été démontré que le NGF induit la différenciation des cellules PC12 par le maintien de l'activité de la voie ERK1/2, à l'inverse de l'EGF qui induit la prolifération accompagnée par l'atténuation rapide de cette voie (Marshall, 1995, Sasagawa et al., 2005). De plus, des études par fractionnement subcellulaire ont montré qu'après stimulation des cellules PC12 ou de neurones par le NGF, TrKA est localisé dans la fraction enrichie en vésicules recouvertes de clathrines (CCV) avec certains composant de la voie ERK1/2, (Howe et al., 2001). Par ailleurs, d'autres études ont montré que le transport vers le compartiment endosomal du complexe neurotrophine/TrK est important pour l'activité prolongée d'ERK1/2 dépendante de Rap1 (York et al., 1998, Hisata et al., 2007). Cette GTPase monomérique est localisée préférentiellement sur les endosomes (Zhang et al., 2000a).

3. La régulation de la voie ERK1/2 par le signalosome

Parmi les voies de signalisation cellulaire, les neurotrophines activent la voie MAPK/ERK (Figure 15). Cette voie joue un rôle important dans le développement neuronal, et notamment dans la croissance neuritique et la formation des synapses, ainsi que dans la plasticité neuronale. Certaines études ont montré l'implication du signalosome dans la dynamique de cette voie. En effet, il a été démontré que : i) la surexpression d'un mutant dominant négatif de Rab7 induit l'accumulation d'endosomes contenant TrKA et potentialise ainsi l'activation d'ERK1/2 et la

croissance neuritique (Saxena et al., 2005), ii) l'inhibition de l'internalisation de TrkA, par la surexpression d'un mutant dominant négatif de la dynamine 1, induit l'atténuation de l'activation d'ERK1/2 et ainsi de la croissance neuritique (Zhang et al., 2000), iii) l'addition de NGF à proximité des extrémités distales axonales, dans une culture compartimentalisée de neurones sympathiques et sensoriels, induit l'activation de CREB nucléaire, ainsi que la survie et la différenciation neuronale (Ye et al., 2003, Kuruvilla et al., 2004). Ceci montre bien l'implication de l'internalisation de TrkA et de l'activation de la voie ERK1/2 durant la croissance neuritique et l'activité neuronale.

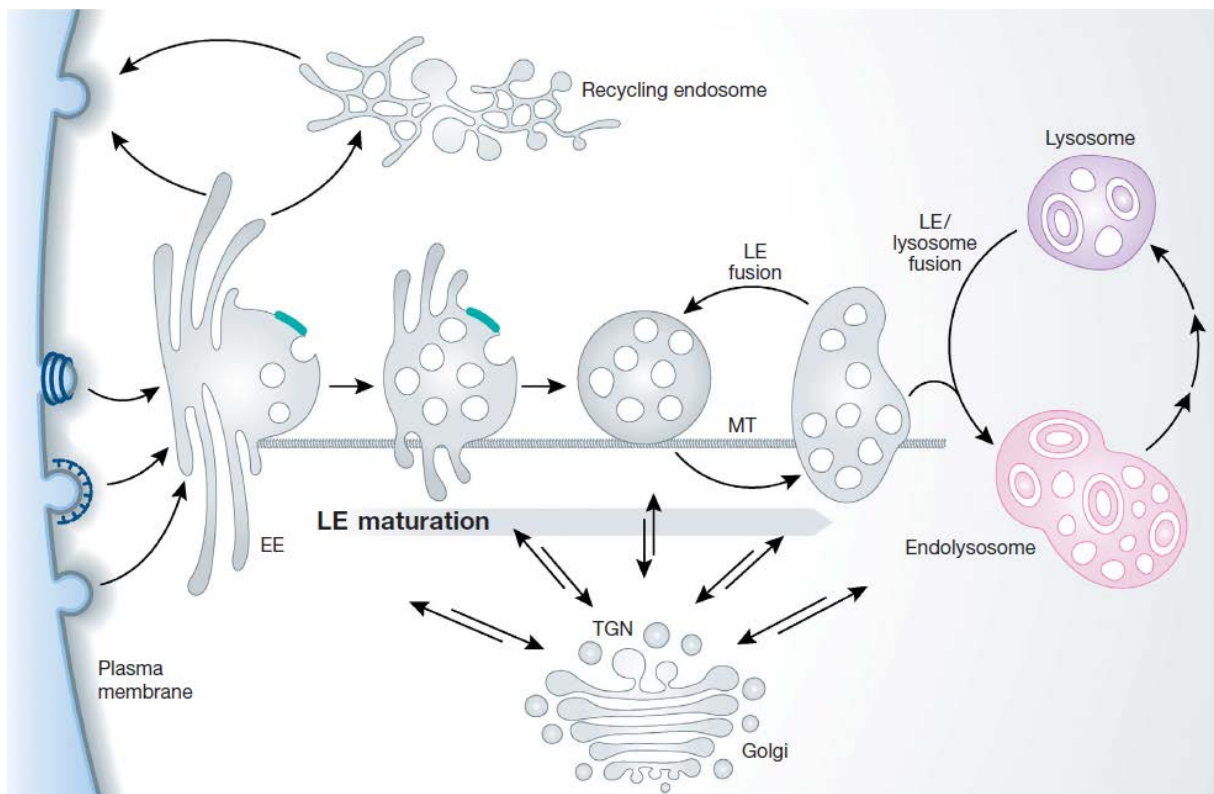


Figure 15: Le système endosome / lysosome ou endolysosomal. Les vésicules d'endocytose nouvellement formées fusionnent avec les endosome précoces ou *early endosome* (EE) localisé à la périphérie cellulaire. Les EE jouent un rôle important dans le tri des composants membranaires : i) ils assurent le recyclage direct vers la membrane plasmique de ses composants ou un recyclage indirect via le passage par les endosomes de recyclage ou *recycling endosome* (RE), ou ii) ils assurent la dégradation de leur contenu via le passage par le système lysosomal. En effet durant ce passage, les EE subissent des étapes de maturation, encore mal connues, pour former les endosomes tardifs ou *late endosome* (LE), dérivés de domaines vacuolaires des EE. Les LE sont transportés vers la région périnucléaire via les microtubules (MT) et durant cette acheminement, ils subissent des étapes de maturation après fusion homotypique avec le compartiment endosomal, jusqu'à la fusion finale avec les lysosomes pour former des endolysosomes. Ces derniers assurent la dégradation des contenus endosomaux. Les protéines Rab jouent un rôle important dans ces processus. Selon la protéine impliquée on peut identifier les différents compartiments : Rab5 marque les EE, Rab7 marque les LE et Rab4/11 marquent les RE (Huotari and Helenius, 2011).

4. L'identité du signalosome

La nature de cette structure de signalisation est encore mal connue. Certaines études suggèrent que le signalosome contenant TrK est principalement constitué de corps multivésiculaires ou *MultiVesicular Body* (MVB), positif pour Rab7 (marqueur des endosomes tardifs ou LE), ou contenant Rab5 (marqueur des endosomes précoces ou EE) (Sandow et al., 2000, Harrington and Ginty, 2013).

VI. Le développement dendritique et la formation des épines

1. Le développement dendritique

Le développement dendritique est une étape cruciale dans le processus de la neurogenèse. Cette étape est caractérisée par la formation de l'arborisation dendritique et la formation des épines dendritiques dans le cas des neurones glutamatergiques. Le branchement de l'arbre dendritique est un processus très dynamique. Il débute avec la formation d'un filopode qui progresse et se contracte plusieurs fois par minute (Dailey and Smith, 1996). Ce filopode croît vers le cône de croissance axonal pour former une synapse (Cooper et Smith (Cooper and Smith, 1992), 1992 ; Jontes (Jontes and Smith, 2000) et al., 2000). Cette dynamique implique la réorganisation du cytosquelette neuronal (Parrish et al., 2007). En effet, la formation de dendrites se produit quand les filaments d'actine sont déstabilisés ; ainsi les microtubules envahissent le filopode et facilitent son prolongement (Georges et al., 2008). La polymérisation des microtubules et leurs dynamiques contribuent à la morphologie de l'arborisation dendritique et joue également un rôle clé dans la formation des épines et par conséquent dans la plasticité neuronale (Gu and Zheng, 2009, Jaworski et al., 2009, Kapitein et al., 2010).

L'arborisation dendritique ainsi que son branchement sont modulées en réponse aux informations reçues et elles sont stabilisées et maintenues grâce à la signalisation postsynaptique (Cline, 2001, Niell et al., 2004). En effet, certaines études ont montré que : i) l'activité synaptique régule la croissance de l'arborisation dendritique (Rajan and Cline, 1998), ii) différents signaux extracellulaires, incluant les facteurs stimulant l'activité neuronale, les neurotrophines, les molécules d'adhésion cellulaire, les

molécules extracellulaires du guidage influencent la morphologie dendritique, le branchement et leurs développements (McAllister, 2000, Van Aelst and Cline, 2004). Plusieurs molécules ont été identifiées comme modulateurs de la morphologie dendritique. Parmi ces modulateurs on peut citer les neurotransmetteurs (Kaufmann and Moser, 2000), les nétrines (Wadsworth, 2002), les sémaphorines (Polleux et al., 2000, Dent et al., 2004) et les facteurs neurotrophiques comme le BDNF et le NT3 (Niblock et al., 2000, Dijkhuizen and Ghosh, 2005, Danzer, 2008).

2. Les épines dendritiques

Les épines ont été identifiées pour la première fois par Santiago Ramon y Cajal en analysant les dendrites des cellules de Purkinje. Il les a décrits comme ceci : « Ces épines pourraient être les points de réception du courant électrique » (Portera Cailliau and Yuste, 2001). L'épine dendritique est une expansion latérale à tête ovoïde reliée aux branches dendritiques par un pédicule ou un cou plus au moins longue et représente la composante postsynaptique de la majorité des synapses excitatrices ou glutamatergiques dans le cerveau (Bourne and Harris, 2008). Elles semblent jouer un rôle déterminant dans la force synaptique et constituer le site de stockage de la mémoire à long terme (Segal, 2002).

Les épines sont des structures très dynamiques qui changent de morphologies au cours de leurs vies. Plusieurs évidences expérimentales suggèrent que le changement de la morphologie des épines joue un rôle clé dans la formation de la mémoire et l'apprentissage (Yuste and Bonhoeffer, 2001, Kasai et al., 2003). Ces changements morphologiques et structuraux des épines sont gouvernés par la dynamique des filaments d'actine (Figure 16). En effet, la taille, la forme et la mobilité des épines dépend largement de la dynamique de l'actine (Ethell and Pasquale, 2005, Tada and Sheng, 2006). Un réseau complexe de protéines régulatrices de la dynamique de l'actine contrôle l'arrangement et la morphologie des épines, comprenant les facteurs de nucléation, de stabilisation et de déstabilisation de l'actine comme les facteurs GEF et GAP de la famille des Rho-GTPases.

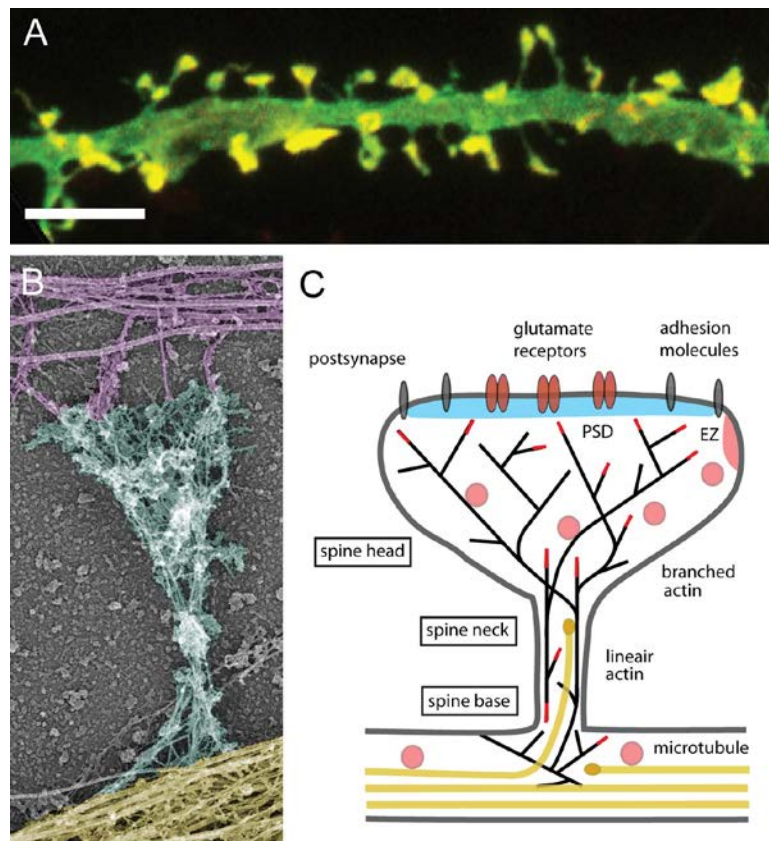


Figure 16: Illustration de la morphologie générale d'une épine mature ainsi que l'organisation du cytosquelette dans cette structure. (A) Exemple d'une dendrite provenant d'une culture des neurones d'hippocampe et recouvert d'épines. Barre : 5µm. (B) L'organisation du cytosquelette au sein d'une épine mature déterminée par ME. En jaune le shaft dendritique, en bleu claire l'épine dendritique et en mauve la terminaison axonale. (C) illustration schématique d'une épine mature et de sa composition en cytosquelette et en protéines de la densité postsynaptique. (B, C) La tête d'épine ou *spine head* contient un réseau dense de filaments d'actine branchés croisés entre eux, tandis que le cou ou *spine neck* contient des filaments d'actine arrangés longitudinalement. Au niveau de la base de l'épine ou *spine base*, les filaments d'actine forment un réseau branché en contact avec les microtubules (Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

Des études de microscopie électronique ont permis d'identifier plusieurs catégories d'épines selon leurs formes et leurs tailles : i) le filopode est une épine immature avec une structure longue et mince, ii) le trapu ou *stubby* est une épine mature avec une structure sans nuque, et iii) le mushroom est une épine mature sous forme d'un champignon (Hering et al., 2003, Bourne and Harris, 2008).

Les épines dendritiques sont des structures qui présentent des formes très variables (Figure 17). Les changements morphologiques des épines sont fortement liés à la différence fonctionnelle au niveau synaptique (Yuste and Bonhoeffer, 2001). En effet, des études structurales et fonctionnelles ont montré une forte corrélation entre la plasticité synaptique et les changements morphologiques des épines. Par exemple,

l'induction de la LTP ou *long-term potentiation* cause l'élargissement de la tête de l'épine, alors que la LTD ou *long-term depression* cause son rétrécissement (Yuste and Bonhoeffer, 2001, Kasai et al., 2003).

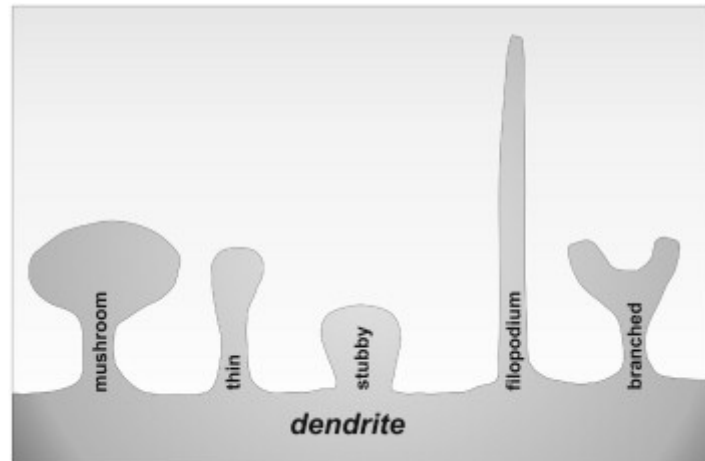


Figure 17: les différentes morphologies d'une épine dendritique. Selon leurs morphologie, les épines dendritiques sont divisées en épines matures comprenant les épines *mushroom*, *stubby* et branchée ou *branched*. Tandis que les épines non matures sont représentées par les filopodes ou *filopodium* et *thin* (von Bohlen Und Halbach, 2009).

2.1. Origine et formation des épines dendritiques au cours de développement

Deux origines des épines dendritiques ont été proposées. Soit i) elles sont formées à partir de filopodes dendritiques (Ziv and Smith, 1996, Marrs et al., 2001), soit ii) elles sont issus des synapses formées directement à partir du shaft dendritique (Harris, 1999), avec ou sans un contact synaptique (Sotelo, 1990).

1.1.1. Le filopodes comme origine des épines

Au cours des premiers stades du développement neuronal, les dendrites sont recouvertes de filopodes. Ces structures ont une grande dynamique ; elles croissent et se rétractent rapidement (Ziv and Smith, 1996, Dunaevsky et al., 1999, Lendvai et al., 2000). Des analyses microscopiques ont montré que lors de la maturation, le nombre de synapses augmente, ainsi que le nombre des épines matures, tandis qu'en parallèle le nombre de filopodes diminue. Ceci suggère que les filopodes puissent être les précurseurs des épines matures (Ziv and Smith, 1996). Ces mêmes auteurs ont déterminé les séquences de la maturation de filopodes en épines matures sur des cultures des neurones d'hippocampe. Ils ont montré que le contact

du filopode avec l'axone induit la transformation du filopode en épine mature et stable. Cette transformation implique la réduction de la mobilité du filopode, sa régression et l'élargissement de l'extrémité distale du filopode formant ainsi la tête et la nuque de l'épine. D'ailleurs, d'autres études ont également montré que la formation des synapses induit la transformation de filopodes en épines matures (Maletic-Savatic et al., 1999, Marrs et al., 2001, Okabe et al., 2001, Trachtenberg et al., 2002). Selon ces études, la grande mobilité des filopodes sert à explorer son environnement et à trouver sa cible axonale, pour former le contact synaptique. En accord avec cette vision, il a été démontré que la libération du glutamate par l'élément présynaptique axonal influence l'initiation et l'élongation des filopodes (Portera-Cailliau et al., 2003, Tashiro and Yuste, 2003). Ces observations suggèrent que le glutamate puisse être la molécule qui guide les filopodes vers les sites présynaptiques libérant ce neurotransmetteur.

1.1.2. Origine dendritique

Ce modèle est proposé à partir des observations montrant que la majorité des synapses formées dans des neurones pyramidaux jeunes sont localisées sur le shaft dendritique et pas sur le filopodes (Harris et al., 1992), et qu'au fur et à mesure que le réseau neuronal devient mature, le nombre de synapses au niveau des épines augmente alors que celles du shaft dendritique diminuent (Marrs et al., 2001). Dans ce modèle ce sont les filopodes axonaux qui trouvent l'élément postsynaptique.

3. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'initiation et l'élongation d'un filopode dendritique

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'initiation de la formation des épines sont encore mal compris, mais les données actuelles suggèrent que le filopode dendritique s'initie directement à partir d'un site riche en actine branché ou à partir d'un lamellipode. Ceci met en évidence le rôle primordial de la dynamique de l'actine dans cette étape (Figure 18).

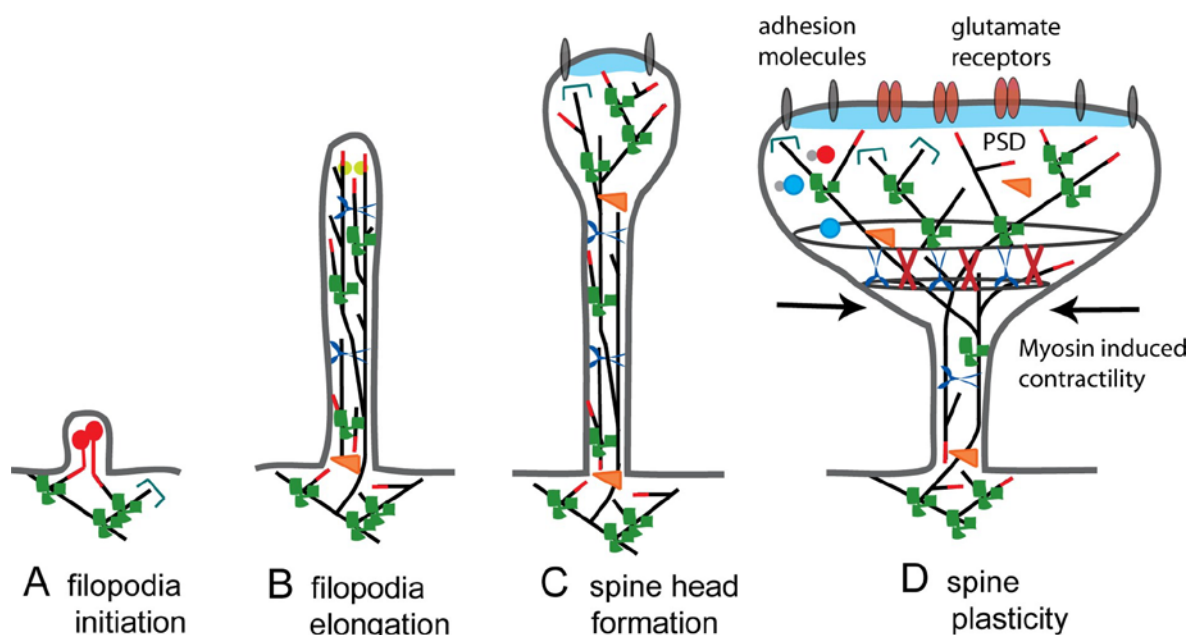


Figure 18: Illustration des différentes étapes de formation d'une épine mature. Le développement d'une épine débute par l'initiation d'un filopode dendritique (A). Ensuite, ce filopode s'allonge grâce à un soutien fourni par le cytosquelette d'actine, représenté ici en trait noir avec une extrémité '+' en rouge (B). Après la formation d'un contact synaptique, l'extrémité distale du filopode change sa morphologie et devient un peu plus large grâce à la formation d'un réseau de filaments d'actine branchés (C). A la fin de sa maturation, l'épine adopte une morphologie plus large, qui sert à renforcer le contact synaptique. Cette étape est caractérisée par la formation de la densité postsynaptique riche en récepteurs (D, Adapté de Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

Il est intéressant de noter que la courbure membranaire module aussi cette étape. En effet, certaines études ont montré que les protéines contenant le domaine I-BAR ou *inverse Bin/Amphiphysin/Rvs* peuvent être impliquées dans l'initiation des filopodes via l'induction d'une déformation membranaire (Saarikangas et al., 2009). En effet, ces protéines interagissent électrostatiquement avec les phospholipides chargés négativement, tel que le PIP2, grâce aux acides aminés chargés positivement de leurs domaines I-BAR. Ceci induit la séquestration de ces phospholipides au niveau du site d'initiation, facilitant ainsi la courbure membranaire et l'initiation des filopodes (Saarikangas et al., 2009).

Une fois que le filopode dendritique est formé et le contact avec l'axone est fait, la mobilité de l'épine diminue progressivement et sa structure est stabilisée. Cette stabilité exige l'assemblage des composants pré et postsynaptique (Arikkath and Reichardt, 2008, Yoshihara et al., 2009). Les épines nouvellement formées sont en

général longues et minces avec une petite tête. Cette étape est également contrôlée par la dynamique d'actine et des microtubules (Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

3.1. Le contrôle du développement et le remodelage des épines par la dynamique de l'actine

L'actine est le composant majeur du cytosquelette dans les épines (Hotulainen et al., 2009). Il s'y trouve sous forme monomérique (G) ou filamenteuse (F). Cette forme filamenteuse confère la morphologie de l'épine (Hotulainen et al., 2009). En effet, les filaments d'actine forment un faisceau longitudinal au niveau de la nuque et du corps de l'épine, alors qu'à sa périphérie les filaments d'actine sont organisés en réseau ramifié (Hotulainen and Hoogenraad, 2010). L'organisation de l'actine est dynamique dans les épines et elle fait l'objet d'une régulation continue (Fischer et al., 2000, Matus et al., 2000). En effet, les réarrangements de l'actine contrôlent la formation et la perte de filopodes dendritiques et des épines, ainsi que leurs morphologies (Trachtenberg et al., 2002, Zito et al., 2004). Plusieurs protéines interagissent avec l'actine et régulent ainsi l'assemblage, la stabilité et le désassemblage des filaments d'actine. Parmi ces protéines on peut citer deux familles de GTPases monomériques ; les Rho et Arf.

3.2. Le contrôle du développement et le remodelage des épines par la famille des RhoGTPases

La famille des petites GTPase Rho compte plus d'une dizaine de membres dont les plus étudiés sont RhoA, Rac1 et Cdc42. Ce sont des régulateurs clés de la dynamique du cytosquelette d'actine impliqués dans une multitude de fonctions cellulaires (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Ces protéines fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires de la signalisation intracellulaire. En effet, elles existent sous deux conformations, la forme active liée au GTP et la forme inactive liée au GDP. Les Rho-GTPases maintenues essentiellement sous forme inactive sont activées par des facteurs d'échange (GEFs) qui déplacent le GDP permettant ainsi la fixation du GTP. La forme active, liée au GTP, sera ainsi capable d'agir sur ses effecteurs en amont (Ridley, 2001). D'autre part, les protéines GAP (GTPase-

activating proteins) stimulent l'activité d'hydrolyse du GTP lié à la GTPase et en conséquence induisent l'inactivation des RhoGTPases.

RhoA stimule la formation des fibres de stress et augmente la contractilité cellulaire (Ridley, 2001), alors que Rac1 induit l'accumulation de filaments d'actine au niveau de la membrane plasmique, formant ainsi les lamellipodes et les replis membranaires ou *ruffles*, tandis que Cdc42 induit la formation de filopodes (Ridley, 2001).

Dans les neurones, Rac1 et Cdc42 induisent la formation de protrusions cellulaires et stimulent l'extension neuritique et le guidage attractif (Luo, 2000). En revanche, RhoA cause la collapse du cône de croissance et la rétraction neuritique ainsi que le guidage répulsif. Au niveau dendritique, la surexpression de la forme constitutivement active de Rac1 cause une réduction drastique de la taille des épines dendritiques et une augmentation de la densité des épines et du nombre des synapses (Luo, 2000, Govek et al., 2004). D'un autre côté, la surexpression d'un mutant inactif de Rac1 cause une réduction des épines et du nombre des synapses (Penzes et al., 2003, Zhang et al., 2003). Ceci suggère que Rac1 stimule le développement des nouvelles épines et contrôle leur morphologie, ainsi que leur maintien. De même, un mutant dominant négatif de Cdc42 affecte la morphogénèse des épines (Irie and Yamaguchi, 2002). Ceci suggère donc l'implication de Cdc42 dans la formation des épines. En revanche, la surexpression de la forme constitutivement active de RhoA stimule la rétraction et l'élimination des épines induisant ainsi une réduction de la densité en épines dendritiques (Tashiro et al., 2000, Govek et al., 2004).

En général, l'extension des filopodes nécessite l'augmentation de la polymérisation et l'élongation des filaments d'actine, qui pourrait être contrôlé par l'activation de Cdc42 et l'inhibition de RhoA. De même, la rétraction de l'épine est probablement médiée par RhoA via son contrôle de la contractilité des filaments d'actine. Finalement, la morphologie de l'épine nécessite l'assemblage de l'actine en réseau branché qui pourrait être médié par Rac1 et Cdc42 (Penzes et al., 2003). Il est important de noter ici que la plupart des études menées à ce jour, sur l'implication des GTPases Rho dans la formation des épines, implique la surexpression de mutants dominants négatifs ou de mutants constitutivement actifs. Ceci limite

forcément les conclusions que nous pouvons tirer de ces expériences. D'autre part, étant donné les multiples fonctions jouées par ces GTPases, la mise en œuvre des techniques d'ARN interférences vont s'avérer difficile. Pour y voir plus clair, il serait peut-être utile d'envisager une stratégie de type CALI comme décrit plus loin pour la V-ATPase, afin de pouvoir inactiver de manière très précise dans le temps et l'espace les différentes Rho GTPases.

Certains régulateurs des GTPase Rho ont également été impliqués dans le développement neuronal. C'est le cas de β PIX ou *β Pak-interacting exchange factor*, GEF pour Rac1 et Cdc42, qui facilite leur interaction avec la protéine kinase PAK1 ou *p21-activated kinase*, et qui est impliquée dans la morphogenèse des épines (Zhang et al., 2003). L'inhibition de l'activité catalytique de β PIX ou sa délocalisation dans la synapse induisent la réduction des épines matures ainsi que du nombre de synapses (Zhang et al., 2003). Une implication de β PIX dans la croissance dendritique a également été montrée récemment (Mo et al., 2012). D'un autre côté, la protéine RhoGAP oligophrenine1 (OPHN1), associée à une forme de retard mental, joue également un rôle important dans la régulation des épines dendritiques. En effet, OPHN1 est localisée dans les épines dendritiques et l'extinction de cette protéine réduit la longueur des épines, probablement via l'inhibition de l'activité de RhoA et de son effecteur ROCK ou *Rho-associated kinase* (Govek et al., 2004). Les neurones d'hippocampe *Ophn1*^{-/-} en culture présentent également un défaut de maturation des épines dendritiques (Khelifaoui et al., 2007). Pour finir il est intéressant de noter que diverses GTPase de la famille Rho et β PIX ont été impliqués dans la régulation de l'activité de la PLD1 (Momboisse et al., 2010).

3.3. Implication du trafic membranaire dans la formation des épines

En plus de la réorganisation du cytosquelette d'actine, il est évident que la formation et la croissance des épines dendritiques nécessitent de la membrane supplémentaire, afin de permettre l'expansion et l'élargissement des épines. Cette membrane supplémentaire pourrait être fournie soit par la membrane plasmique latérale du shaft dendritique ou par la fusion de membrane intracellulaire avec la membrane plasmique de l'épine (Spacek and Harris, 1997).

En effet, il a été démontré que : i) la LTP induit la formation des épines et leur croissance via la stimulation de l'exocytose et du trafic membranaire entre les endosomes de recyclage et la membrane plasmique au niveau des épines dendritiques nouvellement formées ou au cours de maturation (Park et al., 2006). De même ii), l'activation d'Arf6, un autre régulateur important de PLD1, induit la formation des épines matures ainsi qu'une réduction de filopodes (Choi et al., 2006). Ces auteurs ont suggéré qu'Arf6 est impliquée dans la maturation des épines dendritique via son implication dans le trafic membranaire et la régulation de l'actine via l'activation de Rac-1.

3.4. Implication d'Arf6 dans le développement neuronal

La famille des protéines Arf joue un rôle important à la fois dans la régulation de la dynamique d'actine, dans la modification de la composition lipidique de la membrane ainsi que dans le trafic membranaire (Jaworski, 2007). Cette famille de protéine Arf est subdivisée en trois classes, à savoir i) la classe 1 regroupant Arf1 et 3 qui sont impliquées dans le trafic intracellulaire entre le Golgi et le RE. ii) la classe 2 comprenant Arf4 et 5 impliquées dans le transport au sein du Golgi, et finalement iii) la classe 3 représentée par Arf6. Cette protéine assure le trafic entre la membrane plasmique et le système endosomal, via l'activation de la PI4P5K et la PLD1 (Figure 18) (Melendez et al., 2001, Oude Weernink et al., 2007). Arf6 est également impliquée dans la régulation de la dynamique de l'actine via l'activation de Rac-1 (figure 18) (Santy et al., 2005).

Des études antérieures ont mis en évidence un rôle essentiel d'Arf6 ainsi que ses régulateurs, GEF et GAP, dans le développement et la morphologie neuronale incluant la différenciation axone/dendrite, la régulation de la complexité de l'arborisation dendritique et la formation des épines dendritiques (Hernandez-Deviez et al., 2002, Hernandez-Deviez et al., 2004, Miyazaki et al., 2005). Plus récemment, le rôle d'Arf6 a été confirmé dans la maturation des épines impliquant un mécanisme d'internalisation de la molécule d'adhésion cellulaire *Telencephalin* (Raemaekers et al., 2012).

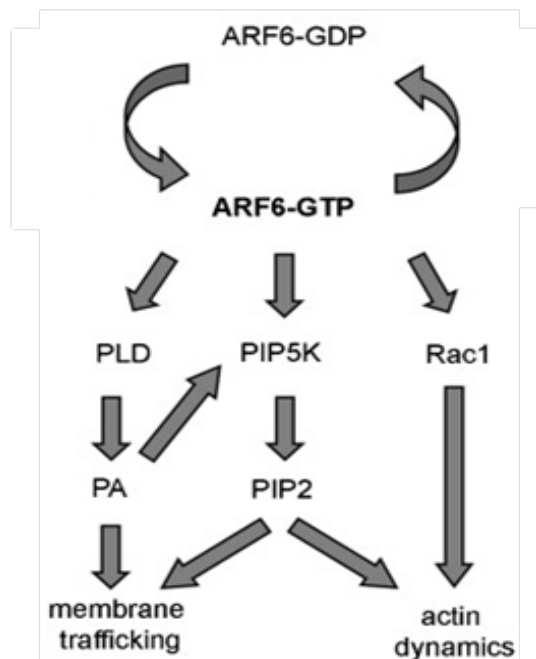


Figure 18: Les voies de signalisation activées par Arf6 dans les neurones.

Adapté (Jaworski, 2007).

En conclusion, différents acteurs moléculaires semblent converger vers la régulation du cytosquelette et du transport vésiculaire permettant une régulation fine et dynamique des épines dendritiques qui sont par essence les structures qui intègrent les signaux au sein du système nerveux central. Il est intéressant de noter que plusieurs de ces acteurs semblent converger vers la phospholipase D étant donné sa capacité à moduler la synthèse du PA, un lipide aux multiples facettes.

LA PHOSPHOLIPASE D

La Phospholipase D

La phospholipase D est une enzyme localisée principalement au niveau des membranes cellulaires. Elle hydrolyse un phospholipide membranaire abondant la phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (PA) et choline. Le PA est un phospholipide polaire, chargé négativement et relativement rare au sein des membranes (< 1%). Le PA intervient dans la voie de biosynthèse des différents phospholipides et grâce à ses propriétés physico-chimique, le PA joue également un rôle important dans la modulation des propriétés physiques de la membrane. Le PA produit par la PLD peut aussi agir comme un second messenger puisqu'il peut être converti en LPA ou DAG, régulant ainsi la signalisation cellulaire (Jenkins et al., 1994, Jenkins and Frohman, 2005)

L'activité PLD a été détectée des organismes simples jusqu'aux organismes complexes, allant des virus et bactéries jusqu'à la levure, les plantes et les animaux. Chez ces derniers l'activité PLD a été détectée dans de nombreux tissus et lignées cellulaires (Meier et al., 1999) (Jenkins and Frohman, 2005). A l'échelle cellulaire, cette activité est détectée dans plusieurs régions de la cellule ; à savoir la membrane plasmique, le cytoplasme, le noyau, et les endo-membranes (Golgi, RE et les endosomes) (Colley et al., 1997).

Le clonage et la caractérisation des gènes codant les protéines PLD ont permis d'identifier deux isoformes (PLD1 et PLD2) dans les cellules animales. Ces deux isoformes sont codés par deux gènes différents. Chez l'homme, ces deux gènes sont localisés dans les régions 3q26 et 17p13, respectivement. Plus récemment, les gènes PLD3 et PLD4 ont été identifiés. Bien que l'activité PLD pour ces deux isoformes n'ait pas encore été établie, PLD3 semble impliquée dans la différenciation cellulaire (Osisami et al., 2012) et PLD4 dans la phagocytose par les cellules microgliales (Otani et al., 2011). Comme il y a encore peu de données sur PLD3 et PLD4, je me focaliserai ici sur PLD1 et PLD2.

Les études fonctionnelles de l'activité PLD ont montré que les deux protéines, PLD1 et PLD2, requièrent du PIP₂ pour leur activité. Dans un premier temps, il a été démontré que contrairement à la PLD1 dont l'activité est fortement stimulée par des régulateurs (PKC, Rho et ARF), PLD2 ne verrait pas ou peu son activité modulée en

présence de ces protéines (Colley et al., 1997). Toutefois des études récentes semblent remettre en question ce modèle, puisque il a été démontré que l'activité de la PLD2 est modulée par les protéines Arf (Kim et al., 2003, Koch et al., 2004, Hiroyama and Exton, 2005, Rankovic et al., 2009) et par Rac2 (Peng et al., 2011). D'autre part, un certain nombre de protéines inhibant la forte activité basale de la PLD2 ont été identifiées, telles que l'actine, l' α -actinine, l' α -synucleine et la tubuline (Park et al., 2000, Lee et al., 2001, Payton et al., 2004, Chae et al., 2005).

I. Clonage et identification des PLDs animales

Le gène codant la PLD1 humaine a été cloné pour la première fois en 1995 par Hammond et al. Ces travaux ont montré que le gène cloné code pour une protéine de 1074 acides aminés (AA) ayant une masse moléculaire de 120 kDa. Une étude ultérieure de la même équipe a permis d'identifier une deuxième isoforme de PLD1 issu d'un épissage alternatif de l'exon 8, appelé PLD1b. Cet isoforme comporte une délétion d'une séquence de 38 AA (Hammond et al., 1997). Les deux isoformes PLD1a et PLD1b ont, par la suite, également été identifiés dans un extrait du cerveau du rat (Park et al., 1997) et chez la souris (Colley et al., 1997).

Le groupe de Mike Frohman a ensuite identifié chez la souris, un second gène codant une protéine assez identique à la PLD1. Cette protéine est composée de 932 AA. Elle a une grande homologie avec PLD1, surtout au niveau de ces deux domaines catalytiques. De plus, cette protéine, dénommée PLD2, est déletée au niveau de la séquence codante pour la région 'loop' chez la PLD1 (Colley et al., 1997). A partir de protéines recombinantes, ces auteurs ont également montré que la PLD1 a une activité basale faible (Hammond et al., 1997), contrairement à la PLD2 qui est fortement active *in vivo* ou *in vitro* (Colley et al., 1997). Des propriétés similaires ont été mises en évidence pour la PLD2 isolée à partir du rat (Nakashima et al., 1997) ou de l'homme (Lopez et al., 1998).

Etant donné qu'elle a constitué le sujet majeur de ma thèse, je présenterai ici plus en détail la PLD1.

II. Structure primaire de la PLD1

Les analyses des séquences peptidiques des différentes PLD clonées ont mis en évidence quatre régions conservées entre les différentes isoformes et les espèces ; à savoir les régions I, II, III et IV (Colley et al., 1997). Ces quatre domaines ont été décrits comme responsables de l'activité catalytique de la PLD (Figure 19) (Frohman and Morris, 1999).

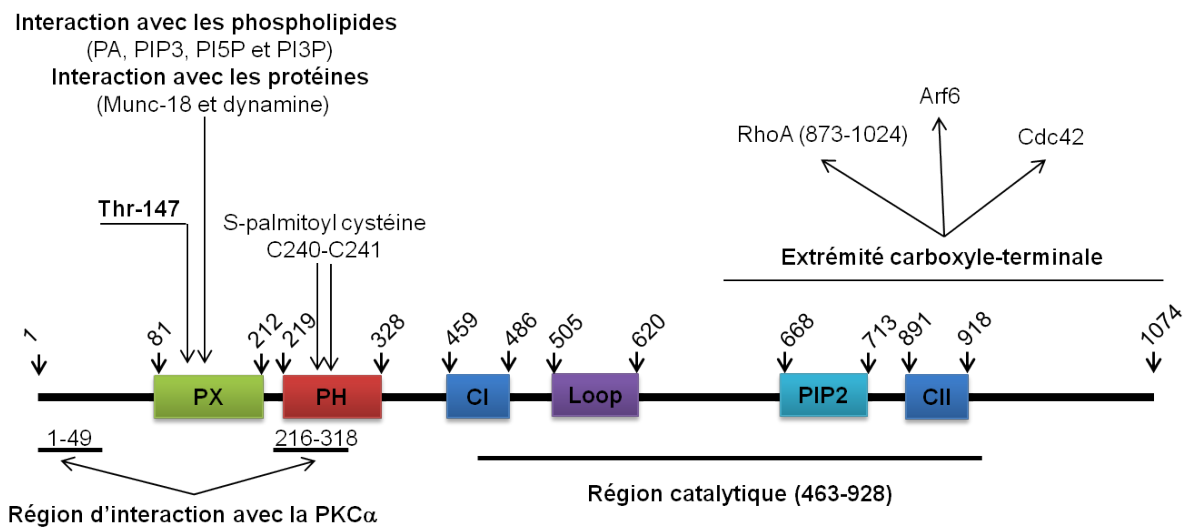


Figure 19: Structure primaire de la PLD1

1. Les deux domaines HKD ou domaines catalytiques (régions CRII et CRIV)

Ces deux domaines sont caractérisés par la présence de trois résidus conservés chez toutes les espèces, à savoir une histidine (**H**), une lysine (**K**) et un acide aspartique (**D**). Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que ces trois acides aminés sont essentiels pour l'activité catalytique des PLDs *in vitro* et *in vivo* (Sung et al., 1997). En fait, la présence simultanée de ces deux domaines est indispensable pour l'activité catalytique de la PLD (Sung et al., 1997). Un modèle catalytique a été proposé et nommé mécanisme *ping pong*, car il fait intervenir successivement les deux domaines catalytiques de la PLD1 (Figure 20). Il est à noter qu'un mécanisme d'action similaire est proposé pour la PLD2.

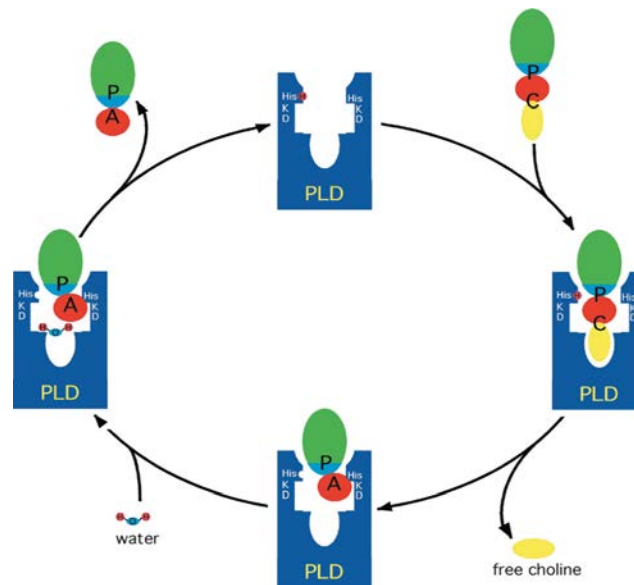


Figure 20: Modèle *ping pong* de l'activité catalytique de la PLD. L'activité catalytique de la PLD est médiée à la fois par les deux domaines HKD, un à l'extrémité amino-terminale et l'autre à l'extrémité carboxyl-terminale. Ces deux domaines forment une poche dans laquelle s'insère la phosphatidylcholine (PC). Le modèle actuel propose que la PLD catalyse la PC en PA en deux étapes : i) le domaine HKD amino-terminal subit une protonation au niveau de l'histidine. A l'entrée de la PC dans la poche catalytique, la choline sera libérée suite à la déprotonation de l'histidine du domaine amino-terminal. Alors que le PA reste lié à l'histidine du domaine carboxyl-terminal, formant ainsi un intermédiaire PLD-PA. ii) le PA sera ensuite libéré par la protonation de l'histidine du domaine carboxyl-terminal par une molécule d'eau. Adapté (Jenkins and Frohman, 2005).

2. Les régions conservées CRI et CRIII (Conserved Region III ou motif IYIENQFF)

Ces deux régions sont importantes pour l'activité catalytique, puisque des mutations de certains acides aminés dans ces régions diminuent l'activité catalytique de la PLD (Frohman et al., 1999). En comparaison avec le récepteur de l'acétylcholine, qui interagit avec la choline grâce aux acides aminés aromatiques (Trp, Phe et Tyr), ces régions peuvent être également impliquées dans l'interaction avec le groupement méthyle de la choline de la phosphatidylcholine. Ceci pourrait rendre l'activité PLD plus efficace via le rapprochement des deux domaines HKD, et également plus spécifique pour la phosphatidylcholine (Frohman et al., 1999). Une autre étude a montré que la région CRIII contient également un site consensus de liaison à la caveoline, ce qui pourrait permettre l'association de la PLD aux caveoles (Okamoto et al., 1998).

3. Le domaine PH

le domaine PH ne semble pas être directement impliqué dans l'interaction de la PLD1 avec le PIP2 (Hoer et al., 2000). Mais il joue un rôle important dans la localisation subcellulaire de la PLD1 (Du et al., 2003, Jenkins and Frohman, 2005), et ceci probablement via la palmitoylation de deux cystéines en position 240 et 241. En effet, cette palmitoylation conduit à une localisation de la PLD1 dans les domaines membranaires riches en caveoline de la membrane plasmique. Cette localisation est importante pour que la PLD1 puisse réguler la signalisation induite par l'EGF (Han et al., 2002).

Ce domaine peut également réguler l'activité PLD (Hodgkin et al., 1999, Sugars et al., 1999), puisqu'il contient un site de liaison pour la PKC (Kook and Exton, 2005). Pour finir, ce domaine est responsable de l'interaction avec la sous unité $\mu 2$ du complexe AP2 (Lee et al., 2009) et avec AP180 (Lee et al., 1997), ce qui suggère sa participation éventuelle dans des phénomènes d'endocytose.

4. Le domaine PX

Ce domaine conservé de la levure à l'homme est composé de 100-140 AA. Il est impliqué dans l'interaction avec les domaines protéiques SH3 et les phospholipides. Les protéines contenant un domaine PX ont une tendance à être localiser dans les compartiments endosomales, où elles participent au trafic intracellulaire (Seet and Hong, 2006).

Des analyses fonctionnelles et structurales ont montré que la PLD1 lie certains phospholipides et certaines protéines grâce à son domaine PX. Ce domaine semble également jouer un rôle déterminant dans la localisation subcellulaire de la PLD1 et dans son activité.

4.1. Rôle du domaine PX dans l'interaction de la PLD1 avec les phospholipides

L'utilisation de liposomes et de *PIP strip*, pour étudier les interactions protéine/lipide *in vitro*, a permis de montrer que le domaine PX de la PLD1 lie le PI5P (Du et al.,

2003) et le PI3,4,5P3 ou PIP3 (Lee et al., 2005). Stahelin et al (2004), en se basant sur la structure 3D du domaine PX de la protéine p47^{phox}, ont montré que le domaine PX de la PLD1 forme deux poches, une qui lie les phospholipides (PIs) et l'autre qui lie le PA ou les phosphatidylsérines (Figure 21). La poche de liaison aux PIs est formée par 3 feuillets β suivit par un sous domaine formé par 3 hélices α . Cette poche et le sous domaine constituent une niche pour la tête polaire des PI. La deuxième poche présente un site secondaire de liaison des lipides. C'est une poche profonde riche en acide aminée basique (Arg70 et His51 pour la PLD1) qui lie modérément le PA ou le PS (Stahelin et al., 2004).

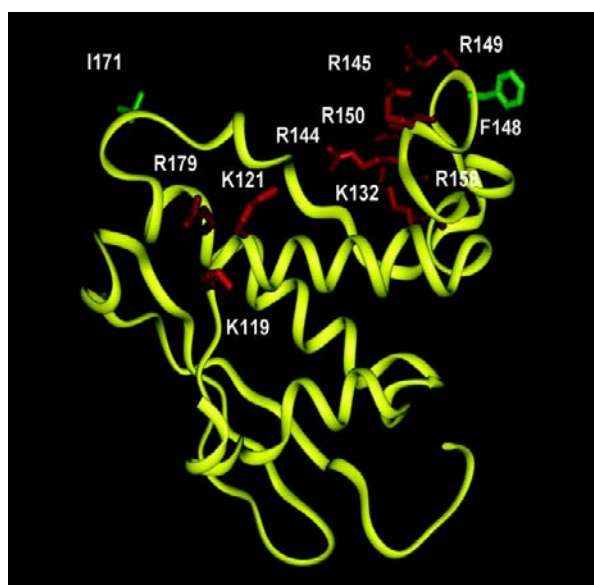


Figure 20: Modèle de la structure du domaine PX de la PLD1. Les résidus des deux poches liant les phospholipides sont présentés en rouges. Résidus liants les PIs (Lys119, Lys121, and Arg179). Les résidus liants le PA ou PS (Lys132, Lys144, Arg145, Arg149, Arg150, and Arg159) (Adapté de Stahelin et al., 2004).

L'analyse de l'indice de réfraction par la technique du Biacore (SPR ou *Surface plasmon resonance*) a montré que le domaine PX de la PLD1 possède une plus grande affinité pour le PIP3 que pour le PI5P et le PI3P. D'autre part, le PA coopère avec le PI pour augmenter la liaison du domaine PX avec la membrane des liposomes (Stahelin et al., 2004). Le site de liaison au PA semble donc être impliqué dans la stabilisation de l'interaction entre la protéine et la membrane, tel que cela a été récemment démontré pour Dock2, une GEF pour Rac qui lie également le PA (Nishikimi et al., 2009, Sanematsu et al., 2013).

4.2. Rôle du domaine PX dans l'interaction de la PLD1 avec les protéines

Grace à son domaine PX, la PLD1 lie également deux protéines impliquées dans le trafic membranaire, à savoir Munc-18 et la dynamine 1. Munc-18 lie la PLD1 et inhibe son activité (Lee et al., 2004), alors que la dynamine 1 interagit avec la PLD1 pour faciliter l'endocytose des récepteurs à l'EGF (EGFR) et à l'insuline (Lee et al., 2006).

Il est intéressant de noter que le domaine PX de PLD1 contient la séquence consensus de phosphorylation par la kinase RSK2 (**R-X-R-X-X-S/T**). Cette séquence consensus est présente dans le domaine PX de la PLD1 de toutes les espèces, mais pas dans la PLD2 (voir alignement Figure 22), suggérant son importance fonctionnelle conservée au cours de l'évolution. D'ailleurs notre équipe a montré par le passé que la PLD1 est phosphorylée sur son résidu Thr-147 en réponse à une dépolarisation dans les cellules PC12. Cette phosphorylation augmente l'activité de la PLD1 (Zenou-Meyer et al., 2008). De même, ce résidu peut également être phosphorylé par la PKC α en réponse à une stimulation avec l'EGF ou le PMA (Han et al., 2002, Chang et al., 2011).

PLD1

```
sub_sp_Q13393_01-212 .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENMIR.EEQFFLORRK
SPT_H0X295_OTOGA .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPLPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENMIR.EEQFFLORRK
SPT_E2RLQ7_GANFA .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENMIR.EEQFFLORRK
SPT_F15H14_PIG .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENMIR.EEQFFLORRK
SPT_G5B775_HETGA .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EAPREMPSPSS.ENMIR.EEQFFLORRK
SPT_H2PC00_PONAB .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENMIR.EEQFFLORRK
SPT_I3MF06_SPEIR .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENMIR.EEQFFLORRK
SPT_G3SKY1_L0XAF .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SW_PLD1_CRGR .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SPT_Q6NVF2_MOUSE .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENMIR.EEQFFLORRK
SPT_D4A318_RAT .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENMIR.EEQFFLORRK
SPT_F6LEW9_HORSE .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENMIR.EEQFFLORRK
SPT_G1R095_NOMLE .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SPT_L5K9P6_PTEAL .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SPT_H0VH96_CAPO .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SPT_K3U066_DESRO .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SPT_A6QR57_BOVIN .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SPT_L5H1P3_BOSMU .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SPT_G1R095_MYOLU .RSINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SPT_G3H4H6_CRGR .SINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SPT_L5LWU5_MYODS .RSINLYTIELTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
```

PLD2

```
SPT_G5BWA3_HETGA .TCTLYSVRLTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SPT_L5LDY8_MYODS .TCTLYSVRLTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
SPT_F7AVC9_CALIA .TCTLYSVRLTHGEFKWQVKKKFKHFGEFHRELLKYKAFIRIPIPTRRHFRQNVK...EEMPRLPSLPRSS.ENTIR.EEQFFLORRK
```

Figure 21: Alignement du domaine PX de PLD.

L'alignement a été réalisé à l'aide du site internet *PipeAlign* (<http://bips.u-strasbg.fr/PipeAlign/>).

III. Localisation subcellulaire de la PLD1

L'absence d'anticorps spécifiques pour détecter l'expression endogène de la PLD1 pose un grand problème pour identifier sa localisation et sa distribution subcellulaire. Ainsi, des études d'immunocytochimie et de fractionnement subcellulaire ont montré,

dans plusieurs types cellulaires, que la PLD1 surexprimée est localisée majoritairement sur des structures vésiculaires et à la membrane plasmique. Je détaillerai ici certaines études qui ont entrepris de caractériser la localisation de la PLD1. Malgré les controverses entre ces études, elles semblent valider la notion que la PLD1 vésiculaire correspond principalement à des granules ou vésicules de sécrétion et à des endosomes.

La première étude réalisée par Colley et al (1997) a montré que la PLD1 surexprimée dans des cellules COS-7 est localisée principalement sur des vésicules périnucléaires et parfois à la membrane plasmique. Du et al (2003), en collaboration avec notre équipe, ont démontré que cette localisation n'est pas statique, mais au contraire qu'elle est dynamique et qu'elle dépend de l'état de la cellule. Ainsi, dans des cellules COS-7, la PLD1 surexprimée présente une distribution périnucléaire, où elle colocalise avec EEA1, GM130 et le récepteur à la transferrine qui sont respectivement des marqueurs des endosomes précoces, du Golgi et des endosomes nouvellement internalisés. Après 2h de stimulation avec le PMA, la PLD1 transloque massivement à la membrane plasmique, puis après 4h, elle redevient vésiculaire. Il semble en plus que le trafic de ces vésicules soit facilité par l'activité de la PLD1. En effet, la surexpression de la PLD1 catalytiquement inactive (PLD1 K898R) transloque moins à la membrane plasmique (Du et al., 2003).

Cette translocation de la PLD1 de vésicules périnucléaires vers la membrane plasmique a également été démontrée dans des adipocytes (3T3-L1) suite à l'induction par l'insuline, qui stimule aussi l'activité PLD (Emoto et al., 2000, Huang et al., 2005). Dans les cellules basophiles de rat (RBL-2H3) PLD1b-GFP ou HA-PLD1b sont localisées sur des vésicules de sécrétion. Cependant après stimulation, elles transloquent à la membrane plasmique (Brown et al., 1998, Choi et al., 2002, Powner and Wakelam, 2002). De même, dans les cellules MIN6, une lignée de cellules β pancréatique, la stimulation induit la translocation de la PLD1 associée aux granules, contenant l'insuline, vers la membrane plasmique (Hughes et al., 2004).

Au niveau de la membrane plasmique, certaines études ont montré que la PLD1 est localisée dans les rafts lipidiques, enrichies en Caveoline-1 (Kim et al., 1999, Han et al., 2002). D'autre part, le groupe de Gill Di Paolo a récemment mis en évidence que

dans des cellules HeLa ou CHO cultivées en absence de sérum la PLD1 redistribue vers les autophagosomes, où elle colocalise avec la LC3 (Dall'Armi et al., 2010).

La présence de la PLD1 à la membrane Golgienne ou du RE reste un grand débat et un sujet de controverse enflammé entre différents groupes. En effet, tandis que certaines études suggèrent la présence de la PLD1 au niveau de l'appareil de Golgi, Toda et al., (1999) ont montré que le traitement des cellules HeLa, NRK ou Vero par la Bréfeldine A, qui perturbe le réseau Golgien, n'affecte pas la distribution de la PLD1 surexprimée. De même, la PLD1 surexprimée ne se localise pas dans la Golgi selon Hughes et al (2001). Les observations réalisées au sein de notre équipe valide ces dernières observations car nous n'avons pas pu mettre en évidence de PLD1-GFP ou PLD1-HA au niveau du Golgi dans des cellules PC12. Toutefois, la génération de certains anticorps anti-PLD1 a confirmé cette localisation périnucléaire, principalement dans le Golgi, le RE, les endosomes et à la membrane plasmique (Freyberg et al., 2001, Lucocq et al., 2001).

Les limites des deux approches sont liées d'une part à la surexpression de PLD1 qui pourrait induire une localisation artefactuelle de cette protéine dans des vésicules hétérogènes et d'autre part à l'utilisation d'anticorps dont la spécificité n'est pas totale. Il est donc certain qu'il faudra encore obtenir des outils de meilleure qualité avant de pouvoir clore ces controverses sur la localisation subcellulaire de la PLD1.

IV. Les domaines impliqués dans la localisation subcellulaire de la PLD1

L'étude menée par Du et al (2003) sur la caractérisation des domaines de la PLD1 impliqués dans sa localisation membranaire a montré que les domaines PX et PH sont indispensables pour la localisation périnucléaire de PLD1 et pour son recyclage de la membrane plasmique vers des vésicules périnucléaires. Ceci suggère l'importance de ces deux domaines dans l'internalisation de la PLD1 et en particulier le domaine PX. En effet, la délétion de ce domaine n'affecte pas la localisation périnucléaire, mais inhibe l'internalisation de la PLD1 via un mécanisme dépendant du PI5P, un phosphoinositide enrichie dans les endosomes. Une telle implication du domaine PH dans l'internalisation de la PLD1 a également été suggérée. En effet, ce domaine contient deux cystéines qui pourraient être palmitoylés (Cys240-Cys241).

La mutation de ceux deux cystéines affecte l'internalisation probablement via un mécanisme dépendant des radeaux ou *rafts* lipidiques (Han et al., 2002, Du et al., 2003). En effet, un mutant de la PLD1 non palmytilable est principalement localisé à la membrane plasmique (Sugars et al., 1999, 2002). L'implication du domaine PH dans la localisation membranaire a également été démontrée dans les adipocytes. Dans ces cellules, la délétion du domaine PH (224-323) de la PLD1 conduit à sa localisation cytoplasmique et non vésiculaire/périnucléaire (Emoto et al., 1999, Zhang et al., 1999). De même, dans les cellules COS-7 et les cellules musculaires lisses, la mutation de deux résidus localisées dans le domaine PH (K252/R253) affecte la localisation membranaire de PLD1, la conduisant à devenir cytosolique (Sugars et al., 2002).

Le domaine carboxy-terminal de la PLD1 semble aussi jouer un rôle dans sa localisation endosomale, puisque des mutations au niveau de ce domaine inhibe la colocalisation de PLD1 avec le marqueur des endosomes précoces EEA1 dans les cellules HeLa et HEK-293 stimulées à l'EGF (Hughes and Parker, 2001).

Pour finir, le domaine d'interaction avec le PIP2 (R691, 695G) est indispensable à la localisation plasmique de la PLD1. En effet, cette mutation conduit à une expression complètement cytosolique de la PLD1 dans différents types cellulaires (Du et al., 2003).

V. Régulation de l'activité de la PLD1

Dans de nombreux types cellulaires, la PLD1 est activée en réponse à une stimulation par certaines hormones, neurotransmetteurs ou facteurs de croissance. Plusieurs études ont montré que cette activation est régulée principalement par le PIP2, la PKC et certaines protéines GTPase, principalement, Arf, RhoA, Rac et Cdc42.

Henage et al (2006) ont montré que ces différents régulateurs agissent différemment sur la cinétique de l'activité enzymatique de PLD1. En effet, ils ont montré que la PKC et Arf augmentent l'efficacité catalytique de la PLD1 par augmentation du potentiel catalytique (K_{cat}) et la diminution de la constante interfaciale de Michaelis,

K_m^b qui reflète l'interaction entre la PLD1 et son substrat. En revanche, RhoA, Rac1 et Cdc42 augmentent le potentiel catalytique en agissant seulement sur le K_m^b . Donc ces protéines agissent comme des effecteurs allostériques pour augmenter l'activité catalytique de la PLD1. De même, ces auteurs ont montré que le PIP2 potentialise l'effet des ces différents activateurs et qu'il est essentiel pour l'effet synergique sur l'activation de PLD1 entre PKC α /Arf ou Arf/RhoA (Henage et al., 2006).

1. Régulation de la PLD1 par la PKC

Le lien entre la PLD1 et la PKC a été établi dans un premier temps par le fait que la stimulation des cellules COS-7 surexprimant la PLD1, avec le PMA, un activateur classique de PKC, augmente l'activité PLD (Colley et al., 1997). L'activation de la PLD1 par la PKC ne semble pas induite par l'activité kinase de la PKC, puisque la PKC α active la PLD1 *in vitro* même en absence d'ATP (Hammond et al., 1997, Min et al., 1998b). En effet, l'interaction entre les deux protéines semble suffisante pour activer la PLD1 (Conricode et al., 1992, Singer et al., 1996, Colley et al., 1997, Min and Exton, 1998, Min et al., 1998a, Kim et al., 1999). Hu et al (2003) ont montré que l'augmentation rapide de l'activité de la PLD1, en réponse au PMA, est corrélée avec l'augmentation de l'interaction de la PLD1 avec la PKC, et que la phosphorylation de la PLD1 par la PKC α n'est induite que plus tardivement. Ces observations ont été confirmées par Kook et al (2005). En outre, la surexpression d'un mutant dominant négatif de la PKC α stimule l'activité PLD plus fortement que la forme sauvage. En effet, le mutant dominant négatif est localisé majoritairement à la membrane plasmique où il pourrait interagir plus efficacement avec la PLD1 pour stimuler son activité (Hu et al., 2003).

L'effet inhibiteur des certains inhibiteurs de la PKC sur l'activité de la PLD1 observé par plusieurs équipes, pourrait être expliqué par une action sur la phosphorylation de certains régulateurs de la PLD1 par la PKC. Par exemple, la PKC phosphoryle et inhibe Ras-GAP conduisant à une activation de Ras qui active d'autres GTPases régulant la PLD1 (Colley et al., 1997). Hu et al (2003) ont également montré que le traitement des cellules COS-7 avec la Staurosporine, un inhibiteur de PKC, réduit partiellement l'interaction entre PLD1 et la PKC induite par le PMA. Ceci pourrait

donc expliquer la diminution de l'activité PLD en présence d'un inhibiteur de PKC. L'importance de l'interaction entre la PLD1 et la PKC a été aussi démontrée par Kim et al (1999), puisque la caveoline-1 qui lie la PLD1 inhibe son activité en réduisant l'interaction entre la PLD1 et la PKC α .

La PKC active la PLD1 par son interaction avec l'extrémité amino-terminale de la PLD1 (Sung et al., 1999). Toutefois en se basant sur une stratégie de mutagenèse par insertion d'un peptapeptide ou PIM, le mutant PLD1 Δ 87 (PIM87) est activée *in vitro* par Arf et RhoA en présence de PIP2 et pas par la PKC α , tandis que l'interaction entre la PKC et la PLD1-PIM87 est maintenue (Zhang et al., 1999). D'ailleurs, la PKC interagit aussi avec la PLD1 via son domaine PH (Kook et al., 2005). Ceci montre l'importance des deux domaines amino-terminal et PH pour que la PKC puisse activer la PLD1 et suggère aussi que la PKC pourrait induire un changement conformationnel de la PLD1 pour augmenter son activité. Henage et al (2006) ont montré que la PKC agit sur le K b_m , qui reflète l'interaction entre la PLD1 et son substrat ; cet effet pourrait donc être dû à un changement conformationnel favorisant l'accès du PC dans le domaine catalytique de la PLD1.

Pour finir, la PKC α lie également la PLD1 via son extrémité carboxy-terminal et plus précisément via le résidu F663. La mutation de ce résidu, phénylalanine en acide aspartique, inhibe l'interaction entre les deux protéines et l'activation de la PLD1 suite à une stimulation des cellules COS-7 au PMA. D'autre part, il semble que ce soit la forme dephosphorylée de la PKC α qui transloque de la membrane plasmique vers la région périnucléaire pour interagir et ainsi activer la PLD1 (Hu and Exton, 2005). Toutefois, la PKC α phosphoryle la PLD1 au niveau de la Ser-2, de la Thr-147 et de la Ser-561, suite à une stimulation des cellules COS-7 au PMA ou l'EGF. La mutation de ces trois résidus réduit l'activité PLD en réponse à l'EGF (Han et al., 2002). Ainsi la stimulation par le PMA ou l'EGF induit la phosphorylation de PLD1 au niveau des *rafts* lipidiques, où la PLD1 est en complexe avec la caveoline-1 et le récepteur à l'EGF (Han et al., 2002). Des observations similaires ont été faites sur des neutrophiles stimulées au fMLP (Chang et al., 2011).

2. Régulation de la PLD1 par la kinase RSK2

Les travaux de notre équipe ont par ailleurs montré que la PLD1 est phosphorylée sur la Thr-147 et activée par la kinase RSK2 dans les cellules chromaffines (Zenou-Meyer et al., 2008). L'impact de cette phosphorylation sur le comportement cellulaire de la PLD1 est encore mal connu.

RSK2 (*Ribosomal S6 Kinase 2*) appartient à la famille des protéines Serine/Thréonine kinases qui contient 4 membres (RSK 1-4). Elle est phosphorylée et activée directement par ERK1/2 en réponse à une stimulation extracellulaire par des facteurs de croissance, certaines hormones ou encore certains neurotransmetteurs. Après son activation, RSK2 phosphoryle différents substrats cytosoliques et nucléaires, tels que CREB, c-Fos, ATF4 et l'histone H3 (Hauge and Frodin, 2006). Via son activité kinase, RSK2 est impliquée dans des différents processus cellulaires tels que, la transcription, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

Le gène *RSK2* humain ou *RPS6KA3* est localisé sur le bras court du chromosome X (Xp22.2). Il comporte 22 exons (Delaunoy et al., 2006). Les mutations du gène *RPS6KA3* qui code la protéine RSK2 ont été identifiées chez des patients souffrant du syndrome de Coffin-Lowry (CLS). Le CLS est une pathologie génétique rare lié au chromosome X et ayant une incidence estimée entre 1:50 000 à 1:100 000. Ce syndrome est caractérisé par un retard de croissance, des troubles du développement psychomoteur, ainsi que des malformations squelettiques progressives (Pereira et al., 2010).

Des analyses post-mortem réalisées par Grange et Coffin (2003) sur deux patients (une femme et un homme) ont montré une légère dilatation ventriculaire chez les deux patients et une réduction de la taille du cervelet. Au niveau cellulaire, ils ont rapporté une perte des neurones, au niveau du cervelet et du cortex, ainsi qu'une prolifération anormale et irrégulière des cellules gliales (Coffin, 2003).

Une autre étude récente menée par Kesler et al., (2007) a également identifié des défauts structuraux du cerveau chez des patients CLS. Ces patients souffriraient d'une réduction de volume total du cerveau, suggérant que l'absence de RSK2

affecterait le développement normal du cortex, de l'hippocampe et du cervelet (Kesler et al., 2007).

Le gène murin *Rsk2* a une expression ubiquitaire durant l'embryogenèse et chez l'adulte. Dans le cerveau murin, le messenger *Rsk2* est fortement exprimé dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet (Zenjou et al., 2002), structures particulièrement impliquées dans les fonctions cognitives.

Une souris invalidée pour le gène *Rsk2* a été créée par recombinaison homologue. Les études histologiques et anatomiques ne montrent pas d'anomalie évidente du système nerveux central, mais les études comportementales ont par contre mis en évidence un retard d'apprentissage et de mémoire spatiale à long terme. En effet, ces souris *KO-Rsk2* ont plus des difficultés d'adaptation aux nouveaux environnements (Poirier et al., 2007). On note également un dysfonctionnement du système dopaminergique au niveau du cortex cérébral chez ces souris (Marques Pereira et al., 2008). Récemment, Morice et al., (2013) ont montré un défaut d'expression de gènes et de phosphorylation de CREB induite par le LTP sur ce modèle murin déficient en RSK2. D'autre part, ils ont également trouvé un défaut postsynaptique résumé par un élargissement de la taille des épines dendritiques et une réduction de la conductance des récepteurs AMPA et NMDA, au niveau des neurones de gyrus denté des souris *Rsk2*^{-/-} (Morice et al., 2013).

3. Régulation de la PLD1 par d'autres protéines kinases

La PLD1 est également phosphorylée sur Ser-505 par l'AMPK. La casein kinase II (CK2), phosphoryle également la PLD1 sur ses résidus Ser-610/611. Toutefois, cette phosphorylation ne semble pas affecter l'activité de PLD1, mais pourrait jouer un rôle dans sa localisation subcellulaire (Ganley et al., 2001). En revanche, la PKN (α/β), *protein kinase C-related protein kinases*, lie l'extrémité amino-terminale de la PLD1 et stimule son activité indépendamment de l'ATP (Oishi et al., 2001), d'une manière probablement similaire à ce que peut faire la PKC.

4. Régulation de la PLD1 par les GTPases

La famille des GTPases monomériques de types Ras est composée de 5 sous familles: Ras, Rho, Rab, Arf et Ran. Ces protéines sont régulées par l'association/dissociation de guanosine triphosphate (GTP) et de son dérivé le guanosine diphosphate (GDP). Les GTPases sont inactives lorsqu'elles sont liées au GDP, tandis que la liaison du GTP les active. L'échange du GDP par le GTP est contrôlé par les protéines GEF, qui stimulent la dissociation du GDP. Des protéines GAP accélèrent l'activité GTPase pour hydrolyser le GTP en GDP et permettre leur retour à l'état inactif (Cherfils and Zeghouf, 2013).

4.1. Rôles majeurs des protéines GTPases monomériques

- ➔ La sous famille des Ras-GTPases, comprenant également Ral et Rheb sont des régulateurs majeurs de la croissance, de la différenciation et de la survie cellulaire.
- ➔ Les Rho-GTPases, comprenant Rho, Rac et Cdc-42 sont impliqués dans la régulation du cytosquelette d'actine et le trafic vésiculaire par la régulation de la dynamique de l'actine.
- ➔ La sous famille des Rab et Arf constitue un régulateur majeur du trafic intracellulaire, impliquée dans le bourgeonnement des vésicules, leur transports et ciblage vers les organelles subcellulaires.
- ➔ Les Ran-GTPases sont impliquées dans le transport nucléo-cytoplasmique (Bouquier et al., 2009, Csepanyi-Komi et al., 2012).

4.2. GTPases monomériques et activité PLD1

Les premières études réalisées *in vitro* ont montré que certaines protéines G potentialisent l'activité de PLD1 en présence de PIP2. Ainsi, Arf1 active la PLD1 50 fois, alors que Rac-1, Rho-A et Cdc-42 sont activés 13 fois, 10 fois et 5 fois respectivement (Hammond et al., 1995, Hammond et al., 1997, Hodgkin et al., 1999). Ces GTPases activent la PLD1 par interaction allostérique. Le domaine amino-terminal de la PLD1 n'intervient pas dans cette interaction allostérique. En effet, l'utilisation de PLD1 tronquée de son domaine amino-terminal a montré que Arf1/6,

Rho-A, Rac-1 et Cdc-42 sont toujours capable de l'activer (Sung et al., 1999 , Zhang et al., 1999). Ceci suggère que ces GTPases interagissent avec la partie carboxy-terminale de la PLD1.

La cartographie des sites d'interaction a montré que :

- i) Rho-A interagit avec un site localisé à l'extrémité carboxy-terminale de PLD1 entre les résidus 873-1024. Des mutations ponctuelles (K946A, V950A, R955A et K962A) réduisent l'activité *in vitro* de la PLD1 en présence de la forme active de Rho-A (V14RhoA), alors que les doubles mutations K946A/K962A, K946A/V950A et K962A/V950A inhibent complètement cette activation et l'interaction entre la PLD1 et Rho-A (Cai and Exton, 2001).
- ii) Cdc42 lie la PLD1 via sa région switch I. La forme active de Cdc42 (Q61L) interagit avec la PLD1 alors que les mutants Cdc42-F37A ou Y40C ne lient plus et n'activent pas la PLD1. En plus de ce site d'interaction, la région spécifique pour Rho de Cdc42 (*Rho insert region*) est indispensable pour l'activation de la PLD1. Cette région interfère aussi avec l'activation de la PLD1 par la PKC ou Arf, puisque sa délétion inhibe l'activité PLD en présence de ces deux protéines (Walker et al., 2000).
- iii) Le site d'interaction entre la PLD1 et Arf est encore inconnu. Cependant, l'activation de la PLD1 par les protéines Arf est dépendante du PIP2 (Chung et al., 1997, Henage et al., 2006) et du Mg^{2+} (Hammond et al., 1997).

Enfin, la PLD1 est activée par RalA-GTP. L'interaction entre ces deux protéines potentialise l'activation de PLD1 par Arf1/6 (Kim et al., 1998, Vitale et al., 2005). RalA et Arf1 interagissent avec la PLD1 sur deux sites distincts et elles coopèrent en synergie pour activer la PLD1 (Luo et al., 1997 , Kim et al., 1998). De même Rheb interagit et active la PLD1 *in vivo* et *in vitro*. Cette activation est contrôlée par la protéine GAP, TSC2 (Sun et al., 2008).

De nombreux groupes ont par la suite tenté de caractériser le rôle des GTPases monomériques dans l'activation de la PLD1 dans divers contextes cellulaires (Jang et al., 2002). Il s'avère que l'implication des GTPases est dépendante de type cellulaire et également en fonction de la voie de signalisation impliquée. Les travaux de notre équipe ont montré que les GTPases Arf6, RalA et Rac1 coopèrent pour permettre

l'activation optimale de la PLD1 au cours de l'exocytose dans les cellules chromaffines (Bader and Vitale, 2009).

5. Inhibition de l'activité PLD1 par des protéines du trafic membranaire

Des régulateurs négatifs de PLD1 ont également été identifiés. La stimulation de l'activité PLD1 en réponse au PMA dans les cellules KATOIII est inhibée par la surexpression d'AP180 impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine. Cette inhibition est médiée par l'interaction directe entre les deux protéines. AP180 lie l'extrémité carboxy-terminale de la PLD1 via les résidus TVTSP situés en position 311-314 (Lee et al., 1997, Cho et al., 2011). L'amphiphysine lie l'extrémité amino-terminale de la PLD et inhibe son activité induite par le PMA dans les cellules COS-7 (Lee et al., 2000a). La PI5P phosphatase synaptojanine inhibe également l'activité de la PLD via un mécanisme dépendant du PIP2 (Chung et al., 1997). Pour finir, Munc-18 inhibe aussi l'activité PLD via une interaction directe (Lee et al., 2004).

VI. Rôles cellulaires de la PLD1 et de son produit le PA

La caractérisation des régulateurs de la PLD1 tels que Arf, PKC et RhoA a permis de suggérer une implication de la PLD1 dans le trafic vésiculaire, dans la sécrétion et dans la signalisation cellulaire (Frohman et al., 1999). Etant donné les nombreuses fonctions cellulaires dans lesquelles la PLD1 a été impliquée (Jang et al., 2012), j'ai choisi de me focaliser sur les deux fonctions majeures de la PLD1 qui nous intéressent, à savoir son implication dans le trafic membranaire et la signalisation cellulaire.

1. Implication de la PLD1 dans le trafic vésiculaire et l'exocytose

Plusieurs études ont montré que la stimulation des cellules endocrines avec un sécrétagogue augmente l'activité PLD en parallèle de la sécrétion. Ceci suggère une implication de la PLD1 et/ou de la PLD2 dans la sécrétion. En effet, il a été démontré que la stimulation de la lignée des cellules β -pancréatiques MIN6 avec le glucose induit la libération d'insuline qui est accompagnée par une augmentation de l'activité PLD et plus spécifiquement de l'activité de la PLD1, puisque cette lignée n'exprime que cette isoforme. Dans ces cellules, la PLD1 endogène ou surexprimée est localisée en partie sur des vésicules riches en insuline. Le traitement de ces cellules

avec le 1-butanol (qui bloque la production de PA en formant un phosphatidylalcool) ou la surexpression d'un mutant catalytiquement inactif PLD1(K898R) réduit la translocation des vésicules d'insuline et leur libération (Hughes et al., 2004). Dans ces cellules, l'activation de la PLD1 en réponse au glucose est induite par Arf6. La PLD1, ainsi activée, induit la phosphorylation de mTOR et de sa cible p70S6K ou S6K. L'activation de la voie mTOR-S6K est impliquée dans la régulation de l'expression de Beta-2, un régulateur de la transcription du gène d'insuline et de la sécrétion de l'insuline. Ainsi l'inactivation d'Arf6 par le Bréfeldine A réduit l'activité de la PLD1 et en conséquence réduit l'expression de Beta-2 et la sécrétion de l'insuline (Ma et al., 2010). Un rôle direct de la PLD1 dans la fusion des vésicules d'insuline a aussi été proposé. En effet, la surexpression de la PLD1 dans les cellules 3T3L1 augmente la localisation du transporteur du glucose Glut4 à la membrane plasmique, suite à une stimulation par l'insuline. Cet effet est bloqué par le mutant inactif de PLD1(K898R) ou par l'extinction de la PLD1 (Huang et al., 2005). Le traitement des cellules avec de la lysophosphatidylcholine (LPC) qui induit une courbure membranaire positive de la membrane externe, restaure la localisation de Glut4 à la membrane plasmique en absence de l'activité de PLD1, suggérant que la PLD1 est impliquée dans l'étape finale de la fusion membranaire (Huang et al., 2005). L'implication de la PLD1 dans une étape finale de l'exocytose a également été démontrée par notre équipe dans les cellules chromaffines et les cellules PC12, parce que le LPC restaure la sécrétion en absence de PLD1 (Zeniou-Meyer et al., 2007).

La PLD1 joue également un rôle dans le trafic des vésicules contenant la GTPase Rap1 et dans sa localisation à la membrane plasmique (Mor et al., 2009). En effet, le traitement des cellules Jurkat T avec le 1-butanol inhibe la translocation des vésicules Rap1 à la membrane plasmique induite par la stimulation du récepteur des cellules T ou TCR (*T cell receptor*). Ces vésicules Rap1 contiennent aussi la PLD1. Il semble que la PLD1 contrôle la livraison des vésicules Rap1 à la membrane plasmique, où cette dernière sera activée par la G3G, une GEF activée par le TCR contrôlant l'adhésion cellulaire (Mor et al., 2009).

L'implication de la PLD1 et de son produit le PA dans la libération des contenus vésiculaires a aussi été démontrée dans les cellules endothéliales, où la stimulation par l'histamine induit la libération du facteur VWF (*Von Willebrand factor*) et en

parallèle une augmentation de l'activité de la PLD1 et la production de PA à la membrane plasmique (Disse et al., 2009). Le traitement des cellules avec le 1-butanol ou l'extinction de la PLD1 inhibe la sécrétion du facteur VWF induite par l'histamine.

D'autres études ont montré également l'implication de PLD1 dans la neurosécrétion. Humeau et al (2001) ont montré qu'une forme proche de la PLD1 est impliquée dans la libération d'acétylcholine par les neurones d'Aplysie (Humeau et al., 2001). D'autre part, la surexpression de PLD1-GFP dans des neurones d'hippocampe augmente la sécrétion de la serine protéase le tPA (*Tissue plasminogen activator*), induite par la forskoline ou l'ionophore calcique A23187. Ceci conduit également à augmenter la longueur des neurites (Zhang et al., 2005). Ces auteurs ont proposé que la PLD1 stimule la croissance neuritique en favorisant la libération de tPA.

La PLD1 est aussi impliquée dans le trafic des vésicules contenant APP (*Amyloid Precursor Protein*). En effet, la PLD1 joue un rôle important dans la formation et le transport des vésicules contenant APP à partir du réseau transgolgien vers la membrane plasmique. La localisation membranaire d'APP est essentielle pour induire son rôle dans la formation des synapses, la guidance de l'axone et la croissance neuritique. La surexpression de PLD1 restaure la croissance et le branchement neuritique en absence de la préséniline-1 (PS1), une sous unité de la γ -sécrétase impliquée dans le clivage d'APP en A β . En effet, cette surexpression augmente la production de PA et ainsi le trafic des vésicules APP en absence de PS1 (Cai et al., 2006). Pour finir, la PLD1 augmente aussi l'expression de PS1 à la membrane plasmique en absence d'APP. Cette augmentation est dépendante de l'activité de PLD1 (Liu et al., 2009).

1.1. Régulation de l'activité de la PLD1 pendant l'exocytose

Au cours de la stimulation de l'exocytose dans les cellules neuroendocrines, l'activité de PLD1 est stimulée par la phosphorylation de sa thréonine 147 par la kinase RSK2 (Zeniou-Meyer et al., 2007). D'autre part, cette phosphorylation augmente la production de PA à la membrane plasmique nécessaire à la sécrétion hormonale (Zeniou-Meyer et al., 2008). L'activité de la PLD1 au cours de la fusion des granules de sécrétion avec la membrane plasmique, dans les cellules PC12 ou les cellules

chromaffines, est aussi régulée par ARF6 et son facteur d'échange ARNO (Vitale et al., 2001, Vitale et al., 2002a, Vitale et al., 2002b, Begle et al., 2009). L'extinction d'ARF6 mais pas celle d'ARF1 réduit l'activité PLD induite par la stimulation de 60-70% et le recrutement à la membrane plasmique de Spo20-GFP, une sonde spécifique du PA. La production de PA à la membrane est PLD1 dépendante puisque seul l'extinction de la PLD1 bloque le phénomène, tandis que l'extinction de la PLD2 n'a pas d'effet (Begle et al., 2009).

Liu et al (2005) ont montré que SCAMP2, une protéine transmembranaire impliquée dans l'étape finale de la fusion, est impliquée dans le recrutement d'ARF6 à la membrane plasmique en réponse à la stimulation des cellules PC12 (Liu et al., 2005). Ceci est en accord avec les travaux de notre équipe qui ont montré pour la première fois qu'Arf6 est recruté des granules de sécrétion vers la membrane plasmique en réponse à une stimulation (Vitale et al., 2002a, Vitale et al., 2002b). Ainsi, il semble que SCAMP2 joue un rôle dans le recrutement et le rapprochement de PLD1 et d'ARF6, activée par ARNO, au niveau de site de fusion, où les quatre protéines colocalisent (Figure 22).

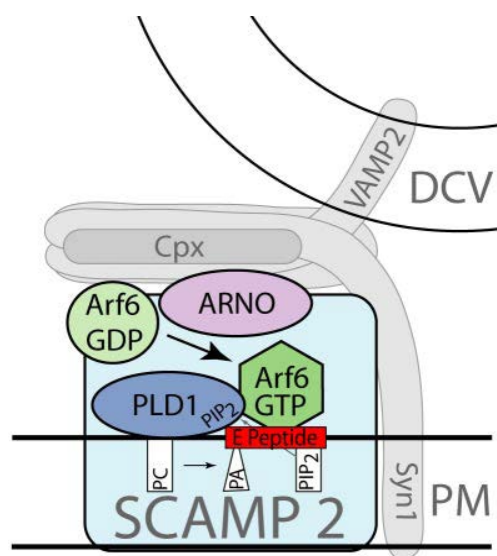


Figure 22: Modèle proposé de la régulation de PLD1 par Arf6 et ARNO lors de l'exocytose.
(Adapté de Liu et al., 2005).

De plus, la GTPase Rac1 est impliquée dans l'activation de la PLD1 et la production du PA au cours de la sécrétion hormonale dans les cellules PC12, mais pas RhoA ou Cdc42 (Momboisse et al., 2009). D'autre part, β Pix permet l'activation de Rac1 et

induit la production de PA via la PLD1 au niveau de site d'exocytose favorisant ainsi la libération hormonale (Momboisse et al., 2009). β Pix est recrutée à la membrane plasmique par le facteur suppresseur de tumeur Scribble via son domaine PDZ (Audebert et al., 2004).

La PKC semble aussi être impliquée dans la régulation de l'activité de PLD1 au cours de la libération hormonale, puisque la surexpression du mutant PLD1-PIM87, qui ne répond pas à la PKC, augmente la libération hormonale mais plus faiblement que la forme sauvage de la PLD1 (Vitale et al., 2001).

Enfin, la GTPase RalA est également impliquée dans l'exocytose des cellules chromaffines où elle stimule l'activité de la PLD1 de manière synergique avec Arf6 (Vitale et al., 2005). Des observations similaires ont été faites sur les cellules β -pancréatiques (Lijubicic et al., 2009). Dans ces cellules, RalGDS permet l'activation de RalA et ainsi son interaction avec le domaine amino-terminal de la PLD1 favorisant ainsi l'exocytose (Lijubicic et al., 2009).

1.2. Dynamique et fonction du PA pendant de l'exocytose

Afin d'étudier la dynamique de la production de PA lors de l'exocytose régulé, Zeniou-Meyer et al (2007) ont utilisé Spo20-GFP comme une sonde spécifique du PA. Ils ont montré par microscopie à onde évanescente, que la sonde Spo20-GFP est recrutée à la membrane plasmique suite à une stimulation de la sécrétion avec une cinétique extrêmement semblable à l'activité sécrétrice mesurée en parallèle par ampérométrie. L'étude ultra structurale des cellules transfectées avec cette sonde a montré en outre que le PA est produit à la périphérie cellulaire, probablement au niveau de la membrane plasmique et/ou au niveau des granules de sécrétion arrimés aux sites d'exocytose.

Pour résumer, le rôle potentiel de la PLD1 dans l'étape finale de la fusion membranaire semble dû à son produit le PA. Ce phospholipide pourrait moduler la fusion par au moins trois mécanismes distincts. Le PA pourrait stimuler le recrutement et l'activité de protéines de la machinerie d'exocytose telle que la syntaxine-1A (Lam et al., 2008). En effet, la syntaxine 1 contient un domaine juxtamembranaire polybasique qui interagit avec les phospholipides anioniques

comme le PA et le PIP2 (Lam et al., 2008). Le PA peut également modifier la topologie membranaire en favorisant localement une courbure membranaire négative du feuillet interne de la membrane plasmique (Figure 23, chapitre précédent et Ammar et al., 2013b). Enfin, le PA peut être transformé en d'autres lipides de signalisation comme le DAG qui peuvent également recruter et activer certaines protéines associées au complexe SNARE.

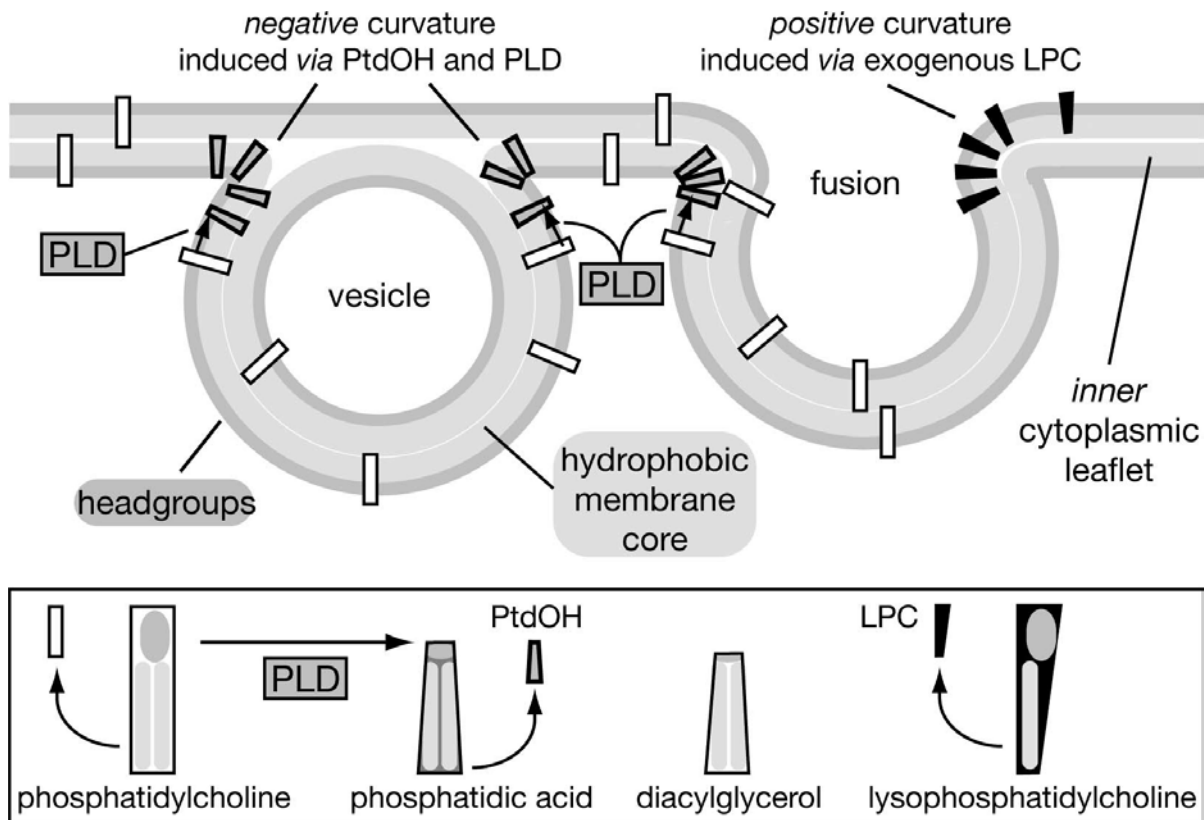


Figure 23: Modèle proposé pour le rôle fusiogénique du PA lors de l'exocytose. Au cours de l'étape finale de l'exocytose, l'activation de la PLD1 induit la production de PA au niveau des sites d'exocytose. L'accumulation de PA au niveau de la membrane plasmique facilite une courbure négative. D'autre part, le LPC facilite une courbure positive de la membrane grâce à sa forme conique inverse, ce qui permet d'expliquer qu'il puisse restorer l'activité sécrétrice en absence de PLD1. Adapté (Cazzolli et al., 2006).

2. Implication de la PLD1 dans la signalisation cellulaire

Le PA produit par la PLD pourrait jouer un rôle important dans la modulation de la signalisation cellulaire soit via le recrutement des partenaires de signalisation à la membrane ou via une activation directe.

2.1. Régulation de l'activité de PI4P5K

La PI4P5K catalyse la production de PIP2 à partir de PI4P. Comme je l'ai décrit initialement, le PIP2 joue un rôle important dans le trafic membranaire (exocytose et endocytose). Donc il me semble intéressant d'exposer ici le rôle potentiel de la PLD1 dans la régulation de la production de PIP2. En effet, les premières études ont montré que le PA stimule l'activité de PI4P5K *in vitro* et *in vivo* (Jenkins et al., 1994, Divecha et al., 2000). Ensuite, Jarquin-Pardo et al., (2007) ont montré que le PA lie l'extrémité carboxy-terminale de la PI4P5K-I β et augmente ainsi son affinité pour son substrat (PI4P) et que cette interaction régule la dynamique de l'actine et la formation des fibres de stress dans les cellules NIH3T3 (Jarquin-Pardo et al., 2007). Récemment, Roach et al., (2012) ont confirmé l'implication du PA dans la régulation de l'activité de PI4P5K et identifié le site de liaison du PA au niveau de la PI4P5K-I γ (Roach et al., 2012). Il est aussi important de noter que la PLD1 sembler interagir directement avec la PI4P5K-I (Divecha et al., 2000). En fait, il semble qu'Arf6 et la PLD agissent dans une boucle de synergie positive pour activer la PI4P5K- α , afin de produire le PIP2 à la membrane plasmique (Honda et al., 1999, Perez-Mansilla et al., 2006).

2.2. Régulation des voies MAPK et mTOR/S6K par le PA

Il a été démontré que la PLD1 est également impliquée via le PA dans l'activation de la voie Ras-ERK1/2 en contrôlant la localisation subcellulaire de Raf (Ghosh and Bell, 1997, Rizzo et al., 2000, Wang et al., 2002, Ghosh et al., 2003). D'autre part, la PLD1 régule l'activité de mTOR/S6K via le PA (Fang et al., 2003, Yoon et al., 2011). En effet, il semble que le PA régule l'activation de la voie MAPK par le recrutement des partenaires de cette voie à la membrane cellulaire, telles que Raf, SOS et KSR (Andresen et al., 2002). D'autre part, il a été démontré que le PA recrute la protéine kinase Raf à la membrane plasmique, au niveau des rafts lipidiques riches en caveoline suite à une stimulation à l'EGF (Hu et al., 2000). De plus, le PA sert à recruter Raf au niveau de la membrane endosomale suite à une stimulation à l'insuline (Rizzo et al., 2000).

D'autre part, il a été démontré que la PLD1 régule l'activation d'ERK1/2 via un mécanisme dépendant de la protéine PEA15 (Sulzmaier et al., 2012). Il est aussi intéressant de souligner que le PA pourrait réguler l'expression de la PLD1 via l'activation de la voie MAPK. En effet, le traitement des cellules cancéreuses SKBR3 avec un facteur de croissance induit une augmentation de l'expression de PLD1 via un mécanisme dépendant de l'activation des voies Ras-Raf-Mek-ERK1/2-NFκB et Ras-AKT-NFκB via le PA (Figure 24) (Kang et al., 2010).

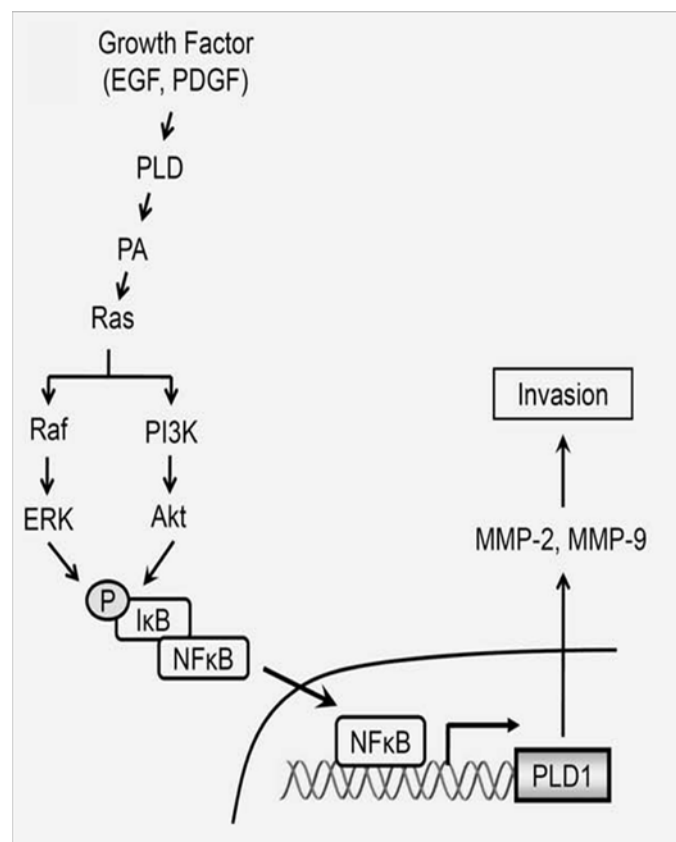


Figure 24: Modèle de la régulation de l'expression de PLD1 via les voies de signalisation MAPK et PI3K-NFκB sous le contrôle de PA.

Concernant mTOR (*mammalian target of rapamycin*), il a été démontré que le PA produit par la PLD1 régule l'activation de mTOR. En effet, le PA lie mTOR au niveau de son domaine FRB (*FKBP12-rapamycin-binding domain*, Fang et al., 2003). Cette interaction semble entrer en compétition directe avec la rapamycine, régulant ainsi l'activation de mTOR (Fang et al., 2001). D'autre part, la PLD1 pourrait réguler l'activation de mTOR via l'interaction avec son régulateur Rheb (Sun et al., 2008).

VII. Expression de la PLD1 dans le système nerveux

Une étude menée par Colley et al., (1997) a montré une expression forte de la PLD1 dans différentes régions du système nerveux murin. Ainsi, une forte expression de la PLD1 a été détectée au niveau de gyrus denté, de la moelle épinière et de la rétine. Au niveau du gyrus denté, la PLD1 apparaît localisée au niveau des neurones. D'autre part, l'expression de la PLD1 diminue drastiquement dans les cellules au cours de leur différenciation en neurones et au cours de la migration à la couche extérieur de la moelle épinière et du cortex. De plus, ils ont noté que la PLD1 est fortement exprimée au niveau du neuroépithélium. En revanche, ils ont montré que la PLD2 est exprimée principalement dans des cellules de petite taille, ce qui semble cohérent en apparence avec une expression de la PLD2 dans les cellules gliales au niveau de gyrus denté.

Lee et al (2000) ont montré que la PLD1 a une expression neuronale ubiquitaire au niveau du cerveau et la moelle épinière de rat. De plus, ils ont noté une expression forte de la PLD1 au niveau du cortex, de bulbe olfactif, cervelet et la moelle épinière. A l'échelle cellulaire, ils ont montré que la PLD1 est localisée principalement au niveau de soma neuronal ainsi qu'au niveau des certains astrocytes (Lee et al., 2000b).

Lorsque l'expression de la PLD1 a été étudié à l'aide d'un anticorps anti-PLD1 purifié par affinité, un fort signal a été observé dans l'hippocampe en développement, notamment au niveau des secteurs CA1 and CA3 et du gyrus denté (Figure 25)(Min et al., 2001b). Apparemment une forte augmentation du signal PLD1 a été détectée la première semaine postnatale suivie d'une diminution notable, suggérant que la PLD1 puisse être impliqué dans le développement des neurones hippocampiques.

VIII. Rôle de la PLD1 dans la croissance neuritique

Des études antérieurs ont suggéré l'implication de la PLD1 et de la PLD2 dans la croissance neuritique (Kanaho et al., 2009). Je me focaliserai ici sur l'implication de la PLD1 dans la régulation de la croissance neuritique.

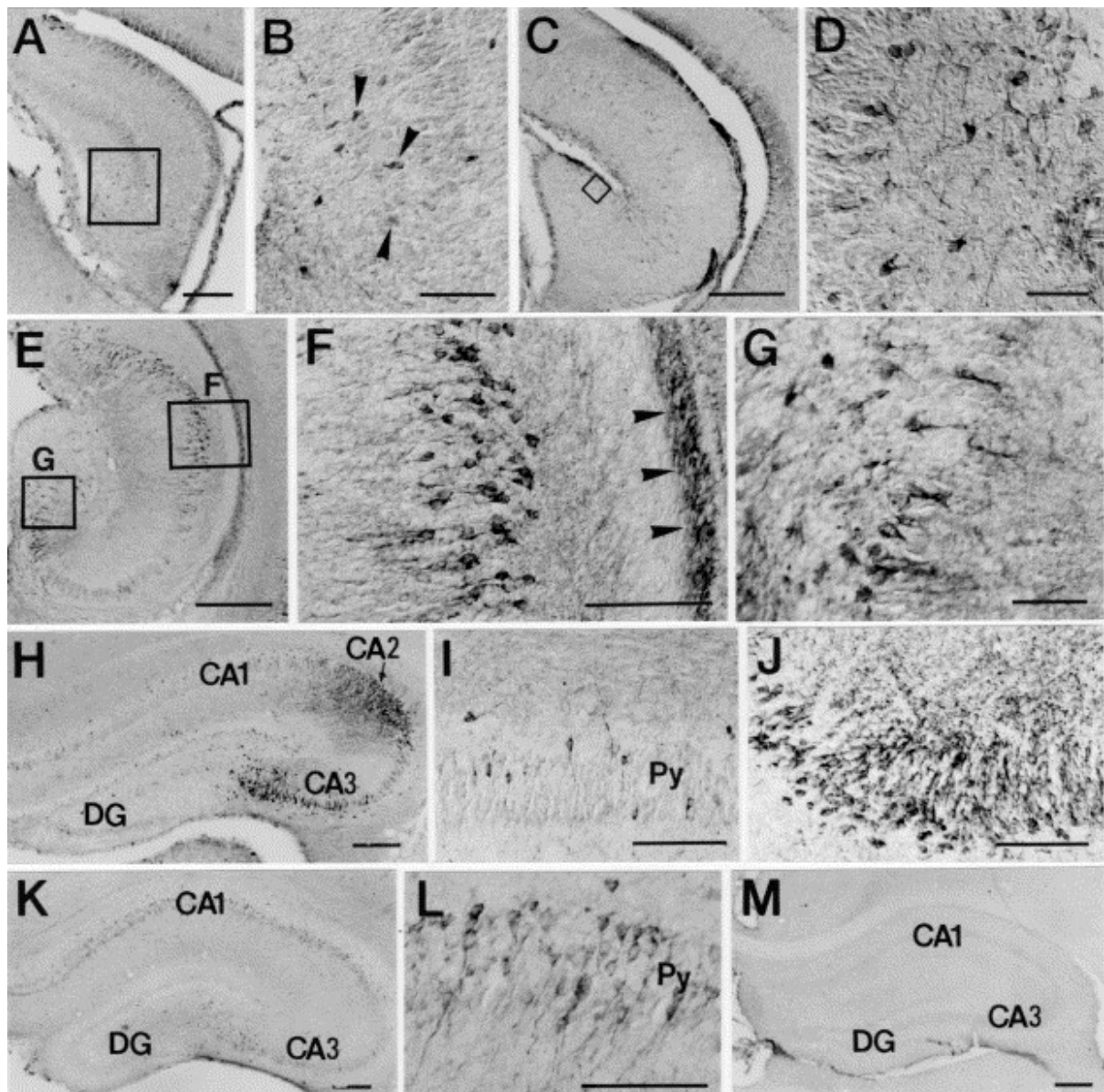


Figure 25: Expression de la PLD1 dans l'hippocampe de rat au cours du développement. (A) Coupe d'hippocampe à E18. (B) grossissement d'une région de (A) montrant l'expression neuronale de la PLD1 indiquée par une flèche. (C) Coupe d'hippocampe à E20. (D) grossissement d'une région de (C) montrant l'augmentation de l'expression neuronale de la PLD1. (E) Coupe d'hippocampe à P1. (F) un grossissement de la CA1, les flèches indiquent l'expression forte de la PLD1 au niveau de la zone ventriculaire du ventricule latérale et (G) un grossissement de la CA3. (H) Coupe d'hippocampe à P3. (I) grossissement d'une région de la couche des cellules pyramidales (Py) de la zone CA1. (J) grossissement de la zone CA2, notez l'expression forte de la PLD1 au niveau de cette zone. (K) Coupe d'hippocampe à P7. (L) grossissement de la zone CA1. (M) Coupe d'hippocampe à P14. Echelle: 200 μ m (A) ; 50 μ m (B, D, G) ; 300 μ m (C, E, H, K, M) et 100 μ m (F, I, J, L). (Adapté de Min et al., 2001a).

L'implication de la PLD1 dans la croissance neuritique a été examiné dans plusieurs types cellulaires telles que les cellules PC12 (Hayakawa et al., 1999, Min et al., 2001a), les cellules H19-7 (Oh et al., 2007, Choi et al., 2012, Yoon et al., 2012) et les neurones (Lalli and Hall, 2005, Zhang et al., 2005, Cai et al., 2006, Zhu et al., 2012).

Au niveau des cellules PC12, l'induction de la différenciation neuronale par le NGF induit une forte augmentation de l'expression de la PLD1 ainsi que son activité en parallèle de la croissance neuritique (Hayakawa et al., 1999 , Min et al. 2001b). D'autre part, Yoon et al (2005) ont montré que l'expression de la PLD1 augmente au cours des premiers jours du développement des neurones corticaux en culture. De même l'expression de la PLD1 est forte au cours de 5 premiers jours en culture des neurones d'hippocampe (Zhu et al., 2012). Ceci suggère un rôle potentiel de la PLD1 au cours de la formation et la croissance neuritique.

Il est intéressant de noter que la PLD1 régule la croissance neuritique des cellules H19-7 via un mécanisme dépendant de la régulation transcriptionnelle de Bcl-2 et des facteurs neurotrophiques BDNF et NT4/5 (Yoon et al., 2012). En effet, ces auteurs ont montré que le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) induit la croissance neuritique des cellules H19-7 suite à l'activation de la voie Ras-PI3K-PLC γ . Cette voie induit l'activation de la PLD1, qui à son tour induit l'expression de Bcl-2 et ainsi l'augmentation de l'expression des facteurs neurotrophiques.

1. Régulation de l'activité de la PLD1 pendant la croissance neuritique et le développement neuronal

Il a été démontré, au cours de la différenciation des cellules PC12, que l'activité PLD1 est régulée par la PKC (Min et al., 2001b). De même, ces auteurs ont trouvé que la PLD1 interagit avec la protéine Shc, qui lie le récepteur du NGF (TrkA). Au cours du développement neuronal, l'activité de la PLD1 est régulée par Cdc42 (Yoon et al., 2006), par RhoA (Zhu et al., 2012) et par Ral (Lalli et al., 2005). Ces derniers auteurs ont montré que Ral augmente la ramification de l'arborisation dendritique via un mécanisme qui dépend en partie de la PLD1.

En revanche, Zhu et al (2012) ont montré que la PLD1 inhibe la ramification dendritique des neurones d'hippocampe en culture. En effet, ils ont montré que l'extinction de la PLD1 augmente la ramification dendritique et que la surexpression de la PLD1 inhibe ce phénomène, probablement via un mécanisme dépendant de RhoA.

2. Les limites des outils utilisés pour étudier la fonction des PLDs

A ce jour, les études portant sur l'implication de la PLD1 dans la croissance neuritique et le développement neuronal se sont basées sur trois stratégies différentes : i) inhibition de la production de PA par le 1-butanol (réaction de transphosphatidylation en présence d'alcool qui forme un phosphatidyl-alcool à la place du PA) comme marqueur de l'activité PLD globale, ou ii) l'extinction de l'expression de PLD1 par ARN interférence ou iii) la surexpression de la PLD1 ou de mutants.

Malheureusement, l'utilisation de 1-butanol ne permet pas de distinguer entre la fonction de l'une de deux isoformes, et plus problématique certaines études récentes ont montré que les effets observés suite à un traitement avec le 1-butanol ne sont pas spécifiques pour PLD1 ou PLD2 (Sato et al., 2013). D'autre part, la surexpression de PLD pourrait conduire à la formation de vésicules anormales, comme cela a été décrit pour certaines GTPase. Pour finir, les études par ARN interférence ne permettent pas de tenir compte du rôle joué par la PLD dans la cellule avant que l'extinction soit complète. Ceci est particulièrement vrai pour l'étude de l'implication de la PLD dans le développement neuronal, notamment parce que le niveau d'expression de PLD1 est spécifiquement élevé au cours des premiers temps de ce processus.

IX. Le modèle murin *Pld1*^{-/-}

Afin de circonvenir à certains des défauts exposés ci-dessus, nous avons choisi d'utiliser un modèle de souris invalidées pour la PLD1. Une cassette LacZ/NEO a été insérée entre l'exon 3 et l'exon 5 par recombinaison hétérologue (Figure 26). L'insertion de la cassette a été contrôlée par Southern Blot. L'ADN génomique a été digéré par l'enzyme de restriction *Bgl*III et les bandes ont été révélées par une sonde localisée en amont de l'exon 3. La bande wild-type (+/+) fait 9.4kb et celle contenant la cassette fait 11 kb. L'absence d'expression du messenger PLD1 et de la protéine a été également vérifiée par RT-PCR et western blot, respectivement (Elvers et al., 2010).

Les souris hétérozygotes *Pld1*^{+/-} ou homozygotes *Pld1*^{-/-} se développent normalement. Elles sont fertiles et ont un comportement similaire à celui des souris sauvages. Par ailleurs, Elvers et al., 2010 ont montré que ces souris ont un problème

de coagulation sanguine via un mécanisme dépendant de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et un défaut d'agrégation dépendant de la glycoprotéine 1b.

Un deuxième modèle *Pld1*^{-/-} a été récemment décrit par Dall'Amri et al., (2010). Il a été obtenu par l'élimination des deux exons 13 et 14. Ces auteurs ont montré un défaut d'autophagie en absence de la PLD1 dans ce modèle de souris.

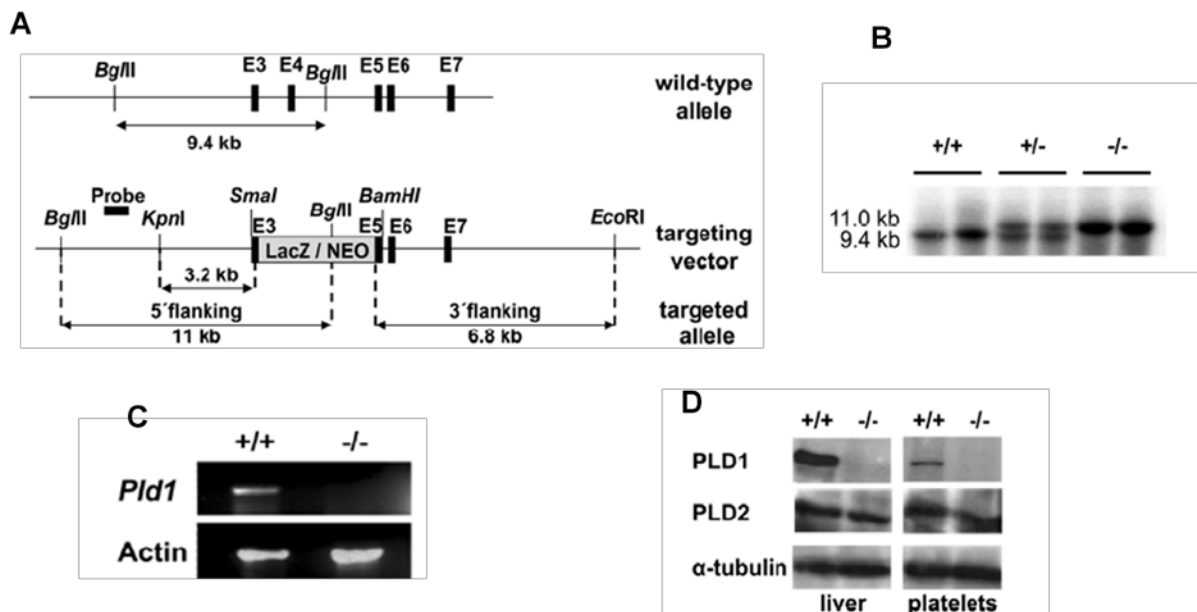


Figure 26: Stratégie de génération de la souris *Pld1*^{-/-}.

En Conclusion, l'activité PLD1 est contrôlée par plusieurs régulateurs intracellulaires. En outre, ces régulateurs jouent un rôle majeur soit dans la régulation de la dynamique du cytosquelette ou/et dans le trafic membranaire. Comme je l'ai détaillé dans l'introduction, ces deux processus biologiques sont à la base de la croissance neuritique et du développement neuronal.

Une altération du développement neuronal pourrait être une cause du retard mental caractéristique du syndrome de Coffin-Lowry, causé par la perte de l'activité kinase de RSK2. L'implication de la PLD1 dans la croissance neuritique ainsi que le contrôle de l'activité enzymatique de la PLD1 par RSK2 au cours de l'exocytose, nous ont laissé penser à un lien possible entre les deux protéines au cours du développement neuronal. Une altération de ce lien éventuel en cas de perturbation de l'expression de RSK2 pourrait ainsi contribuer au développement de la pathologie du syndrome de Coffin-Lowry.

RESULTATS

RESULTATS

I. Article 1

La kinase RSK2 responsable du syndrome de Coffin-Lowry régule la croissance neuritique via la phosphorylation de la PLD1 conduisant à la synthèse d'acide phosphatidique

La kinase RSK2 est impliquée dans plusieurs processus cellulaires tel que la différenciation et la survie cellulaire. L'altération de l'activité kinase de RSK2 est impliquée dans le développement d'une pathologie humaine caractérisée principalement par un retard mental nommée le syndrome de Coffin-Lowry. La physiopathologie de ce syndrome est encore mal connue, mais elle semble impliquer, pour cet aspect cognitif, une altération du fonctionnement du système nerveux qui peut être lié à des défauts du fonctionnement synaptique et/ou du développement du réseau synaptique.

De part l'implication supposée de la PLD1 dans la croissance neuritique dans des systèmes neuronaux modèles ainsi que le contrôle de l'activité enzymatique de la PLD1 par RSK2 identifié par notre équipe, il nous est apparu opportun de tester l'hypothèse d'un lien possible entre les deux protéines au cours du développement neuronal. Une altération de ce lien éventuel en cas de perturbation de l'expression de RSK2 pourrait ainsi contribuer développement de la pathologie du syndrome du Coffin-Lowry.

Ainsi durant la première partie de ma thèse, je me suis focalisé à déterminer l'effet de l'absence de la PLD1 sur le développement des neurones corticaux en culture en utilisant un modèle de souris transgénique *Pld1*^{-/-}, récemment mis en place dans mon équipe.

Mais dans un premier temps, je me suis attaché à déterminer le niveau d'expression de la PLD1 au cours du développement cérébral chez la souris. Les résultats obtenus montrent :

- i) une forte expression de la PLD1 au cours du développement du cortex embryonnaire (E15 et E16, Figure 27).
- ii) Une forte expression de la PLD1 au cours de la première semaine du développement des neurones corticaux en culture, avec un maximum entre 2DIV et 3DIV. Ceci coïncide avec la croissance axonale (2-4 DIV) et le quatrième stade du

développement neuronal (4-15 DIV) comprenant la formation des dendrites et leur ramification (Figure 28).

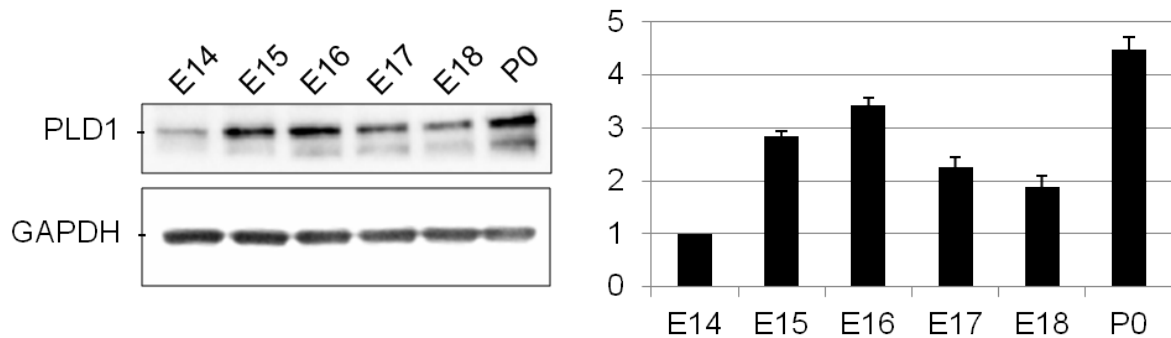


Figure 27: Expression de la PLD1 dans le cortex au cours du développement embryonnaire. A chaque stade du développement, le cortex de souris a été prélevé et lysé, puis 35 µg de protéines ont été déposées et migrées sur un gel de polyacrylamide. Après transfert, les protéines ont été révélées par l'application d'un anticorps spécifiques : anti-PLD1 ou GAPDH. Le niveau d'expression de PLD1 a été déterminé par rapport au taux d'expression de GAPDH. Quantification des deux expériences différentes où l'expression moyenne est normalisée par rapport à l'expression moyenne des neurones à E14.

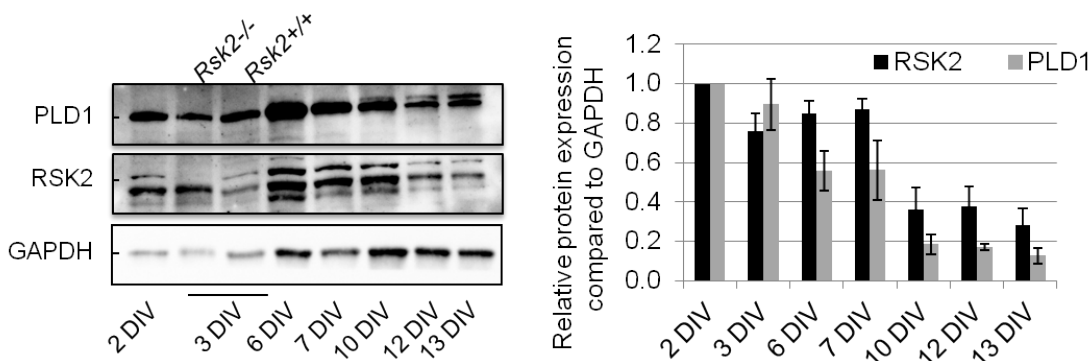


Figure 28: Expression de PLD1 et de RSK2 au cours du développement des neurones corticaux en culture. Des neurones corticaux (E17) ont été mis en culture puis lysés après différents temps de culture *in vitro* (2, 3, 6, 7, 10, 12 et 13 DIV). 35 µg de protéines ont été déposées et migrées sur un gel de polyacrylamide. Après transfert, les protéines ont été révélées par l'application des anticorps spécifiques : anti-PLD1, anti-RSK2 et GAPDH. Le niveau d'expression de chaque protéine a été déterminé par rapport au taux d'expression de GAPDH. Quantification de deux expériences différentes où l'expression moyenne a été normalisée par rapport à l'expression moyenne des neurones à 2 DIV.

iii) En absence de la PLD1, les neurones corticaux en culture ont un retard de développement par rapport aux neurones *Pld1*^{+/+}. De plus, l'absence de PLD1 affecte la ramification de l'arborisation dendritique touchant principalement la

ramification secondaire, ainsi que la maturation des épines dendritique (Voir publication Ammar et al., 2013a).

iv) d'une manière intéressante en absence de RSK2 les neurones corticaux en culture ont aussi un retard du développement semblable à celui observé chez les neurones *Pld1*^{-/-} (Voir publication Ammar et al., 2013a).

Afin de déterminer le lien possible entre ces deux protéines au cours de la croissance neuritique, j'ai utilisé la lignée cellulaire PC12 qui développe des neurites en présence de NGF et qui présente l'avantage d'être beaucoup plus facilement transfectable que des neurones en culture primaire. L'inhibition pharmacologique de l'activité de l'une des deux protéines ou l'extinction par ARN interférence de PLD1 et RSK2 ont confirmé l'implication de ces deux protéines dans la croissance neuritique sur ce modèle cellulaire (Voir publication Ammar et al., 2013a). D'une manière intéressante, j'ai trouvé que le traitement des cellules PC12 avec un inhibiteur des PLD (FIPI) ou de la PLD1 (CAY93) avant la première stimulation par le NGF a un effet plus drastique sur le nombre de cellules PC12 développant des neurites et sur la longueur des neurites que si cet inhibiteur est ajouté après le NGF (Figure 29). Ces résultats indiquent que l'inhibition de la PLD réduit le développement des neurites même si celui-ci est engagé, mais il souligne également le fait que la PLD semble impliqué de manière très précoce dans la croissance neuritique de cellules PC12 induite par le NGF.

J'ai pu montrer dans les cellules PC12 que le NGF induit une stimulation rapide de la voie MAPK-ERK1/2, ainsi que la phosphorylation et l'activation de RSK2, suivie par une phosphorylation, dépendante de RSK2, de PLD1 sur sa thréonine 147 (Voir publication Ammar et al., 2013a). D'autre part, j'ai pu mettre en évidence que RSK2 et PLD1 colocalise à la périphérie cellulaire suite à la stimulation des cellules PC12 par le NGF (Voir publication Ammar et al., 2013a). De plus, j'ai mis en évidence une interaction potentielle entre ces deux protéines ou tout du moins leur présence dans un complexe multiprotéique puisqu'elle co-immunoprécipite suite à la stimulation des cellules PC12 par le NGF. La stimulation par le NGF conduit également à une augmentation de l'activité PLD mesurée sur des extraits de cellules PC12 et l'utilisation d'une sonde pour le PA m'a permis de mettre en évidence une synthèse

de PA aux sites de développement des neurites (Voir publication Ammar et al., 2013a).

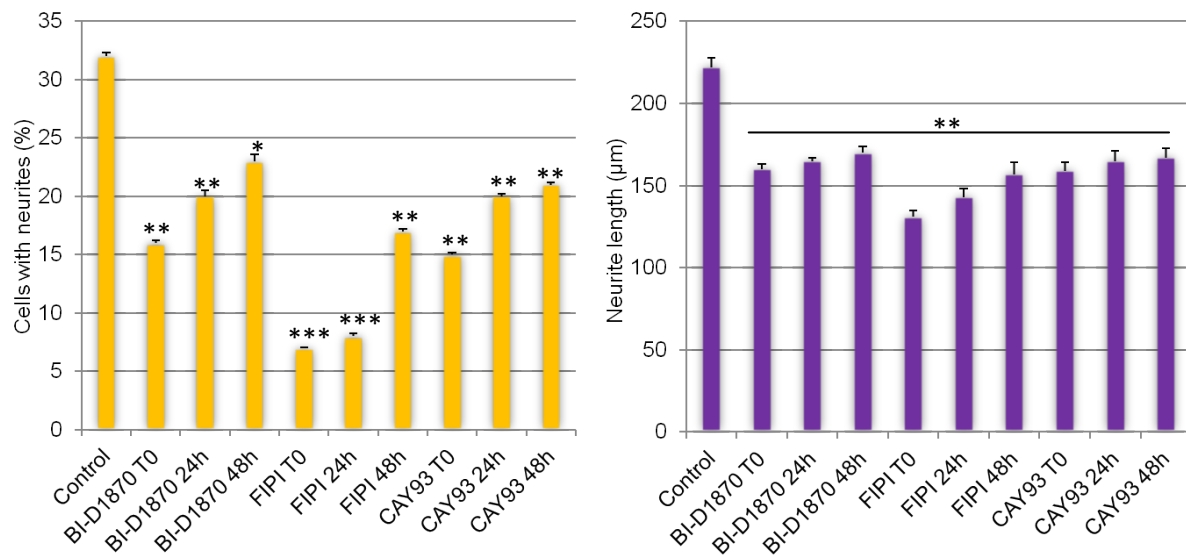


Figure 29: Réduction de la croissance neuritique induite par le NGF des cellules PC12 traitées par des inhibiteurs de PLD ou de RSK. Des cellules PC12 stimulées par le NGF pendant 6 jours ont été traitées par les inhibiteurs indiqués soit i) 30 min avant la première application du NGF (T0), ou ii) 24h après la première application du NGF, ou iii) 48h après la première application du NGF. Après 6 jours, les cellules ont été fixées et marquées par la phalloïdine couplée à la rhodamine. Les mesures de longueur des neurites ont été faites à l'aide d'ImageJ. FIPI est un inhibiteur de PLD1 et de PLD2, CAY93 est un inhibiteur spécifique de la PLD1 et BI-D1870 est un inhibiteur de RSK2.

D'une manière intéressante, j'ai trouvé que la PLD1 colocalise avec la protéine SNARE Ti-VAMP ou VAMP7 sur des structures vésiculaires périnucléaires et également au niveau des neurites (Voir publication Ammar et al., 2013a). Vu le rôle important de Ti-VAMP dans le trafic membranaire et la croissance neuritique, j'ai voulu vérifier si PLD1 et RSK2 peuvent moduler l'exocytose des vésicules Ti-VAMP au cours de la croissance neuritique. Des expériences de microscopie à onde évanescente m'ont permis de montrer que PLD1 et RSK2 sont importantes pour la fusion des vésicules VAMP7 au niveau du cône de croissance, permettant ainsi l'apport de membrane nécessaire à la croissance des neurites (Voir publication Ammar et al., 2013a).

Etant donné que la croissance dendritique est également régulée par la dynamique du cytosquelette, j'ai examiné l'organisation des microtubules au sein de cette

structure. Une analyse préliminaire semble indiquer que cette organisation n'est pas affectée en absence de la PLD1 (Figure 30).

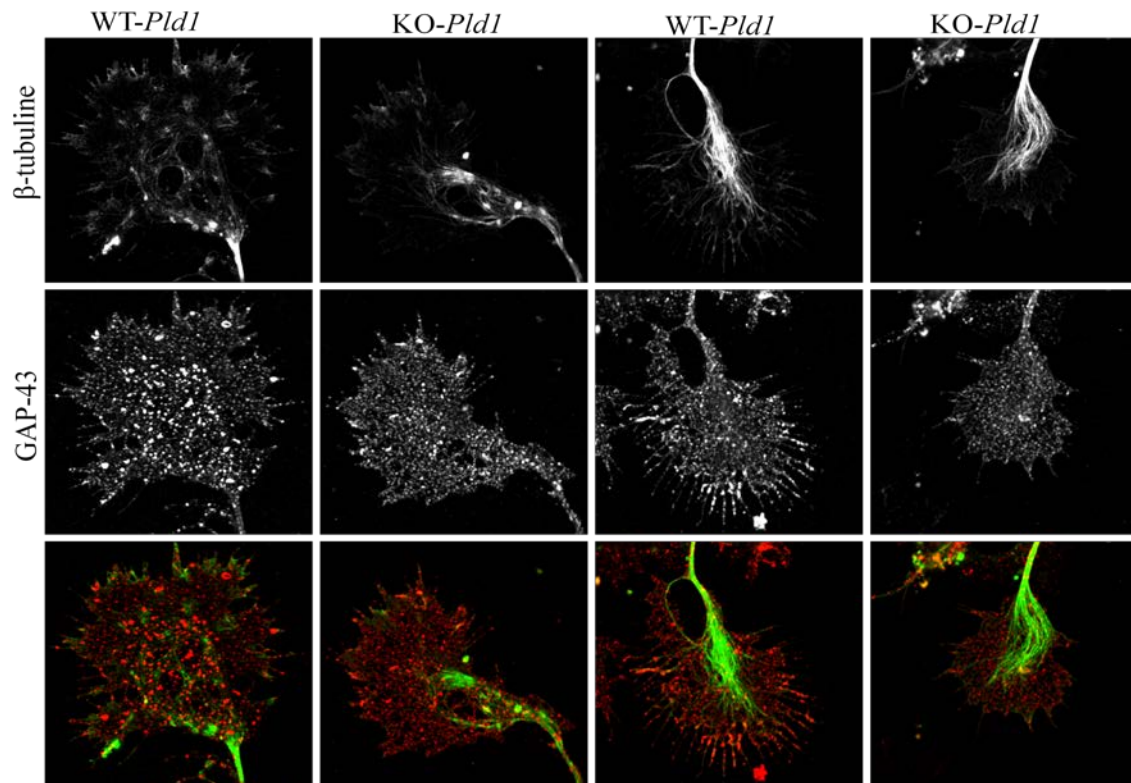


Figure 30: Organisation des microtubules au niveau des cônes de croissance des neurones *Pld1*^{+/+} et *Pld1*^{-/-}. Les cônes de croissance ont été révélés par un marquage avec la protéine GAP-43 et l'organisation des microtubules au sein du cône est révélée par un marquage avec un anticorps anti β -tubuline. Bar = 10 μ m.

The Journal of Neuroscience

<http://jneurosci.msubmit.net>

Nicolas Vitale, CNRS UPR-3212

Commercial Interest:

The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 regulates neurite outgrowth through phosphorylation of phospholipase D 1 (PLD1) and synthesis of phosphatidic acid

Regulation of PLD1 by RSK2 during neurite outgrowth

Ammar M.R.¹, Humeau Y², Hanauer A.³, Nieswandt B.⁴, Bader M.F.¹, & Vitale N^{1,5}.

¹ Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UPR-3212 Centre National de la Recherche Scientifique & Université de Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France.

^é Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS), UMR-5297 Centre National de la Recherche Scientifique & Université de Bordeaux 2, 146, rue Léo-Saignat 33077 Bordeaux Cedex, France.

³ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale & Université de Strasbourg, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, France.

⁴ Chair of Vascular Medicine, University Hospital and Rudolf Virchow Center - DFG Research Center for Experimental Biomedicine - Josef-Schneider-Strasse 2; D15, 97080 Würzburg, Germany.

⁵ Corresponding author: vitalen@inci-cnrs.unistra.fr

28 pages, 9 figures, Abstract 225 words, Introduction 491 words, Discussion 1210 words

ACKNOWLEDGMENTS. We thank T. Thahouly and V. Calco for technical assistance, Drs S. Chasserot-Golaz, S. Gasman, N. Grant, and S. Ory for critical reading of the manuscript and the microscopy facilities of Plateforme Imagerie In Vitro. pHluorin-VAMP-7 was provided by Dr. T. Galli (Institut Jacques Monod, Paris). This work was supported by Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-09-BLAN-0326-01 (to N.V.), Fondation Jérôme Lejeune (to A.H.), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant Ni556/8-1 (to B.N.).

ABSTRACT

More than 80 human X-linked genes have been associated with mental retardation (MR) and deficits in learning and memory. However, most of the identified mutations induce limited morphological alterations in brain organization and the molecular bases underlying neuronal clinical features remain elusive. We show here that neurons cultured from mice lacking ribosomal S6 kinase 2 (*Rsk2*), a model for the Coffin-Lowry syndrome (CLS), exhibit a significant delay in growth in a similar way to that shown by neurons cultured from phospholipase D1 (*Pld1*) knockout mice. We found that gene silencing of *Pld1* or *Rsk2* as well as acute pharmacological inhibition of PLD1 or RSK2 in PC12 cells strongly impaired neuronal growth factor (NGF)-induced neurite outgrowth. Expression of a phosphomimetic PLD1 mutant rescued the inhibition of neurite outgrowth in PC12 cells silenced for RSK2, revealing that PLD1 is a major target for RSK2 in neurite formation. NGF-triggered RSK2-dependent phosphorylation of PLD1 led to its activation and the synthesis of phosphatidic acid at sites of neurite growth. Additionally, TIRF microscopy experiments revealed that RSK2 and PLD1 positively control fusion of TiVAMP/VAMP-7 vesicles at sites of neurite outgrowth. We propose that the loss of function mutations in *RSK2* that leads to CLS and neuronal deficits are related to defects in neuronal growth due to impaired RSK2-dependent PLD1 activity resulting in a reduced vesicle fusion rate and membrane supply.

INTRODUCTION

Coffin–Lowry syndrome (CLS) is a rare syndromic form of mental retardation (MR) that shows X-linked inheritance (Hanauer and Young, 2002). Key features of CLS are growth and psychomotor retardation, characteristic facial and digital abnormalities, and progressive skeletal alterations (Manouvrier-Hanu et al., 1999). CLS is caused by heterogeneous loss-of-function mutations in the *RSK2* (90-kDa ribosomal S6 kinase) gene (*RPS6KA3*) that maps to Xp22. 2 (Trivier et al., 1996). *RSK2* is a serine-threonine protein kinase of 740 amino acids (90kDa) that belongs to a family of four members, *RSK1-4*, that share a highly conserved structure and are widely expressed in mammals and in many cell types. *RSK2* was first described to act at the distal end of the ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway (Frödin and Gammeltoft, 1999). Different substrates of *RSK2* subsequently identified include transcription factors such as ATF4, cFOS and CREB (Pereira et al., 2010). Activation of *RSK2* is, therefore, thought to influence gene expression and to be involved in cell proliferation and survival.

In human and mouse, the highest levels of *RSK2* expression are observed in regions with high synaptic activity, including the neocortex, the hippocampus, and Purkinje cells, which are essential components in cognitive function and learning, suggesting that *RSK2* might function in these processes (Zeniou et al., 2002). Indeed, deletion of *RSK2* orthologue (*S6KII*) in *Drosophila* leads to short-term memory defects in a classical olfactory learning paradigm. The *Rsk2*-null mouse created as a model for CLS develops a progressive osteopenia due to impaired osteoblast function (Yang et al., 2004). Although no major brain abnormalities are evident at the anatomical and histological levels in *Rsk2*-KO mice, behavioral studies reveal profound retardation in spatial learning and a deficit in long-term spatial memory (Poirier et al., 2007). On the other hand, a number of subtle neuroanatomical abnormalities have been found in CLS individuals (Hunter, 2002; Stephenson et al., 2005). For example, a

morphometric MRI-based study of CLS brain morphology has revealed a reduced total brain volume that appeared to be correlated with the severity of CLS outcome (Kesler et al., 2007). Altogether, these observations favor a role for RSK2 in the development and plasticity of neuronal circuits, but the molecular basis for this function remains elusive.

In agreement with a direct role of RSK2 in neurotransmission, we recently described that RSK2 is a critical upstream signaling element in the activation pathway of phospholipase D1 (PLD1), which produces fusogenic lipids required for calcium-regulated exocytosis (Zeniou-Meyer et al., 2008; 2009). Taking into consideration that both PLD1 and PLD2 have been implicated in the regulation of neurite growth in neural cell lines and neural stem cells (Kanaho et al., 2009), we decided to investigate whether mutations or loss of expression of RSK2 interfere with the growth and development of neurons by modulating PLD activity. Using cultures of cortical neurons from transgenic mice models and PC12 cells, we demonstrate that RSK2 is an essential modulator of PLD1 activity and is required for neurite outgrowth.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Antibodies anti- β -tubulin (Cell Signaling), anti-RSK2 (Santa Cruz Biotechnology), anti-PLD1, anti-SNAP25, anti-ERK, anti-phospho-ERK, anti-phospho-RSK (New England BioLabs), anti-MAP2 (Sigma), anti-phospho-PLD1 (Thr-147) (Cell Signaling) were used. The RSK inhibitor BI-D1870 was obtained from Enzo Life Sci., the PLD1 inhibitor CAY-10593 (CAY-93) from Interchim, DRAQ5 from Biostatus, and NGF, phalloidin-tetramethylrhodamine B, and FIPI from (Sigma). Plasmids and siRNA sequences have been described previously (Corrotte et al., 2006.; Zeniou-Meyer et al., 2007; 2008) pHluorin-VAMP-7 was provided by Dr. T. Galli (Institut Jacques Monod, Paris).

Animals and tissue dissection. *Pld1*^{-/-} and *Rsk2*^{-/-} mice were described previously (Elvers et al., 2010; Yang et al., 2004). All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24th November 1986 (86/609/EEC). Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

Cell Culture and NGF treatment. Cortical neurons were cultured from E15 mice in Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 2% B-27, 1% GlutaMAX and 1% Pen/Strep. Low-density cultures were plated on poly-L-lysine (Sigma)-coated glass coverslips at 25000 neurons/cm². For the analysis of early neurite outgrowth (DIV1–3), random images were taken of the cultures using a $\times 63$ lens on a Leica SP5II confocal microscope. Cultured 80% confluent PC12 cells were transfected by Lipofectamin 2000 (Lam et al., 2008). NGF was applied to cells 48 to 72h after transfection at 50 ng/ml and added freshly every 24h. Cells developing neurites were counted and the neurite length measured using ImageJ software with Simple neurite tracer plug-in.

Determination of PLD activity. PC12 cells were incubated with medium or medium containing the different drugs for 30 min and then incubated for 30 min with NGF 50 ng/ml. PLD activity was measured as described previously (Lopez et al., 2012). The PLD activity of the cell not treated with NGF was subtracted. Data are given as the mean of six determinations performed on at least three different cell preparations $\pm$ SEM.

Western Blot and Immunoprecipitation. After treatment, cells were lysed and proteins were resolved by SDS 4-12% PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes as described (de Barry et al., 2006). Detection was performed by chemiluminescence by using the Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce). For immunoprecipitation, protein extracts were prepared in lysis buffer (50 mM Hepes, 3 mM EGTA, 3 mM CaCl_2 , 3 mM MgCl_2 , 80 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 1 mM sodium orthovanadate, 40 mM NaF, and protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich)). Five hundred micrograms of total protein were used. Quantification of Western blots was performed as described earlier (Béglé et al., 2009).

Immunocytochemistry. Neurons and PC12 cells were fixed and further processed for immunofluorescence as described previously (Vitale et al., 1998). Stained cells were visualized with a Leica SP5II confocal microscope. Colocalization level of Spo20p and SNAP25 was estimated as described previously (Zeniou-Meyer et al., 2007). Quantification of RSK2 and PLD1 co-localization was performed for each condition on 30-selected regions of interest on the membrane ruffles from 15 cells using Image J.

Live cell imaging and TIRF microscopy. PC12 cells were transfected with PLD1-GFP or VAMP-7-*pHluorin* and incubated with NGF overnight. The next day, optical recordings were

performed using a Axiovert 200 with Moane TIRF-2 (Zeiss) equipped with an objective 100X NA 1.45 and an ImageM camera (Hamamatsu). Temperature was maintained at 37°C during recording. Under the conditions of observation used, one pixel corresponded to 160 nm. Stream acquisitions were performed at 1.44 Hz for 3 min with an exposure time of 280 ms. Selective excitation was obtained using argon laser lines at 488 and optical filter bandpass (500-540 nm) were used for the emission. Fusion events of VAMP-7-pHluorine vesicles were manually counted by using the ImageJ software. The interval between successive fusion events was calculated for each cell imaged and represented in frequency. Drugs were applied 30 min before recording.

Statistics. Statistical analysis was performed with R software using parametric (t test; Fig.1-7) and non-parametric (Wilcox test, Fig. 9) tests compared to the corresponding control condition (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

RESULTS

RSK2 and PLD1 are involved in neurite outgrowth

Axon and dendrite outgrowth are critical events in the establishment of neuronal networks during brain development. This complex process is not fully understood, but the forming neurons appear to go through at least three morphologically distinct steps. Stage 1: formation of lamelliopodia, stage 2: sprouting of multiple neurites similar to each other in structure and composition, stage 3: differentiation of neurites into either axons or dendrites (Fig. 1A). The establishment of synapses and networks are the last steps in the formation of mature neurons. We cultured cortical neurons from *Rsk2*-null mouse and found a dramatic delay in this process compared to neurons cultured from WT littermates (Fig. 1B). At 24 hr of culture, a significant proportion of neurons from *Rsk2*^{-/-} mice were still in the first stage of development. At 72 hr, when most neurons of WT mice had progressed through the second and third phases of development, 20% of *Rsk2*^{-/-} neurons were still at stage 1 (Fig. 1B). Conversely, the proportion of neurons reaching stage 3 in the *Rsk2*-null mice was significantly reduced (Fig. 1B) and axons of the *Rsk2*^{-/-} neurons at state 3 were approximately 30% shorter than WT neurons (data not shown). Since PLD1, but not PLD2, contains a RSK2 phosphorylation site at Thr147, we also examined cortical neurons from *Pld1*-null mouse. As illustrated in Fig. 1B, *Pld1*^{-/-} neurons displayed a delay in outgrowth that was very similar to that of *Rsk2*^{-/-} neurons and also displayed shorter axons (data not shown).

To further test the hypothesis that PLD1 plays a role in neurite outgrowth and may thereby be involved in neuronal development, we investigated the effect of PLD1 knockdown on subsequent neuronal development hallmarks using the *Pld1*^{-/-} mice. Dendritic morphogenesis is an important step for the establishment of neural circuitry. The number of primary dendrites arising from the cell body, higher order dendrites emerging from primary dendrites and

dendritic branching patterns appear to be critical for neuronal function (Jan and Jan, 2010). *Pld1* knockout affected dendritic branching at 10 DIV, as observed by Sholl analysis (Fig. 2A,B), a standard assay for measuring dendritic complexity (Jaworski et al., 2005). Although we found no significant differences in the number of primary branching dendrites, the number of secondary branching dendrites was significantly reduced in neurons cultured from *Pld1*^{-/-} mice (Fig. 2C). Because the dendritic tips were at the terminal branches and reflected the complexity of dendrites, we next analyzed whether the number of dendritic tips was altered in neurons lacking PLD1. Consistent with the reduction in secondary dendritic branching, the number of dendritic tips was decreased in neurons from *Pld1*^{-/-} mice (Fig. 2C).

Dendritic spines are key features for neuronal development and synaptic function. For instance the density and morphology of dendritic spines are directly correlated with their functions. To test the possibility that PLD1 is involved in dendritic spine development, we used actin labeling to outline dendritic spines in cultured cortical neurons (Fig. 2D). In agreement with the possibility that PLD1 is involved in neuronal development, we found a significant decrease in total spine density in 10 DIV *Pld1*^{-/-} neurons (Fig. 2E). In fact this reduction in spine density specifically affected mushroom and branched spines, which are the forms of mature spines (Fig. 2F). These observations suggest a reduced level of functional synapses in neurons lacking PLD1. Although early pharmacological approaches have postulated that PLD 1/2 could be involved in neurite outgrowth, this is the first report using *Pld1*-null mouse that validates this idea and support the concept that this may have a long-term effect on neuronal development.

NGF stimulation triggers RSK2-dependent phosphorylation and activation of PLD1 in PC12 cells

The possible interplay between RSK2 and PLD1 in neurite outgrowth was further

investigated using the classical NGF-induced neurite outgrowth assay in pheochromocytoma PC12 cells. Both reduction of RSK2 or PLD1 expression by siRNA-silencing experiments affected neurite outgrowth in response to NGF stimulation (Fig. 3A). Rescue experiments performed by co-expressing RSK2 or PLD1 constructs insensitive to siRNA ruled out possible off-target effects of the siRNAs (Fig. 3A). Similar results were obtained using pharmacological inhibitors. NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells was potently inhibited by the RSK inhibitor BI-D1870 (Sapkota et al., 2007) and by the PLD inhibitors FIPI and CAY-93 (Su et al., 2009; Lewis et al., 2009) (Fig. 3B).

To dissect the signaling pathway linking NGF stimulation to RSK2 and PLD1, PC12 cells were challenged with NGF for different periods of time and phosphoproteins were detected in cell extracts by Western blotting. NGF stimulation produced progressive and parallel increases in the level of phosphorylated RSK2 and PLD1, reaching a plateau at 15 min (Fig. 4). Interestingly, the RSK inhibitor BI-D1870 was found to block in a dose-dependent manner the NGF-induced phosphorylation of PLD1 (Fig. 4), in agreement with the idea that PLD1 might be a target activated by phosphorylated RSK2 upon NGF stimulation.

The intracellular distribution of over-expressed RSK2 and PLD1 is depicted in Figure 5. In resting PC12 cells, RSK2 displayed a nuclear and perinuclear distribution, whereas PLD1 was mostly found in the periphery of the nucleus most likely associated with vesicular structures (Fig. 5A). A 30-min stimulation with NGF induced a change in PC12 cell morphology (ruffles) and caused a partial re-distribution of both PLD1 and RSK2 to the cell periphery where the two proteins appeared to co-localize (Fig. 5A, arrowheads). Quantification revealed that at membrane ruffles 94.2 ± 1.0 % of RSK2 and PLD1 signals co-localized. This recruitment of GFP-PLD1 to the periphery of NGF-treated cells is in line with the ability of PLD1 to cycle from vesicular structures to the plasma membrane (Vitale et al., 2001; Du et al., 2003). Co-immunoprecipitation experiments of endogenous RSK2 and PLD1 confirmed

that both proteins were associated in the same complex in NGF-treated cells (Fig. 5B). Additionally, we found that NGF induced a potent increase in PLD activity (~ 80%) that was completely blocked by the broad-spectrum PLD inhibitor FIPI and strongly inhibited by the specific PLD1 inhibitor CAY-93, suggesting that NGF mainly stimulated type 1 PLD activity (Fig. 5C). RSK2 inhibition by BI-D1870 also significantly prevented NGF-induced PLD1 activation (Fig. 5C). These results suggest that NGF stimulation triggers the recruitment of RSK2 and PLD1 to growing neurite endings where activated RSK2 phosphorylates and activates PLD1.

NGF-evoked neurite outgrowth is mediated by RSK2-induced PLD1 phosphorylation on Thr-147

RSK2 has been shown to activate PLD1 by phosphorylating Thr147 residue (Zeniou-Meyer et al., 2008). To reinforce the idea that the phosphorylation of PLD1 by RSK2 is important for neurite outgrowth, we measured neurite length after NGF treatment in PC12 cells expressing RSK2 siRNAs and attempted to rescue growth with WT or mutated PLD1 proteins. In cells with a reduced RSK2 level, neither expression of PLD1 WT or PLD1(T147A), a phosphorylation-deficient mutant, restored neurite outgrowth (Fig. 6). In contrast, expression of the phosphomimetic PLD1(T147E) mutant restored growth despite the reduced RSK2 level. These results are consistent with a sequence of events in which NGF leads to RSK2 phosphorylation and activation, which in turn phosphorylates PLD1 on Thr147, stimulating PLD1 activity and promoting neurite outgrowth.

Phosphatidic Acid Synthesis at Sites of Neurite Outgrowth.

PLD1 is responsible for the production of phosphatidic acid (PA). Thus we examined PA synthesis in PC 12 cells using the PA-binding domain of Spo20p fused to GFP as a PA sensor

(Zeniou-Meyer et al., 2007; Kassas et al., 2012). In resting cells, Spo20p-GFP was present in the nucleus, but after a 30-minute application of NGF, a significant fraction was recruited to the plasma membrane where it co-localized with SNAP25 (Fig. 7A and B). PLD1 inhibition (by CAY-93), but also RSK2 inhibition (by BI-D1870) completely prevented the recruitment of Spo20p to the cell periphery, highlighting the importance of RSK2 in NGF-induced PLD1 activation and PA synthesis at the plasma membrane (Fig. 7A and B). Interestingly, Spo20p expression in PC12 cells strongly reduced the number and length of the NGF-induced neurites (Fig. 7C), most likely by quenching PA and preventing its function in neurite outgrowth. The molecular mechanism by which PA may control neurite outgrowth has yet to be elucidated. However, it might be related to the proposed role of PA in vesicular trafficking i.e. a promoter of vesicle fusion with target membranes through biophysical changes in membrane topology and/or recruitment and activation of fusion promoters at the fusion site (Bader and Vitale, 2009).

Neurite initiation entails significant surface area expansion. It involves distinct pathways that require coordination between the actin cytoskeleton and fusion of vesicle to provide membrane to the growing endings (D'Allessandro et al., 2010; Gupton et al., 2010). In NGF treated PC12 cells, we observed anterograde and retrograde movement of PLD1-positives vesicles in neurites and occasionally the directional movement of PLD1-positive vesicles toward the tips of the growing neurites (Fig. 8A). To further characterize these PLD1-positive vesicles in PC12 cells, we tested for the presence of the vesicular SNARE proteins VAMP-2, VAMP-4, or Ti-VAMP/VAMP-7. As shown in Figure 8B, PLD1 did not co-localize with VAMP-2, only partially with VAMP-4 in the perinuclear region, but strongly co-localized with VAMP-7. Interestingly after NGF treatment, VAMP-7 and PLD1 were found at the tip of growing neurites (Fig. 8C). VAMP-7 vesicles are known to play a major role in neurite outgrowth (Martinez-Arca et al., 2000). To probe the idea that RSK2-activated PLD1 may

play a critical role in the fusion of VAMP-7 vesicles at the tip of growing neuritis, we recorded the fusion of pHluorin-VAMP7 vesicles by total internal reflection microscopy (TIRFM) (Burgo et al., 2012). In PC12 cells, NGF treatment triggered successive fusion events of VAMP-7 vesicles at the neurite growth cones (Fig. 9A). Treatment with the PLD1 and RSK inhibitors significantly reduced the frequency of these fusion events as revealed by the increase in the intervals between successive events (Fig. 9B,C). This observation supports the idea that RSK2-stimulated PLD1 activity is functionally involved in VAMP-7 vesicle incorporation at the growing endings of developing neurites.

DISCUSSION

Despite intensive research on Coffin–Lowry syndrome (CLS), the relationship between genotype and phenotype remains poorly understood. Specific physiological roles of RSK2 are also unclear and little is currently known about the cellular effects of RSK2 in neurons. Behavioral studies in *Rsk2*-KO mice revealed normal motor coordination, but a profound retardation in spatial learning and a deficit in long-term spatial memory provide evidence that RSK2 has similar roles in mental functioning in both mice and humans (Poirier et al., 2007). Although *Rsk2*-KO mice show no obvious brain abnormalities at the anatomical and histological levels, we show here that cortical neurons cultured from these mice display significant developmental delay. At three days of culture, only 20% of the *Rsk2*-KO mice neurons developed an axon compared to 60% in WT neurons. These observations are in line with the recent finding that *Rsk2* knockdown perturbs the differentiation of neural precursors into neurons (Dugani et al., 2010). Since we previously identified PLD1 as a target of RSK2 in neuroendocrine regulated exocytosis (Zenou-Meyer et al., 2008; 2009), we decided to investigate the possibility that PLD1 could be involved in RSK2-mediated neurite outgrowth. In agreement with this idea, we found that cortical neurons cultured from *Pld1*-KO mice displayed a significant delay in development comparable to neurons from *Rsk2*-KO mice. Using the classical NGF-induced neurite outgrowth assay in PC12 cells, we show that RSK2 co-localizes, phosphorylates and regulates PLD1 activity in response to NGF stimulation. NGF-induced neurite outgrowth is severely impaired in RSK2-depleted cells, but this can be rescued by expressing a phosphomimetic mutant of PLD1. Finally, both RSK2 and PLD1 inhibitors inhibit PA synthesis and VAMP7 vesicle fusion at growth cones in response to NGF. Together, our findings reveal a mechanism in which RSK2-mediated PLD1 activation

and subsequent PA synthesis favor vesicular fusion and membrane supply required for neurite outgrowth.

PLD activity has been implicated in neurite outgrowth in various neuronal models for over a decade, but most of these findings rely on the use of ethanol as a non-specific inhibitor of PA synthesis and in most cases the PLD isoform involved was not identified. Using for the first time a combination of knockout mice model, a gene silencing approach and the recently described isoform-specific PLD inhibitors, we demonstrate here that PLD1 contributes to neurite outgrowth but also in dendrite branching and spine development. Yet, in apparent contradiction, PLD1 has recently been described to negatively regulate dendritic branching in hippocampal neurons (Zhu et al., 2012). Although these findings were obtained with a different type of neurons, another reason for this discrepancy may rely on the method used to modify PLD1 expression levels i.e. over-expression or silencing at 3 DIV. In the present study, PLD1 was genetically knocked down implying that critical functions of PLD1 in early stages of neurite outgrowth could not be missed. It is also worth to mention that our results are in line with the previous report showing that the GTPase RalB promotes branching through a pathway involving PLD (Giovanna and Hall, 2005).

We have previously reported that RSK2 phosphorylation of PLD1 is important for regulated exocytosis in chromaffin cells (Zeniou-Meyer et al., 2008) and for neurotransmission (Humeau et al., 2001), indicating that this pathway may regulate various vesicular trafficking events in neurosecretory cells. In support of this hypothesis, PLD1 was shown to regulate intracellular trafficking of presenilin-1, a critical component of the γ -secretase complex (Liu et al., 2009). Of particular interest, up-regulation of PLD1 rescues impaired β AAPP trafficking to the plasma membrane and defects in neurite outgrowth capacity in a familial form of Alzheimer disease presenilin-1 mutant neurons (Cai et al., 2006). It is thus tempting to speculate that the RSK2-phosphorylated form of PLD1 plays a key role in promoting

vesicular delivery of key component for neuronal development and function.

We found that PLD1 knockout also reduced the number of mature spines on dendrites. Many higher cognitive disorders, such as mental retardation, Rett syndrome and autism, are associated with aberrant spine morphology and an altered long-term potentiation in neuron in culture (Pavlowsky et al., 2012). Since dendritic spines are thought to represent a morphological correlate of neuronal plasticity, altered spine morphology may underlie or contribute to cognitive deficits seen in CLS. In agreement with this idea, we recently reported an alteration of long-term potentiation at cortical neuron synapses in the lateral amygdala (Zeniou-Meyer et al., 2010). Signaling cascades that are important for cytoskeletal regulation may have an impact on spine morphology. Among those, the Rho GTPase signaling pathway that is known to be involved in the regulation of the actin cytoskeleton seems to play fundamental roles in the structural plasticity of dendritic spines (Svitkina et al., 2010). The interplay between PLD1 and Rho GTPases has been shown in several cellular processes, but it remains to be established if the altered dendrite and spine morphology observed in *Pld1* knockout mice, relies on an alteration of Rho activity. It is also worthwhile mentioning that the GTPase ARF6, an activator of PLD1 (Bader et al., 2004), has been reported to play a positive role in spine formation (Choi et al., 2006), in line with the findings reported here.

PLD1 synthesizes phosphatidic acid (PA), a bioactive lipid that has been proposed for a role in various trafficking events including endocytosis and regulated exocytosis in various cell types (Bader and Vitale, 2009). In the process of neurite outgrowth, PA could stimulate the fusion of vesicles with the plasma membrane for the purpose of supplying membrane components to extending neurites, but also directly or indirectly regulate actin cytoskeletal organization, which is essential for the formation of filopodia and lamellipodia at growth cones. We did not find a significant modification of actin and tubulin staining in neurons cultured from *Rsk2*-KO and *Pld1*-KO mice (data not shown). However, we observed that

RSK2 and PLD1 inhibitors significantly reduced the frequency of VAMP-7 vesicle fusion in growth cones, favoring the idea that RSK2-stimulated PLD1-induced PA production plays a role in VAMP-7 vesicle incorporation at the growing endings of developing neurites. The mechanism(s) by which PA promotes membrane fusion remains debated but it may be linked to its ability to generate membrane curvature (Zeniou-Meyer et al., 2007), regulate phosphoinositol 4-5 biphosphate levels (Honda et al., 1999), and/or modulate syntaxin-1 activity (Lam et al., 2008). Our observation that expression of a PA-sensor partially inhibits neurite outgrowth suggests that PA acts in part by recruiting key proteins at the vesicle fusion site.

Finally, it should be mentioned that the development in culture of neurons from *Rsk2* and *Pld1* knockout models is delayed but not completely blocked. A possible explanation is that neurons compensate defects in the RSK2/PLD1 pathway by using alternative sources of PA. For instance, the PLD2 isoform has been also suggested to contribute to neurite outgrowth (Kanaho et al., 2009). Alternatively in ribbon synapses, the PA involved in synaptic vesicle trafficking arises from lysophosphatidic acid acyltransferase activity (Schwarz et al., 2011) and the diacyl-glycerol (DAG)-kinases can also convert DAG into PA. Nevertheless, the present results support the idea that defects in PLD1 activity and fusogenic lipid synthesis could provide an explanation at the molecular level for abnormal growth and development of neural circuits leading to the learning and memory deficits observed after *RSK2* loss of function mutations in animal models and CLS patients.

REFERENCES

- Bader MF, Doussau F, Chasserot-Golaz S, Vitale N, Gasman S. (2004) Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. (2004) *Biochim Biophys Acta*. 1742:37-49.
- Bader MF, Vitale N (2009) Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1791: 936 –941.
- Béglé A, Tryoen-Tóth P, de Barry J, Bader MF, Vitale N. (2009) ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem*. 284:4836-4845.
- Burgo A, Proux-Gillardeaux V, Sotirakis E, Bun P, Casano A, Verraes A, Liem RK, Formstecher E, Coppey-Moisan M, Galli T. (2012) A molecular network for the transport of the TI-VAMP/VAMP7 vesicles from cell center to periph. *Dev Cell* 23:166-180.
- Cai D, Zhong M, Wang R, Netzer WJ, Shields D, Zheng H, Sisodia SS, Foster DA, Gorelick FS, Xu H, Greengard P (2006) Phospholipase D1 corrects impaired betaAPP trafficking and neurite outgrowth in familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutant neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1936 –1940.
- Choi S, Ko J, Lee JR, Lee HW, Kim K, Chung HS, Kim H, Kim E. (2006) ARF6 and EFA6A regulate the development and maintenance of dendritic spines. *J Neurosci*. 18:4811-4819.
- Corrotte M, Chasserot-Golaz S, Huang P, Du G, Ktistakis NT, Frohman MA, Vitale N, Bader MF, Grant NJ. (2006) Dynamics and function of phospholipase D and phosphatidic acid during phagocytosis. *Traffic* 7:365-377.
- D'Allessandro R, Racchetti G and Meldolesi J (2010) Outgrowth of neurites is a dual process. *Communicative and Integrative Biology* 3:576-578.

de Barry J, Janoshazi A, Dupont JL, Procksch O, Chasserot-Golaz S, Jeromin A, Vitale N. (2006) Functional implication of neuronal calcium sensor-1 and phosphoinositol 4-kinase-beta interaction in regulated exocytosis of PC12 cells. *J Biol Chem* 281:18098-18111.

Du G, Altshuller YM, Vitale N, Huang P, Chasserot-Golza S, Morris AJ, Bader MF, Frohman MA (2003) Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol* 162:305–315.

Dugani CB, Paquin A, Kaplan DR, Miller FD. (210) Coffin-Lowry syndrome: a role for RSK2 in mammalian neurogenesis. *Dev Biol.* 347:348-359.

Elvers M, Stegner D, Hagedorn I, Kleinschnitz C, Braun A, Kuijpers ME, Boesl M, Chen Q, Heemskerk JW, Stoll G, Frohman MA, Nieswandt B (2010) Impaired alpha(IIb)beta(3) integrin activation and shear-dependent thrombus formation in mice lacking phospholipase D1. *Sci Signal* 3: ra1.

Frödin M, Gammeltoft S (1999) Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151:65–77.

Gambino F, Khelifaoui M, Fourcaudot E, Poulain B, Reibel-Foisset S, Hanauer A, Vitale N, Chelly J, Billuart P, Lüthi A, Humeau Y (2013) X-linked Intellectual Disability genes are required for presynaptic cAMP/PKA-dependent LTP. *J Physiol (London)* in press.

Giovanna L, Hall A, (2005) Ral GTPases regulate neurite branching through GAP-43 and the exocyst complex. *J Cell Biol.* 2005 Dec 5;171(5):857-869.

Gupton SL, Gertler (2010) Integrin Signaling Switches the Cytoskeletal and Exocytic Machinery that Drives Neuritogenesis. *Dev Cell* 18:725–736.

Hanauer A, Young ID (2002) Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features. *J Med Genet* 39:705-713.

Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris AJ, Frohman MA, Kanaho Y (1999) Phosphatidylinositol 4-phosphate

5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*. 99:521-352.

Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont JL, Du G, Frohman MA, Bader MF, Poulain B (2001) A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15300–15305.

Hunter AG (2002) Coffin-Lowry syndrome: a 20-year follow-up and review of long-term outcomes. *Am J Med Genet* 111:345-355. *J Biol Chem*. 284:4836-4845.

Jan YN, Jan LY (2010) Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nat Rev Neurosci* 11:316–328.

Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. (2005) Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci*. 25:11300-11312.

Kanaho Y, Funakoshi Y, Hasegawa H. (2009) Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth. *Biochim Biophys Acta* 1791:898-904.

Kassas N, Tryoen-Tóth P, Corrotte M, Thahouly T, Bader MF, Grant NJ, Vitale N. (2012) Genetically encoded probes for phosphatidic acid. *Methods Cell Biol* 108:445-459.

Kesler SR, Simensen RJ, Voeller K, Abidi F, Stevenson RE, Schwartz CE, Reiss AL. (2007) Altered neurodevelopment associated with mutations of RSK2: a morphometric MRI study of Coffin-Lowry syndrome. *Neurogenetic* 8:143-147.

Lam AD, Tryoen-Toth P, Tsai B, Vitale N, Stuenkel EL. (2008) SNARE-catalyzed fusion events are regulated by Syntaxin1A-lipid interactions. *Mol Biol Cell*. 19:485-97.

Lewis JA, Scott SA, Lavieri R, Buck JR, Selvy PE, Stoops SL, Armstrong MD, Brown HA, Lindsley CW. (2009) Design and synthesis of isoform-selective phospholipase D (PLD) inhibitors. Part I: Impact of alternative halogenated privileged structures for PLD1 specificity. *Bioorg Med Chem Lett* 19:1916-1920.

Liu Y, Zhang YW, Wang X, Zhang H, You X, Liao FF, Xu H. (2009) Intracellular trafficking of presenilin 1 is regulated by beta-amyloid precursor protein and phospholipase D1. *J Biol Chem*. 284:12145-12152.

Lopez CI, Pelletán LE, Suhaiman L, De Blas GA, Vitale N, Mayorga LS, Belmonte SA. (2012) Diacylglycerol stimulates acrosomal exocytosis by feeding into a PKC- and PLD1-dependent positive loop that continuously supplies phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochim Biophys Acta* 1821:1186-1199.

Manouvrier-Hanu S, Amiel J, Jacquot S, Merienne K, Moerman A, Coëslie A, Labarriere F, Vallée L, Croquette MF, Hanauer A. (1999) Unreported RSK2 missense mutation in two male sibs with an unusually mild form of Coffin-Lowry syndrome. *J Med Genet* 10:775-778.

Martinez-Arca S, Alberts P, Zahraoui A, Louvard D, Galli T. (2000) *J Cell Biol* 149:889-900.

Pavlovsky A, Chelly J, Billuart P (2012) Emerging major synaptic signaling pathways involved in intellectual disability. *Mol Psychiatry*. 2012 Jul;17(7):682-93.

Pereira PM, Schneider A, Pannetier S, Heron D, Hanauer A. (2010) Coffin Lowry syndrome. *Eur J Hum Genet* 6:627-633.

Poirier R, Jacquot S, Vaillend C, Southiphong AA, Libbey M, Davis S, Laroche S, Hanauer A, Welzl H, Lipp HP, Wolfer DP. (2007) Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene *Rsk2* in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior. *Behav Genet* 1:31-50.

Sapkota GP, Cummings L, Newell FS, Armstrong C, Bain J, Frodin M, Grauert M, Hoffmann M, Schnapp G, Steegmaier M, Cohen P, Alessi DR. (2007) BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochem J* 401:29-38.

Schwarz K, Natarajan S, Kassas N, Vitale N, Schmitz F. (2011) The synaptic ribbon is a site of phosphatidic acid generation in ribbon synapses. *J Neurosci.* 31:15996-16011.

Stephenson JB, Hoffman MC, Russell AJ, Falconer J, Beach RC, Tolmie JL, McWilliam RC, Zuberi SM. (2005) The movement disorders of Coffin-Lowry syndrome. *Brain Dev* 27:108-113.

Su W, Yeku O, Olepu S, Genna A, Park JS, Ren H, Du G, Gelb MH, Morris AJ, Frohman MA. (2009) 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI), a phospholipase D pharmacological inhibitor that alters cell spreading and inhibits chemotaxis. *Mol Pharmacol* 75:437-446.

Svitkina T, Lin WH, Webb DJ, Yasuda R, Wayman GA, Van Aelst L, Soderling SH. (2010) Regulation of the postsynaptic cytoskeleton: roles in development, plasticity, and disorders. *J Neurosci.* 2010 Nov 10;30(45):14937-14942.

Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A. (1996) Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* 384:567-570.

Vitale N, Caumont AS, Chasserot-Golaz S, Du G, Wu S, Sciorra VA, Morris AJ, Frohman MA, Bader MF. (2001) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells *Embo J* 20, 2424-2434.

Vitale N, Horiba K, Ferrans VJ, Moss J, Vaughan M. (1998) Localization of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1) in lysosomes and Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:8613-8618.

Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Li L, Brancorsini S, Sassone-Corsi P, Townes TM, Hanauer A, Karsenty G. (2004) ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 117:387-398.

Zeniou M, Ding T, Trivier E, Hanauer A. (2002) Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning. *Hum Mol Genet* 11:2929-22940.

Zeniou-Meyer M, Béglé A, Bader MF, Vitale N. (2009) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 controls neuroendocrine secretion through the regulation of phospholipase D1 at the exocytotic site. *Ann N Y Acad Sci* 1152:201-208.

Zeniou-Meyer M, Gambino F A, Ammar MR, Humeau Y, Vitale N. (2010) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein rsk2 and neurosecretion. *Cell Mol Neurobiol* 30:1401-1406.

Zeniou-Meyer M, Liu Y, Béglé A, Olanich ME, Hanauer A, Becherer U, Rettig J, Bader MF, Vitale N. (2008) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of phospholipase D1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8434-8439.

Zeniou-Meyer M, Zabari N, Ashery U, Chasserot-Golaz S, Haeberle' AM, Demais V, Bailly Y, Gottfried I, Nakanishi H, Neiman AM, Du G, Frohman MA, Bader MF, Vitale N (2007) Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J Biol Chem* 282:21746 –21757.

Zhu YB, Kang K, Zhang Y, Qi C, Li G, Yin DM, Wang Y. (2012) PLD1 Negatively Regulates Dendritic Branching. *J Neurosci.* 32:7960-7969.

FIGURES

Figure 1: Involvement of RSK2 and PLD1 in neurite outgrowth. A) Cortical neurons from *Rsk2^{y/-}*, *Pld1^{-/-}* or wild type mice were stained for F-actin (red), β tubulin (green) and DRAQ5 (blue) at various stages of development. Bars = 10 μ m. B) Percentage of cells at stage 1, 2 or 3 counted after 24, 48 or 72 hr in culture. At least 150 cells were counted for each condition. Similar observations were obtained with at least 3 different cell cultures.

Figure 2: PLD1 knockout affects neuronal development. A) Typical neurons from *Pld1^{+/+}* and *Pld1^{-/-}* mice at 10 DIV. Bar = 50 μ m. B) Sholl analysis revealed a significant reduced number of crossings in *Pld1^{-/-}* ($n > 25$ cells in each condition). C) Quantification of primary and secondary dendrites and neurite tips ($n > 20$ cells in each condition). D) Typical actin (red) and MAP2 (green) staining neurons from *Pld1^{+/+}* and *Pld1^{-/-}* mice at 10 DIV. Bar = 10 μ m. E) Quantification of PLD1 knockout effect on the spine linear density. F) Quantification of *Pld1* knockout effect on spine morphology by counting the number of stubby, mushroom, filopodia and branched spine. Similar observations were obtained with at least 3 different cell cultures ($n > 25$ cells in each condition).

Figure 3: RSK2 and PLD1 play a role in NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. A) Neurite length from PC12 cells silenced for RSK2 or PLD1 expression after 3 days of NGF treatment. Co-expression of siRNA resistant construct (human-RSK2 or human-PLD1) rescued the phenotype. B) Neurite length from PC12 cells exposed for 30 min to the RSK2 inhibitor BI-D1870 or to the PLD1 inhibitor (FIPI or CAY-93) prior to NGF addition for 3 days. Similar observations were obtained with at least 3 different cell cultures ($n > 25$ cells in each condition).

Figure 4: NFG stimulation triggers RSK2 and PLD1 phosphorylation in PC12 cells. Cells were stimulated with NGF (50 ng/ml) for 5 to 60 min and the levels of phosphoproteins and total RSK2 and PLD1 proteins were examined by western blotting and quantified. A 30-min pretreatment with the RSK2 inhibitor BI-D1870 inhibited NGF-induced PLD1 phosphorylation in a dose-dependent manner (pPLD1/PLD1 levels were normalized to the control condition in absence of BI-D1870). Quantifications were performed on 3 independent experiments.

Figure 5: RSK2 stimulates PLD1 activity in NGF-stimulated PC12 cells. A) Distribution of RSK2 and PLD1 in resting and NGF-stimulated PC12 cells. NGF treatment induced a partial co-localization of RSK2-GFP and PLD1-mcherry at the cell periphery. Bars = 10 μ m. B) RSK2 and PLD1 are present in the same protein complex in NGF-stimulated PC cells. After NGF treatment, immunoprecipitation of endogenous RSK2 co-precipitated endogenous PLD1. Conversely, immunoprecipitation of endogenous PLD1 co-precipitated endogenous RSK2. C) Effect of PLD1 or RSK2 inhibitors on NGF-induced PLD activity in PC12 cells. FIPI, PLD inhibitor; CAY-10593, PLD1 inhibitor; BI-D1870, RSK2 inhibitor. Similar observations were obtained with at least 3 different cell cultures.

Figure 6: Phosphorylation of PLD1 is important for neurite outgrowth. Neurite length after NGF treatment in PC12 cells silenced for RSK2 expression and co-expressing either wild type PLD1, the phosphorylation deficient mutant PLD1(T147A) or the phosphomimetic PLD1(T147E) mutant. Expression of the phosphomimetic PLD1(T147E) rescued NGF-

induced neurite outgrowth in cells with reduced RSK2 levels. Results were pooled from 3 independent experiments.

Figure 7: NGF-induced PA synthesis at the cell periphery is prevented by RSK2 and PLD1 inhibitors. A) Distribution of the PA sensor Spo20p-GFP in resting and NGF-stimulated PC12 cells. 30 min-NGF triggers the recruitment of Spo20p-GFP to the cell periphery revealing PA synthesis at the plasma membrane. The fluorescence distribution of Spo20p-GFP and the plasma membrane marker SNAP25 along the line drawn on the pictures is represented in arbitrary units. Pre-exposure to PLD1 or RSK2 inhibitors prevented the recruitment of Spo20p to the cell periphery in NGF-stimulated cells. Bars = 10 μ m. B) Quantification of the Spo20p-GFP/SNAP25 co-localization. C) Control or Spo20p expressing cells were grown in presence of NGF and the number and length of neurites were estimated. Similar observations were obtained with at least 3 different cell cultures (n > 25 cells in each condition).

Figure 8: PLD1 is associated with VAMP-7 positive vesicles. A) PC12 cells expressing PLD1-GFP were treated with NGF for 24 hr and imaged by time-lapse video microscopy. A typical image extracted from a movie shows the vesicular pattern of PLD1-GFP, especially at the tip of the neurite (Scale bar, 1 μ m). PLD1-positive vesicles moved in both directions within the neurite (green and blue tracks) and towards the plasma membrane in the growth cone (red track). B) Co-localization of PLD1 and GFP-VAMP-2, GFP-VAMP4, or RFP-VAMP-7 in PC12 cells before or after NGF treatment for 24 hr. Selected areas were zoomed. C) NGF treatment induced a partial co-localization of PLD1 and VAMP-7 at neurite tips (arrows). Bars = 10 μ m. Similar observations were obtained with at least 3 different cell cultures.

Figure 9: RSK2 and PLD1 regulate VAMP-7 vesicle fusion rate at the ends of growing neurites. A) Portion of a PC12 neurite tip expressing VAMP-7-pHluorine imaged by TIRF microscopy for 3 minutes. 12 consecutive images from a 1.44-Hz movie are shown. Time is marked on each image. Arrows show the appearance and disappearance of two VAMP-7-pHluorine signals reflecting vesicle fusion and a shift of pHluorine signal due to the neutralization of the intra-vesicular pH. (Scale bar, 1 μ m). B and C) PC12 cells expressing VAMP-7-pHluorin were incubated overnight with NGF. Prior to VAMP-7 vesicle recording by TIRFM, cells were pre-incubated with PLD inhibitors (FIPI or CAY-93) or RSK inhibitor (BI-D1870) for 30 min. The intervals between successive events (s) were determined with ImageJ and their frequency plotted. The red dotted lines indicate the distribution of intervals between VAMP-7-pHluorine vesicles fusion events. Significance was determined by Wilcoxon signed-rank test.

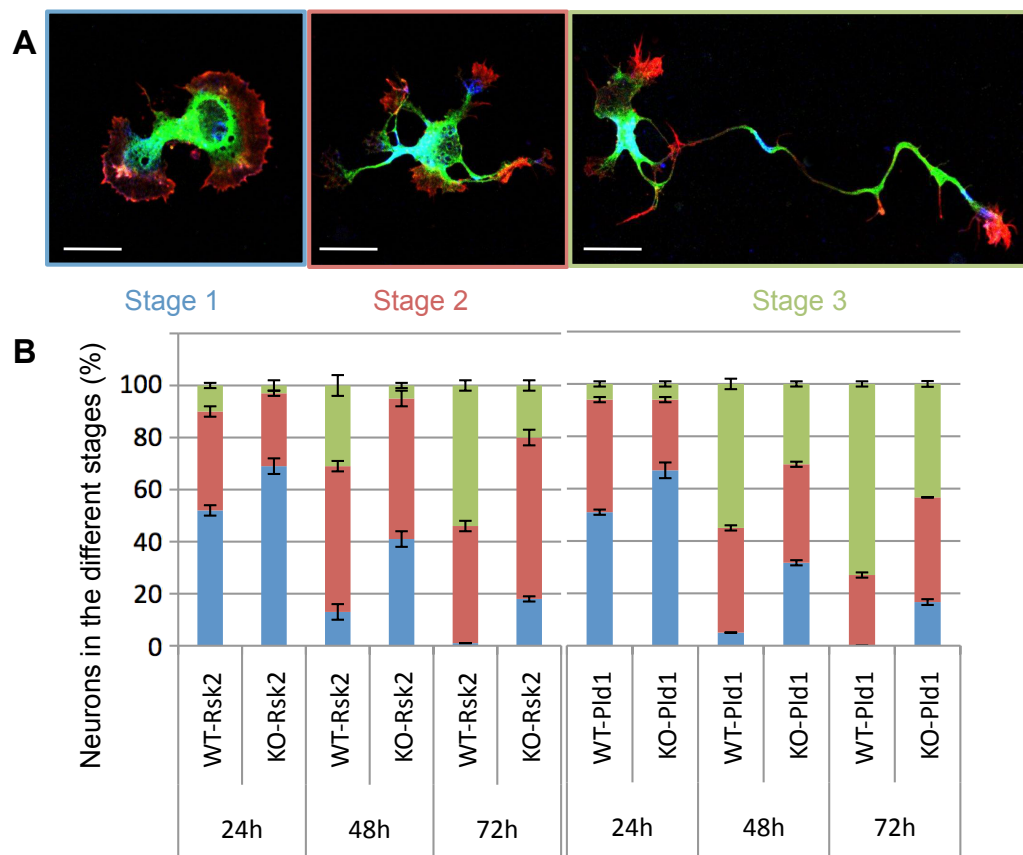


Figure 1: Ammar et al.

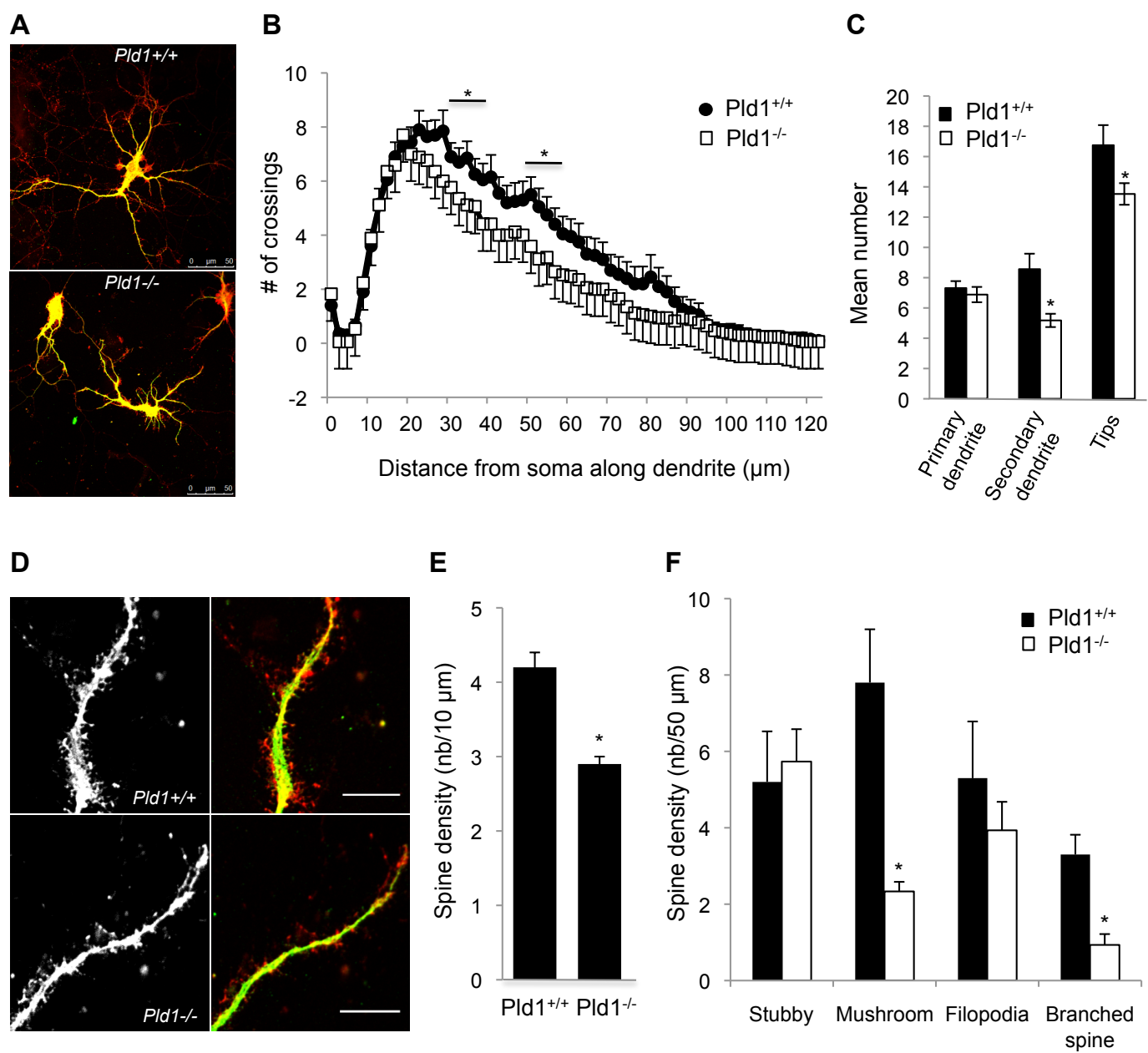


Figure 2: Ammar et al.

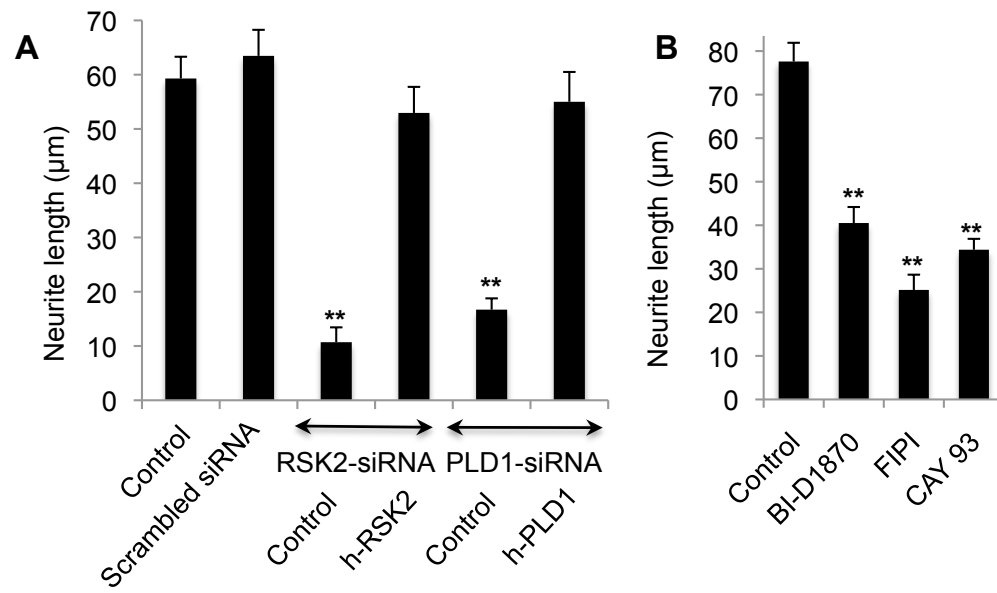


Figure 3: Ammar et al.

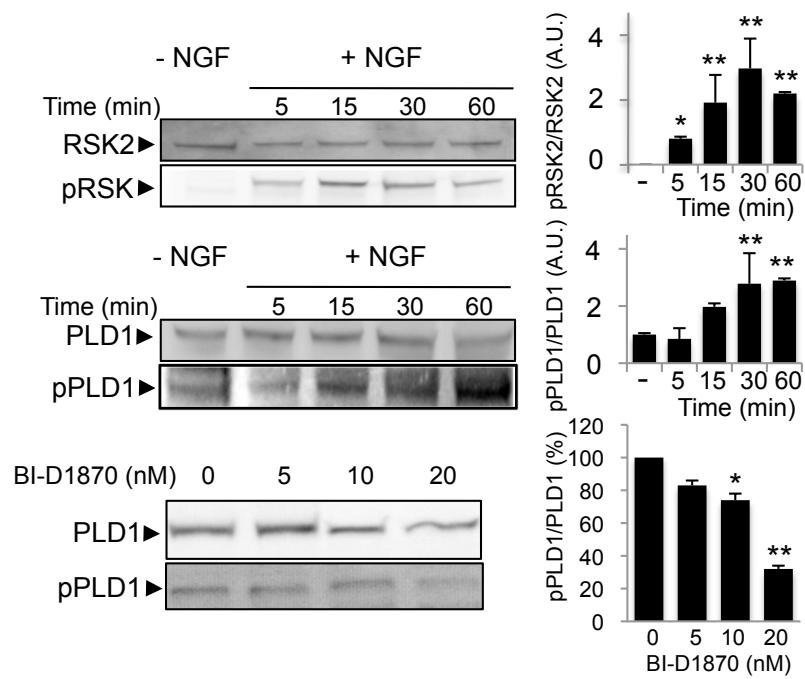


Figure 4: Ammar et al.

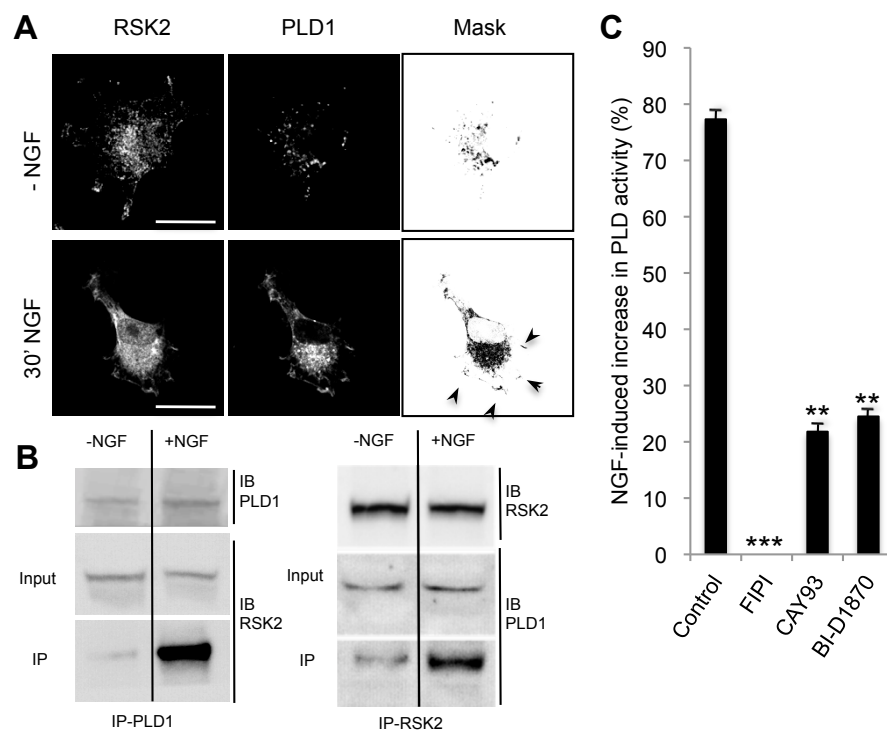


Figure 5: Ammar et al.

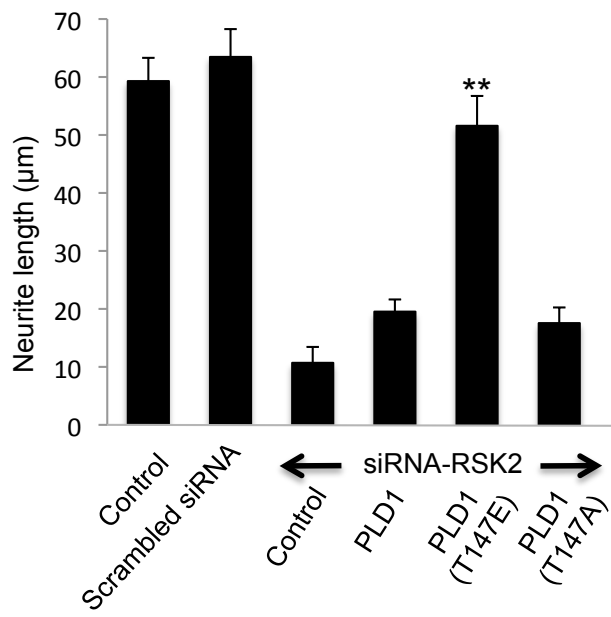


Figure 6: Ammar et al.

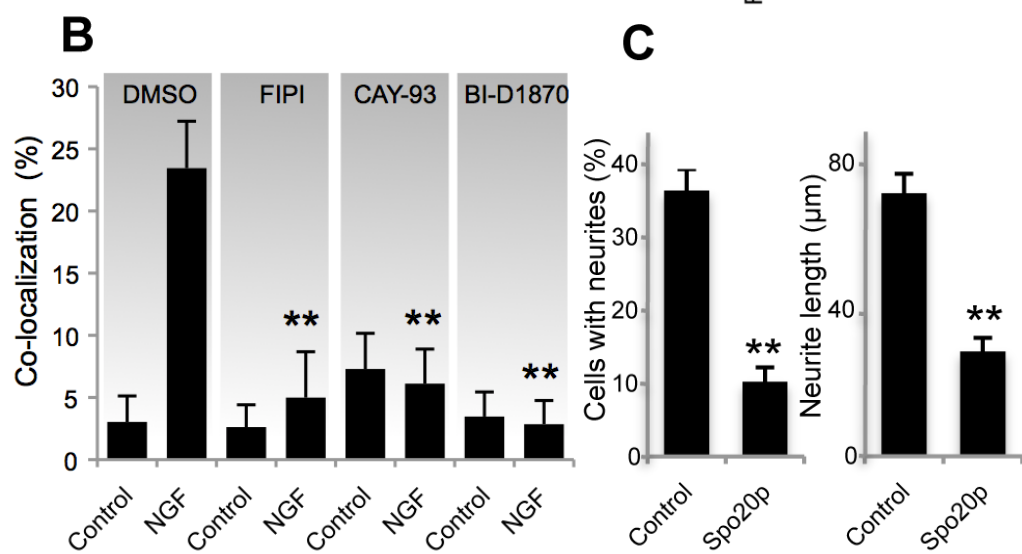
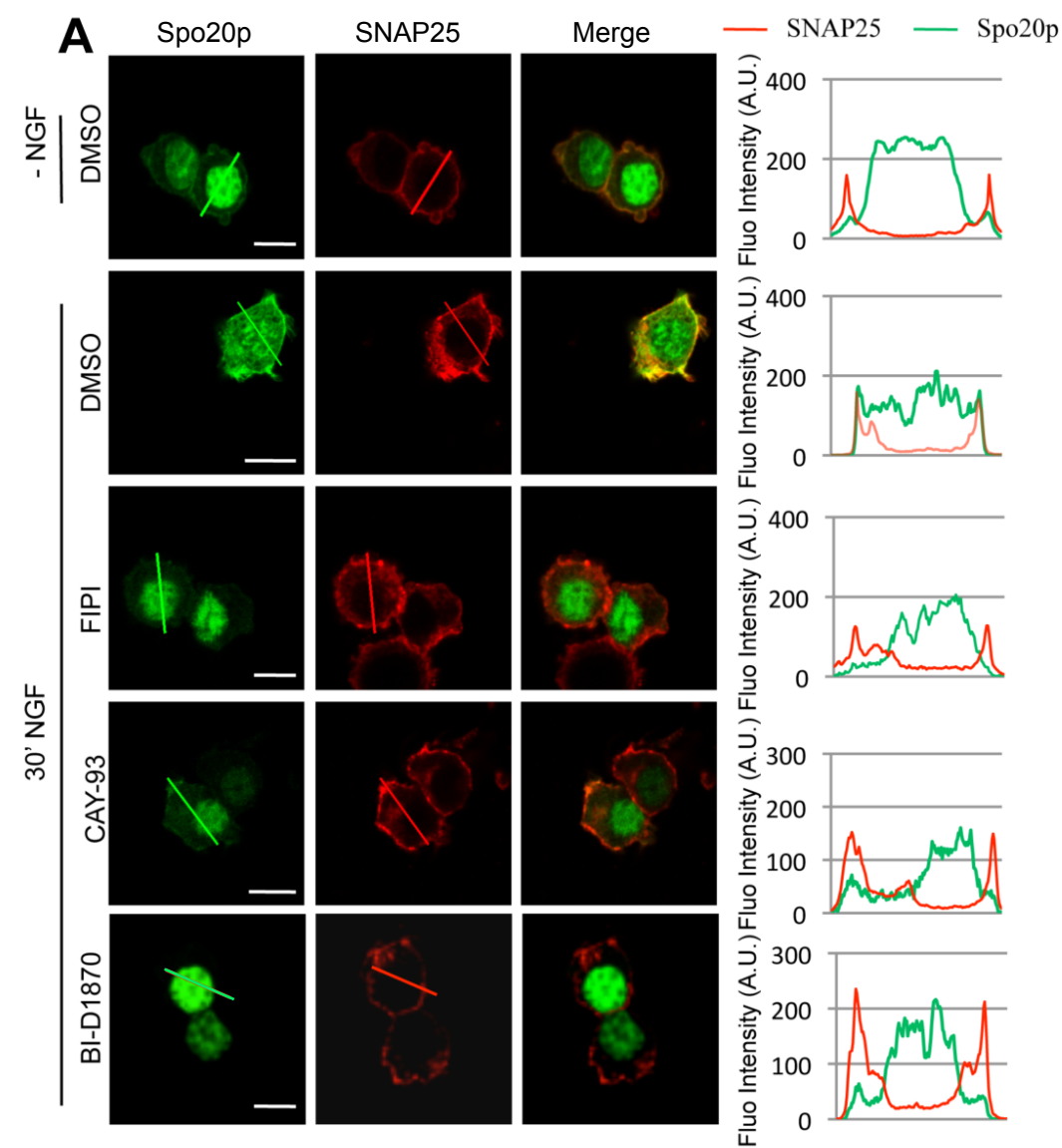


Figure 7: Ammar et al.

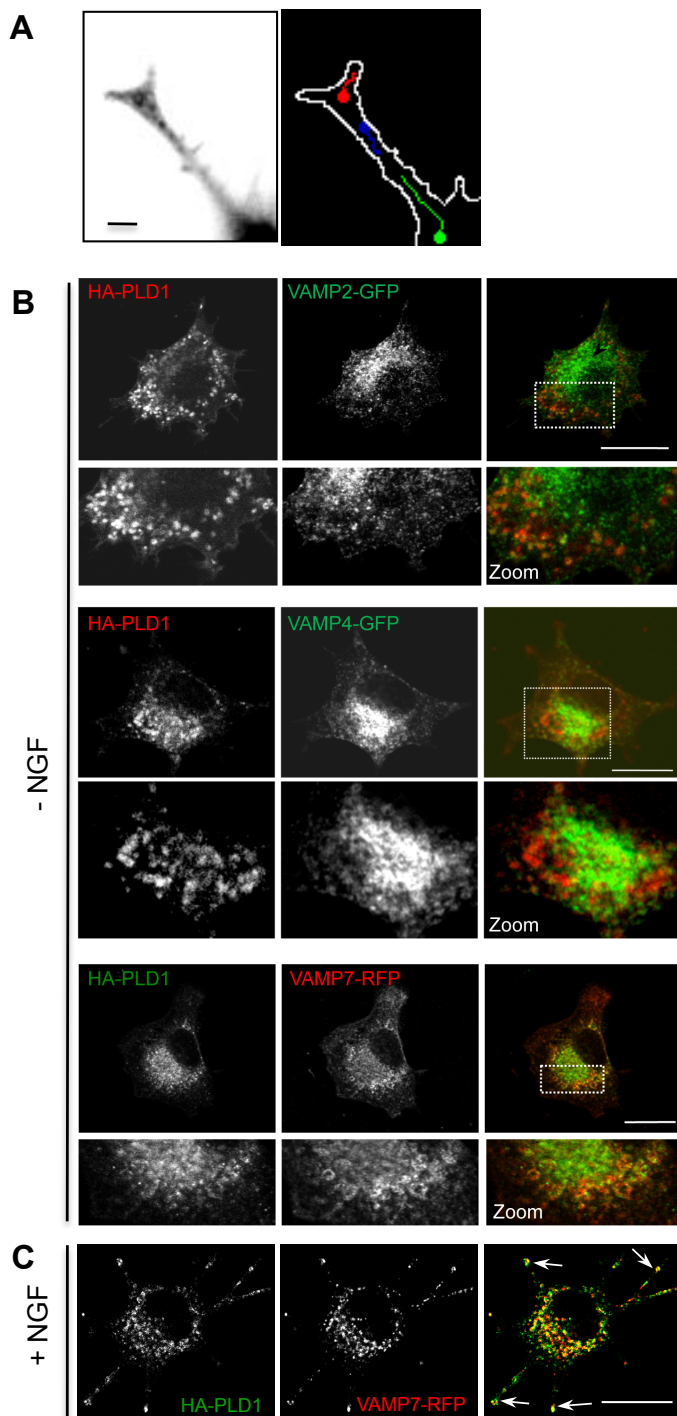


Figure 8: Ammar et al.

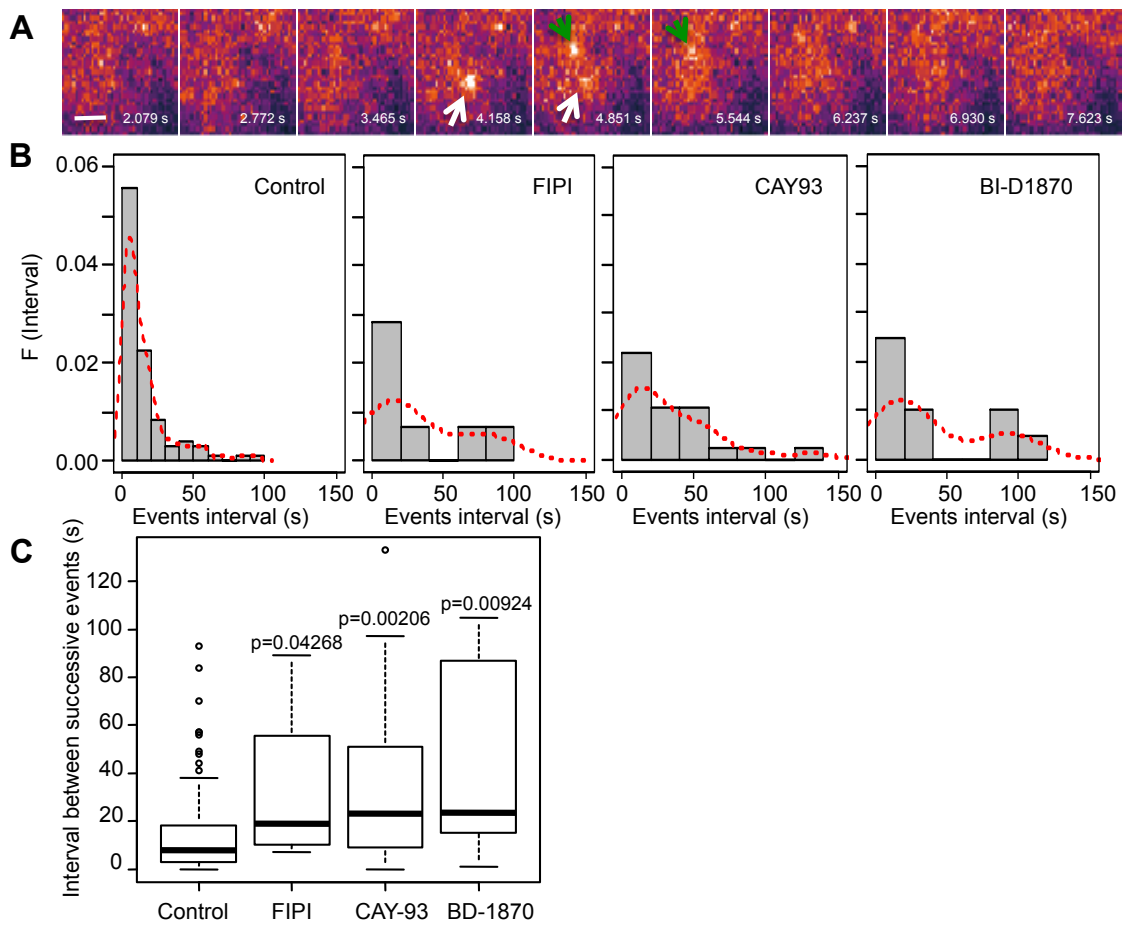


Figure 9: Ammar et al.

ARTICLE 2

**Caractérisation des voies de signalisation impliquant RSK2
et la PLD1 dans le développement neuronal induit par les
neurotrophines**

II. Article 2

Caractérisation des voies de signalisation impliquant RSK2 et la PLD1 dans le développement neuronal induit par les neurotrophines

Les neurotrophines sont impliquées dans la régulation du développement du circuit neuronal ainsi que de leurs fonctions affectant ainsi la prolifération et la différenciation cellulaire, la croissance des dendrites et de l'axone, la synaptogenèse et la plasticité synaptique (Huang and Reichardt, 2001, Minichiello et al., 2002, Lu et al., 2005, Reichardt, 2006). Parmi ces neurotrophines, le BDNF joue un rôle important dans la modulation de la morphologie neuronale, particulièrement dans la ramification de l'arborisation dendritique et donc dans sa complexité et la densité des épines dendritiques. Le BDNF induit son effet via l'activation de voies de signalisation cellulaire comme la voie MAPK-ERK1/2 et la voie PI3K-AKT-mTOR (Gaiddon et al., 1996, Chao, 2003, Kumar et al., 2005). Ces voies de signalisations induisent leurs effets par des événements de signalisation locale, au niveau des sites d'induction, ou plus loin au niveau du noyau par l'activation de la transcription de gènes. CREB fait partie des facteurs de transcription les plus étudiés dans la transcription et le remodelage de la morphologie neuronale (Redmond et al., 2002, Wayman et al., 2006). La voie MAPK-ERK1/2 implique séquentiellement SOS, RAS, RAF, MEK et ERK1/2. Cette voie pourrait réguler plusieurs processus cellulaires tels que la transcription, l'adhésion, la croissance, la survie et la prolifération cellulaire. Elle fait partie des différentes voies impliquées dans l'augmentation de la complexité dendritique dépendante de l'activité (Ha and Redmond, 2008). Après son activation par phosphorylation dépendante de MEK, ERK1/2 pourrait phosphoryler à son tour plusieurs protéines cytosoliques ou nucléaires telles que RSK2 et Elk-1, respectivement (Vaidyanathan and Ramos, 2003, Sulzmaier et al., 2012). RSK2 ainsi activée, pourrait activer d'autres protéines par phosphorylation telles que CREB (Bjorbaek et al., 1995) et PLD1 (Zeniou-Meyer et al., 2008). En effet, plusieurs mutations du gène codant RSK2 ont été identifiées chez des patients souffrant d'un retard mental syndromique lié au chromosome X, syndrome de Coffin-Lowry impliquant partiellement CREB (Trivier et al., 1996).

Au cours de la première partie de ma thèse, j'ai montré qu'en absence de PLD1 les neurones corticaux en culture présentent une réduction de la complexité de

l'arborisation dendritique ainsi qu'une diminution de la densité des épines dendritique, avec en particulier une réduction des épines matures. Comme, il a également été démontré que la PLD1 est impliquée, via la production de PA, dans l'activation de la voie Ras-ERK1/2 en contrôlant la localisation subcellulaire de Raf (Ghosh et al., 1996, Rizzo et al., 2000, Ghosh et al., 2003) et que d'autre part, la PLD1 régule l'activité de mTOR via le PA (Fang et al., 2003, Hornberger et al., 2006, Foster, 2007, Sun et al., 2008, Yoon et al., 2011), je me suis intéressé à ces voies de signalisation.

Afin de mieux comprendre le défaut dendritique observé chez les neurones corticaux *Pld1*^{-/-} en culture, j'ai étudié l'activation de la voie ERK1/2-RSK2-CREB ainsi que la voie mTOR-S6K induite par le BDNF. Ensuite, je me suis intéressé au mode de régulation de la voie ERK1/2-RSK2-CREB par la PLD1 induite par le BDNF ou le NGF. Pour cela, j'ai utilisé des neurones corticaux en culture à 3 DIV, où le niveau d'expression de la PLD1 est proche de son niveau maximal (Figure 28), mais aussi des cellules PC12 en culture.

1. Le BDNF stimule l'activité PLD dans les neurones en culture

Le traitement des neurones sauvages avec le BDNF induit une stimulation rapide et persistante de l'activité PLD au cours du temps avec un maximum observé à 30 min, où l'on mesure une augmentation de 8% par rapport aux neurones non traités (Figure 31).

Il faut noter que le NGF induit pour sa part une augmentation beaucoup plus soutenue de l'activité PLD (80% par rapport à des cellules PC12 non traitées, Ammar et al., 2013a). Cette différence d'efficacité des deux neurotrophines (BDNF et NGF) sur le niveau d'activation de l'activité PLD pourrait être expliquée par une forte activité PLD basale au cours du développement neuronal. Ainsi le niveau d'activité PLD basale de nos neurones corticaux en culture pourrait être déjà significativement plus élevé que dans les cellules PC12. En accord avec cette hypothèse, Zhu Yan-Bing et al., (2012) ont montré une forte augmentation de l'activité basale PLD à 3 DIV.

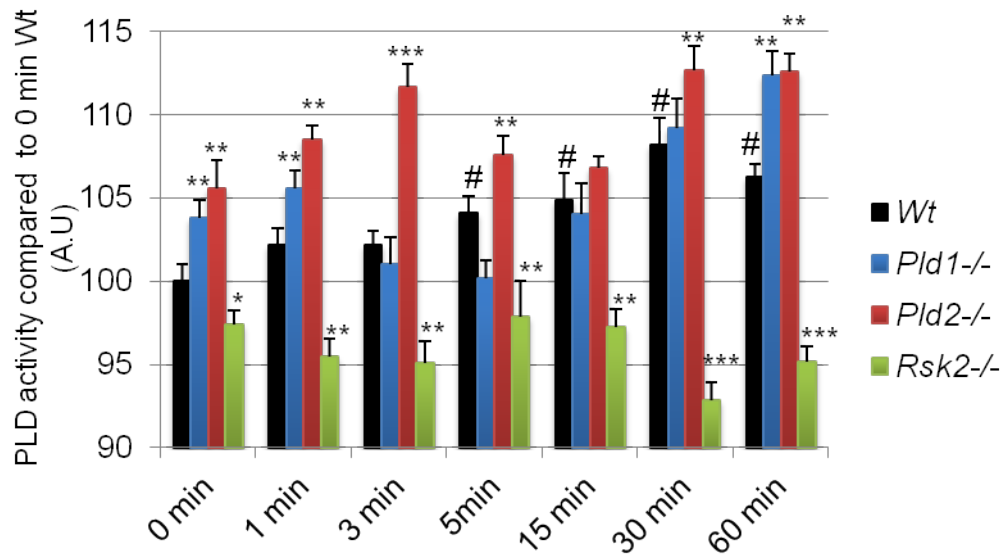


Figure 31: Régulation de l'activité PLD par le BDNF. Les neurones corticaux sauvages, *Pld1*^{-/-} ou *Pld2*^{-/-} ou *Rsk2*^{-/-} en culture (3DIV) ont été traités par le BDNF (100ng/ml) pendant différents temps. L'activité PLD a été déterminée et représentée sous la forme d'un rapport par rapport à l'activité PLD des neurones sauvages non stimulés au BDNF. * ou # $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (2 expériences avec 6 duplicatas).

Comme l'activité PLD mesurée par notre essai représente la somme de l'activité des différents isoformes de PLD, j'ai utilisé des neurones issus de souris *Pld1*^{-/-} et *Pld2*^{-/-} en culture pour distinguer l'activité de chaque isoforme. D'une manière intéressante, en absence de PLD1 et en condition de repos l'activité PLD totale (représentant virtuellement l'activité PLD2) augmente d'une manière significative par rapport aux neurones sauvages ($4\% \pm 0.89\%$). Cette augmentation est maintenue jusqu'à 1 min en présence de BDNF ($5.2\% \pm 0.92\%$). Elle est réduite de 5% à partir de 3 min de traitement par le BDNF et jusqu'à 15 min. Ensuite l'activité PLD augmente progressivement au cours du temps ($12.3\% \pm 1.5\%$ après 60 min de BDNF). D'autre coté, en absence de PLD2, l'activité PLD mesurée représente virtuellement l'activité PLD1. Cette activité augmente par rapport aux neurones sauvages ($5.095\% \pm 1.92\%$). Après 3 min de traitement par le BDNF, l'activité PLD1 augmente de 7%, puis elle est réduite après 5-15 min de traitement, ensuite l'activité de PLD1 ré-augmente pour atteindre un maximum entre 30-60 min du BDNF ($112\% \pm 0.92\%$ à 60 min). Ces expériences montrent que les deux isoformes de PLD sont probablement activées en absence de BDNF et que le traitement par le BDNF induit initialement une augmentation de l'activité de PLD1 accompagnée par une réduction de l'activité de PLD2. Ensuite l'activité PLD1 est réduite à partir de 5 min alors que celle de PLD2 augmente jusqu'à 60 min suivie par une augmentation de l'activité PLD1 après 15

min. Il est particulièrement intéressant de noter que l'activité PLD globale n'est pas diminuée en absence de l'une des deux isoformes de PLD. Il semble donc exister un mécanisme de compensation par l'autre isoforme qui peut dans une certaine mesure maintenir l'activité basale de production de PA par cette voie des phospholipases D. D'une manière intéressante, alors que l'absence de RSK2 affecte très modérément l'activité PLD en l'absence de BDNF, l'augmentation de l'activité PLD induite au cours du temps par le traitement est fortement réduite en absence de RSK2 (Figure 31). Je peux rappeler que l'inhibiteur de RSK2 (BI-D1870) réduit l'augmentation de l'activité PLD induite par le NGF (Ammar et., 2013a). Ceci semble confirmer l'implication de RSK2 dans la régulation de l'activité de la PLD1 par phosphorylation sur sa Thr-147 lorsque le développement neuronal est induit par les neurotrophines.

2. Diminution de l'activation de la voie ERK1/2-RSK2-CREB et mTOR-S6K induite par BDNF en absence de PLD1 dans les neurones corticaux en culture

La stimulation des neurones corticaux sauvages en culture par le BDNF induit une phosphorylation rapide d'ERK1/2 qui augmente au cours du temps (Figure 32). En revanche, même si le BDNF induit la phosphorylation d'ERK1/2 en absence de PLD1, cette augmentation est moins forte que celle observée dans le cas des neurones sauvages. Après quantification, nous observons une réduction de phospho-ERK1/2 de 44.33% $\pm$ 5.25% (Figure 32). Ceci montre l'importance de la PLD1 dans l'activation et le maintien de la phosphorylation d'ERK1/2 au cours du temps.

En revanche, en absence de RSK2, le taux de phosphorylation d'ERK1/2 augmente par rapport aux neurones sauvages et cette augmentation est maintenue jusqu'à 30 min de traitement par le BDNF. Etant donné que RSK2 phosphoryle et active la PLD1 suite à la stimulation des cellules PC12 par le NGF (Ammar et al., 2013a), ces résultats suggèrent que l'implication de la PLD1 dans l'activation et le maintien de la phospho-ERK1/2 est indépendante de RSK2.

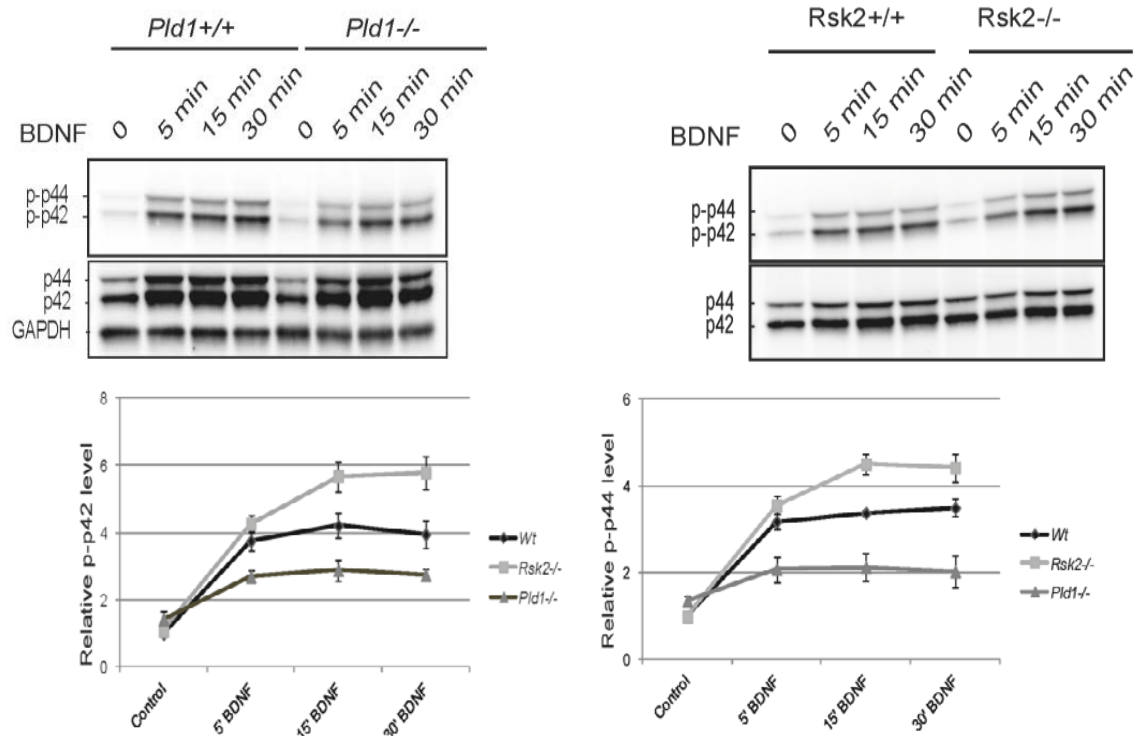


Figure 32: Implication de la PLD1 dans le maintien de la phosphorylation d'ERK1/2 induite par le BDNF. Des neurones corticaux sauvages ou *Pld1*^{-/-} ou *Rsk2*^{-/-} en culture (3DIV) ont été traités par le BDNF (100ng/ml) pendant différents temps. Puis les cellules sont lysées et 35 µg des protéines ont été déposées et migrées sur gel SDS-PAGE. Après transfert, les protéines ont été révélées par l'application des anticorps spécifiques anti-ERK1/2, anti phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) et anti-GAPDH. Le taux de phospho-ERK1/2 a été déterminé par rapport au taux d'ERK1/2 totale, puis normalisé par rapport à l'expression de GAPDH. La phosphorylation de phospho-p42 (ERK1) et phospho-p44 (ERK2) est normalisée par rapport aux neurones non traités. Quantification réalisée sur trois expériences différentes.

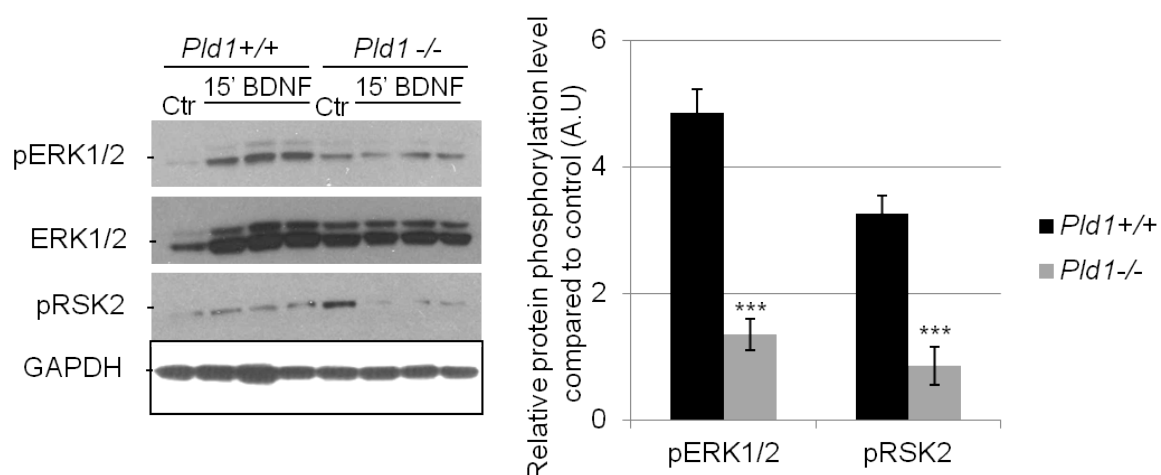


Figure 33: Implication de la PLD1 dans la phosphorylation de RSK2 induite par le BDNF. Des neurones corticaux sauvages ou *Pld1*^{-/-} ou *Rsk2*^{-/-} en culture (3DIV) ont été traités comme indiqué pour la Figure 34 et les taux de pERK1/2 et pRSK2 estimés. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

D'une manière intéressante, l'absence de PLD1 réduit également la phosphorylation de RSK2 induite par un traitement de 15 min au BDNF. Cette réduction est d'environ 50% par rapport au niveau de pRSK2 mesuré dans les neurones *Pld1*^{+/+} (Figure 33).

D'autre part, le taux de phosphorylation de CREB sur Ser-133 est réduit de 66% ± 0.7% chez les neurones *Pld1*^{-/-}, par rapport aux neurones *Pld1*^{+/+} (Figure 34), alors qu'en absence de RSK2 le taux de phosphorylation de CREB n'est réduit que de 33% ± 1.6%.

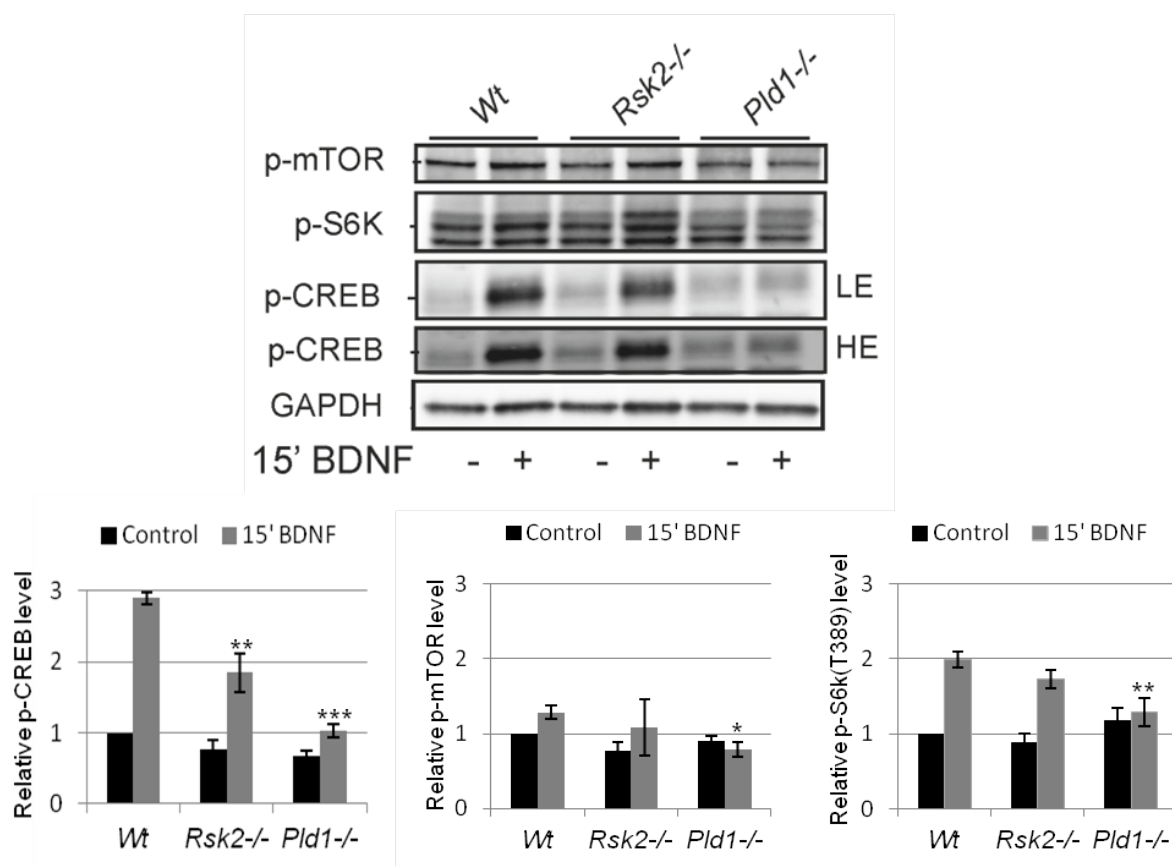


Figure 34: Implication de la PLD1 dans la régulation de l'activité de CREB et mTOR. Des neurones de chaque génotype (3DIV) ont été traités ou pas par le BDNF pendant 15 min. Le taux de phospho-protéine a été déterminé par rapport au taux d'expression de GAPDH. Quantification de trois expériences différentes où la phosphorylation est normalisée par rapport aux neurones non traités. LE : faible exposition, HE : forte exposition * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001.

Le BDNF induit aussi une légère augmentation du niveau de phosphorylation de mTOR sur Ser2448 après 15 min d'incubation (Figure 34). Cette augmentation est complètement inhibée en absence de PLD1 (Figure 34). Par contre les constatations faites en absence de RSK2 ne permettent pas d'obtenir de différence significative

entre les conditions, en raison d'une trop grande variabilité des résultats (Figure 34). Par ailleurs, nous avons pu observer que la phosphorylation de la S6K sur Thr139 (le substrat de mTOR) est complètement inhibée en absence de PLD1 (Figure 34).

Il a été rapporté que le traitement des neurones avec le BDNF induit une augmentation de phosphorylation d'ERK1/2 et de CREB au niveau nucléaire (Zhou et al., 2011, Kim et al., 2012). Afin de vérifier si le taux de phosphorylation nucléaire de ces deux protéines est altéré en absence de PLD1, j'ai quantifié l'intensité de la fluorescence de p-CREB et p-ERK1/2 15 min après stimulation par le BDNF. Le taux de fluorescence rapporté à la surface nucléaire montre que le taux de phospho-CREB est réduit de 50% dans les neurones *Pld1*^{-/-}, alors que celui d'ERK1/2 ne diffère pas dans les deux génotypes (Figure 35). Ceci suggère que la PLD1 contrôle la phosphorylation nucléaire de CREB et la phosphorylation cytoplasmique d'ERK1/2.

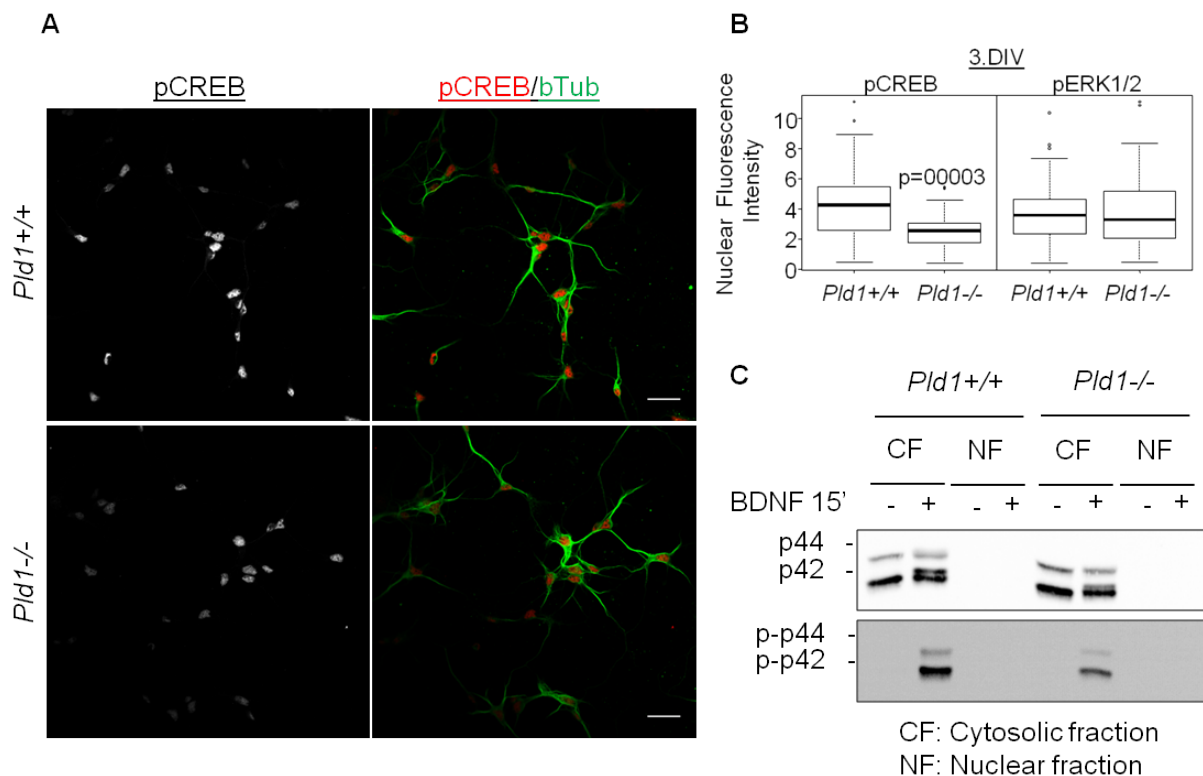


Figure 35: Réduction du taux de phospho-ERK1/2 cytosolique et de phospho-CREB nucléaire des neurones traités par le BDNF en absence de la PLD1. **A)** Des neurones en culture (3 DIV) ont été traités 15 min par le BDNF. Après fixation, les neurones ont été marqués avec un anticorps anti- β tubuline, tandis que le taux de phospho-CREB ou pERK1/2 (non présenté ici) est révélé par un anticorps anti-p-Ser133 de CREB. **(B)** Quantification du taux nucléaire de la phospho-ERK1/2 ou CREB. L'intensité du marquage a été normalisée par rapport à la surface nucléaire. **(C)** Réduction de phospho-ERK1/2 au niveau de la fraction cytosolique en absence de la PLD1. Les neurones en culture (3DiV) traités par le BDNF pendant 15 min. Bar= 25 μ m.

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai réalisé un fractionnement subcellulaire pour séparer la fraction cytosolique de la fraction nucléaire. L'analyse du taux de phosphorylation d'ERK1/2 confirme bien la réduction cytosolique de phospho-ERK1/2 15 min après stimulation au BDNF (Figure 35).

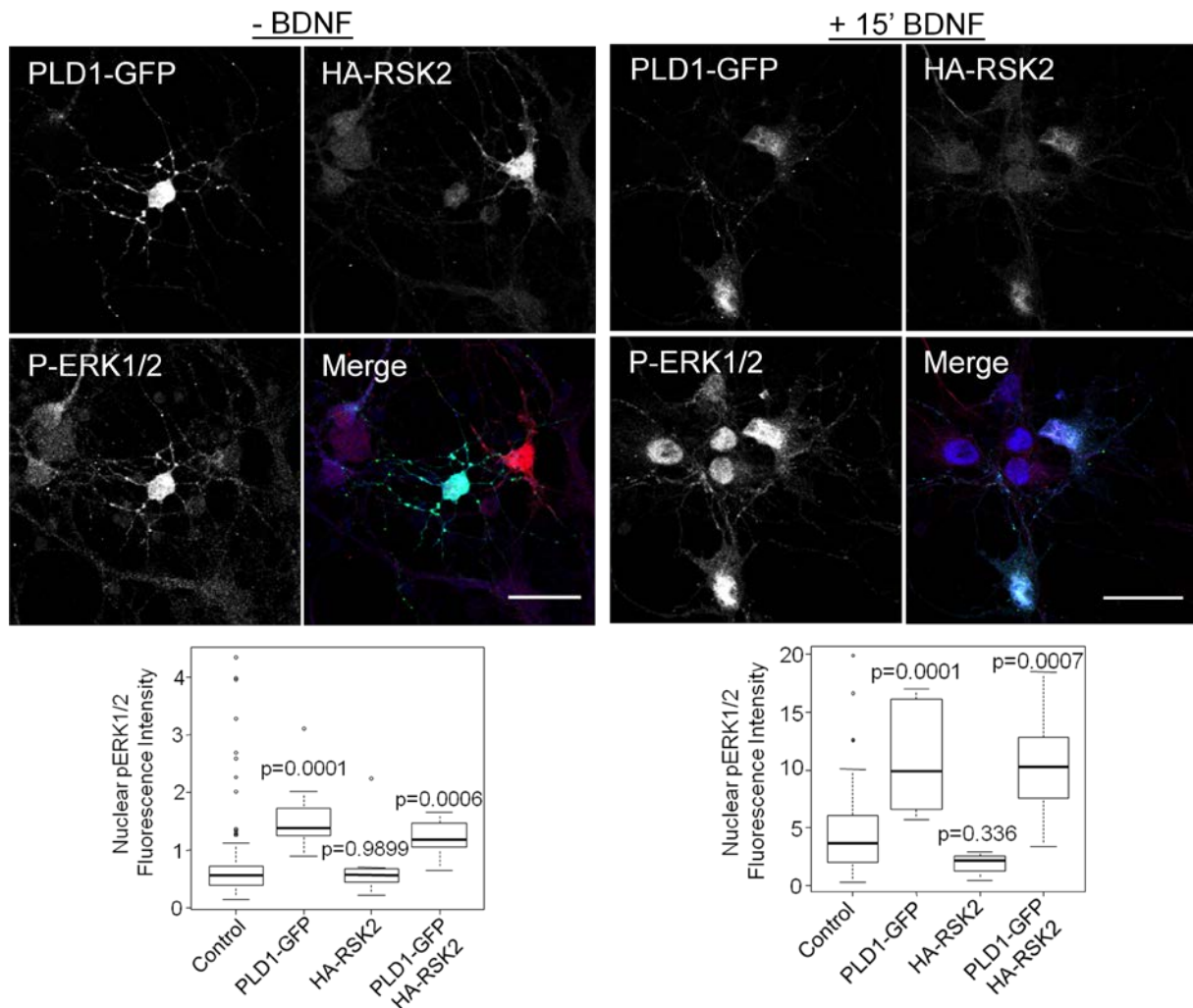


Figure 36: Augmentation de taux de phospho-ERK1/2 dans les neurones corticaux en culture surexprimant PLD1-GFP. Des cellules ont été co-transfectées à 2 DIV avec PLD1-GFP et HA-RSK2. 24H après les cellules ont été stimulées ou pas par le BDNF pendant 15 min. Après fixation les cellules ont été marquées avec un anti-phospho-ERK1/2, révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor-647 et un anti-HA révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor-555. Le taux de phospho-ERK1/2 nucléaire a été normalisé par rapport à la surface nucléaire révélée par DAPI. Bar= 25µm.

3. La surexpression de PLD1 induit une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2, RSK2 et CREB

Afin de confirmer l'implication de la PLD1 dans la régulation de la voie ERK1/2-RSK2-CREB, j'ai choisi de surexprimer PLD1-GFP dans des neurones corticaux en culture. Les neurones surexprimant PLD1-GFP présentent une augmentation de phospho-ERK1/2 nucléaire de 2 fois par rapport aux cellules non transfectées dans les conditions de repos (Figure 36). Une stimulation par le BDNF pendant 15 min augmente de 5 fois le taux de phospho-ERK1/2 nucléaire pour les cellules contrôles. En revanche, dans le cas des neurones exprimant PLD1-GFP cette augmentation est de 10 fois (Figure 36). En résumé, les neurones surexprimant la PLD1 présente un niveau plus élevé de phospho-ERK1/2 nucléaire et ce niveau augmente encore d'avantage en réponse au BDNF.

D'une manière intéressante, la totalité des neurones surexprimant PLD1-GFP présente en outre d'une augmentation de phospho-ERK1/2 nucléaire une augmentation du taux de phospho-ERK1/2 cytosolique. Ceci est particulièrement visible au niveau périnucléaire et neuritique. Cette augmentation semble être spécifique de la PLD1 puisque la surexpression d'HA-RSK2 ou de la GFP seule n'induit pas l'augmentation de phospho-ERK1/2 (Figure 36).

D'une manière surprenante, la surexpression d'HA-RSK2 n'affecte pas la phosphorylation nucléaire d'ERK1/2 (Figure 36). En effet, on aurait pu s'y attendre puisqu'il a été établi précédemment que RSK2 régule négativement la phosphorylation d'ERK1/2 via la phosphorylation et l'inhibition de SOS (Clark et al., 2007). En outre, nous observons ici que la co-expression d'HA-RSK2 avec PLD1-GFP n'affecte pas l'augmentation de phospho-ERK1/2 induite par PLD1-GFP (Figure 36).

En outre, la surexpression de PLD1-GFP augmente également le taux de phospho-CREB nucléaire. Cette augmentation est voisine de 30% par rapport aux neurones non transfectés 15 min après stimulation au BDNF (Figure 37).

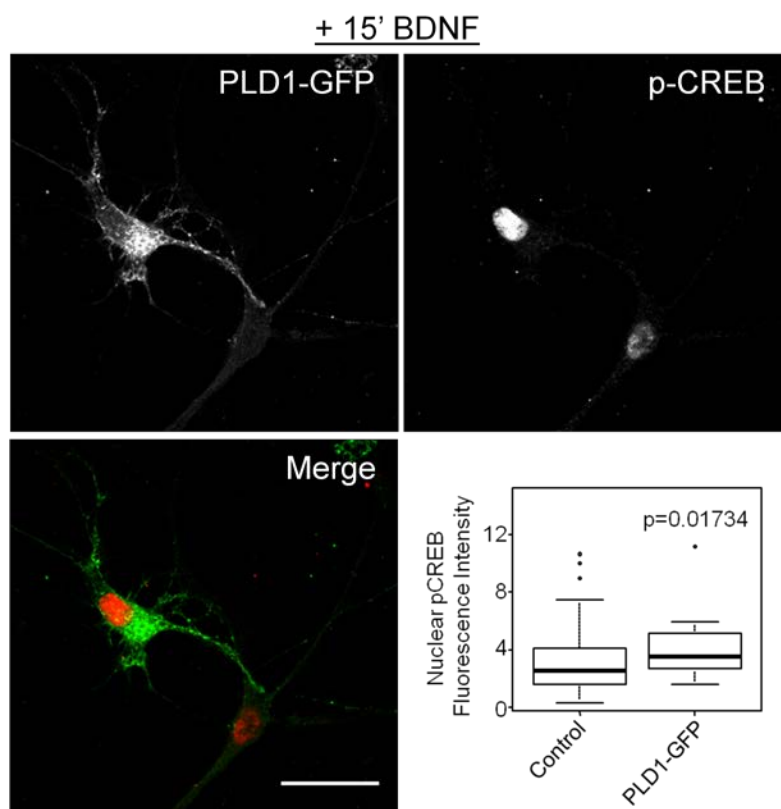


Figure 37: Augmentation du taux de phospho-CREB nucléaire dans les neurones surexprimant PLD1-GFP. Des neurones corticaux ont été co-transfectés à 2 DIV avec PLD1-GFP. 24H après les cellules ont été stimulées ou pas par le BDNF pendant 15 min. Après fixation les cellules ont été marquées avec un anti-phospho-CREB, révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor-555. Le taux de phospho-CREB nucléaire a été normalisé par rapport à la surface nucléaire révélée par DAPI. Bar= 25µm.

Dans un deuxième temps, j'ai transfecté des cellules PC12 afin de pouvoir valider ces résultats par une analyse par western blot après traitement des cellules au NGF. Comme montré précédemment le NGF induit une phosphorylation rapide d'ERK1/2, qui est maintenue jusqu'à une heure (Ammar et al., 2013a). En outre, en accord avec nos résultats précédent, cette stimulation par le NGF induit aussi la phosphorylation de RSK2, ainsi qu'une augmentation au cours du temps de la phosphorylation de PLD1 (Thr-147) (Figure 38). De manière remarquable cette augmentation du niveau de phospho-PLD1 a pu être observée sur la PLD1 surexprimée (Figure 38, faible exposition), mais aussi sur le PLD1 endogène (Figure 38, forte exposition). Mes résultats antérieurs indiquent que la phosphorylation de la PLD1 suite à la stimulation au NGF est RSK2 dépendante (Ammar et al., 2013a). En outre, le NGF induit aussi la phosphorylation de CREB sur Ser-133 dans les cellules PC12 (données non

présenté), et cette phosphorylation est maximale après 15 min de traitement au NGF (Figure 38).

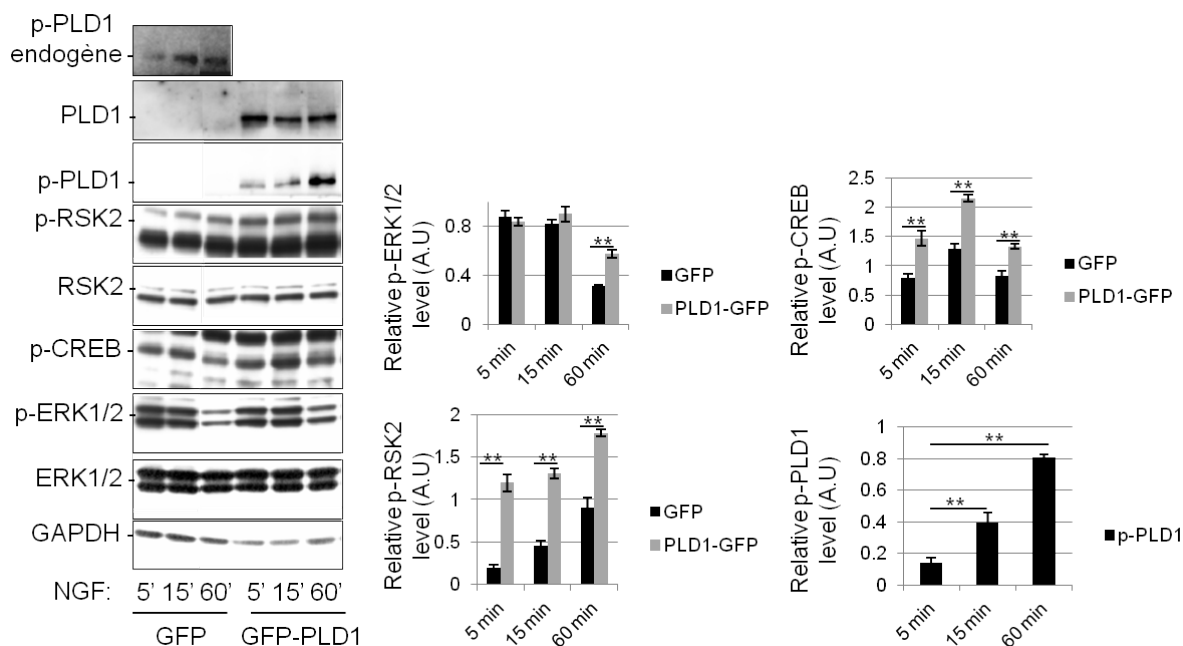


Figure 38: Augmentation de l'activation de la voie MAPK (ERK1/2-RSK2-CREB) dans les cellules PC12 surexprimants PLD1-GFP et traitées par le NGF. Des cellules PC12 ont été transfectées avec un plasmide codant PLD1-GFP ou GFP seule. 24h après, les cellules ont été stimulées ou pas par le NGF pendant des différents temps (5', 15' et 60'). Le taux de phosphoprotéine a été déterminé par rapport au taux d'expression de la protéine non phosphorylée puis normalisée par rapport au niveau d'expression de GAPDH. La quantification du taux de phospho-PLD1 (Thr-147) regroupe PLD1 endogène et PLD1-GFP. Quantification réalisée sur trois expériences différentes. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

La surexpression de PLD1-GFP induit une augmentation de 40% du niveau de phospho-ERK1/2 après une heure de traitement par le NGF, en comparaison des cellules exprimant la GFP (Figure 38). Ceci suggère que la PLD1 pourrait être impliquée dans le maintien de la phosphorylation d'ERK1/2 au cours du temps. D'une manière intéressante, la surexpression de PLD1-GFP induit une augmentation du taux de phospho-RSK2 et de phospho-CREB 5 min, 15 min et 60 min après stimulation au NGF par rapport aux cellules surexprimant la GFP (Figure 38). Ces résultats semblent bien confirmer l'implication de la PLD1 dans la régulation de la voie ERK1/2-RSK2-CREB, suite à la stimulation des cellules avec une neurotrophine. Cette régulation semble être due à l'activité de la PLD1 qui produit du PA. En effet, la transfection des cellules PC12 avec la sonde Spo20-GFP qui se fixe sur le PA réduit de 60% le taux de phospho-CREB nucléaire par rapport aux cellules non

transfectées ou surexprimant la GFP (Figure 39). A ce propos, je voudrais rappeler que j'ai montré que la transfection des cellules PC12 avec la sonde Spo20-GFP inhibe également la croissance neuritique induite par le NGF (Ammar et al., 2013a). Ceci suggère donc que la sonde Spo20-GFP en se liant au PA inhibe l'interaction d'une ou plusieurs protéines impliquées dans l'activation de la voie ERK1/2-RSK2-CREB. Un candidat potentiel comme cible du PA dans ce processus pour être la GTPase Raf.

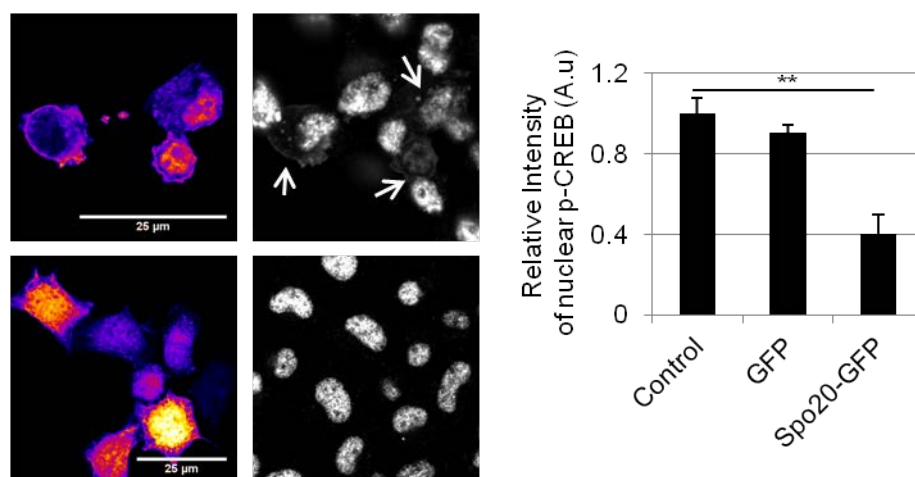


Figure 39: Réduction de phospho-CREB nucléaire induite par NGF dans les cellules PC12 surexprimants Spo20-GFP. Des cellules PC12 ont été transfectées avec un plasmide codant Spo20-GFP ou GFP seule. 24h après, les cellules ont été stimulées ou pas par le NGF pendant 15 min. Le taux de phospho-CREB a été normalisé par rapport à la surface nucléaire. Bar= 25µm. ** $p \leq 0.01$.

4. Colocalisation de PLD1, RSK2 et ERK1/2 au niveau de structures vésiculaires

Les résultats précédents montrent que la PLD1 régule l'activation de la voie ERK1/2-RSK2-CREB en réponse au traitement des cellules avec des neurotrophines. J'ai donc cherché à voir si ces protéines sont localisées au même endroit dans les neurones. D'une manière intéressante, PLD1-GFP colocalise partiellement avec phospho-ERK1/2, puisque j'ai pu mesurer un taux de colocalisation de $67\% \pm 2.35\%$ après un traitement de 15 min au BDNF. Ces deux protéines colocalisent principalement au niveau de structures ponctiformes présentes dans le corps cellulaires, mais également dans les prolongements (Figure 40). En plus, j'ai pu observer que HA-RSK2 colocalise aussi avec PLD1-GFP et phospho-ERK1/2 au

niveau de ces structures ponctiformes avec un taux de colocalisation de $23\% \pm 3.12\%$ (Figure 40).

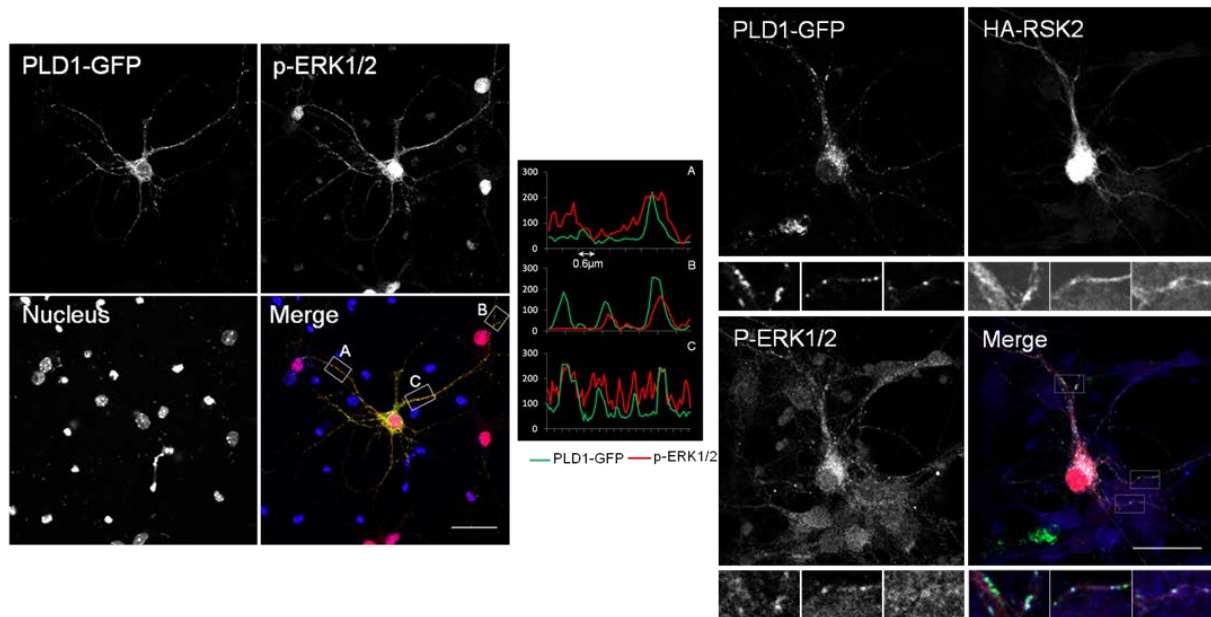


Figure 40: Colocalisation vésiculaire partielle entre PLD1-GFP, phospho-ERK1/2 et HA-RSK2. Des neurones corticaux ont été co-transfectées à 2 DIV avec PLD1-GFP et HA-RSK2. 24h après, les cellules ont été stimulées ou pas par le BDNF pendant 15 min. Après fixation les cellules ont été marquées avec un anti-phospho-ERK1/2, révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor-647 et un anti-HA révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor-555. Bar= 25μm.

5. BDNF induit la formation d'un complexe entre PEA15, ERK1/2, RSK2 et PLD1

Il a été précédemment démontré que la protéine PEA15 ou *phosphoprotein enriched in astrocytes* interagit avec PLD1 (Zhang et al., 2000b, Viparelli et al., 2008, Doti et al., 2010, Farina et al., 2013), ERK1/2 (Formstecher et al., 2001, Hill et al., 2002) et RSK2 (Vaidyanathan and Ramos, 2003, Vaidyanathan et al., 2007). La PLD1 interagit avec la partie amino-terminale de PEA15, tandis qu'ERK1/2 et RSK2 se lient à la partie carboxy-terminale (Figure 41).

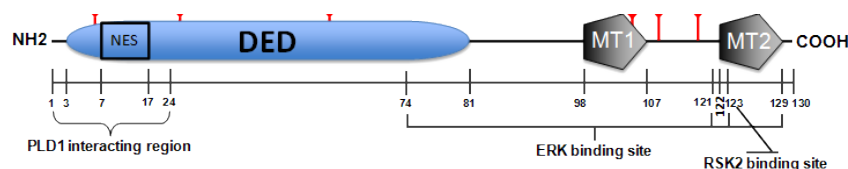


Figure 41: Représentation des principaux domaines de PEA15, ainsi que des sites de liaison d'ERK1/2, de PLD1 et de RSK2.

Ainsi cette protéine apparaît comme un candidat intéressant pour servir de matrice à la formation d'un complexe entre les trois protéines. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai réalisé une co-immunoprécipitation à partir de cultures neuronales traitées ou pas avec le BDNF. Au repos, PEA15 ne co-immunoprécipite pas les trois protéines recherché (Figure 42). En revanche, la stimulation des cellules pendant 15 min avec du BDNF semble induire la formation d'un complexe entre PEA15 et ERK1/2, RSK2 et PLD1, puisque les trois protéines coprécipitent avec PEA15 (Figure 42).

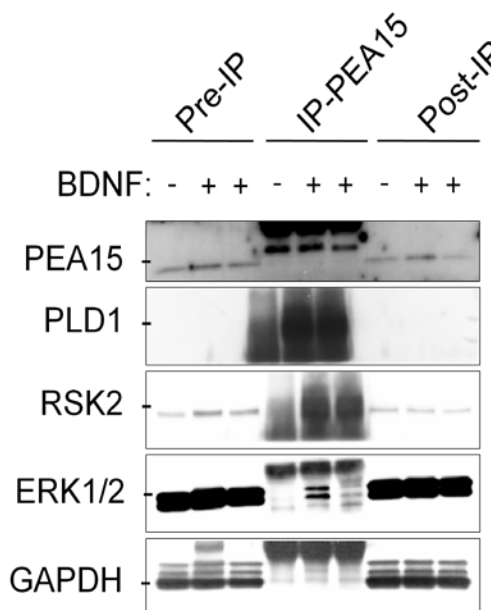


Figure 42: Le BDNF induit la formation d'un complexe protéique contenant ERK1/2, RSK2, PLD1 et PEA15. Des neurones (3DIV) ont été traités ou pas par le BDNF pendant 15 min. Une immunoprécipitation par un anticorps dirigé contre PEA15 a été réalisée. La co-immunoprécipitation de PLD1, RSK2 et ERK1/2 a été testé. GAPDH a été utilisé comme un contrôle négatif d'IP.

5. Localisation endosomale de PLD1 et d'ERK1/2

Afin de déterminer l'identité les structures ponctiformes où colocalisent PLD1 et phospho-ERK1/2, j'ai réalisé une série d'immunomarquages des neurones en culture ou des cellules PC12, ainsi que des fractionnements subcellulaire en utilisant un gradient d'OptiPrep. En utilisant, APPL1 comme marqueur des endosomes précoces et Rab7 comme marqueur des endosomes tardifs, j'ai pu observer que 15.3% $\pm$ 1.67% de PLD1-GFP colocalise avec les endosomes précoces après 15 min de traitement au BDNF et que 30% $\pm$ 2.56% de PLD1-GFP colocalise avec les endosomes tardifs après 15 min de traitement au BDNF. En revanche, après une heure de traitement par le BDNF 67% $\pm$ 3.23% de PLD1-GFP colocalise avec Rab7

(Figure 43). IL semble donc qu'un traitement au BDNF augmente le niveau de PLD1 associé aux endosomes tardifs.

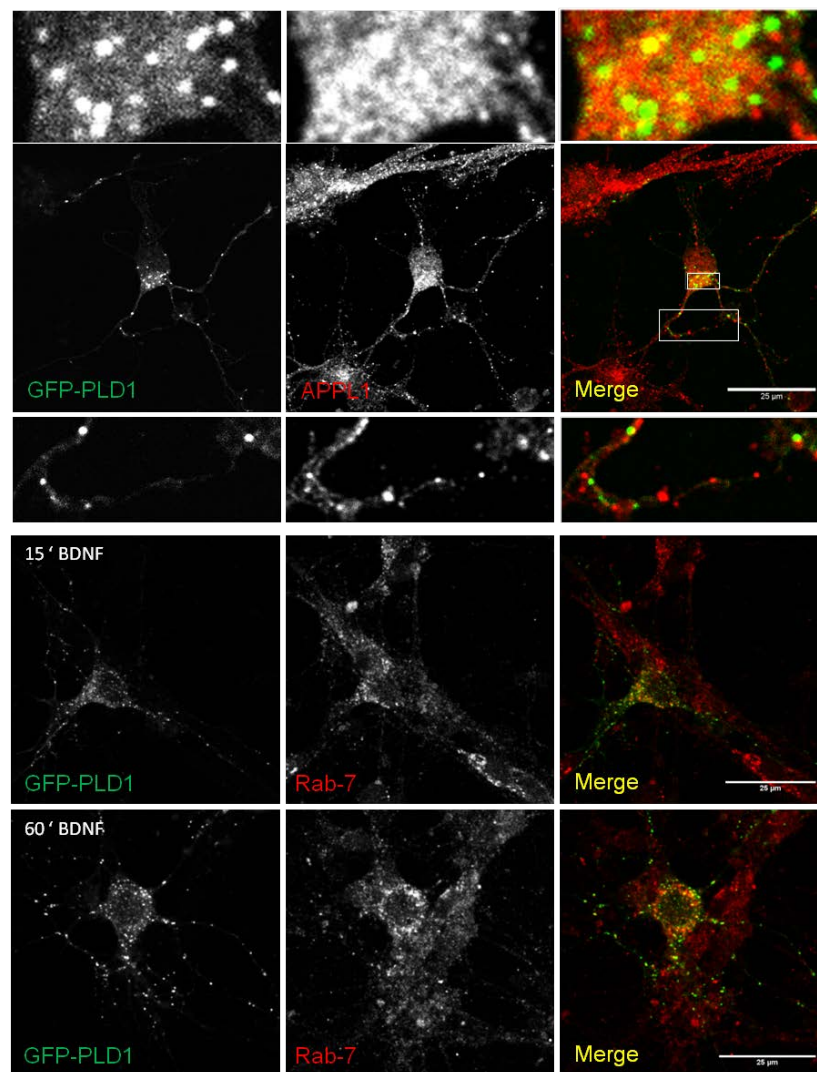


Figure 43: Localisation endosomale de PLD1-GFP. Des neurones corticaux ont été transfectées à 2 DIV avec PLD1-GFP. 24H après, les cellules ont été stimulées ou pas par le BDNF pendant 15 min ou 60 min. Après fixation les cellules ont été marquées avec un anti-APPL1 ou un anti-Rab7, révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor-555. Bar= 25µm.

De même, j'ai montré que phospho-ERK1/2 colocalise partiellement avec PLD1-GFP et Rab7 (Figure 44).

Afin de confirmer la localisation de PLD1, ERK1/2, RSK2 et PEA15 dans le système endosomal, j'ai réalisé un fractionnement sur un gradient d'OptiPrep (5%, 10%, 15%, 20% et 25%), réalisé à partir d'une culture neuronale traitée au BDNF pendant 15 min. Le résultat obtenu montre que PLD1 et RSK2 sont enrichies principalement dans la première fraction (interphase 5-10%). Cette fraction contient aussi le

récepteur au BDNF (TrKB), les marqueurs d'endosome précoce : APPL1/Rab5, phospho-ERK1/2 et PEA15 (Figure 44).

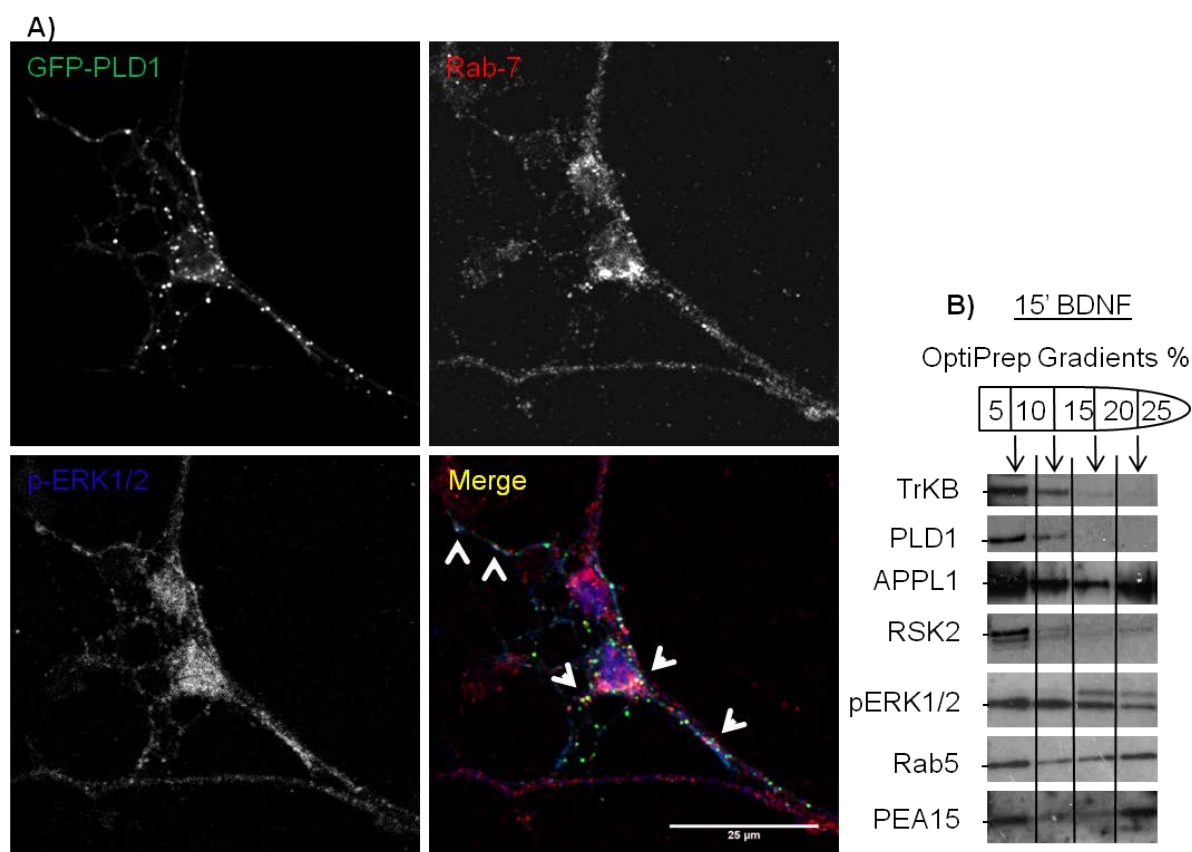


Figure 44: Localisation endosomale de PLD1, d'ERK1/2, RSK2 et de PEA15. (A) Des neurones corticaux ont été transfectés à 2 DIV avec un plasmide codant la PLD1-GFP. 24H après, les cellules ont été stimulées ou pas par le BDNF pendant 15 min. Après fixation les cellules ont été marquées avec un anti-phospho-ERK1/2, révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor-647 et un anti-Rab7, révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor-555. Les flèches montrent certains points de colocalisation entre les trois marqueurs. Bar= 25µm. (B) Fractionnement subcellulaire d'un lysat de neurones corticaux traités au BDNF séparé sur un gradient d'OptiPrep (5%, 10%, 15%, 20% et 25%). Les fractions ont été testées par western-blot avec les anticorps indiqués.

Au niveau des cellules PC12 traitées au NGF, PLD1-GFP colocalise aussi avec Rab7 et phospho-ERK1/2 dans des structures vésiculaires et périnucléaires (Figure 45). En plus, PLD1-GFP colocalise avec phospho-ERK1/2 à la périphérie cellulaire (Figure 45).

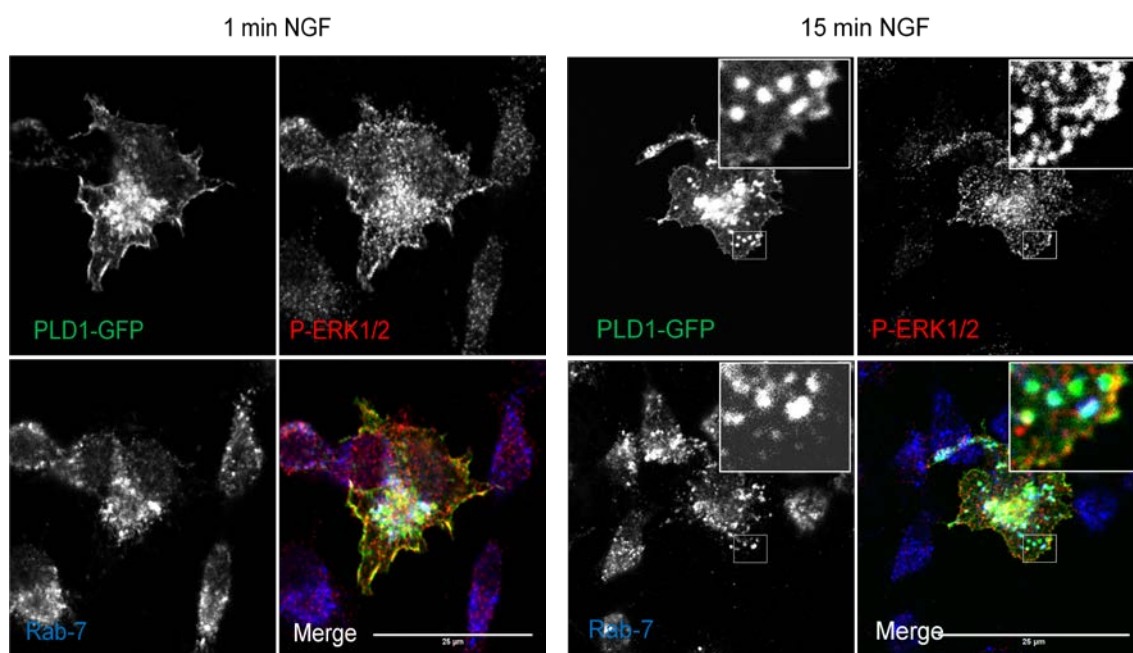


Figure 45: Colocalisation membranaire et endosomale de PLD1-GFP et de phospho-ERK1/2 induite par le NGF. Des cellules PC12 ont été transfectées avec un plasmide codant la PLD1-GFP. 24H après, les cellules ont été stimulées par le NGF. Après fixation les cellules ont été marquées avec un anti-phospho-ERK1/2, révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor-647 et un anti-Rab7, révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor-555. Bar= 25μm.

6. Discussion

L'activité PLD est stimulée par plusieurs facteurs extracellulaires, tels que certains neurotransmetteurs, hormones ou des facteurs de croissance (Frohman and Morris, 1999). Parmi les facteurs de croissance, les neurotrophines jouent un rôle important dans la morphogénèse neuronale, où il a été démontré que les voies de signalisation induites par BDNF/TrkB modulent la complexité dendritique des neurones corticaux (McAllister et al., 1995, Yacoubian and Lo, 2000). Cette modulation est médiée en partie par ERK1/2-CREB (Finkbeiner et al., 1997, Blanquet, 2000, Alonso et al., 2002) et aussi par mTOR (Jaworski et al., 2005, Kumar et al., 2005).

Ayant montré dans la première partie de ce manuscrit que le NGF stimule l'activité PLD dans les cellules PC12 (Ammar et al., 2013a), j'ai également montré ici que le BDNF induit également une augmentation rapide de l'activité PLD dans les neurones corticaux en culture, même si cette activation est d'intensité plus modeste. En effet en utilisant deux modèles murins *Pld1*^{-/-} et *Pld2*^{-/-}, j'ai pu montrer que le BDNF induit une augmentation rapide de PLD1, suivie par une augmentation de PLD2 au cours du temps. Cette augmentation de l'activité PLD coïncide avec l'induction de la

phosphorylation et par conséquent l'activation d'ERK1/2 suite à la formation du complexe BDNF/TrKB. Cette activation est rapide et maintenue au cours du temps jusqu'à 30 min. ERK1/2 ainsi activée est capable de phosphoryler et d'activer RSK2 ou CREB. En parallèle, BDNF induit la phosphorylation et l'activation de mTOR et de sa cible p70-S6K. En absence de la PLD1, j'ai montré que : i) l'activation d'ERK1/2 est fortement réduite au cours du temps par rapport aux neurones sauvages, ii) d'une manière intéressante cette réduction implique aussi une réduction de la phosphorylation de RSK2 et du taux de phospho-CREB nucléaire, et iii) une réduction de l'activation de mTOR et en conséquence de p70-S6K.

Ces résultats sont en accord avec des études précédentes qui ont montré que l'acide phosphatidique, produit par l'une de deux isoformes de PLD, joue un rôle important dans la régulation de la voie MAPK et ceci via le recrutement de la protéine Raf à la membrane plasmique à proximité des sites d'initiation de la signalisation. Raf ainsi recrutée à la membrane pourrait être phosphorylée et activée par la GTPase Ras (Rizzo et al., 1999, Rizzo et al., 2000). Le PA pourrait aussi moduler l'activité de la voie MAPK via son interaction avec la protéine SOS ou la protéine KSR ou *Kinase suppressor of Ras* (Andresen et al., 2002). La réduction de l'activation d'ERK1/2 pourrait aussi expliquer la réduction de l'activation de RSK2 et de CREB.

En plus de la régulation de certaines protéines de la voie MAPK, le PA pourrait aussi réguler l'activation de mTOR (Foster, 2007, Sun and Chen, 2008). D'autre part, il a été montré que la GTPase Rheb, activateur de mTOR, interagit avec la PLD1 et augmente ainsi son activité (Sun et al., 2008).

Puisque RSK2 phosphoryle et régule l'activation de la PLD1 en réponse au NGF, j'ai examiné l'effet de l'absence de RSK2 sur ces voies de signalisation induites par le BDNF. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 au cours du temps par rapport aux neurones sauvages et aussi une réduction de taux de phospho-CREB. Ceci suggère que RSK2 n'intervient pas dans la régulation d'ERK1/2 par la PLD1. L'effet observé pourrait être expliqué par le fait que RSK2 exerce un feedback négatif sur l'activation d'ERK1/2 via la phosphorylation et l'inhibition de SOS (Clark et al., 2007). On peut donc imaginer qu'en absence de RSK2, le feedback négatif sur SOS est levé, engendrant ainsi une sur-activation d'ERK1/2. Ceci pourrait compenser la réduction d'activation d'ERK1/2

en absence de la phosphorylation de PLD1 par RSK2. Malheureusement, je n'ai pas pu examiner la cinétique de la phosphorylation de la PLD1 par RSK2 au cours du traitement au BDNF dans nos modèles de souris transgéniques, car l'anticorps phospho-PLD1 (Thr147) que j'ai utilisé ne détecte pas la protéine murine. Pour circonvenir cette difficulté, j'ai réalisé une immunoprécipitation avec un anticorps qui reconnaît toutes les protéines phosphorylées sur Thr suivie d'un western blot avec les anticorps anti-PLD, mais je n'ai pas pu avoir de résultats convaincants et reproductibles avec cette méthodologie. Pour finir, j'ai opté pour l'examen de l'activité PLD en réponse au BDNF dans les neurones *Rsk2*^{-/-} et j'ai montré qu'en absence de RSK2, l'activité PLD est fortement réduite en réponse au BDNF (Figure 31). Ceci suggère une implication probable de RSK2 dans la régulation de PLD1 et d'ERK1/2.

Pour confirmer l'implication de la PLD1 dans la régulation d'ERK1/2, j'ai opté pour une stratégie de surexpression. PLD1-GFP surexprimée augmente la phosphorylation d'ERK1/2 ainsi que celle de CREB. Ceci semble valider l'idée d'une implication de la PLD1 dans la régulation de la voie MAPK. Cette régulation implique probablement la production du PA, puisque la surexpression de Spo20-GFP, une sonde qui se lie spécifiquement au PA, réduit fortement le taux de phospho-CREB nucléaire induit par le BDNF.

Au niveau des cellules PC12, la surexpression de PLD1-GFP induit également une augmentation du taux de phospho-ERK1/2, après 60 min de NGF. Ceci suggère également l'implication de la PLD1 dans le maintien de l'activité d'ERK1/2 au cours du temps, un phénomène qui a été décrit comme essentiel pour la différenciation cellulaire (Chen et al., 2012a). De plus cette surexpression induit une augmentation du taux de phospho-RSK2 et de phospho-CREB.

D'une manière intéressante, dans les neurones corticaux traités au BDNF, PLD1-GFP colocalise partiellement au niveau de vésicules avec phospho-ERK1/2 et RSK2. Ceci valide l'idée d'un lien fonctionnel entre les trois protéines. Comme il a été démontré précédemment que la protéine PEA15 possède des sites de liaison pour PLD1, ERK1/2 et RSK2 et que la PLD1 joue un rôle important dans l'activation d'ERK1/2 induite par la surexpression de PEA15 et Ras dans les cellules épithéliales (Sulzmaier et al., 2012), j'ai essayé d'établir un lien possible entre ces différentes protéines dans mon modèle d'étude. Afin de mieux comprendre ce lien, j'ai étudié par

co-immunoprécipitation l'interaction entre ERK1/2, RSK2, PLD1 et PEA15 suite à la stimulation des neurones par le BDNF. Les résultats obtenus montrent bien une augmentation de l'interaction entre ces quatre protéines après une stimulation de 15 min au BDNF (Figure 42).

Pour caractériser l'identité des structures vésiculaires où colocalise ERK1/2, RSK2 et PLD1, j'ai réalisé une série d'immunomarquages des neurones corticaux en culture traités au BDNF. Les résultats obtenus ont montré que PLD1-GFP est localisée sur des vésicules contenant APPL1, représentant les endosomes précoces, mais aussi sur des vésicules positives pour Rab7, représentant les endosomes tardifs. D'autre part, j'ai également montré que pERK1/2 colocalise partiellement avec les vésicules contenant Rab7 et PLD1-GFP. J'ai confirmé cette localisation par fractionnement subcellulaire sur un gradient d'OptiPrep, qui m'a permis de montrer que la PLD1 endogène est enrichie dans la fraction contenant le récepteur au BDNF (TrkB), APPL1, Rab5, RSK2, p-ERK1/2 et PEA15, après 15 min de stimulation au BDNF. De même, dans les cellules PC12 traitées au NGF, j'ai observé une colocalisation au niveau des structures vésiculaires entre PLD1-GFP, Rab7 et phospho-ERK1/2. J'ai également pu observer une colocalisation entre PLD1-GFP et phospho-ERK1/2 à la périphérie cellulaire. L'ensemble de ces résultats suggère ainsi que la PLD1 pourrait réguler l'activation d'ERK1/2 à la membrane plasmique comme établi précédemment (Hu et al., 2000), mais aussi au niveau des endosomes. Ceci se fait probablement via la production de PA à la membrane plasmique et/ou au niveau des endosomes qui pourrait permettre de recruter la protéine Raf, favorisant ainsi l'activation d'ERK1/2. En accord avec ce modèle, Rizzo et al., (2000) ont montré que l'insuline induit la production du PA au niveau des endosomes précoces et que ce PA est essentiel pour le recrutement de Raf à la membrane endosomale et à l'induction de la voie MAPK dans des fibroblastes de rat.

Mes données suggèrent donc un rôle important de la PLD1 dans la modulation de la signalisation cellulaire induite par le BDNF/TrKB et plus particulièrement dans l'activation des voies ERK1/2-RSK2-CREB et mTOR/p70-S6K. Ces voies sont connues pour être des voies majeurs de régulation de la morphologie neuronale ainsi que de la plasticité neuronale (Jaworski et al., 2005, Kumar et al., 2005, Ha and Redmond, 2008). En effet, Ha et al (2008) ont montré que les neurones corticaux de

rat en culture (4 DIV), qui ont une activité maintenue d'ERK1/2, présentent une arborisation dendritique plus complexe que ceux qui n'ont pas ce maintien de l'activation d'ERK1/2. Ils ont montré également que le maintien de l'activité d'ERK1/2 induit l'activation et le maintien de l'activité des protéines RSK, CREB et c-Fos, induisant ainsi la ramification et la complexité dendritique en réponse à une activité neuronale. Une autre étude a également montré que l'inhibition d'ERK1/2 réduit la formation des nouvelles épines dendritiques des neurones corticaux induite par le BDNF (Alonso et al., 2004). Il est intéressant de souligner que Ras régule le branchement dendritique (Alpar et al., 2003), et active la GTPase Ral via l'activation de Ral-GSD ou *Ral-guanine nucleotide dissociation stimulator* (Jiang et al, 1995). Par ailleurs, Ral régule le branchement dendritique en partie via la PLD1 (Lalli and Hall, 2005).

Pour finir, Jaworski et al (2005) ont montré également que le traitement chronique des neurones d'hippocampe en culture avec la rapamycine ou l'extinction de mTOR réduisent le branchement dendritique. En effet, ces traitements n'affectent pas le nombre des dendrites primaires induit par le BDNF mais la complexité de l'arborisation dendritique (dendrites secondaire) (Jaworski et al., 2005, Kumar et al., 2005). Il est intéressant de noter qu'en l'absence de PLD1, j'ai observé le même effet sur le développement de neurones corticaux en culture (Ammar et al., 2013a). Etant donné que le PA produit par la PLD peut entrer en compétition avec la rapamycin pour l'activation de mTOR (Foster, 2007), ces résultats semblent valider un modèle dans lequel l'activation des neurones par les neurotrophines est intégrée dans la voie de contrôle de nutrition cellulaire impliquant mTOR par le biais de la PLD1. IL est intéressant de souligner ici qu'une étude récente vient de montrer qu'une altération de la voie de signalisation PLD-mTOR pouvait conduire à la dépression (Feng and Huang, 2013).

En conclusion, mes travaux suggèrent un rôle important de la PLD1 dans la régulation de la morphologie, de la signalisation cellulaire et de la plasticité neuronale en plus de son rôle potentiel dans la neurotransmission. Ces effets semblent faire intervenir l'activation de plusieurs voies de signalisation et mobiliser les capacités de lipide fusogénique joué par le PA dans différent processus de fusion membranaire.

DISCUSSION

DISCUSSION GENERALE

La croissance neuritique est un mécanisme complexe qui est un sujet de recherche crucial et prometteur pour comprendre les mécanismes intracellulaires mis en œuvre dans l'établissement du réseau cérébral, mais aussi dans les pathologies neurodégénératives qui représentent un enjeu sociétal majeur pour les décennies à venir. Les données actuelles ont permis de mettre en évidence l'implication de trois mécanismes principaux dans la croissance neuritique : i) la dynamique du cytosquelette, ii) le trafic intracellulaire et l'apport membranaire au niveau du cône de croissance et iii) la signalisation cellulaire, principalement via la voie MAPK-ERK1/2, qui abouti à la régulation de la transcription.

La voie MAPK-ERK1/2 transmet l'effet des neurotrophines (BDNF) sur la plasticité synaptique, la signalisation nucléaire et la formation de la mémoire (Blanquet, 2000, Lodovichi et al., 2000, Pizzorusso et al., 2000, Finsterwald et al., 2010, Finsterwald and Martin, 2011). Cette voie assure la transmission du signal induit par des récepteurs à la membrane plasmique vers des effecteurs cytoplasmique et nucléaire. Elle est composée des trois protéines kinase principales : Raf, MEK et ERK1/2. Après activation, la kinase ERK1/2 et ses cibles immédiates RSK1-4 transloquent dans le noyau pour induire l'activité transcriptionnelle via la phosphorylation de facteurs de transcription tels que CREB. Ainsi CREB joue également un rôle déterminant dans le développement dendritique induit par l'activité neuronale (Finkbeiner et al., 1997, Redmond and Ghosh, 2005).

Les dendrites sont les premiers sites de réception de l'information neuronale envoyée par plusieurs entrées ou *inputs* synaptiques. Le développement dendritique joue un rôle primordial dans la formation du circuit neuronal (Whitford et al., 2002). Un défaut du développement dendritique est souvent associé avec plusieurs formes du retard mental, telles que le syndrome du Down et le syndrome X fragile (O'Donnell and Warren, 2002, Benavides-Piccione et al., 2004). Le développement de l'arbre dendritique est caractérisé par une extension et/ou une rétraction des branches dendritiques, suivie par une stabilisation de ces branches (Cline, 2001). Ce processus est régulé à la fois par un programme génétique intrinsèque et par un signal externe comme l'activité neuronale, mais aussi par les molécules de guidage

et les facteurs de la croissance (McAllister, 2000, Whitford et al., 2002, Miller and Kaplan, 2003).

De nombreux régulateurs intracellulaires de la PLD1 ont été identifiés dans des contextes cellulaires différents. Par exemple notre équipe a démontré que l'activité de la PLD1 est régulée au cours de l'exocytose régulé dans les cellules neuroendocrines par : i) Arf6 et son effecteur ARNO (Begle et al., 2009), ii) Ral A via une action en synergie avec Arf6 (Vitale et al., 2005), lii) Rac1 et son régulateur β PIX (Momboisse et al., 2009) et iv) par la protéine RSK2 (Zenou-Meyer et al., 2008). D'autre part, il a été démontré que l'activité de la PLD1 est régulée par d'autres protéines de la famille des GTPase Rho, telles que RhoA, Cdc42 dans d'autres contextes cellulaires. Les différentes régulations de l'activité de PLD1 par les GTPases semblent être dépendantes de l'interaction, en d'autre terme il s'agit de régulation allostérique. Par ailleurs, il a été démontré que l'interaction entre ces GTPases et la PLD1 pouvait jouer un rôle important dans le développement neuronal et la croissance neuritique (Lalli and Hall, 2005, Yoon et al., 2006, Zhu et al., 2012), même si le(s) mécanisme(s) impliqué(s) est/sont encore inconnu(s).

Il est aussi important de souligner que la PLD1 pourrait moduler en retour plusieurs de ces régulateurs via le PA puisque certains d'entre eux sont recrutés par le PA, où voient leur activité directement dépendante du PA. En effet, il a été démontré que le PA augmente l'affinité de la PI4P5-kinase envers son substrat le PI4P pour produire le PIP2, qui est lui même un régulateur de la PLD1 (Honda et al., 1999). D'autre part, il a été démontré que le PA pourrait également lier RhoG, Rac2 et Cdc42 (Faugaret et al., 2011). Le modèle actuel propose que le PA permet de recruter les partenaires de la PLD1 du cytosol aux membranes (Jang et al., 2012). De plus, il semble que le PA module également directement la fonction de la PLD1, puisque il a été montré que le domaine PX de la PLD1 contient un domaine de liaison au PA (Stahelin et al., 2004) et que cette interaction semble moduler la fonction du domaine PH de la PLD1 (Sugars et al., 2002, Lee et al., 2009). Ainsi, ces données suggèrent, d'une part une régulation complexe de l'activité de PLD1 et d'autre part une diversité des rôles cellulaires impliquant la PLD1.

Durant ma thèse, je me suis intéressé à examiner le rôle de la PLD1 dans le développement neuronal et la croissance neuritique. Pour ceci, j'ai utilisé un modèle murin déficient en PLD1 nouvellement créé, ainsi que des cellules PC12, modèle d'étude neuronale reconnu pour de la croissance neuritique.

Les résultats obtenus confirment d'une part, l'implication de la PLD1 dans la croissance neuritique, le développement de l'arborisation dendritique et la maturation des épines dendritiques et d'autre part, ils montrent i) le rôle de PLD1 dans la régulation de l'exocytose des vésicules Ti-VAMP/VAMP7 au cours de la croissance neuritique en collaboration avec la protéine kinase RSK2 et ii) son rôle dans la régulation et le maintien de la signalisation endosomale de la voie ERK1/2-RSK2-CREB induite par les neurotrophines, ainsi que la régulation de la voie mTOR/p70-S6K.

I. Rôle de la PLD1 dans la croissance neuritique : Implication de la kinase RSK2 dans la régulation de la PLD1 au cours de l'exocytose des vésicules Ti-VAMP

Au cours de cette étude, j'ai pu montrer qu'en absence de PLD1 les neurones corticaux en culture ont un retard du développement par rapport aux neurones *Pld1*^{+/+}. D'autre part, j'ai trouvé qu'en absence de RSK2 les neurones corticaux en culture ont aussi un retard de développement très semblable à celui observé chez les neurones *Pld1*^{-/-}. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques contre ces deux classes de protéine ou l'extinction de l'expression de PLD1 ou de RSK2 ont confirmé l'implication de ces deux protéines dans la croissance neuritique induite par le NGF sur des cellules PC12 en culture. Le NGF induit une stimulation rapide de la voie MAPK-ERK1/2, ainsi que la phosphorylation et l'activation de RSK2, suivie par une phosphorylation, dépendante de RSK2, de PLD1 sur sa thréonine 147 qui abouti à une augmentation de l'activité PLD. D'autre part, la stimulation des cellules PC12 par le NGF induit une redistribution périphérique significative de PLD1 et RSK2 et une colocalisation significative des deux protéines à cet endroit. Ceci conduit à une stimulation de l'activité PLD1 et *in fine* à une augmentation du niveau de PA à la membrane plasmique. Dans les neurones ou les cellules PC12, la PLD1 est principalement localisée sur des structures vésiculaires au niveau périnucléaire et également au niveau des prolongements neuritiques. D'une manière intéressante,

j'ai trouvé que la PLD1-GFP associée à ces structures vésiculaires est transportée vers le cône de croissance des cellules PC12 traitées au NGF, mais subit également un transport rétrograde, du cône vers le corps cellulaire. Ceci suggère une implication potentielle de la PLD1 dans le trafic vésiculaire au cours de la croissance neuritique. Or à ce jour, deux types des vésicules impliquées dans l'apport membranaire au niveau du cône de croissance ont été décrites. Il s'agit des vésicules positives pour Ti-VAMP/VAMP7 et des vésicules positives pour VAMP4 ou enlargeosomes. J'ai trouvé que PLD1-GFP colocalise fortement avec Ti-VAMP au niveau périnucléaire, dans les prolongements et aussi à l'extrémité distale des neurites en croissance. Pour finir, en utilisant une construction VAMP-7 couplé à la pHfluorin et un microscope à onde évanescente, j'ai montré que des inhibiteurs pharmacologiques de RSK2 et PLD1 contrôlent la fusion des vésicules Ti-VAMP avec la membrane plasmique au cours de la croissance neuritique induite par le NGF.

1. Implication de PLD1 dans la croissance neuritique

Le groupe du Dr Kanaho a montré que le NGF induit une augmentation de l'expression de la PLD1 au cours de la différenciation/croissance neuritique des cellules PC12, ainsi que l'augmentation de son activité (Kanaho et al., 2009). De même, Zhu et al., (2012) ont montré que l'expression et l'activité de PLD1 sont fortes au cours de la première semaine du développement des neurones d'hippocampe en culture.

Des études antérieures ont suggéré deux rôles potentiels de la PLD1 dans la croissance neuritique. En effet, il a été démontré que la surexpression de PLD1-GFP dans des neurones d'hippocampe augmente la sécrétion de la serine protéase tPA (*Tissue plasminogen activator*), induite par la forskoline ou l'ionophore calcique A23187. Ceci conduit également à augmenter la longueur des neurites (Zhang et al., 2005). Ces auteurs ont proposé que la PLD1 stimule la croissance neuritique en favorisant la libération de tPA. D'autre part, Cai et al (2006) ont montré que la surexpression de PLD1 restaure la croissance et le branchement neuritique en absence de la préséniline-1, via un mécanisme dépendant du trafic des vésicules contenant la préséniline-1. Il a également été suggéré que la PLD1 régule la

croissance neuritique via la régulation de l'expression de certains gènes tels que Bcl-2 et le NT3 (Choi et al., 2012, Yoon et al., 2012). Ceci suggère un autre rôle de la PLD1 dans la régulation de la croissance neuritique. Ainsi il est possible qu'en plus de son implication dans le contrôle du trafic membranaire, la PLD1 puisse également être impliquée dans la régulation de la signalisation cellulaire et la transcription. En effet, il a été démontré dans d'autres fonctions cellulaires que la PLD1 régule les voies MAPK (Raf-ERK1/2) et la voie mTOR, dont leur rôle crucial dans le développement neuronal la croissance neuritique sont connus.

2. Implication de RSK2 dans la croissance neuritique

A ce jour une seule étude a examinée l'implication de RSK2 dans la croissance neuritique des cellules PC12 stimulées par le NGF. En effet, Silverman et al., (2004) ont montré que la surexpression d'un mutant constitutivement actif de RSK2 n'affecte pas la croissance neuritique et ils suggèrent en revanche un rôle important de RSK1 dans la croissance neuritique. Or dans cette étude, les résultats montrent que l'implication de RSK1 dans la croissance neuritique semble être indépendante du NGF. D'autre part, la surexpression d'un mutant dominant négatif de RSK1 n'affecte pas la croissance neuritique en présence ou en absence de NGF. Un autre point important est que l'utilisation des mutants constitutivement actifs de RSK1 ou RSK2, qui ne peuvent pas lier ERK1/2 ne peuvent pas reproduire fidèlement cette voie d'activation de la croissance neuritique, puisque le NGF induit la croissance neuritique principalement via ERK1/2. On peut donc imaginer que RSK1 puisse être impliqué dans une voie indépendante du NGF, tandis que RSK2 soit lié à cette voie impliquant le NGF (Silverman et al., 2004).

Une autre étude portant sur l'implication de RSK2 dans la croissance axonale de neurones a suggérée que RSK2 régule négativement la croissance axonale des neurones moteurs en culture traités au BDNF et au CNTF (Fischer et al., 2009). En effet, ces auteurs ont montré que les motoneurones *Rsk2*^{-/-} en culture présentent des axones plus longs et plus branchés par rapport aux neurones *Rsk2*^{+/+}. D'autre part, ils ont montré que la surexpression de RSK2-GFP n'affecte pas l'allongement axonale induite par le BDNF/CNTF, tandis que la surexpression d'un mutant constitutivement actif induit une réduction de la longueur axonale. Ces résultats sont

clairement en contradiction avec les nôtres. Ceci pourrait être expliqué, outre la différence de modèle neuronal utilisé, par les conditions de culture. En effet, les auteurs ont utilisé un milieu de culture contenant 10% du sérum, du BDNF et du CNTF. De plus, ils ont cultivé les neurones sur des lamelles recouvertes de laminines. En revanche, j'ai utilisé la ploy-L-Lysine comme substrat d'attachement pour les cellules et le milieu de culture ne contenait pas de sérum (dont les neurotrophines qu'il contient pourraient moduler plusieurs mécanismes intracellulaires et affectant ainsi la croissance neuritique sans que l'on puisse estimer ces effets). Enfin, il a été démontré que les laminines favorisent la croissance neuritique plus que la poly-L-Lysine (Rangappa et al., 2000).

Pour finir une autre étude récente semble valider nos observations puisque (Dugani et al., 2010) ont montré que l'extinction de RSK2 induit un arrêt de la différenciation de cellules neuronales précurseur en neurones dans le cortex cérébral, en accord avec le concept d'une implication de RSK2 dans le développement neuronal.

3. Régulation de l'activité de PLD1 par RSK2 au cours de la croissance neuritique

L'implication de la PLD1 dans la fusion membranaire a été mise en avant par plusieurs groupes et dans différents modèles cellulaires (Voir l'introduction). Notre équipe a montré que la stimulation de l'exocytose régulée requiert l'activation de PLD1 par une phosphorylation dépendante de RSK2. Ce mécanisme semble contrôler l'étape finale de la fusion membranaire (Zeniou-Meyer et al., 2008). D'autre part, Zeniou-Meyer et al., (2007) ont montré une production de PA produit par la PLD1 au niveau de la membrane plasmique à proximité de structures granulaires apparemment arrimée ou *docked*.

Pour ma part, j'ai montré au cours de ma thèse que le NGF induit la phosphorylation/activation de PLD1 et la production de PA d'une manière dépendante de RSK2, et que ce mécanisme semble contrôler la fusion des vésicules Ti-VAMP nécessaire à l'expansion membranaire et la croissance neuritique, en accord avec le rôle critique de Ti-VAMP dans ce processus (Martinez-Arca et al., 2000, Martinez-Arca et al., 2001).

Le point qui reste le plus obscur est le mécanisme par lequel le PA joue ses différentes fonctions. Toutefois, il a été proposé que le PA puisse moduler la fusion membranaire via deux mécanismes distincts mais pas forcément complètement indépendant. Ainsi le PA pourrait modifier localement la topologie membranaire par l'induction d'une courbure négative au niveau des sites de fusion. Le PA pourrait également promouvoir le recrutement de protéines impliquées dans l'exocytose telles que la syntaxine-1 ou la PI4P5K (Ammar et al., 2013b). Ayant observé que la surexpression d'une sonde du PA Spo20-GFP inhibe la croissance neuritique des cellules PC12 stimulées par le NGF, il est probable que cette sonde masque le site de liaison au PA pour ses partenaires, inhibant ainsi l'interaction avec le PA et le recrutement de ses partenaires potentiels. Parmi ces derniers, je voudrais citer en particulier Ti-VAMP. En effet, les travaux du groupe du Dr Galli indiquent que le domaine *Longin* de Ti-VAMP lie le PA *in vitro*. Comme ce domaine *Longin* inhibe l'activité de Ti-VAMP (Martinez-Arca et al., 2000, Martinez-Arca et al., 2001), on peut imaginer que le PA produit par la PLD1 pourrait induire un changement conformationnel de ce domaine et ainsi promouvoir l'activation de Ti-VAMP. D'autre part, Alberts et al., (2006) ont montré que l'exocytose des vésicules Ti-VAMP est contrôlé par la GTPase Cdc42 qui elle même semble être recruté aux membranes par le PA (Alberts et al., 2006, Faugaret et al., 2011).

II. Régulation du développement de l'arborisation dendritique et la maturation des épines dendritique par PLD1

1. Rôle de PLD1 dans la régulation des voies ERK1/2-RSK2-CREB et mTOR/p70S6K

Les résultats obtenus confirment l'implication de PLD1 dans l'activation de mTOR et d'ERK1/2. En effet, j'ai montré que l'activation de la voie MAPK (ERK1/2-RSK2-CREB) par le BDNF est régulée par la PLD1 dans les neurones corticaux en culture. D'autre part, PLD1 régule aussi l'activation de mTOR-p70-S6K induite par le BDNF. De même, PLD1 régule l'activation de la voie ERK1/2-RSK2-CREB en réponse au NGF dans les cellules PC12. Ainsi, l'implication de la PLD1 semble être médiée à deux niveaux : i) à la membrane plasmique, où la PLD1-GFP colocalise avec phospho-ERK1/2 et ii) également au niveau de la membrane endosomale. Ces

résultats suggèrent que PLD1 assure le maintien de l'activité de la voie ERK1/2-RSK2-CREB au cours du temps induite par une neurotrophine (BDNF ou NGF). De même, ces données suggèrent un rôle de PLD1 dans la régulation de la transcription induite par les neurotrophines. J'ai également montré que le BDNF induit la formation d'un complexe multiprotéique contenant PEA15-ERK1/2-RSK2-PLD1, où PEA15 semble jouer le rôle d'une matrice pour former le complexe. D'autre part, il semble exister une boucle d'autorégulation au niveau de cette voie. En effet, la neurotrophine induit une augmentation de la phosphorylation/activation de PLD1 dépendante de RSK2 au cours du temps, alors que la PLD1 semble elle-même réguler la phosphorylation/activation de RSK2.

2. Rôle de PLD1 dans la régulation développement de l'arborisation dendritique

La dérégulation des voies ERK1/2-RSK2-CREB et mTOR/p70-S6K dans les neurones corticaux *Pld1*^{-/-} pourrait expliquer la réduction de la complexité de l'arborisation dendritique observée chez ces neurones. En accord avec cette hypothèse, il a été démontré que la signalisation BDNF/TrKB-ERK1/2 module la complexité dendritique des neurones corticaux (McAllister, 2000, Alonso et al., 2004). D'autre part, plusieurs études ont montré que mTOR joue un rôle important dans le développement de l'arborisation dendritique (Jaworski et al., 2005, Kumar et al., 2005, Jossin and Goffinet, 2007). Dans les cellules eucaryotes, mTOR forme deux complexes fonctionnels différents: mTORC1 et mTORC2 ou *mTOR complex* (Kim et al., 2002, Sarbassov et al., 2004). Ces deux complexes jouent également un rôle important dans le développement de l'arborisation dendritique (Urbanska et al., 2012) ; et il faut souligner que la PLD1 régule l'activité du complexe mTORC1 (Yoon et al., 2011).

A l'échelle transcriptionnelle, il a été démontré que la voie BDNF/TrKB-ERK1/2-CREB joue un rôle déterminant dans l'expression de certains gènes impliqués dans l'activité neuronale, tels que le gène codant la sous unité NR1 du récepteur NMDA (Kim et al., 2012) ou celui codant la sous unité α du récepteur GABA (Lund et al., 2008). D'ailleurs, il a été démontré que PLD1 régule l'expression de NT3 ou *neurotrophin-3* (Choi et al., 2012) et de Bcl-2 (Yoon et al., 2012) au cours de la différenciation cellulaire et de la croissance neuritique induite par le bFGF. De même,

la PLD1 régule l'expression de la synapsine-1 au cours du développement neuronal (Yoon et al., 2005).

D'autre part, PLD1 pourrait réguler le développement dendritique via ses régulateurs classiques comme cela a été démontré dans le cas de Ral et RhoA. En effet, Lalli et al., (2005) ont montré que Ral augmente la ramification de l'arborisation dendritique des neurones corticaux en culture via un mécanisme qui dépend de la PLD1 et du complexe exocyste. En revanche, les travaux de Zhu et al., (2012) semblent indiquer que la PLD1 inhibe la ramification dendritique primaire et secondaire des neurones d'hippocampe en culture. En effet, ils ont montré que l'extinction de la PLD1 augmente la ramification dendritique et que la surexpression de la PLD1 inhibe ce phénomène, via un mécanisme dépendant de RhoA. Ces résultats sont en contradiction avec les nôtres. Ceci pourrait être expliqué en partie, outre la différence de modèle neuronal utilisé, par la surexpression de la PLD1 qui engendre une augmentation de PA et qui pourrait donc moduler l'activité d'autres protéines telles que RhoG (Faugaret et al., 2011), dont l'implication négative dans le branchement dendritique a été établie (Franke et al., 2012).

3. Rôle de PLD1 dans la maturation des épines dendritique

En absence de PLD1, j'ai observé une réduction de la densité des épines dendritique, principalement une réduction des épines matures, particulièrement des épines *mushroom* et *branched*. Comme je l'ai détaillé dans l'introduction, la formation des épines dendritiques dépend fortement de l'élément présynaptique ou filopode axonal. Donc le retard de la croissance axonale observé chez les neurones *Pld1*^{-/-} en culture pourrait expliquer le défaut de maturation des épines. Il se peut également qu'il y ait tout simplement moins des contacts entre les filopodes axonaux et dendritiques dans la condition *Pld1*^{-/-}. D'autre part, nous pouvons suggérer que ce défaut résulte d'une dérégulation de la signalisation des GTPases Rho. D'une manière intéressante, le défaut des épines dendritiques observé chez les neurones *Ophn1*^{-/-} en culture est à l'inverse de ce que nous observons, avec une augmentation de la densité des épines ainsi que du nombre des épines *mushroom* (Govek et al., 2004, Khelifaoui et al., 2007). D'autre part, il a été démontré que le PA, produit en partie par PLD1, régule la localisation membranaire de neurogranine au

niveau des épines (Dominguez-Gonzalez et al., 2007). Ceci montre un rôle potentiel de PA dans la maturation et la stabilisation des épines dendritiques.

III. Un lien potentiel entre PLD1 et ERK1/2 lors l'arrimage vésiculaire et l'exocytose

D'une manière intéressante, il a été également démontré que le BDNF augmente le nombre des vésicules arrimées ou *docking* à la membrane synaptique et augmente la fréquence des réponses postsynaptique excitatrice miniatures ou spontanées ou mEPSC (Tyler and Pozzo-Miller, 2001). Jovanovic et al., (2000) ont aussi montré que le BDNF contrôle la libération des neurotransmetteurs via un mécanisme dépendant de la phosphorylation de synapsine-1 par ERK1/2 (Jovanovic et al., 2000). De même, Ren et al., (2012) ont montré que la sous unité Exo70 est phosphorylée par ERK1/2 et que cette phosphorylation stimule l'interaction entre Exo70, Sec8 et Exo84 et ainsi l'assemblage du complexe. Ce complexe semble jouer un rôle majeur dans les premières étapes d'arrimage des vésicules à leur site de fusion. En effet, le complexe exocyste, formé par les sous unités Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84, est impliqué dans le *tethering* des vésicules d'exocytose à la membrane plasmique (Ren and Guo, 2012). Donc il semble qu'ERK1/2 en régulant la formation du complexe exocyste puisse aussi agir sur l'exocytose.

En accord avec ce modèle, les résultats d'une étude ultra-structurale sur des coupes des surrénales montrent une réduction significative des vésicules morphologiquement arrimées à la membrane plasmique en absence de la PLD1 (Figure 46).

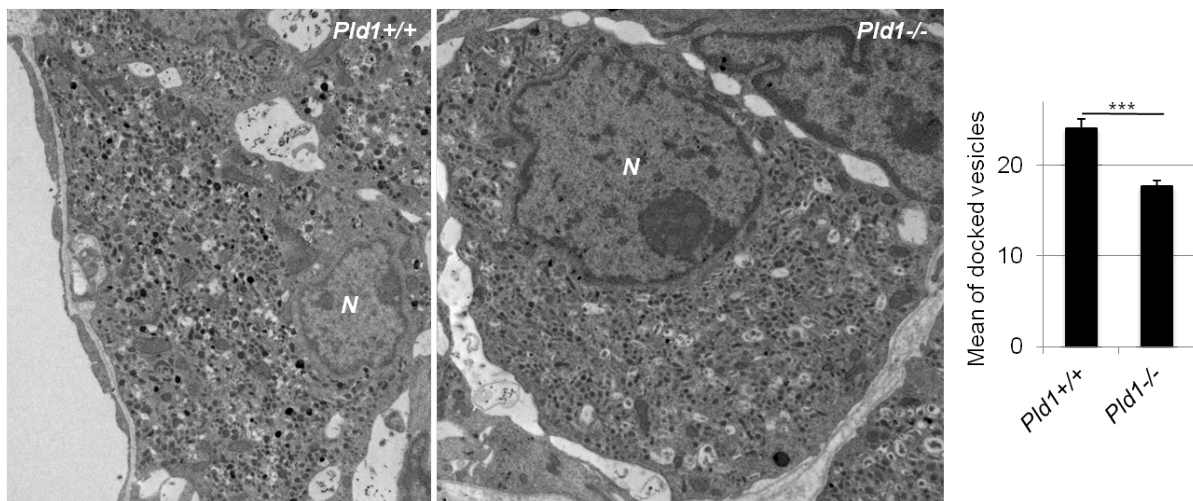


Figure 46: Réduction de nombre des vésicules arrimées à la membrane plasmique en absence de PLD1.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus durant ma thèse confirme l'implication de la PLD1 dans le développement neuronal et la croissance neuritique. En effet, j'ai montré que la PLD1 est impliquée dans deux mécanismes importants du développement neuronal en réponse aux neurotrophines, i) dans l'exocytose des vésicules positives pour Ti-VAMP/VAMP7 au cours de la croissance neuritique (Figure 47, A). Une étape qui semble être sous le contrôle de la kinase RSK2, et ii) dans le maintien de la signalisation endosomale de la voie MAPK-ERK1/2-RSK2 et la phosphorylation de CREB nucléaire (Figure 47, B). D'autre part, j'ai également montré que la PLD1 régule l'activation de mTOR/p70S6K en réponse au BDNF.

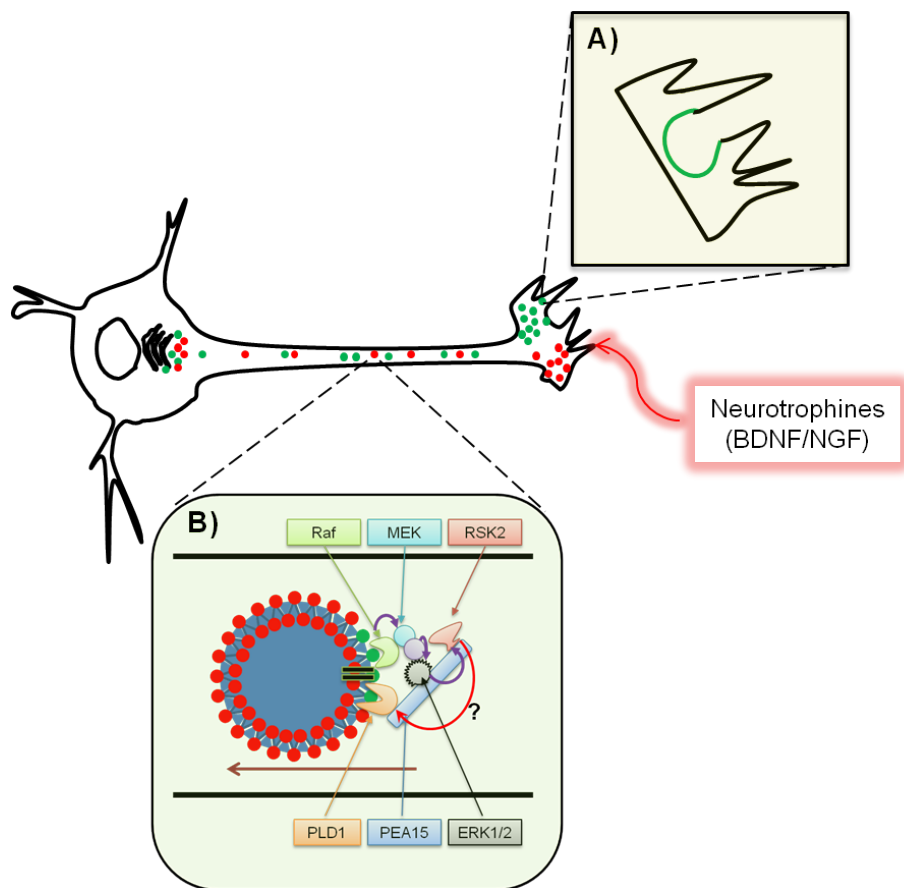


Figure 47: Modèle de l'implication de la PLD1 dans le développement neuronal.

En effet, en intégrant mes résultats aux données bibliographiques antérieurs, la PLD1 et son produit l'acide phosphatidique semblent être au centre des voies majeurs impliquées dans le développement neuronal (Figure 48).

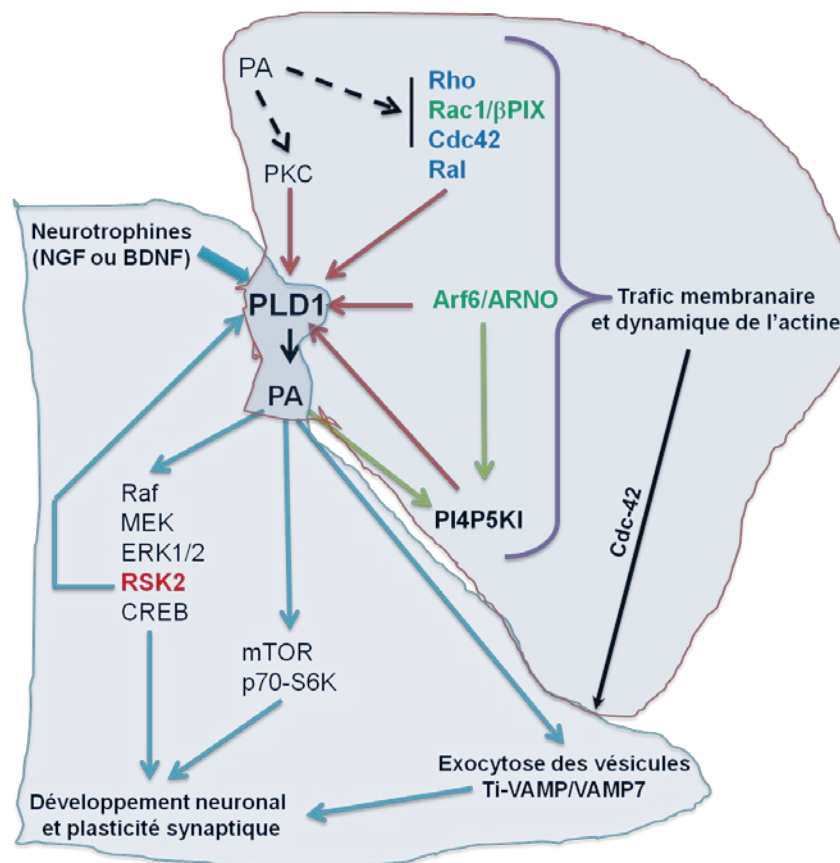


Figure 48: PLD1, un centre organisateur des voies impliquées dans le développement neuronal.

En effet, certains régulateurs intracellulaires de la PLD1 tels que RhoA, Rac-1, Cdc42, RalA/B, ARF6/ARNO et PI4P5KI/PIP2 semblent contribuer de manière importante à la croissance neuritique et au développement neuronal. Ces régulateurs sont impliqués à la fois dans la régulation de la dynamique du cytosquelette et dans la régulation du trafic membranaire, deux mécanismes cruciaux pour la croissance neuritique. De plus, le PA produit par la PLD1 pourrait à son tour moduler les fonctions de ses régulateurs, tels que PI4P5K, RhoG, Rac2 et Cdc42 ; suggérant ainsi la possibilité de multiples boucles de régulation. La régulation des voies MAPK-ERK1/2 et mTOR/p70S6K représente un deuxième mode de régulation important par lequel la PLD1 module le développement neuronal.

Pour confirmer le lien entre la dérégulation des voies MAPK-ERK1/2 et mTOR/p70S6K et la réduction de la ramification de l'arborisation dendritique et la formation/maturation des épines dendritique en absence de la PLD1, il est important

d'examiner plus en détail ces deux processus dans les neurones *Pld1*^{-/-} en réponse à un traitement par le BDNF et d'identifier les voies moléculaires impliquées.

De même, il sera intéressant d'examiner l'effet de la surexpression de la PLD1 sur la signalisation MAPK-ERK1/2 dans les neurones *Rsk2*^{-/-}, afin de déterminer l'existence d'un lien entre RSK2 et PLD1 dans l'activation de la voie MAPK. D'autre part, il serait probablement judicieux d'examiner l'implication de la PLD1 dans la régulation transcriptionnelle induite par les neurotrophines. D'ailleurs, il est intéressant de noter que l'expression de BDNF est sous le contrôle d'ERK1/2 et CREB (Morioka et al., 2013).

Ainsi, mes résultats suggèrent une implication potentielle de la PLD1 dans l'activité neuronale et la plasticité synaptique. Afin de confirmer cette implication, il est à présent important d'examiner ces paramètres *in vivo*, soit par électrophysiologie ou en comportement pour étudier l'implication de la PLD1 dans certaines formes de mémorisation ou apprentissage et de l'étiologie (anxiété, dépression, stress et troubles du comportement).

Il sera également intéressant de vérifier l'implication de la PLD1 dans la migration neuronale, étant donné que la PLD1 est impliquée dans la migration cellulaire (Chen et al., 2012b). Ces auteurs ont aussi montré une réduction de l'adhésion dépendante des intégrines en absence de la PLD1, donc il est intéressant d'exporter ce modèle sur les neurones pour tester l'effet de l'absence de la PLD1 sur la croissance neuritique neuronale, étant donné que Ti-VAMP est elle aussi impliquée dans ce mécanisme (Gupton and Gertler, 2010).

BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Achiriloaie M, Barylko B, Albanesi JP (Essential role of the dynamin pleckstrin homology domain in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol* 19:1410-1415.1999).
- Alberts P, Rudge R, Irinopoulou T, Danglot L, Gauthier-Rouviere C, Galli T (Cdc42 and actin control polarized expression of TI-VAMP vesicles to neuronal growth cones and their fusion with the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 17:1194-1203.2006).
- Allersma MW, Wang L, Axelrod D, Holz RW (Visualization of regulated exocytosis with a granule-membrane probe using total internal reflection microscopy. *Mol Biol Cell* 15:4658-4668.2004).
- Alonso M, Medina JH, Pozzo-Miller L (ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem* 11:172-178.2004).
- Alonso M, Vianna MR, Izquierdo I, Medina JH (Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol* 22:663-674.2002).
- An SJ, Grabner CP, Zenisek D (Real-time visualization of complexin during single exocytic events. *Nature neuroscience* 13:577-583.2010).
- Andresen BT, Rizzo MA, Shome K, Romero G (The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Lett* 531:65-68.2002).
- Antonescu CN, Aguet F, Danuser G, Schmid SL (Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Mol Biol Cell* 22:2588-2600.2011).
- Antonescu CN, Danuser G, Schmid SL (Phosphatidic acid plays a regulatory role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 21:2944-2952.2010).
- Arantes RM, Andrews NW (A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:4630-4637.2006).
- Arikkath J, Reichardt LF (Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 31:487-494.2008).
- Ascano M, Bodmer D, Kuruvilla R (Endocytic trafficking of neurotrophins in neural development. *Trends Cell Biol* 22:266-273.2012).

B

- Bader MF, Vitale N (Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1791:936-941.2009).
- Balaratnasingam C, Morgan WH, Bass L, Kang M, Cringle SJ, Yu DY (Axotomy-induced cytoskeleton changes in unmyelinated mammalian central nervous system axons. *Neuroscience* 177:269-282.2011).
- Barg S, Machado JD (Compensatory endocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192:195-201.2008).

- Beattie EC, Howe CL, Wilde A, Brodsky FM, Mobley WC (NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J Neurosci* 20:7325-7333.2000).
- Begle A, Tryoen-Toth P, de Barry J, Bader MF, Vitale N (ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* 284:4836-4845.2009).
- Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yanez I, de Lagran MM, Elston G, Estivill X, Fillat C, Defelipe J, Dierssen M (On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Prog Neurobiol* 74:111-126.2004).
- Bjorbaek C, Zhao Y, Moller DE (Divergent functional roles for p90rsk kinase domains. *J Biol Chem* 270:18848-18852.1995).
- Blanquet PR (Identification of two persistently activated neurotrophin-regulated pathways in rat hippocampus. *Neuroscience* 95:705-719.2000).
- Bohdanowicz M, Schlam D, Hermansson M, Rizzuti D, Fairn GD, Ueyama T, Somerharju P, Du G, Grinstein S (Phosphatidic acid is required for the constitutive ruffling and macropinocytosis of phagocytes. *Mol Biol Cell* 24:1700-1712.2013).
- Bouquier N, Fromont S, Zeeh JC, Auziol C, Larrousse P, Robert B, Zeghouf M, Cherfils J, Debant A, Schmidt S (Aptamer-derived peptides as potent inhibitors of the oncogenic RhoGEF Tgat. *Chem Biol* 16:391-400.2009).
- Bourne JN, Harris KM (Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31:47-67.2008).
- Bray D, Chapman K (Analysis of microspike movements on the neuronal growth cone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 5:3204-3213.1985).
- Brocker C, Engelbrecht-Vandre S, Ungermann C (Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Current biology : CB* 20:R943-952.2010).
- Brown FD, Thompson N, Saqib KM, Clark JM, Powner D, Thompson NT, Solari R, Wakelam MJ (Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. *Curr Biol* 8:835-838.1998).
- Bunge MB (Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture. *The Journal of cell biology* 56:713-735.1973).
- Burnette DT, Ji L, Schaefer AW, Medeiros NA, Danuser G, Forscher P (Myosin II activity facilitates microtubule bundling in the neuronal growth cone neck. *Developmental cell* 15:163-169.2008).

C

- Cai D, Zhong M, Wang R, Netzer WJ, Shields D, Zheng H, Sisodia SS, Foster DA, Gorelick FS, Xu H, Greengard P (Phospholipase D1 corrects impaired betaAPP trafficking and neurite outgrowth in familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutant neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1936-1940.2006).
- Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S (Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental cell* 12:671-682.2007).
- Cai S, Exton JH (Determination of interaction sites of phospholipase D1 for RhoA. *Biochem J* 355:779-785.2001).

- Carlier MF (Guanosine-5'-triphosphate hydrolysis and tubulin polymerization. Review article. *Molecular and cellular biochemistry* 47:97-113.1982).
- Cazzolli R, Shemon AN, Fang MQ, Hughes WE (Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. *IUBMB Life* 58:457-461.2006).
- Chae YC, Lee S, Lee HY, Heo K, Kim JH, Suh PG, Ryu SH (Inhibition of muscarinic receptor-linked phospholipase D activation by association with tubulin. *J Biol Chem* 280:3723-3730.2005).
- Chan CE, Odde DJ (Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* (New York, NY) 322:1687-1691.2008).
- Chang LC, Huang TH, Chang CS, Tsai YR, Lin RH, Lee PW, Hsu MF, Huang LJ, Wang JP (Signaling mechanisms of inhibition of phospholipase D activation by CHS-111 in formyl peptide-stimulated neutrophils. *Biochem Pharmacol* 81:269-278.2011).
- Chao MV (Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299-309.2003).
- Chen A, Leikina E, Melikov K, Podbilewicz B, Kozlov MM, Chernomordik LV (Fusion-pore expansion during syncytium formation is restricted by an actin network. *J Cell Sci* 121:3619-3628.2008).
- Chen JY, Lin JR, Cimprich KA, Meyer T (A two-dimensional ERK-AKT signaling code for an NGF-triggered cell-fate decision. *Mol Cell* 45:196-209.2012).
- Chen Q, Hongu T, Sato T, Zhang Y, Ali W, Cavallo JA, van der Velden A, Tian H, Di Paolo G, Nieswandt B, Kanaho Y, Frohman MA (Key roles for the lipid signaling enzyme phospholipase d1 in the tumor microenvironment during tumor angiogenesis and metastasis. *Sci Signal* 5:ra79.2012).
- Chen YG, Siddhanta A, Austin CD, Hammond SM, Sung TC, Frohman MA, Morris AJ, Shields D (Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *The Journal of cell biology* 138:495-504.1997).
- Cherfils J, Zeghouf M (Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* 93:269-309.2013).
- Chernomordik LV, Kozlov MM (Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* 72:175-207.2003).
- Chernomordik LV, Leikina E, Frolov V, Bronk P, Zimmerberg J (An early stage of membrane fusion mediated by the low pH conformation of influenza hemagglutinin depends upon membrane lipids. *J Cell Biol* 136:81-93.1997).
- Chernyshova Y, Leshchyn'ska I, Hsu SC, Schachner M, Sytnyk V (The neural cell adhesion molecule promotes FGFR-dependent phosphorylation and membrane targeting of the exocyst complex to induce exocytosis in growth cones. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:3522-3535.2011).
- Cho JH, Oh DY, Kim HJ, Park SY, Choi HJ, Kwon SJ, Lee KS, Han JS (The TSP motif in AP180 inhibits phospholipase D1 activity resulting in increased efficacy of anticancer drug via its direct binding to carboxyl terminal of phospholipase D1. *Cancer Lett* 302:144-154.2011).
- Choi HJ, Chang BJ, Han JS (Phospholipase D1 is an important regulator of bFGF-induced neurotrophin-3 expression and neurite outgrowth in H19-7 cells. *Mol Neurobiol* 45:507-519.2012).
- Choi S, Ko J, Lee JR, Lee HW, Kim K, Chung HS, Kim H, Kim E (ARF6 and EFA6A regulate the development and maintenance of dendritic spines. *J Neurosci* 26:4811-4819.2006).

- Choi WS, Chahdi A, Kim YM, Fraundorfer PF, Beaven MA (Regulation of phospholipase D and secretion in mast cells by protein kinase A and other protein kinases. *Ann N Y Acad Sci* 968:198-212.2002).
- Choo QL, Bray D (Two forms of neuronal actin. *Journal of neurochemistry* 31:217-224.1978).
- Chung JK, Sekiya F, Kang HS, Lee C, Han JS, Kim SR, Bae YS, Morris AJ, Rhee SG (Synaptojanin inhibition of phospholipase D activity by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 272:15980-15985.1997).
- Clark CJ, McDade DM, O'Shaughnessy CT, Morris BJ (Contrasting roles of neuronal Msk1 and Rsk2 in Bad phosphorylation and feedback regulation of Erk signalling. *J Neurochem* 102:1024-1034.2007).
- Choi HJ, Chang BJ, Han JS (Phospholipase D1 is an important regulator of bFGF-induced neurotrophin-3 expression and neurite outgrowth in H19-7 cells. *Mol Neurobiol* 45:507-519.2012).
- Cline HT (Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 11:118-126.2001).
- Coffin GS (Postmortem findings in the Coffin-Lowry Syndrome. *Genet Med* 5:187-193.2003).
- Cohen FS, Melikyan GB (The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J Membr Biol* 199:1-14.2004).
- Colley WC, Altshuller YM, Sue-Ling CK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Branch KD, Tsirka SE, Bollag RJ, Bollag WB, Frohman MA (Cloning and expression analysis of murine phospholipase D1. *Biochem J* 326 (Pt 3):745-753.1997).
- Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR, Owen DJ (Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 109:523-535.2002).
- Conner SD, Schmid SL (Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 162:773-779.2003).
- Conricode KM, Brewer KA, Exton JH (Activation of phospholipase D by protein kinase C. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. *J Biol Chem* 267:7199-7202.1992).
- Cooper MW, Smith SJ (A real-time analysis of growth cone-target cell interactions during the formation of stable contacts between hippocampal neurons in culture. *J Neurobiol* 23:814-828.1992).
- Cotrufo T, Perez-Branguli F, Muhaisen A, Ros O, Andres R, Baeriswyl T, Fuschini G, Tarrago T, Pascual M, Urena J, Blasi J, Giralt E, Stoeckli ET, Soriano E (A signaling mechanism coupling netrin-1/deleted in colorectal cancer chemoattraction to SNARE-mediated exocytosis in axonal growth cones. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:14463-14480.2011).
- Craig AM, Banker G (Neuronal polarity. *Annual review of neuroscience* 17:267-310.1994).
- Csepanyi-Komi R, Levay M, Ligeti E (Rho/RacGAPs: embarras de richesse? *Small GTPases* 3:178-182.2012).

D

- D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F, Bienvenu T, Gedeon AK, Oostra B, Wu SK, Tandon A, Valtorta F, Balch WE, Chelly J,

- Toniolo D (Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nature genetics* 19:134-139.1998).
- D'Alessandro R, Racchetti G, Meldolesi J (Outgrowth of neurites is a dual process. *Communicative & integrative biology* 3:576-578.2010).
- Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, Mantei N (Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nature genetics* 17:346-349.1997).
- Dailey ME, Smith SJ (The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16:2983-2994.1996).
- Dall'Armi C, Hurtado-Lorenzo A, Tian H, Morel E, Nezu A, Chan RB, Yu WH, Robinson KS, Yeku O, Small SA, Duff K, Frohman MA, Wenk MR, Yamamoto A, Di Paolo G (The phospholipase D1 pathway modulates macroautophagy. *Nat Commun* 1:142.2010).
- Danzer SC (Postnatal and adult neurogenesis in the development of human disease. *Neuroscientist* 14:446-458.2008).
- Darios F, Davletov B (Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature* 440:813-817.2006).
- Davletov B, Montecucco C (Lipid function at synapses. *Curr Opin Neurobiol* 20:543-549.2010).
- de Wit H (Morphological docking of secretory vesicles. *Histochemistry and cell biology* 134:103-113.2010).
- Del Cerro MP, Snider RS, Oster M (Evolution of the extracellular space in immature nervous tissue. *Experientia* 24:929-930.1968).
- Delaunoy JP, Dubos A, Marques Pereira P, Hanauer A (Identification of novel mutations in the RSK2 gene (RPS6KA3) in patients with Coffin-Lowry syndrome. *Clin Genet* 70:161-166.2006).
- Delcroix JD, Patel J, Averill S, Tomlinson DR, Priestley JV, Fernyhough P (Peripheral axon crush elevates transport of p75NTR in the central projection of sensory neurones of rats. *Neurosci Lett* 351:181-185.2003).
- Dent EW, Barnes AM, Tang F, Kalil K (Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. *J Neurosci* 24:3002-3012.2004).
- Dent EW, Gertler FB (Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209-227.2003).
- Dent EW, Gupton SL, Gertler FB (The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.2011).
- Dent EW, Kalil K (Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:9757-9769.2001).
- Dernick G, Alvarez de Toledo G, Lindau M (Exocytosis of single chromaffin granules in cell-free inside-out membrane patches. *Nat Cell Biol* 5:358-362.2003).
- Diefenbach TJ, Guthrie PB, Stier H, Billups B, Kater SB (Membrane recycling in the neuronal growth cone revealed by FM1-43 labeling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:9436-9444.1999).
- Dijkhuizen PA, Ghosh A (Regulation of dendritic growth by calcium and neurotrophin signaling. *Prog Brain Res* 147:17-27.2005).
- Disse J, Vitale N, Bader MF, Gerke V (Phospholipase D1 is specifically required for regulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. *Blood* 113:973-980.2009).

- Divecha N, Roefs M, Halstead JR, D'Andrea S, Fernandez-Borga M, Oomen L, Saqib KM, Wakelam MJ, D'Santos C (Interaction of the type I α PIPkinase with phospholipase D: a role for the local generation of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate in the regulation of PLD2 activity. *EMBO J* 19:5440-5449.2000).
- Dominguez-Gonzalez I, Vazquez-Cuesta SN, Algaba A, Diez-Guerra FJ (Neurogranin binds to phosphatidic acid and associates to cellular membranes. *Biochem J* 404:31-43.2007).
- Doti N, Cassese A, Marasco D, Paturzo F, Sabatella M, Viparelli F, Dathan N, Monti SM, Miele C, Formisano P, Beguinot F, Ruvo M (Residues 762-801 of PLD1 mediate the interaction with PED/PEA15. *Mol Biosyst* 6:2039-2048.2010).
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8:1454-1468.1988).
- Du G, Altshuler YM, Vitale N, Huang P, Chasserot-Golaz S, Morris AJ, Bader MF, Frohman MA (Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol* 162:305-315.2003).
- Dugani CB, Paquin A, Kaplan DR, Miller FD (Coffin-Lowry syndrome: a role for RSK2 in mammalian neurogenesis. *Dev Biol* 347:348-359.2010).
- Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R (Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13438-13443.1999).
- Dupraz S, Grassi D, Bernis ME, Sosa L, Bisbal M, Gastaldi L, Jausoro I, Caceres A, Pfenninger KH, Quiroga S (The TC10-Exo70 complex is essential for membrane expansion and axonal specification in developing neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:13292-13301.2009).

E

- El Far O, Seagar M (A role for V-ATPase subunits in synaptic vesicle fusion? *Journal of neurochemistry* 117:603-612.2011).
- Eliasson L, Proks P, Ammala C, Ashcroft FM, Bokvist K, Renstrom E, Rorsman P, Smith PA (Endocytosis of secretory granules in mouse pancreatic beta-cells evoked by transient elevation of cytosolic calcium. *J Physiol* 493 (Pt 3):755-767.1996).
- Emoto M, Klarlund JK, Waters SB, Hu V, Buxton JM, Chawla A, Czech MP (A role for phospholipase D in GLUT4 glucose transporter translocation. *J Biol Chem* 275:7144-7151.2000).
- Ethell IM, Pasquale EB (Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol* 75:161-205.2005).
- Etienne-Manneville S, Hall A (Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.2002).
- Evans AR, Euteneuer S, Chavez E, Mullen LM, Hui EE, Bhatia SN, Ryan AF (Laminin and fibronectin modulate inner ear spiral ganglion neurite outgrowth in an in vitro alternate choice assay. *Developmental neurobiology* 67:1721-1730.2007).

E

- Fang Y, Park IH, Wu AL, Du G, Huang P, Frohman MA, Walker SJ, Brown HA, Chen J (PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. *Curr Biol* 13:2037-2044.2003).
- Farina B, Doti N, Pirone L, Malgieri G, Pedone EM, Ruvo M, Fattorusso R (Molecular basis of the PED/PEA15 interaction with the C-terminal fragment of phospholipase D1 revealed by NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1834:1572-1580.2013).
- Faugaret D, Chouinard FC, Harbour D, El azreq MA, Bourgoin SG (An essential role for phospholipase D in the recruitment of vesicle amine transport protein-1 to membranes in human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 81:144-156.2011).
- Feng P, Huang C (Phospholipase D-mTOR signaling is compromised in a rat model of depression. *J Psychiatr Res* 47:579-585.2013).
- Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME (CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19:1031-1047.1997).
- Finsterwald C, Fiumelli H, Cardinaux JR, Martin JL (Regulation of dendritic development by BDNF requires activation of CRTC1 by glutamate. *J Biol Chem* 285:28587-28595.2010).
- Finsterwald C, Martin JL (Cellular mechanisms underlying the regulation of dendritic development by hepatocyte growth factor. *Eur J Neurosci* 34:1053-1061.2011).
- Fischer M, Kaech S, Wagner U, Brinkhaus H, Matus A (Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:887-894.2000).
- Fischer M, Pereira PM, Holtmann B, Simon CM, Hanauer A, Heisenberg M, Sendtner M (P90 Ribosomal s6 kinase 2 negatively regulates axon growth in motoneurons. *Mol Cell Neurosci* 42:134-141.2009).
- Fisher RJ, Pevsner J, Burgoyne RD (Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18. *Science (New York, NY)* 291:875-878.2001).
- Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S (The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 7:61-98.2012).
- Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G (The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:1617-1626.1991).
- Formstecher E, Ramos JW, Fauquet M, Calderwood DA, Hsieh JC, Canton B, Nguyen XT, Barnier JV, Camonis J, Ginsberg MH, Chneiweiss H (PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev Cell* 1:239-250.2001).
- Foster DA (Regulation of mTOR by phosphatidic acid? *Cancer Res* 67:1-4.2007).
- Fournier AE, Kalb RG, Strittmatter SM (Rho GTPases and axonal growth cone collapse. *Methods in enzymology* 325:473-482.2000).
- Franke K, Otto W, Johannes S, Baumgart J, Nitsch R, Schumacher S (miR-124-regulated RhoG reduces neuronal process complexity via ELMO/Dock180/Rac1 and Cdc42 signalling. *EMBO J* 31:2908-2921.2012).
- Freyberg Z, Sweeney D, Siddhanta A, Bourgoin S, Frohman M, Shields D (Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12:943-955.2001).
- Friedrich R, Yeheskel A, Ashery U (DOC2B, C2 domains, and calcium: A tale of intricate interactions. *Molecular neurobiology* 41:42-51.2010).

- Frohman MA, Morris AJ (Phospholipase D structure and regulation. *Chem Phys Lipids* 98:127-140.1999).
- Frohman MA, Sung TC, Morris AJ (Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1439:175-186.1999).
- Fuhrmans M, Knecht V, Marrink SJ (A single bicontinuous cubic phase induced by fusion peptides. *J Am Chem Soc* 131:9166-9167.2009).
- Fujiwara I, Takahashi S, Tadakuma H, Funatsu T, Ishiwata S (Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nature cell biology* 4:666-673.2002).

G

- Gaiddon C, Loeffler JP, Larmet Y (Brain-derived neurotrophic factor stimulates AP-1 and cyclic AMP-responsive element dependent transcriptional activity in central nervous system neurons. *J Neurochem* 66:2279-2286.1996).
- Ganley IG, Walker SJ, Manifava M, Li D, Brown HA, Ktistakis NT (Interaction of phospholipase D1 with a casein-kinase-2-like serine kinase. *Biochem J* 354:369-378.2001).
- Gaudin Y (Reversibility in fusion protein conformational changes. The intriguing case of rhabdovirus-induced membrane fusion. *Subcell Biochem* 34:379-408.2000).
- Geetha T, Jiang J, Wooten MW (Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 20:301-312.2005).
- Georges PC, Hadzimichalis NM, Sweet ES, Firestein BL (The yin-yang of dendrite morphology: unity of actin and microtubules. *Mol Neurobiol* 38:270-284.2008).
- Ghosh S, Bell RM (Regulation of Raf-1 kinase by interaction with the lipid second messenger, phosphatidic acid. *Biochem Soc Trans* 25:561-565.1997).
- Ghosh S, Moore S, Bell RM, Dush M (Functional analysis of a phosphatidic acid binding domain in human Raf-1 kinase: mutations in the phosphatidate binding domain lead to tail and trunk abnormalities in developing zebrafish embryos. *J Biol Chem* 278:45690-45696.2003).
- Ghosh S, Strum JC, Sciorra VA, Daniel L, Bell RM (Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 271:8472-8480.1996).
- Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ (Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8:46-54.2006).
- Goedert M, Sisodia SS, Price DL (Neurofibrillary tangles and beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Current opinion in neurobiology* 1:441-447.1991).
- Gordon-Weeks PR (Actin dynamics: re-drawing the map. *Nature cell biology* 6:390-391.2004).
- Goslin K, Schreyer DJ, Skene JH, Banker G (Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature* 336:672-674.1988).
- Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L (The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci* 7:364-372.2004).
- Graham ME, O'Callaghan DW, McMahon HT, Burgoyne RD (Dynamin-dependent and dynamin-independent processes contribute to the regulation of single

- vesicle release kinetics and quantal size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7124-7129.2002).
- Grimes ML, Beattie E, Mobley WC (A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9909-9914.1997).
- Grosse G, Grosse J, Tapp R, Kuchinke J, Gorsleben M, Fetter I, Hohne-Zell B, Gratzl M, Bergmann M (SNAP-25 requirement for dendritic growth of hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research* 56:539-546.1999).
- Grote E, Baba M, Ohsumi Y, Novick PJ (Geranylgeranylated SNAREs are dominant inhibitors of membrane fusion. *J Cell Biol* 151:453-466.2000).
- Gu J, Zheng JQ (Microtubules in Dendritic Spine Development and Plasticity. *Open Neurosci J* 3:128-133.2009).
- Guan KL, Rao Y (Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nature reviews Neuroscience* 4:941-956.2003).
- Gupton SL, Gertler FB (Integrin signaling switches the cytoskeletal and exocytic machinery that drives neuritogenesis. *Developmental cell* 18:725-736.2010).

H

- Ha S, Redmond L (ERK mediates activity dependent neuronal complexity via sustained activity and CREB-mediated signaling. *Dev Neurobiol* 68:1565-1579.2008).
- Hammond SM, Altshuller YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, Morris AJ, Frohman MA (Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem* 270:29640-29643.1995).
- Hammond SM, Jenco JM, Nakashima S, Cadwallader K, Gu Q, Cook S, Nozawa Y, Prestwich GD, Frohman MA, Morris AJ (Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-alpha. *J Biol Chem* 272:3860-3868.1997).
- Han JM, Kim Y, Lee JS, Lee CS, Lee BD, Ohba M, Kuroki T, Suh PG, Ryu SH (Localization of phospholipase D1 to caveolin-enriched membrane via palmitoylation: implications for epidermal growth factor signaling. *Mol Biol Cell* 13:3976-3988.2002).
- Harrington AW, Ginty DD (Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nat Rev Neurosci* 14:177-187.2013).
- Harris KM (Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 9:343-348.1999).
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B (Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12:2685-2705.1992).
- Haucke V, Neher E, Sigrist SJ (Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 12:127-138.2011).
- Hauge C, Frodin M (RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* 119:3021-3023.2006).

- Hay JC, Fiset PL, Jenkins GH, Fukami K, Takenawa T, Anderson RA, Martin TF (ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca^{2+} -activated secretion. *Nature* 374:173-177.1995).
- Hayakawa K, Nakashima S, Ito Y, Mizuta K, Miyata H, Nozawa Y (Increased expression of phospholipase D1 mRNA during cAMP- or NGF-induced differentiation in PC12 cells. *Neurosci Lett* 265:127-130.1999).
- Hazuka CD, Foletti DL, Hsu SC, Kee Y, Hopf FW, Scheller RH (The sec6/8 complex is located at neurite outgrowth and axonal synapse-assembly domains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:1324-1334.1999).
- Henage LG, Exton JH, Brown HA (Kinetic analysis of a mammalian phospholipase D: allosteric modulation by monomeric GTPases, protein kinase C, and polyphosphoinositides. *J Biol Chem* 281:3408-3417.2006).
- Henkel AW, Horstmann H, Henkel MK (Direct observation of membrane retrieval in chromaffin cells by capacitance measurements. *FEBS Lett* 505:414-418.2001).
- Henne WM, Boucrot E, Meinecke M, Evergren E, Vallis Y, Mittal R, McMahon HT (FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* 328:1281-1284.2010).
- Hering H, Lin CC, Sheng M (Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci* 23:3262-3271.2003).
- Hernandez-Deviez DJ, Casanova JE, Wilson JM (Regulation of dendritic development by the ARF exchange factor ARNO. *Nat Neurosci* 5:623-624.2002).
- Hernandez-Deviez DJ, Roth MG, Casanova JE, Wilson JM (ARNO and ARF6 regulate axonal elongation and branching through downstream activation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha. *Molecular biology of the cell* 15:111-120.2004).
- Hill JM, Vaidyanathan H, Ramos JW, Ginsberg MH, Werner MH (Recognition of ERK MAP kinase by PEA-15 reveals a common docking site within the death domain and death effector domain. *EMBO J* 21:6494-6504.2002).
- Hirling H, Steiner P, Chaperon C, Marsault R, Regazzi R, Catsicas S (Syntaxin 13 is a developmentally regulated SNARE involved in neurite outgrowth and endosomal trafficking. *The European journal of neuroscience* 12:1913-1923.2000).
- Hiroshima M, Exton JH (Localization and regulation of phospholipase D2 by ARF6. *J Cell Biochem* 95:149-164.2005).
- Hisata S, Sakisaka T, Baba T, Yamada T, Aoki K, Matsuda M, Takai Y (Rap1-PDZ-GEF1 interacts with a neurotrophin receptor at late endosomes, leading to sustained activation of Rap1 and ERK and neurite outgrowth. *J Cell Biol* 178:843-860.2007).
- Hodgkin MN, Clark JM, Rose S, Saqib K, Wakelam MJ (Characterization of the regulation of phospholipase D activity in the detergent-insoluble fraction of HL60 cells by protein kinase C and small G-proteins. *Biochem J* 339 (Pt 1):87-93.1999).
- Hoer A, Cetindag C, Oberdisse E (Influence of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human phospholipase D1 wild-type and deletion mutants: is there evidence for an interaction of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with the putative pleckstrin homology domain? *Biochim Biophys Acta* 1481:189-201.2000).

- Hom RA, Vora M, Regner M, Subach OM, Cho W, Verkhusha VV, Stahelin RV, Kutateladze TG (pH-dependent binding of the Epsin ENTH domain and the AP180 ANTH domain to PI(4,5)P₂-containing bilayers. *J Mol Biol* 373:412-423.2007).
- Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamazaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawamoto K, Nakayama K, Morris AJ, Frohman MA, Kanaho Y (Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99:521-532.1999).
- Hornberger TA, Chu WK, Mak YW, Hsiung JW, Huang SA, Chien S (The role of phospholipase D and phosphatidic acid in the mechanical activation of mTOR signaling in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4741-4746.2006).
- Hotulainen P, Hoogenraad CC (Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 189:619-629.2010).
- Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpaa K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P (Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* 185:323-339.2009).
- Howe CL, Mobley WC (Long-distance retrograde neurotrophic signaling. *Curr Opin Neurobiol* 15:40-48.2005).
- Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC (NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 32:801-814.2001).
- Hu T, Exton JH (A point mutation at phenylalanine 663 abolishes protein kinase C alpha's ability to translocate to the perinuclear region and activate phospholipase D1. *Biochem Biophys Res Commun* 333:750-753.2005).
- Huang EJ, Reichardt LF (Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.2001).
- Huang P, Altshuler YM, Hou JC, Pessin JE, Frohman MA (Insulin-stimulated plasma membrane fusion of Glut4 glucose transporter-containing vesicles is regulated by phospholipase D1. *Mol Biol Cell* 16:2614-2623.2005).
- Hughes WE, Elgundi Z, Huang P, Frohman MA, Biden TJ (Phospholipase D1 regulates secretagogue-stimulated insulin release in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 279:27534-27541.2004).
- Hughes WE, Parker PJ (Endosomal localization of phospholipase D 1a and 1b is defined by the C-termini of the proteins, and is independent of activity. *Biochem J* 356:727-736.2001).
- Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont JL, Du G, Frohman MA, Bader MF, Poulain B (A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15300-15305.2001).
- Huotari J, Helenius A (Endosome maturation. *EMBO J* 30:3481-3500.2011).
- Igarashi M, Kozaki S, Terakawa S, Kawano S, Ide C, Komiya Y (Growth cone collapse and inhibition of neurite growth by Botulinum neurotoxin C1: a t-SNARE is involved in axonal growth. *The Journal of cell biology* 134:205-215.1996).

I

- Irie F, Yamaguchi Y (EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nat Neurosci* 5:1117-1118.2002).

J

- Jahn R, Lang T, Sudhof TC (Membrane fusion. *Cell* 112:519-533.2003).
- Jang JH, Lee CS, Hwang D, Ryu SH (Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog Lipid Res* 51:71-81.2012).
- Jareb M, Banker G (Inhibition of axonal growth by brefeldin A in hippocampal neurons in culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:8955-8963.1997).
- Jarquín-Pardo M, Fitzpatrick A, Galiano FJ, First EA, Davis JN (Phosphatidic acid regulates the affinity of the murine phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase- β for phosphatidylinositol-4-phosphate. *J Cell Biochem* 100:112-128.2007).
- Jaworski J (ARF6 in the nervous system. *Eur J Cell Biol* 86:513-524.2007).
- Jaworski J, Kapitein LC, Gouveia SM, Dortland BR, Wulf PS, Grigoriev I, Camera P, Spangler SA, Di Stefano P, Demmers J, Krugers H, Defilippi P, Akhmanova A, Hoogenraad CC (Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61:85-100.2009).
- Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M (Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 25:11300-11312.2005).
- Jenkins GH, Fiset PL, Anderson RA (Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 269:11547-11554.1994).
- Jenkins GM, Frohman MA (Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci* 62:2305-2316.2005).
- Jewell JL, Oh E, Ramalingam L, Kalwat MA, Tagliabracci VS, Tackett L, Elmendorf JS, Thurmond DC (Munc18c phosphorylation by the insulin receptor links cell signaling directly to SNARE exocytosis. *The Journal of cell biology* 193:185-199.2011).
- Jontes JD, Smith SJ (Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron* 27:11-14.2000).
- Jorgacevski J, Potokar M, Grilc S, Kreft M, Liu W, Barclay JW, Buckers J, Medda R, Hell SW, Parpura V, Burgoyne RD, Zorec R (Munc18-1 tuning of vesicle merger and fusion pore properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:9055-9066.2011).
- Jossin Y, Goffinet AM (Reelin signals through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to control cortical development and through mTor to regulate dendritic growth. *Mol Cell Biol* 27:7113-7124.2007).
- Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS (Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 3:323-329.2000).
- Jurney WM, Gallo G, Letourneau PC, McLoon SC (Rac1-mediated endocytosis during ephrin-A2- and semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:6019-6028.2002).

K

- Kanaho Y, Funakoshi Y, Hasegawa H (Phospholipase D signalling and its involvement in neurite outgrowth. *Biochim Biophys Acta* 1791:898-904.2009).

- Kang DW, Min G, Park do Y, Hong KW, Min do S (Rebamipide-induced downregulation of phospholipase D inhibits inflammation and proliferation in gastric cancer cells. *Exp Mol Med* 42:555-564.2010).
- Kapitein LC, Yau KW, Hoogenraad CC (Microtubule dynamics in dendritic spines. *Methods Cell Biol* 97:111-132.2010).
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H (Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26:360-368.2003).
- Kasai H, Takahashi N, Tokumaru H (Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. *Physiol Rev* 92:1915-1964.2012).
- Kaufmann WE, Moser HW (Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* 10:981-991.2000).
- Keshishian H (Ross Harrison's "The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement". *Journal of experimental zoology Part A, Comparative experimental biology* 301:201-203.2004).
- Kesler SR, Simensen RJ, Voeller K, Abidi F, Stevenson RE, Schwartz CE, Reiss AL (Altered neurodevelopment associated with mutations of RSK2: a morphometric MRI study of Coffin-Lowry syndrome. *Neurogenetics* 8:143-147.2007).
- Khelfaoui M, Denis C, van Galen E, de Bock F, Schmitt A, Houbbron C, Morice E, Giros B, Ramakers G, Fagni L, Chelly J, Nosten-Bertrand M, Billuart P (Loss of X-linked mental retardation gene oligophrenin1 in mice impairs spatial memory and leads to ventricular enlargement and dendritic spine immaturity. *J Neurosci* 27:9439-9450.2007).
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163-175.2002).
- Kim JH, Han JM, Lee S, Kim Y, Lee TG, Park JB, Lee SD, Suh PG, Ryu SH (Phospholipase D1 in caveolae: regulation by protein kinase Calpha and caveolin-1. *Biochemistry* 38:3763-3769.1999).
- Kim JH, Lee SD, Han JM, Lee TG, Kim Y, Park JB, Lambeth JD, Suh PG, Ryu SH (Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA. *FEBS Lett* 430:231-235.1998).
- Kim JH, Roberts DS, Hu Y, Lau GC, Brooks-Kayal AR, Farb DH, Russek SJ (Brain-derived neurotrophic factor uses CREB and Egr3 to regulate NMDA receptor levels in cortical neurons. *J Neurochem* 120:210-219.2012).
- Kim YR, Cha HY, Lim K, Hwang BD, Hoe KL, Namgung U, Park SK (Activation of epidermal growth factor receptor is responsible for pervanadate-induced phospholipase D activation. *Exp Mol Med* 35:118-124.2003).
- Klenchin VA, Martin TF (Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie* 82:399-407.2000).
- Koch T, Brandenburg LO, Liang Y, Schulz S, Beyer A, Schroder H, Holtt V (Phospholipase D2 modulates agonist-induced mu-opioid receptor desensitization and resensitization. *J Neurochem* 88:680-688.2004).
- Kolpak AL, Jiang J, Guo D, Standley C, Bellve K, Fogarty K, Bao ZZ (Negative guidance factor-induced macropinocytosis in the growth cone plays a critical role in repulsive axon turning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:10488-10498.2009).
- Kook S, Exton JH (Identification of interaction sites of protein kinase Calpha on phospholipase D1. *Cell Signal* 17:1423-1432.2005).

- Krauss M, Kinuta M, Wenk MR, De Camilli P, Takei K, Haucke V (ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Iγ. *J Cell Biol* 162:113-124.2003).
- Ktistakis NT, Brown HA, Waters MG, Sternweis PC, Roth MG (Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *The Journal of cell biology* 134:295-306.1996).
- Kumar V, Zhang MX, Swank MW, Kunz J, Wu GY (Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci* 25:11288-11299.2005).
- Kumari S, Mg S, Mayor S (Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res* 20:256-275.2010).
- Kuruvilla R, Zweifel LS, Glebova NO, Lonze BE, Valdez G, Ye H, Ginty DD (A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell* 118:243-255.2004).
- Kusumi A, Suzuki KG, Kasai RS, Ritchie K, Fujiwara TK (Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. *Trends Biochem Sci* 36:604-615.2011).

L

- Lafont F, Rouget M, Rousselet A, Valenza C, Prochiantz A (Specific responses of axons and dendrites to cytoskeleton perturbations: an in vitro study. *Journal of cell science* 104 (Pt 2):433-443.1993).
- Lalli G, Hall A (Ral GTPases regulate neurite branching through GAP-43 and the exocyst complex. *J Cell Biol* 171:857-869.2005).
- Lam AD, Tryoen-Toth P, Tsai B, Vitale N, Stuenkel EL (SNARE-catalyzed fusion events are regulated by Syntaxin1A-lipid interactions. *Mol Biol Cell* 19:485-497.2008).
- Lamoureux P, Altun-Gultekin ZF, Lin C, Wagner JA, Heidemann SR (Rac is required for growth cone function but not neurite assembly. *Journal of cell science* 110 (Pt 5):635-641.1997).
- Laurino L, Wang XX, de la Houssaye BA, Sosa L, Dupraz S, Caceres A, Pfenninger KH, Quiroga S (PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *Journal of cell science* 118:3653-3662.2005).
- Lee C, Kang HS, Chung JK, Sekiya F, Kim JR, Han JS, Kim SR, Bae YS, Morris AJ, Rhee SG (Inhibition of phospholipase D by clathrin assembly protein 3 (AP3). *J Biol Chem* 272:15986-15992.1997).
- Lee C, Kim SR, Chung JK, Frohman MA, Kilimann MW, Rhee SG (Inhibition of phospholipase D by amphipysins. *J Biol Chem* 275:18751-18758.2000a).
- Lee CS, Kim IS, Park JB, Lee MN, Lee HY, Suh PG, Ryu SH (The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nat Cell Biol* 8:477-484.2006).
- Lee HY, Park JB, Jang IH, Chae YC, Kim JH, Kim IS, Suh PG, Ryu SH (Munc-18-1 inhibits phospholipase D activity by direct interaction in an epidermal growth factor-reversible manner. *J Biol Chem* 279:16339-16348.2004).

- Lee JS, Kim IS, Kim JH, Cho W, Suh PG, Ryu SH (Determination of EGFR endocytosis kinetic by auto-regulatory association of PLD1 with mu2. *PLoS One* 4:e7090.2009).
- Lee JS, Kim JH, Jang IH, Kim HS, Han JM, Kazlauskas A, Yagisawa H, Suh PG, Ryu SH (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate specifically interacts with the phox homology domain of phospholipase D1 and stimulates its activity. *J Cell Sci* 118:4405-4413.2005).
- Lee M, Jo Y, Chun M, Chung J, Kim M, Min D (Immunohistochemical localization of phospholipase D1 in rat central nervous system. *Brain Res* 864:52-59.2000b).
- Lee S, Park JB, Kim JH, Kim Y, Shin KJ, Lee JS, Ha SH, Suh PG, Ryu SH (Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity. *J Biol Chem* 276:28252-28260.2001).
- Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K (Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 404:876-881.2000).
- Leto D, Saltiel AR (Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nature reviews Molecular cell biology* 13:383-396.2012).
- Letourneau PC, Ressler AH (Inhibition of neurite initiation and growth by taxol. *The Journal of cell biology* 98:1355-1362.1984).
- Letourneau PC, Shattuck TA, Ressler AH ("Pull" and "push" in neurite elongation: observations on the effects of different concentrations of cytochalasin B and taxol. *Cell motility and the cytoskeleton* 8:193-209.1987).
- Levine C, Marcillo A (Origin and endpoint of the olfactory nerve fibers: as described by Santiago Ramon y Cajal. *Anat Rec (Hoboken)* 291:741-750.2008).
- Levine RA, Nam EC, Melcher J (Somatosensory pulsatile tinnitus syndrome: somatic testing identifies a pulsatile tinnitus subtype that implicates the somatosensory system. *Trends Amplif* 12:242-253.2008).
- Lin CH, Forscher P (Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron* 14:763-771.1995).
- Lippincott-Schwartz J (An evolving paradigm for the secretory pathway? *Molecular biology of the cell* 22:3929-3932.2011).
- Liu L, Liao H, Castle A, Zhang J, Casanova J, Szabo G, Castle D (SCAMP2 interacts with Arf6 and phospholipase D1 and links their function to exocytotic fusion pore formation in PC12 cells. *Mol Biol Cell* 16:4463-4472.2005).
- Liu Y, Zhang YW, Wang X, Zhang H, You X, Liao FF, Xu H (Intracellular trafficking of presenilin 1 is regulated by beta-amyloid precursor protein and phospholipase D1. *J Biol Chem* 284:12145-12152.2009).
- Llobet A, Gallop JL, Burden JJ, Camdere G, Chandra P, Vallis Y, Hopkins CR, Lagnado L, McMahon HT (Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse. *J Neurosci* 31:8512-8519.2011).
- Lockerbie RO, Miller VE, Pfenninger KH (Regulated plasmalemmal expansion in nerve growth cones. *The Journal of cell biology* 112:1215-1227.1991).
- Lodovichi C, Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L (Effects of neurotrophins on cortical plasticity: same or different? *J Neurosci* 20:2155-2165.2000).
- Lonze BE, Ginty DD (Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35:605-623.2002).
- Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD (Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2. *J Biol Chem* 273:12846-12852.1998).

- Lowery LA, Van Vactor D (The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature reviews Molecular cell biology* 10:332-343.2009).
- Lu P, Jones LL, Tuszynski MH (BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp Neurol* 191:344-360.2005).
- Lucocq J, Manifava M, Bi K, Roth MG, Ktistakis NT (Immunolocalisation of phospholipase D1 on tubular vesicular membranes of endocytic and secretory origin. *Eur J Cell Biol* 80:508-520.2001).
- Ludueno RF (Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *International review of cytology* 178:207-275.1998).
- Lund IV, Hu Y, Raol YH, Benham RS, Faris R, Russek SJ, Brooks-Kayal AR (BDNF selectively regulates GABAA receptor transcription by activation of the JAK/STAT pathway. *Sci Signal* 1:ra9.2008).
- Luo L (Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* 1:173-180.2000).

M

- Ma WN, Park SY, Han JS (Role of phospholipase D1 in glucose-induced insulin secretion in pancreatic Beta cells. *Exp Mol Med* 42:456-464.2010).
- Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K (Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283:1923-1927.1999).
- Maness PF, Schachner M (Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nature neuroscience* 10:19-26.2007).
- Marques Pereira P, Gruss M, Braun K, Foos N, Pannetier S, Hanauer A (Dopaminergic system dysregulation in the *mrsk2_KO* mouse, an animal model of the Coffin-Lowry syndrome. *J Neurochem* 107:1325-1334.2008).
- Marrs GS, Green SH, Dailey ME (Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nat Neurosci* 4:1006-1013.2001).
- Marshall CJ (Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.1995).
- Martin TF (Tuning exocytosis for speed: fast and slow modes. *Biochimica et biophysica acta* 1641:157-165.2003).
- Martinez-Alonso E, Tomas M, Martinez-Menarguez JA (Golgi tubules: their structure, formation and role in intra-Golgi transport. *Histochemistry and cell biology*.2013).
- Martinez-Arca S, Alberts P, Zahraoui A, Louvard D, Galli T (Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. *J Cell Biol* 149:889-900.2000).
- Martinez-Arca S, Coco S, Mainguy G, Schenk U, Alberts P, Bouille P, Mezzina M, Prochiantz A, Matteoli M, Louvard D, Galli T (A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:3830-3838.2001).
- Mascotti F, Caceres A, Pfenninger KH, Quiroga S (Expression and distribution of IGF-1 receptors containing a beta-subunit variant (betagc) in developing

- neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:1447-1459.1997).
- Matus A, Brinkhaus H, Wagner U (Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses. *Hippocampus* 10:555-560.2000).
- McAllister AK (Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex* 10:963-973.2000).
- McAllister AK, Lo DC, Katz LC (Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 15:791-803.1995).
- McMahon HT, Kozlov MM, Martens S (Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell* 140:601-605.2010).
- Medeiros NA, Burnette DT, Forscher P (Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nature cell biology* 8:215-226.2006).
- Meier KE, Gibbs TC, Knoepp SM, Ella KM (Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439:199-213.1999).
- Melendez AJ, Harnett MM, Allen JM (Crosstalk between ARF6 and protein kinase Calpha in Fc(gamma)RI-mediated activation of phospholipase D1. *Curr Biol* 11:869-874.2001).
- Miller FD, Kaplan DR (Signaling mechanisms underlying dendrite formation. *Curr Opin Neurobiol* 13:391-398.2003).
- Miller M, Peters A (Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *The Journal of comparative neurology* 203:555-573.1981).
- Miller RJ (Calcium signalling in neurons. *Trends in neurosciences* 11:415-419.1988).
- Min DS, Choi JS, Chun MH, Chung JW, Lee MY (Transient expression of phospholipase D1 in developing rat hippocampus. *Neurosci Lett* 310:125-128.2001a).
- Min DS, Exton JH (Phospholipase D is associated in a phorbol ester-dependent manner with protein kinase C- α and with a 220-kDa protein which is phosphorylated on serine and threonine. *Biochem Biophys Res Commun* 248:533-537.1998).
- Min DS, Kim EG, Exton JH (Involvement of tyrosine phosphorylation and protein kinase C in the activation of phospholipase D by H₂O₂ in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 273:29986-29994.1998a).
- Min DS, Lee KH, Chang JS, Ahn BH, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ, Kim MS, Jo YH (Altered expression of phospholipase D1 in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cells* 11:386-391.2001b).
- Min DS, Park SK, Exton JH (Characterization of a rat brain phospholipase D isozyme. *J Biol Chem* 273:7044-7051.1998b).
- Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M (Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36:121-137.2002).
- Miyazaki H, Yamazaki M, Watanabe H, Maehama T, Yokozeki T, Kanaho Y (The small GTPase ADP-ribosylation factor 6 negatively regulates dendritic spine formation. *FEBS Lett* 579:6834-6838.2005).
- Mo J, Lee D, Hong S, Han S, Yeo H, Sun W, Choi S, Kim H, Lee HW (Preso regulation of dendritic outgrowth through PI(4,5)P₂-dependent PDZ interaction with betaPix. *Eur J Neurosci* 36:1960-1970.2012).
- Momboisse F, Lonchamp E, Calco V, Ceridono M, Vitale N, Bader MF, Gasman S (betaPIX-activated Rac1 stimulates the activation of phospholipase D, which is associated with exocytosis in neuroendocrine cells. *J Cell Sci* 122:798-806.2009).

- Momboisse F, Ory S, Ceridono M, Calco V, Vitale N, Bader MF, Gasman S (The Rho guanine nucleotide exchange factors Intersectin 1L and beta-Pix control calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol* 30:1327-1333.2010).
- Monck JR, Alvarez de Toledo G, Fernandez JM (Tension in secretory granule membranes causes extensive membrane transfer through the exocytotic fusion pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7804-7808.1990).
- Mor A, Wynne JP, Ahearn IM, Dustin ML, Du G, Philips MR (Phospholipase D1 regulates lymphocyte adhesion via upregulation of Rap1 at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 29:3297-3306.2009).
- Morice E, Farley S, Poirier R, Dallerac G, Chagneau C, Pannetier S, Hanauer A, Davis S, Vaillend C, Laroche S (Defective synaptic transmission and structure in the dentate gyrus and selective fear memory impairment in the Rsk2 mutant mouse model of Coffin-Lowry syndrome. *Neurobiol Dis* 58C:156-168.2013).
- Morioka N, Yoshida Y, Nakamura Y, Hidaka N, Hisaoka-Nakashima K, Nakata Y (The regulation of exon-specific brain-derived neurotrophic factor mRNA expression by protein kinase C in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1509:20-31.2013).
- Mueller BK (Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annual review of neuroscience* 22:351-388.1999).
- Murthy M, Garza D, Scheller RH, Schwarz TL (Mutations in the exocyst component Sec5 disrupt neuronal membrane traffic, but neurotransmitter release persists. *Neuron* 37:433-447.2003).

N

- Nakashima S, Matsuda Y, Akao Y, Yoshimura S, Sakai H, Hayakawa K, Andoh M, Nozawa Y (Molecular cloning and chromosome mapping of rat phospholipase D genes, Pld1a, Pld1b and Pld2. *Cytogenet Cell Genet* 79:109-113.1997).
- Nakazawa H, Sada T, Toriyama M, Tago K, Sugiura T, Fukuda M, Inagaki N (Rab33a mediates anterograde vesicular transport for membrane exocytosis and axon outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:12712-12725.2012).
- Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG (Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol Biol Cell* 14:417-431.2003).
- Niblock MM, Brunso-Bechtold JK, Riddle DR (Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J Neurosci* 20:4165-4176.2000).
- Niell CM, Meyer MP, Smith SJ (In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nat Neurosci* 7:254-260.2004).
- Nishikimi A, Fukuhara H, Su W, Hongu T, Takasuga S, Mihara H, Cao Q, Sanematsu F, Kanai M, Hasegawa H, Tanaka Y, Shibasaki M, Kanaho Y, Sasaki T, Frohman MA, Fukui Y (Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis. *Science* 324:384-387.2009).

O

- O'Donnell WT, Warren ST (A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci* 25:315-338.2002).
- Oh DY, Park SY, Cho JH, Lee KS, Min do S, Han JS (Phospholipase D1 activation through Src and Ras is involved in basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth of H19-7 cells. *J Cell Biochem* 101:221-234.2007).
- Oishi K, Takahashi M, Mukai H, Banno Y, Nakashima S, Kanaho Y, Nozawa Y, Ono Y (PKN regulates phospholipase D1 through direct interaction. *J Biol Chem* 276:18096-18101.2001).
- Okabe S, Miwa A, Okado H (Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J Neurosci* 21:6105-6114.2001).
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP (Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:5419-5422.1998).
- Osisami M, Ali W, Frohman MA (A role for phospholipase D3 in myotube formation. *PLoS One* 7:e33341.2012).
- Otani Y, Yamaguchi Y, Sato Y, Furuichi T, Ikenaka K, Kitani H, Baba H (PLD4 is involved in phagocytosis of microglia: expression and localization changes of PLD4 are correlated with activation state of microglia. *PLoS One* 6:e27544.2011).
- Oude Weernink PA, Lopez de Jesus M, Schmidt M (Phospholipase D signaling: orchestration by PIP2 and small GTPases. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 374:399-411.2007).
- Owald D, Sigrist SJ (Assembling the presynaptic active zone. *Current opinion in neurobiology* 19:311-318.2009).

P

- Pang ZP, Sudhof TC (Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Current opinion in cell biology* 22:496-505.2010).
- Pantano S, Montecucco C (The blockade of the neurotransmitter release apparatus by botulinum neurotoxins. *Cell Mol Life Sci*.2013).
- Park JB, Kim JH, Kim Y, Ha SH, Yoo JS, Du G, Frohman MA, Suh PG, Ryu SH (Cardiac phospholipase D2 localizes to sarcolemmal membranes and is inhibited by alpha-actinin in an ADP-ribosylation factor-reversible manner. *J Biol Chem* 275:21295-21301.2000).
- Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD (Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52:817-830.2006).
- Park SK, Provost JJ, Bae CD, Ho WT, Exton JH (Cloning and characterization of phospholipase D from rat brain. *J Biol Chem* 272:29263-29271.1997).
- Parrish JZ, Emoto K, Kim MD, Jan YN (Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. *Annu Rev Neurosci* 30:399-423.2007).
- Payton JE, Perrin RJ, Woods WS, George JM (Structural determinants of PLD2 inhibition by alpha-synuclein. *J Mol Biol* 337:1001-1009.2004).
- Peng HJ, Henkels KM, Mahankali M, Marchal C, Bubulya P, Dinanier MC, Gomez-Cambroneiro J (The dual effect of Rac2 on phospholipase D2 regulation that explains both the onset and termination of chemotaxis. *Mol Cell Biol* 31:2227-2240.2011).

- Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE, Huganir RL (Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37:263-274.2003).
- Pereira PM, Schneider A, Pannetier S, Heron D, Hanauer A (Coffin-Lowry syndrome. *Eur J Hum Genet* 18:627-633.2010).
- Perez-Mansilla B, Ha VL, Justin N, Wilkins AJ, Carpenter CL, Thomas GM (The differential regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases and phospholipase D1 by ADP-ribosylation factors 1 and 6. *Biochim Biophys Acta* 1761:1429-1442.2006).
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT (BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303:495-499.2004).
- Pfenninger KH, Laurino L, Peretti D, Wang X, Rosso S, Morfini G, Caceres A, Quiroga S (Regulation of membrane expansion at the nerve growth cone. *Journal of cell science* 116:1209-1217.2003).
- Piomelli D, Astarita G, Rapaka R (A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat Rev Neurosci* 8:743-754.2007).
- Pizzorusso T, Fagiolini M, Gianfranceschi L, Porciatti V, Maffei L (Role of neurotrophins in the development and plasticity of the visual system: experiments on dark rearing. *Int J Psychophysiol* 35:189-196.2000).
- Poirier R, Jacquot S, Vaillend C, Souththiphong AA, Libbey M, Davis S, Laroche S, Hanauer A, Welzl H, Lipp HP, Wolfer DP (Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene *Rsk2* in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior. *Behav Genet* 37:31-50.2007).
- Polleux F, Morrow T, Ghosh A (Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404:567-573.2000).
- Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R (Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci* 23:7129-7142.2003).
- Portera Cailliau C, Yuste R ([On the function of dendritic filopodia]. *Rev Neurol* 33:1158-1166.2001).
- Powner DJ, Wakelam MJ (The regulation of phospholipase D by inositol phospholipids and small GTPases. *FEBS Lett* 531:62-64.2002).

R

- Racchetti G, Lorusso A, Schulte C, Gavello D, Carabelli V, D'Alessandro R, Meldolesi J (Rapid neurite outgrowth in neurosecretory cells and neurons is sustained by the exocytosis of a cytoplasmic organelle, the enlargeosome. *Journal of cell science* 123:165-170.2010).
- Raemaekers T, Peric A, Baatsen P, Sannerud R, Declerck I, Baert V, Michiels C, Annaert W (ARF6-mediated endosomal transport of Telencephalin affects dendritic filopodia-to-spine maturation. *EMBO J* 31:3252-3269.2012).
- Rajan I, Cline HT (Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J Neurosci* 18:7836-7846.1998).
- Rangappa N, Romero A, Nelson KD, Eberhart RC, Smith GM (Laminin-coated poly(L-lactide) filaments induce robust neurite growth while providing directional orientation. *J Biomed Mater Res* 51:625-634.2000).

- Rankovic M, Jacob L, Rankovic V, Brandenburg LO, Schroder H, Holtt V, Koch T (ADP-ribosylation factor 6 regulates mu-opioid receptor trafficking and signaling via activation of phospholipase D2. *Cell Signal* 21:1784-1793.2009).
- Redmond L, Ghosh A (Regulation of dendritic development by calcium signaling. *Cell Calcium* 37:411-416.2005).
- Redmond L, Kashani AH, Ghosh A (Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* 34:999-1010.2002).
- Reichardt LF (Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564.2006).
- Ren J, Guo W (ERK1/2 regulate exocytosis through direct phosphorylation of the exocyst component Exo70. *Dev Cell* 22:967-978.2012).
- Riccio A, Pierchala BA, Ciarallo CL, Ginty DD (An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science* 277:1097-1100.1997).
- Ridley AJ (Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 11:471-477.2001).
- Rizzo MA, Shome K, Vasudevan C, Stolz DB, Sung TC, Frohman MA, Watkins SC, Romero G (Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 274:1131-1139.1999).
- Rizzo MA, Shome K, Watkins SC, Romero G (The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J Biol Chem* 275:23911-23918.2000).
- Roach AN, Wang Z, Wu P, Zhang F, Chan RB, Yonekubo Y, Di Paolo G, Gorge AA, Du G (Phosphatidic acid regulation of PIPKI is critical for actin cytoskeletal reorganization. *J Lipid Res* 53:2598-2609.2012).
- Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA (Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 4:487-492.1990).

S

- Saarikangas J, Zhao H, Pykalainen A, Laurinmaki P, Mattila PK, Kinnunen PK, Butcher SJ, Lappalainen P (Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins. *Curr Biol* 19:95-107.2009).
- Sabo SL, McAllister AK (Mobility and cycling of synaptic protein-containing vesicles in axonal growth cone filopodia. *Nature neuroscience* 6:1264-1269.2003).
- Sampo B, Kaech S, Kunz S, Banker G (Two distinct mechanisms target membrane proteins to the axonal surface. *Neuron* 37:611-624.2003).
- Sandow SL, Heydon K, Weible MW, 2nd, Reynolds AJ, Bartlett SE, Hendry IA (Signalling organelle for retrograde axonal transport of internalized neurotrophins from the nerve terminal. *Immunol Cell Biol* 78:430-435.2000).
- Sanematsu F, Nishikimi A, Watanabe M, Hongu T, Tanaka Y, Kanaho Y, Cote JF, Fukui Y (Phosphatidic acid-dependent recruitment and function of the Rac activator DOCK1 during dorsal ruffle formation. *J Biol Chem* 288:8092-8100.2013).
- Sann S, Wang Z, Brown H, Jin Y (Roles of endosomal trafficking in neurite outgrowth and guidance. *Trends in cell biology* 19:317-324.2009).

- Santy LC, Ravichandran KS, Casanova JE (The DOCK180/Elmo complex couples ARNO-mediated Arf6 activation to the downstream activation of Rac1. *Curr Biol* 15:1749-1754.2005).
- Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14:1296-1302.2004).
- Sasagawa S, Ozaki Y, Fujita K, Kuroda S (Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat Cell Biol* 7:365-373.2005).
- Sato T, Hongu T, Sakamoto M, Funakoshi Y, Kanaho Y (Molecular mechanisms of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils: phospholipase D is dispensable. *Mol Cell Biol* 33:136-145.2013).
- Saxena S, Bucci C, Weis J, Kruttgen A (The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *J Neurosci* 25:10930-10940.2005).
- Schaefer AW, Kabir N, Forscher P (Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *The Journal of cell biology* 158:139-152.2002).
- Schulte C, Racchetti G, D'Alessandro R, Meldolesi J (A new form of neurite outgrowth sustained by the exocytosis of enlargeosomes expressed under the control of REST. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11:1304-1314.2010).
- Seet LF, Hong W (The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 1761:878-896.2006).
- Segal M (Changing views of Cajal's neuron: the case of the dendritic spine. *Prog Brain Res* 136:101-107.2002).
- Segovia M, Ales E, Montes MA, Bonifas I, Jemal I, Lindau M, Maximov A, Sudhof TC, Alvarez de Toledo G (Push-and-pull regulation of the fusion pore by synaptotagmin-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:19032-19037.2010).
- Silverman E, Frodin M, Gammeltoft S, Maller JL (Activation of p90 Rsk1 is sufficient for differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 24:10573-10583.2004).
- Singer WD, Brown HA, Jiang X, Sternweis PC (Regulation of phospholipase D by protein kinase C is synergistic with ADP-ribosylation factor and independent of protein kinase activity. *J Biol Chem* 271:4504-4510.1996).
- Smirnova YG, Marrink SJ, Lipowsky R, Knecht V (Solvent-exposed tails as prestalk transition states for membrane fusion at low hydration. *J Am Chem Soc* 132:6710-6718.2010).
- Smith C, Neher E (Multiple forms of endocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. *J Cell Biol* 139:885-894.1997).
- Sotelo C (Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J Exp Biol* 153:225-249.1990).
- Spacek J, Harris KM (Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci* 17:190-203.1997).
- Stahelin RV, Ananthanarayanan B, Blatner NR, Singh S, Bruzik KS, Murray D, Cho W (Mechanism of membrane binding of the phospholipase D1 PX domain. *J Biol Chem* 279:54918-54926.2004).

- Sugars JM, Celtek S, Manifava M, Coadwell J, Ktistakis NT (Fatty acylation of phospholipase D1 on cysteine residues 240 and 241 determines localization on intracellular membranes. *J Biol Chem* 274:30023-30027.1999).
- Sugars JM, Celtek S, Manifava M, Coadwell J, Ktistakis NT (Hierarchy of membrane-targeting signals of phospholipase D1 involving lipid modification of a pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 277:29152-29161.2002).
- Sugita S (Mechanisms of exocytosis. *Acta physiologica* (Oxford, England) 192:185-193.2008).
- Sulzmaier FJ, Valmiki MK, Nelson DA, Caliva MJ, Geerts D, Matter ML, White EP, Ramos JW (PEA-15 potentiates H-Ras-mediated epithelial cell transformation through phospholipase D. *Oncogene* 31:3547-3560.2012).
- Sun Y, Chen J (mTOR signaling: PLD takes center stage. *Cell Cycle* 7:3118-3123.2008).
- Sun Y, Fang Y, Yoon MS, Zhang C, Roccio M, Zwartkruis FJ, Armstrong M, Brown HA, Chen J (Phospholipase D1 is an effector of Rheb in the mTOR pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8286-8291.2008).
- Sung TC, Roper RL, Zhang Y, Rudge SA, Temel R, Hammond SM, Morris AJ, Moss B, Engebrecht J, Frohman MA (Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J* 16:4519-4530.1997).
- Suter DM, Miller KE (The emerging role of forces in axonal elongation. *Progress in neurobiology* 94:91-101.2011).
- Szaszak M, Christian F, Rosenthal W, Klusmann E (Compartmentalized cAMP signalling in regulated exocytic processes in non-neuronal cells. *Cellular signalling* 20:590-601.2008).

I

- Tada T, Sheng M (Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:95-101.2006).
- Takahashi N, Kishimoto T, Nemoto T, Kadowaki T, Kasai H (Fusion pore dynamics and insulin granule exocytosis in the pancreatic islet. *Science* 297:1349-1352.2002).
- Taraska JW, Almers W (Bilayers merge even when exocytosis is transient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8780-8785.2004).
- Tashiro A, Minden A, Yuste R (Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex* 10:927-938.2000).
- Tashiro A, Yuste R (Structure and molecular organization of dendritic spines. *Histol Histopathol* 18:617-634.2003).
- Tennyson VM (The fine structure of the axon and growth cone of the dorsal root neuroblast of the rabbit embryo. *The Journal of cell biology* 44:62-79.1970).
- Thoenen H, Barde YA (Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev* 60:1284-1335.1980).
- Tojima T (Intracellular signaling and membrane trafficking control bidirectional growth cone guidance. *Neuroscience research* 73:269-274.2012).
- Tomas A, Yermen B, Min L, Pessin JE, Halban PA (Regulation of pancreatic beta-cell insulin secretion by actin cytoskeleton remodelling: role of gelsolin and cooperation with the MAPK signalling pathway. *Journal of cell science* 119:2156-2167.2006).

- Toonen RF, Wierda K, Sons MS, de Wit H, Cornelisse LN, Brussaard A, Plomp JJ, Verhage M (Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:18332-18337.2006).
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K (Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420:788-794.2002).
- Trifaro JM (Molecular biology of the chromaffin cell. *Annals of the New York Academy of Sciences* 971:11-18.2002).
- Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A (Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* 384:567-570.1996).
- Tyler WJ, Pozzo-Miller LD (BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 21:4249-4258.2001).

U

- Urbanska M, Gozdz A, Swiech LJ, Jaworski J (Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons. *J Biol Chem* 287:30240-30256.2012).

V

- Vaidyanathan H, Opoku-Ansah J, Pastorino S, Renganathan H, Matter ML, Ramos JW (ERK MAP kinase is targeted to RSK2 by the phosphoprotein PEA-15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19837-19842.2007).
- Vaidyanathan H, Ramos JW (RSK2 activity is regulated by its interaction with PEA-15. *J Biol Chem* 278:32367-32372.2003).
- Valdez G, Akmentin W, Philippidou P, Kuruvilla R, Ginty DD, Halegoua S (Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *J Neurosci* 25:5236-5247.2005).
- Van Aelst L, Cline HT (Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr Opin Neurobiol* 14:297-304.2004).
- Vega IE, Hsu SC (The exocyst complex associates with microtubules to mediate vesicle targeting and neurite outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:3839-3848.2001).
- Viparelli F, Doti N, Sandomenico A, Marasco D, Dathan NA, Miele C, Beguinot F, Monti SM, Ruvo M (Expression and purification of the D4 region of PLD1 and characterization of its interaction with PED-PEA15. *Protein Expr Purif* 59:302-308.2008).
- Vitale N (Synthesis of fusogenic lipids through activation of phospholipase D1 by GTPases and the kinase RSK2 is required for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *Biochemical Society transactions* 38:167-171.2010).
- Vitale N, Caumont AS, Chasserot-Golaz S, Du G, Wu S, Sciorra VA, Morris AJ, Frohman MA, Bader MF (Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J* 20:2424-2434.2001).
- Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bader MF (Regulated secretion in chromaffin cells: an essential role for ARF6-regulated phospholipase D in the late stages of exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* 971:193-200.2002a).

- Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bailly Y, Morinaga N, Frohman MA, Bader MF (Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *J Cell Biol* 159:79-89.2002b).
- Vitale N, Mawet J, Camonis J, Regazzi R, Bader MF, Chasserot-Golaz S (The Small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *J Biol Chem* 280:29921-29928.2005).
- von Bohlen Und Halbach O (Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Ann Anat* 191:518-531.2009).

W

- Wadsworth WG (Moving around in a worm: netrin UNC-6 and circumferential axon guidance in *C. elegans*. *Trends Neurosci* 25:423-429.2002).
- Walker SJ, Wu WJ, Cerione RA, Brown HA (Activation of phospholipase D1 by Cdc42 requires the Rho insert region. *J Biol Chem* 275:15665-15668.2000).
- Wang L, Cummings R, Usatyuk P, Morris A, Irani K, Natarajan V (Involvement of phospholipases D1 and D2 in sphingosine 1-phosphate-induced ERK (extracellular-signal-regulated kinase) activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *Biochem J* 367:751-760.2002).
- Wayman GA, Impey S, Marks D, Saneyoshi T, Grant WF, Derkach V, Soderling TR (Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron* 50:897-909.2006).
- Whitford KL, Dijkhuizen P, Polleux F, Ghosh A (Molecular control of cortical dendrite development. *Annu Rev Neurosci* 25:127-149.2002).

Y

- Yacoubian TA, Lo DC (Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat Neurosci* 3:342-349.2000).
- Yamada KM, Spooner BS, Wessells NK (Axon growth: roles of microfilaments and microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66:1206-1212.1970).
- Yamada KM, Wessells NK (Axon elongation. Effect of nerve growth factor on microtubule protein. *Experimental cell research* 66:346-352.1971).
- Yamada KM, Wessells NK (Cytochalasin B: effects on membrane ruffling, growth cone and microspike activity, and microfilament structure not due to altered glucose transport. *Developmental biology* 31:413-420.1973).
- Ye H, Kuruvilla R, Zweifel LS, Ginty DD (Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron* 39:57-68.2003).
- Yoon MS, Cho CH, Lee KS, Han JS (Binding of Cdc42 to phospholipase D1 is important in neurite outgrowth of neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 347:594-600.2006).
- Yoon MS, Du G, Backer JM, Frohman MA, Chen J (Class III PI-3-kinase activates phospholipase D in an amino acid-sensing mTORC1 pathway. *J Cell Biol* 195:435-447.2011).

- Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bader MF (Regulated secretion in chromaffin cells: an essential role for ARF6-regulated phospholipase D in the late stages of exocytosis. *Ann N Y Acad Sci* 971:193-200.2002a).
- Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bailly Y, Morinaga N, Frohman MA, Bader MF (Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *J Cell Biol* 159:79-89.2002b).
- Vitale N, Mawet J, Camonis J, Regazzi R, Bader MF, Chasserot-Golaz S (The Small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *J Biol Chem* 280:29921-29928.2005).
- von Bohlen Und Halbach O (Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Ann Anat* 191:518-531.2009).
- Wadsworth WG (Moving around in a worm: netrin UNC-6 and circumferential axon guidance in *C. elegans*. *Trends Neurosci* 25:423-429.2002).
- Walker SJ, Wu WJ, Cerione RA, Brown HA (Activation of phospholipase D1 by Cdc42 requires the Rho insert region. *J Biol Chem* 275:15665-15668.2000).
- Wang L, Cummings R, Usatyuk P, Morris A, Irani K, Natarajan V (Involvement of phospholipases D1 and D2 in sphingosine 1-phosphate-induced ERK (extracellular-signal-regulated kinase) activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *Biochem J* 367:751-760.2002).
- Wayman GA, Impey S, Marks D, Saneyoshi T, Grant WF, Derkach V, Soderling TR (Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron* 50:897-909.2006).
- Whitford KL, Dijkhuizen P, Polleux F, Ghosh A (Molecular control of cortical dendrite development. *Annu Rev Neurosci* 25:127-149.2002).
- Yacoubian TA, Lo DC (Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat Neurosci* 3:342-349.2000).
- Yamada KM, Spooner BS, Wessells NK (Axon growth: roles of microfilaments and microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66:1206-1212.1970).
- Yamada KM, Wessells NK (Axon elongation. Effect of nerve growth factor on microtubule protein. *Experimental cell research* 66:346-352.1971).
- Yamada KM, Wessells NK (Cytochalasin B: effects on membrane ruffling, growth cone and microspike activity, and microfilament structure not due to altered glucose transport. *Developmental biology* 31:413-420.1973).
- Ye H, Kuruvilla R, Zweifel LS, Ginty DD (Evidence in support of signaling endosome-based retrograde survival of sympathetic neurons. *Neuron* 39:57-68.2003).
- Yoon MS, Cho CH, Lee KS, Han JS (Binding of Cdc42 to phospholipase D1 is important in neurite outgrowth of neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 347:594-600.2006).
- Yoon MS, Du G, Backer JM, Frohman MA, Chen J (Class III PI-3-kinase activates phospholipase D in an amino acid-sensing mTORC1 pathway. *J Cell Biol* 195:435-447.2011).
- Yoon MS, Yon C, Park SY, Oh DY, Han AH, Kim DS, Han JS (Role of phospholipase D1 in neurite outgrowth of neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 329:804-811.2005).

- Yoon SN, Kim KS, Cho JH, Ma W, Choi HJ, Kwon SJ, Han JS (Phospholipase D1 mediates bFGF-induced Bcl-2 expression leading to neurite outgrowth in H19-7 cells. *Biochem J* 441:407-416.2012).
- York RD, Molliver DC, Grewal SS, Stenberg PE, McCleskey EW, Stork PJ (Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1. *Mol Cell Biol* 20:8069-8083.2000).
- York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, Stork PJ (Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392:622-626.1998).
- Yoshihara Y, De Roo M, Muller D (Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol* 19:146-153.2009).
- Yu IM, Hughson FM (Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:137-156.2010).
- Yuan XB, Jin M, Xu X, Song YQ, Wu CP, Poo MM, Duan S (Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance. *Nat Cell Biol* 5:38-45.2003).
- Yuste R, Bonhoeffer T (Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24:1071-1089.2001).
- Zeniou-Meyer M, Liu Y, Begle A, Olanich ME, Hanauer A, Becherer U, Rettig J, Bader MF, Vitale N (The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8434-8439.2008).
- Zeniou-Meyer M, Zabari N, Ashery U, Chasserot-Golaz S, Haeberle AM, Demais V, Bailly Y, Gottfried I, Nakanishi H, Neiman AM, Du G, Frohman MA, Bader MF, Vitale N (Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *The Journal of biological chemistry* 282:21746-21757.2007).
- Zeniou M, Ding T, Trivier E, Hanauer A (Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning. *Hum Mol Genet* 11:2929-2940.2002).
- Zhang XF, Schaefer AW, Burnette DT, Schoonderwoert VT, Forscher P (Rho-dependent contractile responses in the neuronal growth cone are independent of classical peripheral retrograde actin flow. *Neuron* 40:931-944.2003).
- Zhang Y, Altshuller YM, Hammond SM, Hayes F, Morris AJ, Frohman MA (Loss of receptor regulation by a phospholipase D1 mutant unresponsive to protein kinase C. *EMBO J* 18:6339-6348.1999).
- Zhang Y, Kanaho Y, Frohman MA, Tsirka SE (Phospholipase D1-promoted release of tissue plasminogen activator facilitates neurite outgrowth. *J Neurosci* 25:1797-1805.2005).
- Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA (Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* 20:5671-5678.2000a).
- Zhang Y, Redina O, Altshuller YM, Yamazaki M, Ramos J, Chneiweiss H, Kanaho Y, Frohman MA (Regulation of expression of phospholipase D1 and D2 by PEA-15, a novel protein that interacts with them. *J Biol Chem* 275:35224-35232.2000b).
- Zhou X, Xiao H, Wang H (Developmental changes of TrkB signaling in response to exogenous brain-derived neurotrophic factor in primary cortical neurons. *J Neurochem* 119:1205-1216.2011).

- Zhu YB, Kang K, Zhang Y, Qi C, Li G, Yin DM, Wang Y (PLD1 Negatively Regulates Dendritic Branching. *J Neurosci* 32:7960-7969.2012).
- Zito K, Knott G, Shepherd GM, Shenolikar S, Svoboda K (Induction of spine growth and synapse formation by regulation of the spine actin cytoskeleton. *Neuron* 44:321-334.2004).
- Ziv NE, Smith SJ (Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.1996).
- Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD (Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* 6:615-625.2005).

ANNEXES

I. Article 3

The V-ATPase membrane domain is a sensor of granular pH that controls the exocytotic machinery.

II. Revue 1

The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 and neurosecretion.

III. Revue 2

LIPIDS IN REGULATED EXOCYTOSIS: WHAT ARE THEY DOING?

The V-ATPase membrane domain is a sensor of granular pH that controls the exocytotic machinery.

Sandrine Poëa-Guyon¹, Mohammed Rafet Ammar², Marie Erard³, Muriel Amar¹, Alexandre W. Moreau⁴, Philippe Fossier¹, Vincent Gleize^{1, 5}, Nicolas Vitale^{2, 6, 7}, and Nicolas Morel^{1, 6, 7}.

¹ Centre de Neurosciences Paris-Sud, Université Paris-Sud, CNRS UMR8195, Orsay F-91405, France.

² Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UPR-3212 Centre National de la Recherche Scientifique & Université de Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France.

³ Université Paris Sud, Laboratoire de Chimie Physique, UMR8000, Orsay F-91405, France.

⁴ present address: Department of Neuroscience, Physiology, and Pharmacology, University College London, 21 University Street, London WC1E 6DE, UK.

⁵ present address: CRICM - UPMC/Inserm UMR S975, Paris F-75651 cedex 13, France.

⁶ corresponding authors: Nicolas Morel, Centre de Neurosciences Paris-Sud, Université Paris-Sud, CNRS UMR 8195, Orsay F-91405, France. E-mail: nicolas.morel@u-psud.fr; Nicolas Vitale, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UPR-3212 Centre National de la Recherche Scientifique & Université de Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France. E-mail: vitalen@inci-cnrs.unistra.fr.

⁷ both authors contributed equally to the work

Running title: V0-ATPase and transmitter exocytosis

Total number of characters: 34753; JCB manuscript #201303104 (revised 2013-07-11)

Abstract

Several reports have suggested that the V0 domain of the V-ATPase is directly implicated in secretory vesicle exocytosis, through a role in membrane fusion. We report a rapid decrease in neurotransmitter release after acute photo-inactivation of the V0 a1-I subunit in neuronal pairs. Likewise, inactivation of the V0 a1-I subunit in chromaffin cells resulted in a decreased frequency and prolonged kinetics of amperometric spikes induced by depolarization, with shortening of the fusion pore open time. Dissipation of the granular pH gradient was associated with an inhibition of exocytosis, and correlated with the V1-V0 association status in secretory granules. We thus conclude that V0 serves as a sensor of intra-granular pH that controls exocytosis and synaptic transmission via the reversible dissociation of V1 at acidic pH. Hence, the V-ATPase membrane domain would allow the exocytotic machinery to discriminate fully loaded and acidified vesicles from vesicles undergoing neurotransmitter reloading.

Introduction

V-ATPases transport protons across the membrane of various organelles (e.g. lysosomes, endosomes, *trans*-Golgi network, secretory granules), and the acidification of these organelles is required for many cellular processes (e.g. maturation or degradation of proteins, receptor-mediated endocytosis, proton-coupled transport of small molecules) (Forgac, 2007). V-ATPases are large multimeric enzymes organized in two domains, V1 and V0. The cytosolic V1 domain contains eight different subunits (A-H) with subunits A catalyzing ATP hydrolysis (Forgac, 2007). The V0 membrane domain translocates protons and contains five copies of proteolipid subunit c and single copies of subunits a, c'', d and e (Forgac, 2007). In vertebrates, four isoforms of subunit a (a1-a4) have been identified with specific cellular and tissues distributions (Toei et al, 2010). Four variants of a1 are generated by alternative splicing, with a1-I being specifically addressed to nerve terminals (Morel et al, 2003; Poëa-Guyon et al, 2006). The V-ATPase activity generates a large electrochemical proton gradient in synaptic vesicles in neurons and in chromaffin granules in neuroendocrine chromaffin cells, their internal pH reaching pH 5.2-5.5 (Michaelson & Angel, 1980; Földner & Stadler, 1982) and 5.5 (Johnson & Scarpa, 1976; Pollard et al, 1979), respectively. This electrochemical proton gradient energizes the accumulation of neurotransmitters in synaptic vesicles by specific vesicular transporters, or of catecholamines in chromaffin granules. A low intragranular pH is also required for catecholamine binding to chromogranins within the secretory granules (Camacho et al, 2006).

Independently of its well established role in proton translocation, V0 has been implicated in neurotransmitter release (Hiesinger et al, 2005), in intra-cellular membrane fusion events (Peters et al, 2001; Peri and Nüsslein-Volhard, 2008; Williamson et al, 2010; Strasser et al, 2011) and in exocytosis (Liegeois et al, 2006), suggesting that V0 could be directly involved in the fusion between two membrane compartments. The exocytotic release of transmitter

molecules packaged in synaptic vesicles or secretory granules is a highly regulated process that allows vesicles to fuse with the plasma membrane. This rapid process requires the formation of a fusion pore that opens and then expands leading to full membrane fusion upon an increase in the cytosolic calcium level (Jahn & Fasshauer, 2012). Among the proteins involved in membrane fusion, the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors (SNAREs) have been proposed to constitute the core of the fusion machinery (Rizo & Rosenmund, 2008; Wickner & Scheckman, 2008). The formation of a SNARE complex between the vesicle-associated SNARE VAMP-2 (synaptobrevin-2) and the plasma membrane t-SNAREs syntaxin-1 and SNAP-25 allows vesicle docking to the plasma membrane and provides the energy required for membrane fusion (Jahn & Fasshauer, 2012). It has been proposed that V0 could be a component of the fusion pore (Peters et al, 2001; Morel et al, 2001) or, alternatively, that it could favor lipid mixing and the formation of a lipidic fusion pore (Strasser et al, 2011; El Far and Seagar, 2011). Indeed, V0 has been shown to interact with SNARE proteins (Galli et al, 1996; Peters et al, 2001; Morel et al, 2003; Hiesinger et al, 2005; Di Giovanni et al, 2010). In addition, V0 could also behave as a pH sensor (Hurtado-Lorenzo et al, 2006; Hosokawa et al, 2013), that could participate in the priming steps that render secretory vesicles competent for exocytosis (Morel, 2003). These pioneer studies relied on the genetic impairment of specific V0 subunits that perturbed organelle membrane fusion while preserving their acidification. But, with long-term V0 inactivation, it is difficult to exclude the possibility that the observed membrane fusion deficits result indirectly from alterations in membrane protein or lipid metabolism or trafficking rather than from the impairment of V0 itself. The acute and selective inactivation of V0 should by-pass such limitations. We thus made use of the chromophore-assisted light inactivation (CALI) technique (Tour et al, 2003; Jacobson et al, 2008). The protein of interest is genetically modified by insertion of a small tetracystein (TC) motif which specifically binds

membrane-permeant biarsenical dyes. Upon illumination, these dyes release short lived reactive oxygen singlets that locally and specifically inactivate the TC tagged protein (Tour et al, 2003; Yan et al, 2006). This approach has already been successfully validated for the study of synaptic transmission in *Drosophila* (Marek & Davies, 2002).

Our results show that the photo-inactivation of the V0 α 1-I subunit leads to a rapid impairment of synaptic transmission in neurons and of catecholamine release in chromaffin cells. This effect is clearly different from the delayed effect of either pharmacological inhibition of proton transport or photo-inactivation of the V1 catalytic subunit A, strongly arguing that V0 regulates fusion independently from proton transport. We also observed that granule exocytosis in neurosecretory PC12 cells is dependent on the intra-granular pH and that V0 appears to behave as an intra-granular pH sensor that regulates the exocytotic machinery.

Results

Photo-inactivation of the V0 subunit $\alpha 1$ -I impairs neurotransmitter release.

In order to test the effect of an acute inactivation of V0 on synaptic transmission, we expressed a TC-tagged subunit $\alpha 1$ -I in neurons. We chose to modify this isoform of the V0 subunit α since it is present in synaptic vesicles and chromaffin granules (Morel et al, 2003; Poëa-Guyon et al, 2006; Saw et al, 2011). Synaptic transmission was then monitored in connected neuronal pairs before and immediately after the photo-inactivating flash. The recombinant V0 subunit $\alpha 1$ -I (or V1 subunit A) carrying the tetracystein (TC) motif FLNCCPGCCMEP was generated by insertion of the motif between either an N- or C-terminal Flag tag and the $\alpha 1$ coding sequence (figure 1A). Binding of FlAsH-EDT₂, a biarsenical derivative of fluorescein, to the TC motif allows the acute photo-inactivation of the tagged protein when a brief light pulse is delivered (Tour et al., 2003). The insertion of small tags either in N- or C-terminal positions did not modify targeting of the $\alpha 1$ -I subunit to nerve endings (Poëa-Guyon et al, 2006) or to secretory granules in PC12 or chromaffin cells (figures S1 and S5C). In addition, in our experimental conditions, FlAsH-EDT₂ selectively bound to granules in PC12 cells expressing the Flag-TC-tagged $\alpha 1$ -I subunit (figure S1C). Likewise, the subcellular distribution of the V1 subunit A (figure S1E) is not modified by the insertion of a Flag-TC tag at the N-terminal position (figure S1D). These data illustrate that the localization of these recombinant V-ATPase subunits matched that of the endogenous proteins.

Neurons in primary culture were transfected to co-express GFP and the recombinant V-ATPase subunit. The release of neurotransmitter from GFP-expressing neurons was monitored by recording postsynaptic currents elicited by a series of single action potentials delivered at 0.03 Hz to the presynaptic element in neuronal pairs (figures 1B, C and S2), before and after a 1-min photo-inactivating flash. The photo-inactivation procedure did not

affect the base-line neurotransmitter release from neurons that express GFP alone (figure 1C, open circles). In contrast, neurotransmitter release from neurons expressing the TC tagged $\alpha 1$ -I was dramatically decreased after the flash (figure 1C, filled circles). This decrease occurred within 2 min after the flash and the post-synaptic response amplitude then stabilized to a plateau that was maintained for several minutes. This was observed with both GABAergic and glutamatergic neurons expressing the recombinant $\alpha 1$ -I, and the position of the TC tag (N- versus C-terminal) did not affect the outcome of photo-inactivation (figures 1C and S2A). When averaged across the whole data set, the decrease in the post-synaptic response amplitude was $50.3 \pm 6.0 \%$ (Figure 1D, $p < 0.001$, $n = 6$). The observed effect appeared to be independent of the transport of protons by the V-ATPase since incubation of neurons with the specific V-ATPase inhibitor concanamycin A did not impair the base-line neurotransmitter release (spikes frequency of 0.03 Hz) monitored for over 10 min (figure S2B). However, increasing spike frequency to 1Hz in the presence of concanamycin A led to a rapid and important suppression of synaptic transmission (figure S2B) as previously reported (Hong, 2001; Cavelier and Attwell, 2007). In addition, neurotransmitter release from neurons expressing a V1 subunit A with an N-terminal TC tag was not photo-inactivated (data not shown). These data show that the photo-inactivation of the V0 $\alpha 1$ -I subunit of nerve endings results in a rapid (within 2 min) and large (50%) decrease in the release of transmitter, which is independent of the transport of protons by the V-ATPase.

Photo-inactivation of the V0 $\alpha 1$ -I or the V1 A subunits have different effects on the release of catecholamines.

To investigate the mechanisms underlying the decrease in neurotransmission, we conducted similar photo-inactivation experiments on chromaffin cells expressing Flag-TC-tagged V-ATPase subunits. Here we monitored the exocytosis of catecholamines (triggered by KCl

depolarization) by carbon-fiber amperometry (Vitale et al., 2001; Chasserot-Golaz et al., 2005) and gained direct access to several exocytosis parameters (Figure 2C). Catecholamine release from un-transfected or GFP-expressing cells was not affected by incubation with FlAsH-EDT₂ and BAL (2,3-dimercapto-1-propanol) or by illumination (table S3). Furthermore catecholamine release from chromaffin cells expressing recombinant V-ATPase subunits, either the V0 α 1-I subunit with N- or C-terminal tags or the V1 A subunit with an N-terminal Flag-TC tag, was identical to that of un-transfected cells (table S3). This showed that the insertion of the TC and Flag tags in these V-ATPase subunits did not impair the enzyme activity, granule acidification and catecholamine content. We estimated the relative amounts of the endogenous and recombinant V0 α 1 subunits in transfected PC12 cells that co-express the Flag-TC-tagged α 1-I subunit and GFP. The total α 1 subunit content in cells increased by $132 \pm 6 \%$ (n = 3) after transfection, whereas the subunit c content was not affected (figure S4). Considering that only 7 % of cells were effectively transfected in these conditions, we can estimate that the level of recombinant α 1 subunit is 4-5 times higher than that of endogenous α 1 in transfected cells.

Illumination of chromaffin cells transfected with the TC-tagged α 1-I subunit (either in N- or in C-terminal position) modified catecholamine release as shown by the decrease in the exocytotic spike frequency (figure 2A, B, 5 min after flash). Although the total amount of current during the spikes was not modified, the half width was increased and the mean spike amplitude was reduced (figure 2D). In agreement with the notion that spikes were smaller and broader, we also found a significant increase in the rise time value in cells expressing TC-tagged V0 α 1-I and illuminated (figure 2D). Further, significant variations in the pre-spike or foot parameters were observed (figure 2E). Although the percentage of the spikes that presented a detectable foot was not modified (about 25% in the different conditions), chromaffin cells exhibited significantly shorter feet (nearly two-fold reduction in duration)

after photo-inactivation of V0 $\alpha 1$ -I, with a significant reduction in amplitude. Consequently the total foot charge was dramatically reduced after V0 $\alpha 1$ -I photo-inactivation. Altogether these results showed that V0 $\alpha 1$ -I photo-inactivation modifies the fusion pore characteristics as well as the frequency and kinetics of exocytotic events without altering the granule catecholamine content.

Photo-inactivation of the catalytic V1 subunit A yielded dramatically different results. Indeed, no significant changes in the release frequency, nor in the spike or foot parameters were observed when cells were recorded shortly (5 min) after the flash (figure 2A, D). However when cells were recorded 30 min after the flash, a nearly two-fold decrease in the peak current amplitude and in the total amount of current in the spikes was observed, with no significant changes in the spike frequency or kinetics (figure 2A, D). The mean current of the recorded feet was significantly decreased while their duration remained unchanged (figure 2E). These effects most probably reflect an inhibition of proton transport by chromaffin granule V-ATPases since they were very similar to those observed after application of bafilomycin A1, a specific V-ATPase inhibitor (figure 2A, D). Thus, the decrease in current amplitude observed after a 30-min V-ATPase inhibition most likely reflects a decrease in the catecholamine content of granules with no change in the exocytosis itself.

Using siRNAs targeting bovine $\alpha 1$ mRNAs, we reduced the amount of endogenous $\alpha 1$ subunit expressed after 96 h by 60 percent (figure S5A, B). This reduction was associated with modifications of catecholamine release measured by amperometry (figure S5D). All parameters of the amperometric response measured were affected, showing that both the granule catecholamine content and exocytosis were affected. All these defects were effectively rescued by co-expressing the rat $\alpha 1$ -I subunit resistant to the siRNAs targeting the bovine sequence (figure S5D), suggesting that this recombinant subunit is correctly incorporated in a functional granule V-ATPase.

In summary, photo-inactivation of two subunits of the same protein complex resulted in very different alterations in catecholamine release, with inactivation of the V0 α 1-I subunit affecting the fusion pore stability and exocytosis while inactivation of the catalytic V1 A subunit impaired progressively the catecholamine content of secretory granules. This illustrates the exquisite selectivity of the CALI procedure. In addition, the rapidity and temporal control of V0 inactivation allowed by the CALI procedure rendered possible the description of a V0-specific effect on exocytosis occurring before the appearance of the V1-V0-dependent effects on the granular catecholamine content, and this had not been possible after silencing of the endogenous V0 α 1 expression.

Granule exocytosis is inhibited after dissipation of the intra-granular pH gradient.

Even though V-ATPase-dependent proton transport is not required for transmitter release, the intra-granular pH might still be a critical parameter for granule exocytosis. To test this hypothesis, we used neurosecretory PC12 cells and measured in parallel the pH of their secretory granules and exocytosis after various pharmacological treatments expected to affect the intra-granular pH.

Measurements of catecholamine release cannot be used to follow exocytosis since catecholamines leak out into the cytosol when the granular pH raises (Camacho et al, 2006). Therefore we generated a PC12 cell line (2B2) that stably expresses a protein of the granule matrix, chromogranin A, fused with embryonic alkaline phosphatase (CgA-EAP) allowing a sensitive measure of granule exocytosis (Taupenot et al, 2005). This chimeric protein was correctly targeted to chromaffin granules (figure S1) and remained inside the secretory vesicles independently of their internal pH. A second cell line (2B2-95) that stably express CgA-EAP and a V0 α 1-I subunit carrying an N-terminal Flag-TC tag was also generated to allow the purification of the granular V-ATPase.

We took advantage of the pH sensitivity of the fluorescence life-time of the enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) and developed a method that allows the measurement of the intra-granular pH in living PC12 cells (Poëa-Guyon et al, 2013). 2B2 or 2B2-95 PC12 cells were transfected to express CgA-ECFP that was correctly targeted to the secretory granules (Poëa-Guyon et al, 2013). Fluorescence life-time imaging (FLIM) of CgA-ECFP within secretory granules was performed at 37°C on cells incubated with nigericin-containing KCl solutions buffered at varying pH. The fluorescence life-time of CgA-ECFP increased from 1.40 to 2.05 nsec as the pH was raised from pH 5.0 to pH 7.0 (figure 3A). A calibration curve was established for further conversion of the fluorescence life-time data into intra-granular pH values (figure 3A). Under physiological conditions, the intra-granular pH was identical for 2B2 and 2B2-95 cell lines (5.51 ± 0.04 , n=92), showing that expression of a tagged $\alpha 1$ -I subunit did not affect H^+ translocation by the V-ATPase. This value is in good agreement with previously reported determinations measured by alternative methods (Johnson and Scarpa, 1976; Pollard et al, 1979).

Then we used nigericin, NH_4Cl or V-ATPase inhibitors to manipulate the intra-granular pH (figure 3B). Nigericin is a K^+ ionophore that exchanges protons for K^+ . NH_4Cl is in equilibrium with the weak base NH_3 that is membrane permeable and enters acidic compartments where it binds a proton. These two treatments lower the granular pH gradient with little effect on the granular transmembrane potential. Inhibition of V-ATPase activity by specific inhibitors (concanamycin A, bafilomycin A1 and saliphenylhalamide A) blocks proton entry into the granules and the proton gradient progressively dissipates through consumption of internal protons in exchange for substrates by various granular transporters (figure 3B). The FLIM approach allowed repetitive pH measurements, before and after application of the drugs (figure 3D), and estimations of the kinetics of the granular pH changes. From all pH modulators tested, nigericin was the most efficient and raised rapidly

the intra-granular pH to a plateau value of 7.15 ± 0.06 (figure 3C-D). The effect of NH_4Cl on the granular pH was dose-dependent and reversible, with the granular pH going from 6.78 ± 0.04 in the presence of 20 mM NH_4Cl to 5.92 ± 0.05 after the wash (figure 3C). In contrast to nigericin and NH_4Cl , the effect of V-ATPase inhibitors on the granular pH developed slowly (figure 3D) with the granular pH gradient clearly dissipating after 15 min (figure 3C). Hence these different treatments were used to monitor the influence of the granular pH on exocytosis.

Chromaffin granule exocytosis was estimated by measuring CgA-EAP release after depolarization of 2B2 or 2B2-95 PC12 cells. NH_4Cl treatment reduced CgA-EAP release in a dose-dependent manner (figure 4A, B), an effect completely reversed after NH_4Cl wash out, although the reversion was less efficient in the presence of concanamycin A, suggesting that it is partially dependent on V-ATPase activity (figure 4A). Inhibition of CgA-EAP release was even stronger after nigericin treatment (more than 75% inhibition of release), but washing did not reverse this effect (figure 4C). When nigericin-treated cells were washed in the presence of the K^+ ionophore valinomycin (allowing K^+ to escape from secretory granules), a significant recovery of CgA-EAP exocytosis was observed, an effect partially inhibited by concanamycin A (figure 4C). Two v-ATPase inhibitors bafilomycin A1 or concanamycin A, sharing the same binding site on V_0 (Bowman et al, 2006) and having similar effects on V-ATPase activity, did not affect CgA-EAP release (figure 4D). Saliphenylhalamide A, another V-ATPase inhibitor that binds to a different site on V_0 (Xie et al, 2004), decreased CgA-EAP release by 20% (figure 4D). Therefore, with the exception of bafilomycin A1 and concanamycin A, treatments that raise the intra-granular pH inhibited exocytosis of CgA-EAP, an effect that was in a large part reversible (figure 4E).

The effects of intra-granular pH modulators are independent from Ca^{2+} influx, internal calcium stores or ATP metabolism.

Since exocytosis is triggered by the influx of calcium through voltage-dependent calcium channels (VDCCs) that open after cell depolarization, we first tested whether the decreased exocytosis observed in the presence of nigericin or NH_4Cl could be due to a weaker influx of external calcium. When Fura-2 loaded PC12 cells were maintained under resting conditions and in the absence of external calcium, the cytosolic Ca^{2+} concentration remained low and stable even in the presence of 20 mM NH_4Cl . Nigericin triggered a progressive increase in the basal Ca^{2+} level, probably through a release from internal stores (figure 5A), but this cytosolic Ca^{2+} raise was insufficient to trigger any CgA-EAP release (not shown). When cells were depolarized in the presence of calcium, their cytosolic Ca^{2+} levels increased rapidly and remained high as long as the KCl depolarization was maintained (figure 5A). However this Ca^{2+} influx was not affected by nigericin or NH_4Cl treatments (figure 5B). In addition, NH_4Cl inhibited the exocytosis of CgA-EAP to the same extent when it was induced by the calcium ionophore A23187 in the presence of external Ca^{2+} or by KCl depolarization (figure 5C). All these data strongly argue that the inhibitory effects of NH_4Cl and nigericin on exocytosis were not linked to an alteration of the influx of Ca^{2+} through VDCCs.

We then tested the involvement of internal calcium stores on the exocytosis of CgA-EAP either by incubation with thapsigargin, an inhibitor of the reticular calcium pump, or by addition of the calcium ionophore A23187 in the absence of external calcium (figure 5D). These treatments did not trigger any significant increase of the basal CgA-EAP release in resting conditions (not shown). Upon KCl depolarization, CgA-EAP exocytosis was increased after A23187 or thapsigargin treatments, as compared to control conditions (figure 5D), demonstrating that the release inhibition observed after nigericin or NH_4Cl treatments could not be attributed to perturbations of intracellular calcium stores.

Finally we excluded a possible metabolic effect via an inhibition of mitochondrial ATP synthesis since oligomycin A, a specific inhibitor of mitochondrial F1F0-ATPase, induced

only a moderate inhibition of CgA-EAP release (figure S6A). Valinomycin, a K⁺ ionophore, had no effect on CgA-EAP exocytosis (figure S6B).

Altogether these experiments showed that nigericin and NH₄Cl treatments had an effect on CgA-EAP release, which was independent from Ca²⁺ influx, depletion of internal calcium stores or ATP metabolism. Since the inhibition of CgA-EAP release after nigericin or NH₄Cl treatments appeared to be correlated to variations of the intra-granular pH (figure 4E), we propose that the intrinsic exocytotic machinery could be controlled by the intra-granular pH status.

V-ATPase, a sensor of intra-granular pH for the exocytotic machinery?

In marked contrast with the granular pH elevation induced by nigericin or NH₄Cl treatments, the inhibition of V-ATPase activity by bafilomycin A1 and concanamycin A induced a dissipation of the granular pH gradient that was not associated with a modification of CgA-EAP release (figure 4E). To test if binding of these V-ATPase inhibitors directly perturbs the control of exocytosis by the intra-granular pH, cells were incubated with V-ATPase inhibitors prior to nigericin or NH₄Cl treatments. Indeed pre-incubation with V-ATPase inhibitors, which did not significantly alter the effect of nigericin or NH₄Cl treatments on the intra-granular pH (not shown), impacted their effect on CgA-EAP release. Inhibition of CgA-EAP release by 20 mM NH₄Cl (figure 6A) or nigericin (figure 6B) was less pronounced after a pre-incubation with bafilomycin A1, concanamycin A or saliphenylhalamide A. Notably, binding of bafilomycin A1 to the V-ATPase V0 domain protected CgA-EAP release more efficiently than binding of saliphenylhalamide A, in both treatments.

Since the V1 and V0 domains of V-ATPase can reversibly dissociate in different physiological situations (Toei et al, 2010), we tested if the V1-V0 association was modified in conditions affecting the intra-granular pH. We estimated the relative amounts of V1

associated to V0 in chromaffin granules isolated from the 2B2-95 PC12 cell line, under resting conditions or after a 15 min incubation with nigericin or bafilomycin A1 (figure 6C). Cells were treated while attached to collagen-coated culture flasks. After the 15 min incubation, V1-V0 interacting domains were cross-linked by DSP (see Morel et al, 1998) to preserve their association during disruption of the cells and isolation of chromaffin granules in sucrose density gradients. Granules were followed by their CgA-EAP content. The amount of V0 was estimated by probing the endogenous V0 c subunit or the α 1-I subunit carrying a Flag tag on western blots. V1 was detected using antibodies to the catalytic A subunit. After normalization at equal V0 contents, the relative amount of A subunit associated to chromaffin granules after nigericin treatment significantly increased compared to the resting conditions ($254 \pm 37 \%$, $n=3$), while it was lower after bafilomycin A1 binding (figure 6C). The amount of A associated to granules after nigericin treatment was about 300 % of that found after incubation with bafilomycin A1 (figure 6F, G). When cells were pretreated with bafilomycin A1 prior to nigericin treatment, the amount of A associated to the granules was only increased by about 50% (figure 6D, E), indicating that bafilomycin A1 binding to V0 favored the dissociation of V1 from V0. In contrast larger amounts of A were associated to granules after saliphenylhalamide binding (figure 6E), in accordance with previous data obtained with the salicylhalamide A analogue (Xie et al, 2004).

These results suggest that the intra-granular pH regulates the dissociation of V1 from V0. Acidic pH, or bafilomycin A1 binding to V0, favors V1 dissociation, rendering V0 free for other protein interactions that might be important for the exocytotic machinery.

Discussion

Most of the standard cell biology approaches (e.g. RNA interference, dominant negative mutants) are difficult to use to probe the function of V0 in exocytotic membrane fusion

because of its ubiquitous and essential role in proton translocation, which is important for cell viability, many cellular processes and required for secretory vesicle loading. Nevertheless, a direct additional role of V0 in exocytosis has been suggested after the observation that impairment of an organelle-specific isoform of the V0 α subunit generated exocytotic membrane fusion deficits that other subunit α isoforms were unable to rescue, while these subunit α isoforms were able to compensate for organelle acidification (Hiesinger et al, 2005; Liegeois et al, 2006). But it remained difficult to completely rule out indirect effects since other acidic compartments and membrane traffic events were affected in these experiments (Liegeois et al, 2006; Williamson et al, 2010). Hence we have set up an acute and selective inactivation of V0 to by-pass such limitations by using the chromophore assisted light inactivation (CALI) technology. This approach is known to allow acute and temporally controlled inactivation of a TC-tagged protein (Tour et al, 2003; Jacobson et al, 2008). Excitation of the chromophore FLAsH-EDT₂ bound to the TC-motif leads to irreversible damage of the tagged protein. The destructive effects of CALI are mediated by a singlet-oxygen within a radius of 3-50 nm (Tour et al., 2003; Yan et al, 2006) so that only the protein of interest is inactivated (Marek and Davis, 2002). This is especially evident in our results since the photo-inactivation of two subunits within the same protein complex, the V0 α 1-I or the V1 α subunits, led to clearly different functional alterations of synaptic transmission and granule exocytosis, in spite of the fact that the TC motifs were exposed to the cytosol in both cases.

The photo-inactivation of the presynaptic V0 α 1-I subunit in neurons resulted in a rapid and dramatic decrease of neurotransmitter release. Similarly, the inactivation of the chromaffin granule V0 α 1-I subunit modified catecholamine release as shown by the decrease in exocytotic spike frequency. In these experiments, the recombinant TC tagged α 1-I subunit was estimated to be 4-5 times more abundant than the endogenous protein (figure S4),

correctly addressed to the granules and able to rescue V-ATPase activity after silencing of the endogenous subunit (figure S5). Therefore most of the V0 should contain the recombinant subunit and be inactivated. The fact that we observed no complete loss of neurotransmission or catecholamine release suggests that either the photo-inactivation of V0 results in a partial loss of function or alternatively, that V0 might be a modulator of the membrane fusion machinery (Di Giovanni et al, 2010).

Amperometric recordings have shown that the inactivation of $\alpha 1$ -I affects the exocytotic spike frequency but also their kinetics, with a broadening of the spikes and shortening of the foot current duration. V0 inactivation therefore affects the fusion pore stability and slows down the membrane fusion process. Hence V0 could participate in the organization of the fusion pore, possibly via V0-SNAREs interactions (Galli et al, 1996; Morel et al, 2003; Hiesinger et al, 2005; Di Giovanni et al, 2010). V0 could also speed up membrane fusion by favoring lipid mixing between the interacting membranes (Strasser et al, 2011) and the expansion of the fusion pore. In agreement with the later hypothesis, V0 contains a hexameric proteolipid ring made of very hydrophobic subunits that are soluble in organic solvents (Israël et al, 1986) and mutations impairing lipid mixing were identified in these subunits (Strasser et al, 2011).

The role of V0 on secretory vesicle exocytosis is independent of proton transport since the photo-inactivation of the V1 catalytic A subunit or the blockade of proton transport by bafilomycin A1 did not affect exocytosis itself but only led to a delayed decrease of the granule catecholamine content resulting from the progressive dissipation of the granular pH gradient (see figure 3) and catecholamine leakage into the cytosol (Camacho et al, 2006).

Nevertheless, independently of proton transport itself, the intra-granular pH might be important for exocytosis as shown in a number of different organelle traffic events (Kuijpers et al, 1989; Ungerman et al, 1999; Barg et al, 2001; Camacho et al, 2006; but see Cousin and Nicholls, 1997). Using CgA-EAP release as a marker for granule exocytosis we found that

nigericin or NH_4Cl treatments inhibited exocytosis while CgA-EAP granule content was unaffected. This inhibition was not due to a modification of the influx of Ca^{2+} through voltage-dependent calcium channels and intracellular Ca^{2+} levels during depolarization (figure 5A, B), nor to an alteration of internal calcium stores (figure 5D), nor to an altered mitochondrial ATP synthesis (figure S6). The cytosolic pH, which was not modified after incubation with bafilomycin A1 and slightly raised after NH_4Cl or nigericin treatments (not shown), remained within a physiological range that does not affect exocytosis (Thomas et al, 1993; Lindgren et al, 1997). Therefore granule exocytosis impairment after NH_4Cl or nigericin treatments appeared to be directly related to the rise in the intra-granular pH, an efficient exocytosis requiring acidic granules. We propose that the intra-granular pH regulates the exocytotic machinery by inducing V0 conformational changes. At acidic intragranular pH, V0 would be in a “fusion-permissive” conformation that favors exocytosis. In addition, bafilomycin A1 or concanamycin A binding to V0 would stabilize this “fusion-permissive” conformation, both inhibitors sharing the same binding site on V0 (Bowman et al, 2006). This would explain why inhibiting the V-ATPase activity with bafilomycin A1 or concanamycin A dissipated the granular pH gradient without affecting exocytosis; while saliphenylhalamide A, that binds to a different site on V0 (Xie et al, 2004), affected both the granular pH and exocytosis. This would also explain why a pre-incubation with bafilomycin A1 or concanamycin A partially protected exocytosis from the inhibition due to NH_4Cl or nigericin (figure 6). At acidic pH, or after binding of bafilomycin A1, V0 appeared to be in a conformation that favors the dissociation of the catalytic V1 domain whereas, at neutral pH, V0 is in association with V1 (figure 6). Similarly, the alkalization of yeast vacuoles has previously been shown to increase V1 association (Shao and Forgac, 2004). Saliphenylhalamide A, in contrast to bafilomycin A1, increased the V0-V1 association (figure 6), as previously reported with its analogue salicylhalamide A (Xie et al, 2004). This strongly

suggests that what accounts for the reduced exocytosis is a conformational state of V0 after bafilomycin A1 binding, rather than the inhibition of V-ATPase activity. Mutagenesis of yeast vacuole V0 proteolipid subunits identified amino acids that are important for membrane fusion (Strasser et al, 2011), some of them being part of the bafilomycin A1 binding site (Bowman et al, 2006). The identified mutations were also shown to modify the association of V0 with V1 (Strasser et al, 2011). Reversible dissociation of the V1 and V0 V-ATPase domains occurs in various physiological situations as a means to regulate the enzymatic activity (Forgac, 2007; Toei et al, 2010 for reviews). Upon V-ATPase dissociation, the V1 subunit C is released and V1 (minus subunit C) is detached from V0; their reassociation to V0 is an energy consuming process that requires the cytosolic RAVE protein complex (Smardon and Kane, 2007). Recent structural data suggested that the insertion of subunit C within the V1-V0 complex requires “spring loading” structural constraints (Oot et al, 2012). Inversely, a minor structural deformation transmitted to subunit C should be sufficient to dissociate V1 (Stewart and Stock, 2012). The V0 subunit a, which interacts with subunit C via its cytoplasmic domain (Oot and Wilkens, 2012), is a good candidate to link intra-granular pH changes and conformational changes of the proteolipid subunits to the V1-V0-subunit C interface.

The dissociation of V1 renders V0 free to interact with other proteins. This could allow the recruitment of ARNO (cytohesin-2) and the GTPase Arf6 to the membrane by the V-ATPase, which has been proposed as a sensing mechanism of endosomal pH (Hurtado-Lorenzo et al, 2006; Hosokawa et al, 2013). Interestingly Arf6 has been shown to modulate exocytosis in various cellular models including chromaffin cells mainly through the production of fusogenic lipids (Vitale et al., 2002; Aikawa and Martin, 2003; Béglé et al, 2009; Bader and Vitale, 2009). The possibility that the association/dissociation of V0-V1 also contributes in part to the regulation of fusogenic lipid synthesis through the ARNO-Arf6-PLD pathway remains

however to be established. V0 has also been shown to interact with SNAREs. The association of V0 with the v-SNARE VAMP-2 occurs probably as a *cis*-complex within the same neurosecretory vesicles (Galli et al, 1996; Morel et al, 2003; Di Giovanni et al, 2010). Since this V0-VAMP-2 interaction persists when VAMP-2 is engaged in a SNARE complex (Morel et al, 2003), the V0-VAMP-2 complex could remain operative during the late steps of membrane fusion. An interaction of V0 with the t-SNARE syntaxin-1 has also been reported (Hiesinger et al, 2005). It is probably not relevant as an intra-vesicular pH sensing mechanism since it involves either a *trans*-interaction between a vesicular V0 and syntaxin-1 in the presynaptic membrane, and therefore concerns a limited number of already docked synaptic vesicles, or a *cis*-interaction within the presynaptic plasma membrane, unrelated to secretory vesicles, since V0 is also present within the nerve terminal plasma membrane (Morel et al, 2003). It should be stressed here that only one or two molecules of V-ATPase are present per synaptic vesicle (Hicks and Parsons, 1992), as compared to about 30 VAMP-2 molecules (Takamori et al, 2006). This places these one or two V0 molecules in a strategic position. The role of V0 in sensing the intra-vesicular pH probably concerns a priming step that confers to secretory granules the competence for release, before the formation of *trans*-SNARE complexes (Ungerman et al, 1999; Barg et al, 2001). The role of V0 in controlling fusion pore stability and membrane lipid mixing, based on yeast vacuole fusion experiments, should occur after *trans*-SNARE pairing (Peters et al, 2001; Strasser et al, 2011).

Estimates of the amount of transmitter released by single exocytotic events and of the size of vesicles suggest that, in accordance with the quantal hypothesis, fully loaded vesicles are released in preference to partially filled ones (Albillos et al, 1997; Bruns et al, 2000; Tabares et al, 2001). Since in many synapses post-synaptic receptors are not saturated by the released neurotransmitter, the control of the neurotransmitter content of synaptic vesicles is critical for neuronal function (Edwards, 2007). As discussed earlier (Edwards, 2007), synaptic vesicle

exocytosis does not appear to be influenced by the inhibition of vesicular neurotransmitter transporters, and therefore by the vesicular neurotransmitter concentration. Sensing the loading status of synaptic vesicles might therefore rely on V-ATPase conformational changes in response to variations of the intra-vesicular pH. The V0 domain might be of decisive importance in signaling to the exocytotic machinery if a synaptic vesicle is undergoing neurotransmitter reloading (i.e. consuming its pH gradient) or if it is fully loaded (i.e. acidic) and ready to be released into the synaptic cleft (Morel, 2003).

Materials and methods

Reagents

The following reagents were obtained from Sigma: bafilomycin A1, concanamycin A, oligomycin A, valinomycin, thapsigargin, ionophore A23187, BAL (2,3-dimercapto-1-propanol), proteases inhibitor cocktail (P8340). Nigericin was from Tocris. Saliphenylhalamide was a generous gift of Dr De Brabander (Texas University, USA). FlAsH-EDT₂ was purchased from Invitrogen or had been synthesized for us by Orga-Link according to Adams and Tsien (2008). Antibodies to rat V0 c-subunit were a generous gift of Pr S. Okhuma (Kanazawa, Japan). Affinity-purified antibodies to the V1 A and V0 a1 subunits were prepared in the lab as described (Morel et al, 2003; Poëa-Guyon et al, 2006). Anti-Flag and anti-embryonic alkaline phosphatase (EAP) antibodies were from Sigma and Millipore, respectively. Dithiobis-succinimidyl propionate (DSP) was obtained from Pierce. Fura2-AM and BCECF-AM were from Invitrogen and Molecular Probes, respectively.

Plasmids

The following plasmids were used to direct the expression of recombinant proteins. All inserted coding sequences and the junctions with the vectors were verified by sequencing. Plasmids p104, p165 and p166 contain the coding sequences for Flag-TC-a1-I, a1-I-TC-Flag and Flag-TC-A (respectively) inserted in the pIRES-hr-GFP 1a bi-cistronic expression vector (Stratagene) and direct the co-expression of the recombinant proteins and of EGFP. In all cases the sequence encoding the TC tag (peptide FLNCCPGCCMEP containing the tetracysteine motif; Martin et al, 2005) was inserted by restriction between the Flag tag and the subunit sequence. Plasmid pcDNA6-CgA-EAP, obtained from Dr L. Taupenot (Taupenot et al, 2005), was used to generate PC12 cell clones that stably express CgA-EAP. Plasmid p95 contains the Flag-TC-a1-I coding sequence inserted in the p3xFlag-CMV26 vector (Sigma) that confers resistance to the antibiotic G418.

Photo-inactivation of the V0 α 1-I subunit and synaptic transmission.

Primary cultures of rat hippocampal neurons or mouse cortical neurons were performed essentially as described previously (Goslin et al, 1998; Poëa-Guyon et al, 2006). Neurons were transfected at 7 days in vitro with the indicated plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. They were used 7 to 12 days after transfection. Coverslips containing transfected and untransfected neurons were transferred to a recording chamber and continuously perfused with a bubbled (95%O₂/5%CO₂) ACSF containing (in mM): 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, 2 CaCl₂, 1.5 KCl, 1.5 MgSO₄ and 1.25 KH₂PO₄ (pH 7.5, 310-320 mOsm, at 37°C). Stable whole-cell pair recordings were obtained under video-enhanced DIC using an upright microscope (Zeiss Axioscop 2 FS+). Patch pipettes (of 5-7 M Ω resistance) contained the following intracellular solution (in mM): 140 K-gluconate, 10 HEPES, 4 ATP, 2 MgCl₂, 0.4 GTP and 0.5 EGTA (pH 7.3 adjusted with KOH, 280-290 mOsm). A single action potential was elicited in transfected neurons expressing GFP (by a brief depolarizing step under current-clamp) in order to generate a postsynaptic response in a neighboring un-transfected neuron (recorded under voltage-clamp). Synaptically-connected neurons were exposed to 1 μ M FlAsH-EDT₂ (diluted in O₂/CO₂-saturated aCSF) for 10 min. Then neurons were perfused with 1 mM BAL. Finally, whole-field illumination was achieved through the microscope 40x objective for 1 min to allow the photoinactivation of the TC-tagged v-ATPase subunits (light was delivered by a 120 W xenon lamp, X-Cite 120Q from Exfo via an optical fiber). Pre-synaptic action potentials and post-synaptic currents were continuously monitored, before and after the photo-inactivating flash. Post-synaptic responses were expressed as a percent of the mean amplitude of post-synaptic currents recorded during the 5 min preceding the flash. Only neuronal pairs showing stable baseline prior to flash and changes in resting membrane potential inferior to 25% were kept for analysis.

Photo-inactivation of V0 a1-I and V1 A subunits and catecholamine release.

Freshly dissected primary bovine chromaffin cells were cultured in DMEM in the presence of 10 % fetal calf serum, 10 μ M cytosine arabinoside, 10 μ M fluorodeoxyuridine and antibiotics as described previously (Vitale et al., 1993). Bicistronic plasmids expressing v-ATPase subunits and GFP were introduced into chromaffin cells (5×10^6 cells) by Amaxa Nucleofactor systems (Lonza) according to manufacturer's instructions. 48h/72h after transfection, cells were exposed to 1 μ M FlAsH-EDT₂ in Locke's buffer for 10 min and subsequently incubated with 1 mM BAL for 10 min. Locke's buffer is composed of 140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 15 mM HEPES and 11 mM glucose, pH 7.4). Medium was replaced with Locke's buffer before a 1 min illumination through the microscope set-up using a BLCC-2 high power LED (Prizmatix). Catecholamine secretion was evoked by applying K⁺ (100 mM) in Locke's solution without ascorbic acid for 10 s to single cells by mean of a glass micropipette positioned at a distance of 30-50 μ m from the cell. Electrochemical measurements of catecholamine secretion were performed using 5 μ m diameter carbon-fiber electrodes (ALA Scientific) held at a potential of +650 mV compared with the reference electrode (Ag/AgCl) and approached closely to the transfected cells essentially as described previously (Chasserot-Golaz et al., 2005). Amperometric recordings were performed with an AMU130 (Radiometer Analytical) amplifier, sampled at 5 kHz, and digitally low-pass filtered at 1 kHz. Analysis of amperometric recordings was done with a macro (obtained from Dr. R. Borges laboratory; <http://webpages.ull.es/users/rborges/>) written for Igor software (Wavemetrics), allowing automatic spike detection and extraction of spike parameters. The number of amperometric spikes was counted as the total number of spikes with an amplitude > 5 pA.

Generation of PC12 cell lines and CgA-EAP exocytosis measurements.

PC12 cells were transfected with the plasmid pcDNA6-CgA-EAP 48 h before selection for blasticidin S resistance (essentially as in Taupenot et al, 2005). PC12 cells were cultivated in high glucose DMEM containing L-glutamine (Invitrogen) with 10% horse serum (Sigma), 5% fetal bovine serum (Biowest), penicillin and streptomycin (Invitrogen). Cells, seeded on rat tail collagen type I (Jacques Boy Institute) coated plastic dishes ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$), were transfected with the plasmid pcDNA6-CgA-EAP (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Blasticidin S-resistant PC12 colonies were selected with cloning rings and further grown in 24-well collagen-coated culture plates, in the continuous presence of $10\mu\text{g}/\text{ml}$ blasticidin S. Clones were screened for regulated CgA-EAP release by chemiluminescence. The 2B2 cell line was selected and used throughout this work. It was also transfected with plasmid p95 that confers resistance to Geneticin G418 ($0.5\text{ mg}/\text{ml}$) to generate the 2B2-95 cell line that stably express CgA-EAP together with the Flag-TC-a1-I V0 subunit. Detection of EAP activity release from CgA-EAP expressing PC12 cells was achieved by chemiluminescence using the Phosphor-light assay (Roche, Applied Biosystems), according to manufacturer's instructions, in a Berthold Mithras microplate luminometer. Briefly, cells were grown in collagen-coated 24-well culture plates for 48 hours to 60-90 % confluency. They were incubated at 37°C in $300\mu\text{l}/\text{well}$ of the physiological medium M (128 mM NaCl , 5 mM KCl , 1 mM MgCl_2 , $1\text{ g}/\text{l}$ glucose, 10 mM HEPES , 10 mM NaHCO_3 , $2\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.35) with or without drugs as indicated. Basal release was measured at 37°C in $150\mu\text{l}/\text{well}$ of medium M after a 5 or 15 min incubation. Evoked release was measured after a 5 or 15 min incubation at 37°C in the stimulation medium S (63 mM NaCl , 70 mM KCl , 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , $1\text{ g}/\text{l}$ glucose, 10 mM HEPES , 10 mM NaHCO_3 , $2\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.35). In these conditions, 2B2 and 2B2-95 cells displayed a 10-fold increase in CgA-EAP release after cell depolarization. CgA-EAP release (measured in triplicate) was expressed as a percentage of total EAP activity

within the cells before stimulation. Total cellular EAP activity is the sum of the released EAP activity plus the activity remaining in the cells (measured after 0.2 % Triton X100 addition). It was not affected by the various pharmacological treatments used in this work.

Fluorescence life-time imaging (FLIM) of intra-granular pH.

ECFP was amplified by high fidelity PCR from the pECFP-N1 vector (Clontech) with a forward primer designed to introduce a Kpn I restriction site just before the initial ATG and a reverse primer introducing the Not I restriction site just downstream from the TAA stop codon. The amplified ECFP sequence was inserted into the pcDNA6-CgA-EAP vector (see above) in place of the EAP coding sequence using the Kpn I/Not I restriction sites. 2B2 or 2B2-95 PC12 cells, cultured on poly-L-ornithine coated glass slides, were transfected with the CgA-ECFP encoding vector using lipofectamine 2000 (10µg DNA/25 µl lipofectamine 2000, Invitrogen), and experiments were performed 48 h post-transfection. PC12 cells were incubated at $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ in the physiological medium M with or without 5 µM nigericin, NH_4Cl (5, 10 or 20 mM in place of equivalent amounts of NaCl), or 0.4 µM of V-ATPase inhibitors (bafilomycin A1, concanamycin A or saliphenylhalamide A). For pH calibration, cells were incubated in buffers containing 15 mM MES, 15 mM HEPES, 140 mM KCl and 10 µM nigericin at pH ranging from 5 to 7.5. Time-resolved laser scanning TCSPC microscopy was performed on a home-made setup based on a TE2000 microscope equipped with a x60, 1.2NA water immersion objective and a fiber coupled C1 scanning head (Nikon) already described in detail elsewhere (Erard et al 2013). The FLIM setup allows real-time monitoring of ECFP lifetime variations, and provides highly reproducible results (Poëa-Guyon et al, 2013).

Fura-2 imaging.

Cells plated on poly-ornithine coated coverslips were loaded with 5 µM Fura2-AM in HBSS for 30 min (37°C) and rinsed for 10 min with fresh culture medium (DMEM containing 10%

fetal bovine serum). Coverslips were mounted in a perfusion chamber in medium M (see above) prior to imaging with a videomicroscope (Leica DMI 6000) fitted with a high-speed filter changer (Lambda DG4; Sutter Instruments, Novato, CA) to rapidly change excitation between 340 and 380 nm, and fluorescence emission was collected at 510 nm by a bandpass filter. Acquisition of fluorescence and image analysis were performed using a digital imaging system (Simple PCI, Hamamatsu). The fluorescence ratio for 340 and 380 nm excitation ($R_{340/380}$) was measured at 2s intervals during perfusion with medium M, alone or with 5 μ M nigericin, 0.4 μ M bafilomycin A1 or 20 mM NH_4Cl and after switching to the stimulation medium S (with or without the drugs) for 5 min.

BCECF imaging.

Intracellular pH of PC12 cells was determined using BCECF according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Briefly, plated cells were incubated for 1 hour (at RT) in HBSS containing 2 μ M BCECF-AM and rinsed for 1 hour with fresh culture medium (at 37°C). Coverslips were mounted in the perfusion chamber as described for Fura-2 imaging in the videomicroscope (excitation filters: 440AF21 for 440nm and 490DF20 for 490nm, and an emission filter 535DF25). The fluorescence ratio for 490 and 440 nm excitation ($R_{490/440}$) was measured at 20s intervals. For cytosolic pH calibration, cells were perfused with 10 μ M nigericin containing buffers (see FLIM), and $R_{490/440}$ was determined at five different pH values (between 6.8 and 7.6).

Association of the V1 A-subunit to secretory granules.

The 2B2-95 PC12 cells were grown in 75 cm² collagen-coated culture flasks to about 70-90 % confluency. They were washed with 10 ml of medium M (see above) and incubated with the indicated drugs in medium M for 15 min at 37°C. V1-V0 cross-linking (Morel et al, 1998) was then performed at 20-22°C for 30 min in the presence of the various drugs in medium M that also contained DSP (1 mM, from a freshly prepared 0.6 M solution in DMSO). Un-

reacted DSP was then quenched by the addition in the culture flasks of 0.5 ml 0.5 M Tris buffer pH 7.5 (25 mM final concentration) for 15 min at 20-22°C. Cells were then harvested by scraping the flasks and pelleting the cells (800 g_{max} for 10 minutes). Cells were resuspended in 2 ml (for cells from a 75 cm² flask) of the fractionation medium F (300 mM sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris buffer, final pH 7.4) supplemented with a mix of protease inhibitors (Sigma). They were disrupted in a cell homogenizer (16 µm clearance bead, Isobiotec). The lysate was centrifuged (800 g_{max} for 10 min). The supernatant was layered on top of a semi-continuous sucrose gradient made of 4 layers that were allowed to diffuse (1.5 ml of 1.4, 1.2 and 1.0 M sucrose and 3 ml of 0.8 M sucrose, in 1 mM EGTA, 10 mM Tris buffer, final pH 7.4). After centrifugation (40 000 rpm for 120 min in the Beckman SW41 rotor), 0.5 ml fractions were collected and tested for CgA-EAP activity by chemiluminescence and sucrose concentration by refractometry. The granule-containing fractions, identified as a peak of EAP activity at about 1.2 M sucrose, were pooled, diluted in medium F and granules were pelleted (45 000 rpm for 60 min, TI50 Beckman rotor). Granule-containing pellets were resuspended in the SDS-lysis buffer (containing 5% 2-mercaptoethanol) and heated at 95°C for 5 min. Proteins were separated by electrophoresis in 5-15% acrylamide gradient gels, electro-blotted onto nitrocellulose and blots were probed with anti-A, anti-c or anti-Flag antibodies. Immuno-reactive bands were visualized after secondary peroxidase-conjugated antibody binding by chemiluminescence (Supersignal West pico or dura, Pierce). Band luminescence was captured in a GeneGnome imager and quantified using the Genesnap software (Syngene Bio Imaging, Ozyme).

Immunostaining.

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and labeled with a rabbit polyclonal anti-Flag antibody (Sigma) and FITC-labeled goat anti-rabbit antibody (Molecular Probes) or a mouse

monoclonal anti-EAP antibody (Millipore) and Alexa568-labelled goat anti-mouse antibody (Molecular Probes).

Statistical analysis: Data are presented as mean values $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons (Student t test) were performed with the Graph Pad Prism 4 software. Significant differences were marked * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$).

Supplemental material contains 5 figures and 1 table illustrating the granular targeting of recombinant proteins, the effect on synaptic transmission of the photo-inactivation of the V0 $\alpha 1$ -I subunit carrying a C-terminal TC-tag, the lack of effects on catecholamine release of the CALI procedure or expression of recombinant proteins, the effect on catecholamine release of the silencing of endogenous $\alpha 1$ subunit and its rescue by co-expression of the recombinant rat $\alpha 1$ -I subunit, and a control experiment illustrating the effect of F1F0-ATPase inhibition on CgA-EAP exocytosis.

Acknowledgments

We thank V. Rousseau and Dr J-V. Barnier for help on the videomicroscope set-up used for Fura-2, BCECF and FM1-43 imaging, Dr S. O'Reagan for improving our manuscript, Dr L. Taupenot for the pcDNA6-CgA-EAP plasmid, T. Thahouly for chromaffin cell culture and Dr De Brabander for providing us with saliphenylhalamide A. This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (grant ANR-09-blanc-0264-04 to N.V. and N.M.).

REFERENCES

- Adams, S.R., and Tsien, R.Y. (2008). Preparation of the membrane-permeant biarsenicals FlAsH-EDT2 and ReAsH-EDT2 for fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins. *Nature Protocols* 3, 1527-1534.
- Aikawa, Y., and Martin TF. (2003). ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *J Cell Biol.* 162:647-659.
- Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G., and Lindau, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature.* 389, 509-512.
- Bader, M.F., and Vitale, N. (2009). Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1791, 936-41.
- Barg, S., Huang, P., Eliasson, L., Nelson, D.J., Obermüller, S., Rorsman, P., Thévenod, F., and Renström, E. (2001). Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl(-) uptake and acidification. *J. Cell Sci.* 114, 2145-2154.
- Bowman, B.J., McCall, M.E., Baertsch, R., and Bowman, E.J. (2006). A model for the proteolipid ring and bafilomycin/concanamycin-binding site in the vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 281(4) :31885-93.
- Béglé, A., Tryoen-Tóth, P., de Barry, J., Bader, M.F., and Vitale, N. (2009). ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.*, 284, 4836-45.

Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J., and Jahn, R. (2000). Quantal release of serotonin. *Neuron* 28, 205-20.

Camacho, M., Machado, J.D., Montesinos, M.S., Criado, M., and Borges, R. (2006). Intragranular pH rapidly modulates exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* 96, 324-34.

Cavelier, P. and Attwell, D. (2007). Neurotransmitter depletion by bafilomycin is promoted by vesicle turnover. *Neuroscience Lett.* 412, 95-100.

Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., Umbrecht-Jenck, E., Knight, D., Gerke, V., and Bader, M.F. (2005). Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol. Biol. Cell.* 16(3), 1108-19.

Cousin, M.A. and Nicholls, D.G. (1997). Synaptic vesicle recycling in cultured cerebellar granule cells: role of vesicular acidification and refilling. *J. Neurochem.* 69(5), 1927-35.

Di Giovanni, J., Boudkkazi, S., Mochida, S., Bialowas, A., Samari, N., Lévêque, C., Youssouf, F., Brechet, A., Iborra, C., Maulet, Y., Moutot, N., Debanne, D., Seagar, M., and El Far, O. (2010). V-ATPase membrane sector associates with synaptobrevin to modulate neurotransmitter release. *Neuron* 67, 268-79.

Edwards, R.H. (2007). The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* 55, 835-58.

El Far, O., and Seagar, M. (2011). A role for V-ATPase subunits in synaptic vesicle fusion ? *J. Neurochem.* 117, 603-12.

Erard, M., Fredj, A., Pasquier, H., Betolngar, B.D., Bousmah, Y., Derrien, V., Vincent, P., and Merola, F. (2013). Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging. *Molecular Biosystems* 9, 258-67.

Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(11), 917-29.

Füldner, H.H. and Stadler, H. (1982). ³¹P-NMR analysis of synaptic vesicles. Status of ATP and internal pH. *Eur. J. Biochem.* 121(3), 519-24.

Galli, T., McPherson, P.S., and De Camilli, P. (1996). The V0 sector of the V-ATPase, synaptobrevin, and synaptophysin are associated on synaptic vesicles in a Triton X-100-resistant, freeze-thawing sensitive, complex. *J. Biol Chem.* 271(4), 2193-8.

Goslin, K., Asmussen, H. and Banker, G. (1998). Rat hippocampal neurons in low-density culture. In *Culturing Nerve Cells*, Banker G. and Goslin K. ed. (2nd ed., MIT Press, Cambridge, MA), pp. 339-370.

Hicks, B.W. and Parsons, S.M. (1992). Characterization of the P-type and V-type ATPases of cholinergic synaptic vesicles and coupling of nucleotide hydrolysis to acetylcholine transport. *J. Neurochem.* 58(4), 1211-20.

Hiesinger, P.R., Fayyazuddin, A., Mehta, S.Q., Rosenmund, T., Schulze, K.L., Zhai, R.G., Verstreken, P., Cao, Y., Zhou, Y., Kunz, J., and Bellen, H.J. (2005). The v-ATPase V0 subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. *Cell*, 121(4), 607-20.

Hong, S.J. (2001). Reduction of quantal size and inhibition of neuromuscular transmission by bafilomycin A. *Neuropharmacol.* 41, 609-17.

Hosokawa, H., Dip, P.V., Merkulova, M., Bakulina, A., Zhuang, Z., Khatri, A., Jian, X., Keating, S.M., Bueler, S.A., Rubinstein, J.L., Randazzo, P.A., Ausiello, D.A., Gruber, G., and Marshansky, V. (2013). The N-terminus of α -Subunit Isoforms is Involved in Signaling between V-ATPase and Cytohesin-2. *J. Biol. Chem.* 288(8), 5896-913.

Hurtado-Lorenzo, A., Skinner, M., El Annan, J., Futai, M., Sun-Wada, G.H., Bourgoïn, S., Casanova, J., Wildeman, A., Bechoua, S., Ausiello, D.A., Brown, D., and Marshansky, V. (2006). V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat. Cell Biol.* 8, 124-36.

Israël, M., Morel, N., Lesbats, B., Birman, S., and Manaranche, R. (1986). Purification of a presynaptic membrane protein that mediates a calcium-dependent translocation of acetylcholine. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 83(23), 9226-30.

Jacobson, K., Rajfur, Z., Vitriol, E., and Hahn, K. (2008). Chromophore-assisted laser inactivation in cell biology. *Trends in Cell Biol.* 18, 443-50.

Jahn, R., and Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* 490, 201-7.

Johnson, R.G., and Scarpa, A. (1976). Internal pH of isolated chromaffin vesicles. *J. Biol. Chem.* 251(7), 2189-91.

Kuijpers, G.A., Rosario, L.M., and Ornberg, R.L. (1989). Role of intracellular pH in secretion from adrenal medulla chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 264, 698-705.

Liégeois, S., Benedetto, A., Garnier, J.M., Schwab, Y., and Labouesse, M. (2006). The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 173(6), 949-61.

- Lindgren, C.A., Emery, D.G., and Haydon, P.G. (1997). Intracellular acidification reversibly reduces endocytosis at the neuromuscular junction. *J. Neurosci.* 17(9), 3074-84.
- Marek, K.W., and Davis, G.W. (2002). Transgenically encoded protein photoinactivation (FlAsH-FALI): acute inactivation of synaptotagmin I. *Neuron* 36(5), 805-13.
- Martin, B.R., Giepmans, B.N., Adams, S.R., and Tsien, R.Y. (2005). Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat. Biotechnol.* 23(10), 1308-14.
- Michaelson, D.M., and Angel, I. (1980). Determination of delta pH in cholinergic synaptic vesicles: its effect on storage and release of acetylcholine. *Life Sci.* 27(1), 39-44.
- Morel, N., Gérard, V., and Shiff, G. (1998). Vacuolar H⁺-ATPase domains are transported separately in axons and assemble in Torpedo nerve endings. *J. Neurochem.* 71, 1702-8.
- Morel, N., Dunant, Y., and Israël, M. (2001). Neurotransmitter release through the V0 sector of V-ATPase. *J. Neurochem.* 79, 485-8.
- Morel, N. (2003). Neurotransmitter release: the dark side of the vacuolar-H⁺ATPase. *Biol. Cell*, 95(7), 453-7.
- Morel, N., Dedieu, J.C., and Philippe, J.M. (2003). Specific sorting of the $\alpha 1$ isoform of the V-H⁺ATPase a subunit to nerve terminals where it associates with both synaptic vesicles and the presynaptic plasma membrane. *J. Cell Sci.* 116, 4751-62.
- Oot, R.A., Huang, L.S., Berry, E.A., and Wilkens, S. (2012). Crystal structure of the yeast vacuolar ATPase heterotrimeric EGC(head) peripheral stalk complex. *Structure* 20, 1881-92.

Oot, R.A., and Wilkens, S. (2012). Subunit interactions at the V1-Vo interface in yeast vacuolar ATPase. *J. Biol. Chem.* 287, 13396-406.

Peri, F., and Nüsslein-Volhard, C. (2008). Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion in vivo. *Cell*, 133(5), 916-27.

Peters, C., Bayer, M.J., Bühler, S., Andersen, J.S., Mann, M., and Mayer, A. (2001). Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 409, 581-8.

Poëa-Guyon, S., Amar, M., Fossier, P., and Morel, N. (2006). Alternative splicing controls neuronal expression of v-ATPase subunit a1 and sorting to nerve terminals. *J. Biol. Chem.* 281(25), 17164-72.

Poëa-Guyon, S., Pasquier, H., Mérola, F., Morel, N., and Erard, M. (2013). The enhanced cyan fluorescent protein, a sensitive pH sensor for fluorescence lifetime imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* 405(12), 3983-87.

Pollard, H.B., Shindo, H., Creutz, C.E., Pazoles, C.J., and Cohen, J.S. (1979). Internal pH and state of ATP in adrenergic chromaffin granules determined by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 254(4), 1170-77.

Rizo, J., and Rosenmund, C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15, 665-74.

Saw, N.M., Kang, S.Y., Parsaud, L., Han, G.A., Jiang, T., Grzegorzcyk, K., Surkont, M., Sun-Wada, G.H., Wada, Y., Li, L., and Sugita, S. (2011). Vacuolar H(+)-ATPase subunits Voa1

and Voa2 cooperatively regulate secretory vesicle acidification, transmitter uptake, and storage. *Mol. Biol. Cell* 22, 3394-409.

Shao, E., and Forgac, M. (2004). Involvement of the nonhomologous region of subunit A of the yeast V-ATPase in coupling and in vivo dissociation. *J. Biol. Chem.* 279, 48663-70.

Smardon, A.M., and Kane, P.M. (2007). RAVE is essential for the efficient assembly of the C subunit with the vacuolar H(+)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 282, 26185-94.

Stewart, A.G., and Stock, D. (2012). Priming a molecular motor for disassembly. *Structure* 20, 1799-800.

Strasser, B., Iwaszkiewicz, J., Michielin, O., and Mayer, A. (2011). The V-ATPase proteolipid cylinder promotes the lipid-mixing stage of SNARE-dependent fusion of yeast vacuoles. *EMBO J.* 30, 4126-41.

Tabares, L., Alés, E., Lindau, M., and Alvarez de Toledo, G. (2001). Exocytosis of catecholamine (CA)-containing and CA-free granules in chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 276 (43), 39974-9.

Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., and Jahn, R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell.* 127(4), 831-46.

Taupenot, L., Harper, K.L., and O'Connor, D.T. (2005). Role of H⁺-ATPase-mediated acidification in sorting and release of the regulated secretory protein chromogranin A: evidence for a vesiculogenic function. *J. Biol. Chem.* 280(5):3885-97.

- Thomas, P., Wong, J.G., Lee, A.K., and Almers, W. (1993). A low affinity Ca^{2+} receptor controls the final steps in peptide secretion from pituitary melanotrophs. *Neuron* 11:93-104.
- Toei, M., Saum, R., and Forgac, M. (2010). Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry* 49(23):4715-23.
- Tour, O., Meijer, R.M., Zacharias, D.A., Adams, S.R., and Tsien, R.Y. (2003). Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation. *Nat. Biotechnol.* 21:1505-8.
- Ungermann, C., Wickner, W., and Xu, Z. (1999). Vacuole acidification is required for trans-SNARE pairing, LMA1 release, and homotypic fusion. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 96(20):11194-9.
- Vitale, N., Mukai, H., Rouot, B., Thiersé, D., Aunis, D., and Bader, M.F. (1993). Exocytosis in chromaffin cells. Possible involvement of the heterotrimeric GTP-binding protein G(o). *J. Biol. Chem.*, 268:14715-23.
- Vitale, N., Caumont, A.S., Chasserot-Golaz, S., Du, G., Wu, S., Sciorra, V.A., Morris, A.J., Frohman, M.A., and Bader, M.F. (2001). Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J.* 20(10):2424-34.
- Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Bailly, Y., Morinaga, N., Frohman, M.A., and Bader, M.F. (2002). Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 159:79-89.
- Wickner, W., and Schekman, R. (2008). Membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15(7):658-64.

Williamson, W.R., Wang, D., Haberman, A.S., and Hiesinger, P.R. (2010). A dual function of V0-ATPase $\alpha 1$ provides an endolysosomal degradation mechanism in *Drosophila melanogaster* photoreceptors. *J. Cell Biol.* 168(5):885-99.

Xie, X.S., Padron, D., Liao, X., Wang, J., Roth, M.G., and De Brabander, J.K. (2004). Salicylhalamide A inhibits the V0 sector of the V-ATPase through a mechanism distinct from bafilomycin A1. *J. Biol. Chem.* 279(19):19755-63.

Yan, P., Xiong, Y., Chen, B., Negash, S., Squier, T.C., and Mayer, M.U. (2006). Fluorophore-assisted light inactivation of calmodulin involves singlet-oxygen mediated cross-linking and methionine oxidation. *Biochemistry*, 45(15):4736-48.

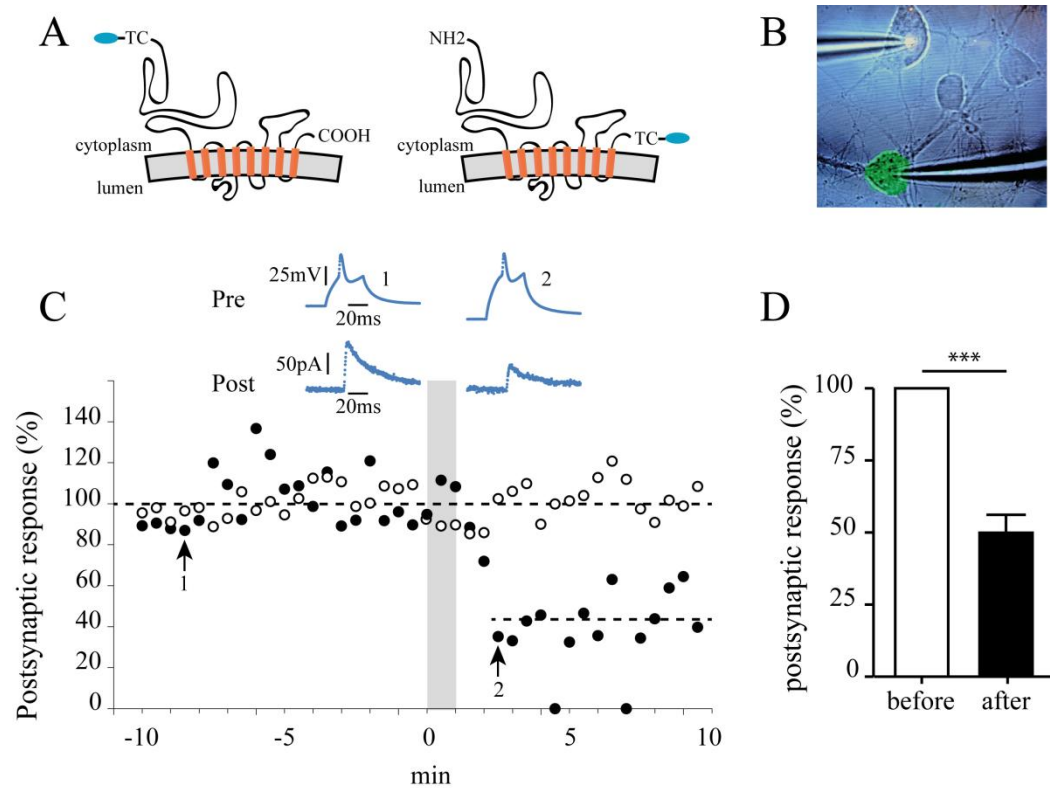


Figure 1

Figure 1: *Photo-inactivation of the $\alpha 1$ -I subunit of V0 impairs synaptic transmission.* A) Representation of the V0 $\alpha 1$ -I subunit with the Flag (blue) and TC tags in N- or C-terminal position. B) Micrograph illustrating the experimental configuration with a patch clamped presynaptic GFP-expressing neuron (stimulated neuron, colorized in green) and a connected un-transfected neuron (voltage-clamped to measure the post-synaptic response). C) Evolution of the post-synaptic current amplitude in response to presynaptic action potentials (stimulation every 30 seconds) of rat hippocampal neurons expressing GFP alone (open circles) or GFP + V0 TC-tagged $\alpha 1$ -I subunit (filled circles). Current amplitudes were expressed in percent of their mean amplitude before the photo-inactivating flash. Neurons were successively incubated with 1 μ M FlAsH-EDT₂ for 10 min and 1 mM BAL without modification of the post-synaptic responses. Photo-inactivation was carried for 1 min (grey area). Typical presynaptic action potentials (PRE) and post-synaptic responses (POST) either before (1) or after (2) the flash are shown. D) Averaged effects of V0 $\alpha 1$ -I subunit photo-inactivation on synaptic transmission. Pooled results include 6 neuronal pairs, either GABAergic or glutamatergic (paired Student's t-test).

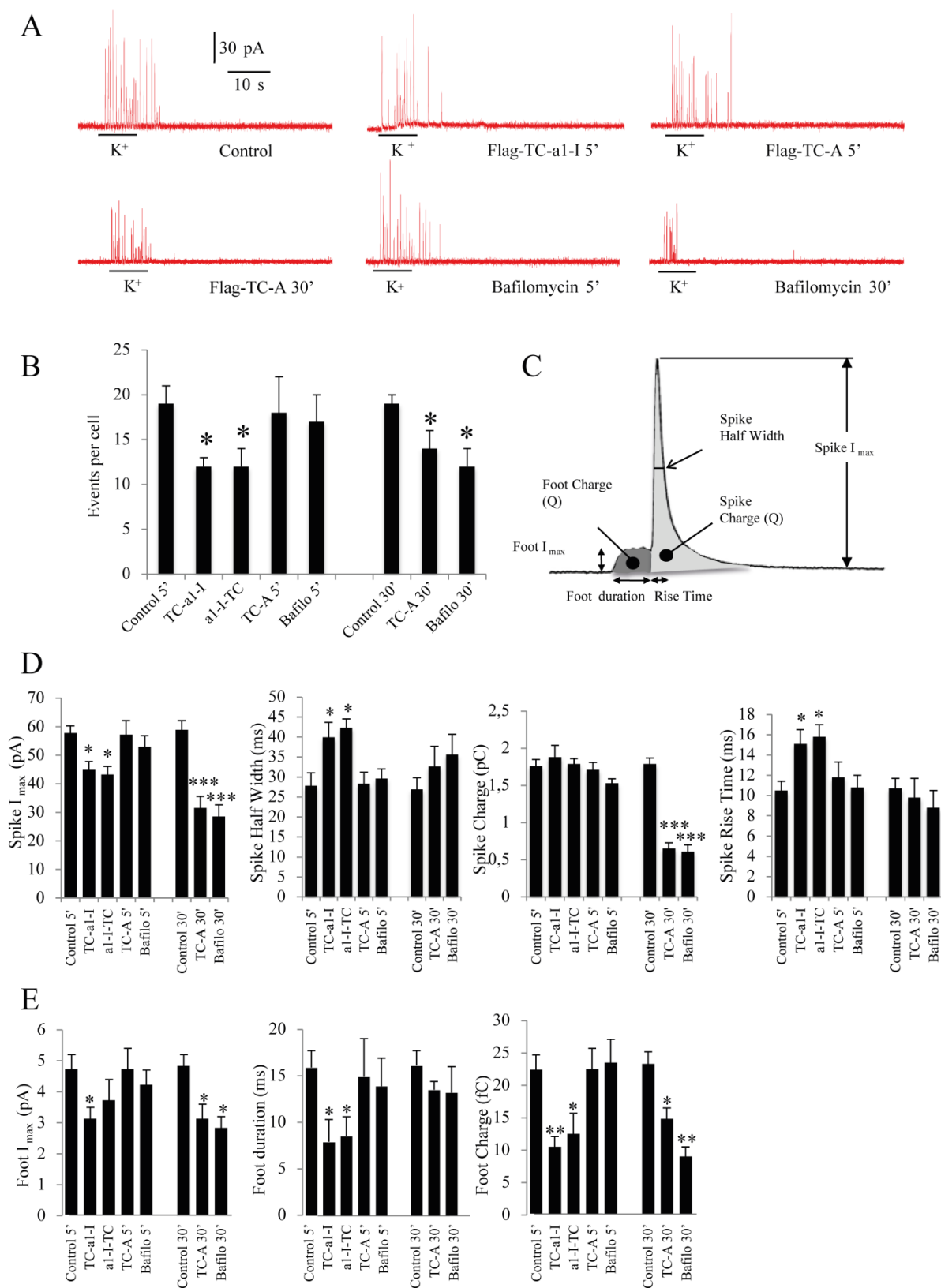


Figure 2

Figure 2: *Photo-inactivation of the V0 $\alpha 1$ -I or V1 A subunits impairs chromaffin cell catecholamine release in different ways.* Chromaffin cells co-expressing either the V0 $\alpha 1$ -I or the V1 A subunits bearing a Flag-TC tag and GFP were successively incubated with the FlAsH-EDT₂ probe that specifically binds to the TC motif, and 1 mM BAL. Photo-inactivation was obtained by a 1 min illumination. Catecholamine release was evoked by a 10 second application of 100 mM KCl onto the recorded cell and measured by carbon fiber amperometry. Control release was measured from un-transfected cells in the same culture dish or from cells that express GFP alone (both submitted to the FlAsH-EDT₂ and BAL treatments and the flash of light). For comparison, catecholamine release from un-transfected cells that were only treated by 0.4 μ M bafilomycin A1 was measured in parallel. A) Typical amperometric recordings from a control cell (control); a cell expressing the V0 recombinant $\alpha 1$ -I subunit, 5 min after the photo-inactivating flash (Flag-TC- $\alpha 1$ -I 5'); cells expressing the V1 recombinant A subunit, 5 or 30 min after the flash (Flag-TC-A 5' and 30', respectively) and un-transfected cells after 5 or 30 min of bafilomycin A1 application (bafilomycin 5' and 30' respectively). B) Number of amperometric spikes detected per cell in the various conditions (mean $\pm$ SD from 25 to 55 cells). Control cells, 5 or 30 min after the flash (control 5' and 30', respectively); cells expressing the V0 $\alpha 1$ -I subunit with the Flag-TC tag in N- or C-terminal position, 5 minutes after the flash (TC- $\alpha 1$ -I and $\alpha 1$ -I-TC); cells expressing the V1 Flag-TC-A subunit, 5 and 30 min post-flash (TC-A 5' and TC-A 30', respectively); cells bafilomycin A1-treated for 5 or 30 min (bafilo 5' and 30'). C) Scheme showing the different parameters of the amperometric response that were measured. A foot current was detected for about 20 to 30 % of amperometric spikes, regardless the conditions tested. D) Main characteristics of amperometric spikes in the different conditions tested (as in B). E) Characteristics of foot currents in the different conditions tested (as in B).

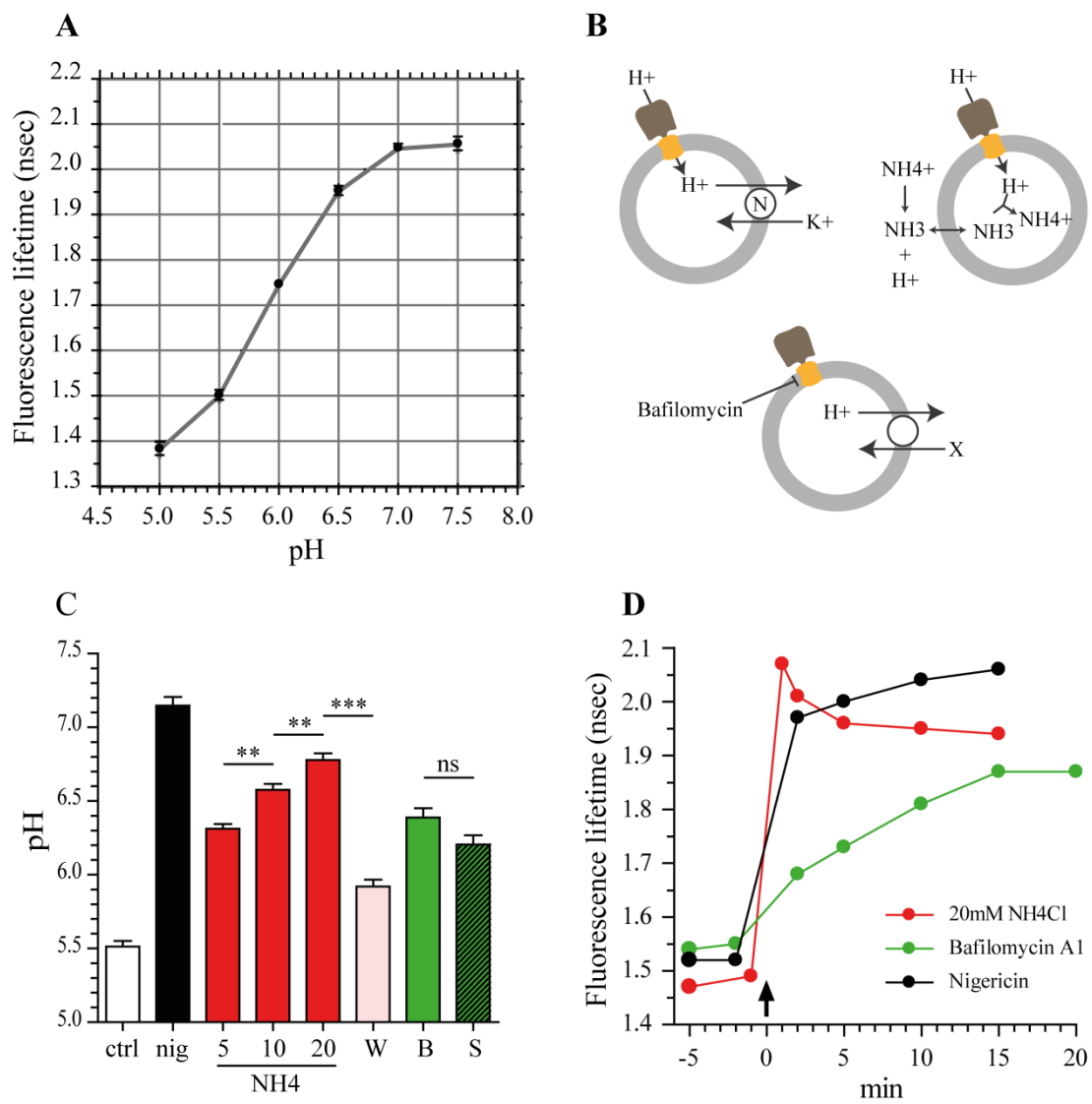


Figure 3

Figure 3: *Manipulation of intra-granular pH in PC12 cells.* PC12 cells expressing chromogranin A fused with the enhanced cyan fluorescent protein (CgA-ECFP) were used to measure intra-granular pH using fluorescence lifetime imaging (FLIM). A) Calibration curve of fluorescence lifetimes of CgA-ECFP in function of intra-granular pH. PC12 cells were incubated in calibration solutions that contain 10 μ M nigericin and 140 mM KCl buffered at the indicated pH. B) Schemes illustrating how nigericin (N), NH_4Cl or v-ATPase inhibitors affect intra-granular pH. C) Intra-granular pH plateau values measured in various conditions. In resting conditions (ctrl) pH was 5.51 ± 0.04 (n=92 cells). After treatment with 5 μ M nigericin (nig), granular pH was 7.15 ± 0.06 (n=30). Increasing concentrations of NH_4Cl led to increasing granular pH, 6.31 ± 0.03 (n=23) at 5 mM, 6.58 ± 0.04 (n=37) at 10 mM, 6.78 ± 0.04 (n=46) at 20 mM, an effect that was reversible after washing out NH_4Cl (w), pH 5.92 ± 0.05 (n=20). The v-ATPase inhibitors bafilomycin A1 (B) and saliphenylhalamide A (S) at 0.4 μ M raised the pH to 6.80 ± 0.05 (n=13) and 6.21 ± 0.06 (n=19), respectively. D) Time-course of granular pH variations following NH_4Cl , bafilomycin A1 or nigericin addition (arrow).

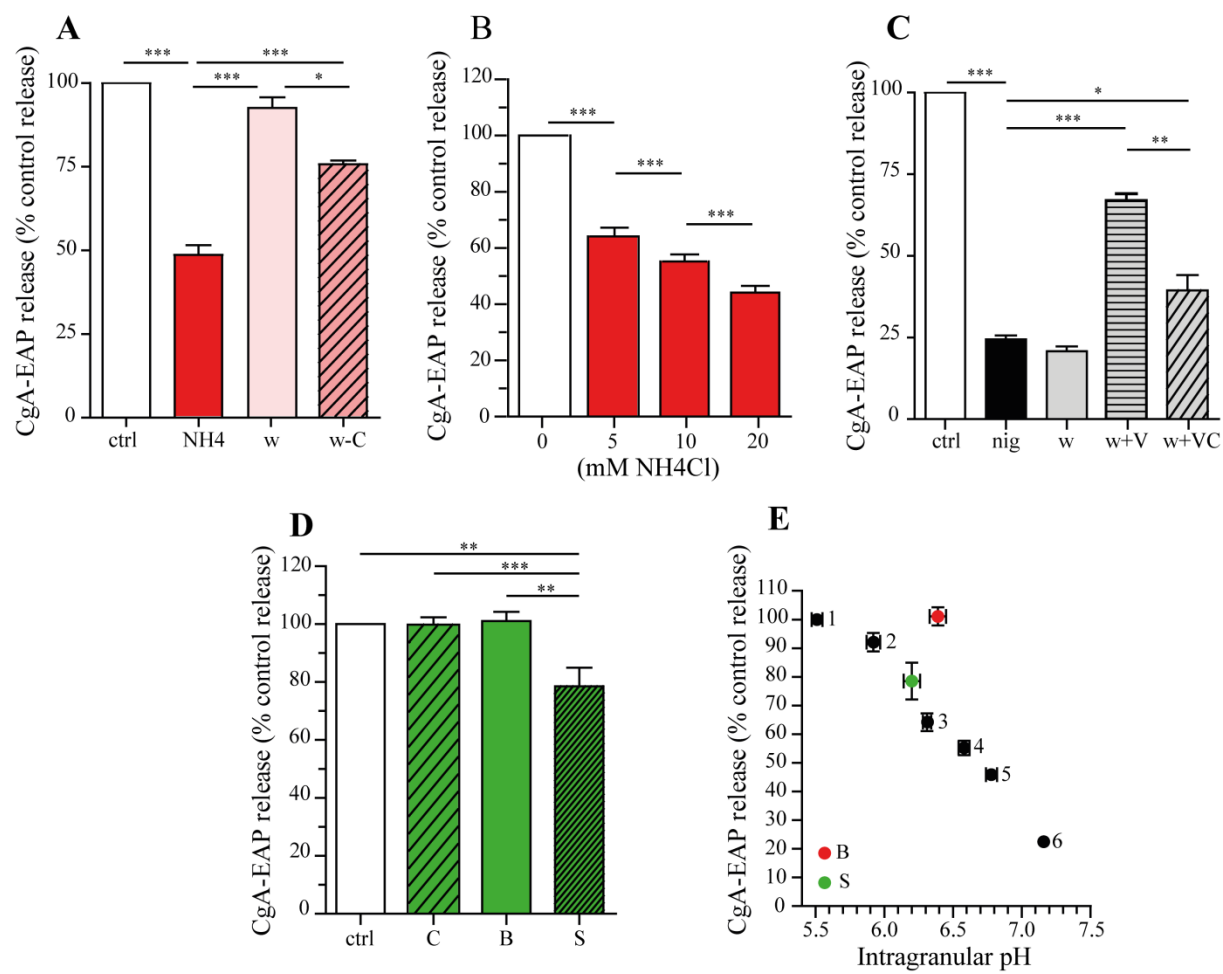


Figure 4

Figure 4: *Treatments that dissipate the granular pH gradient affect exocytotic release of CgA-EAP from PC12 cells.* A) PC12 cells stably expressing chromogranin fused with embryonic alkaline phosphatase (CgA-EAP) were used to estimate exocytosis of secretory granules induced by KCl depolarization (ctrl). Pre-incubation with 20 mM NH₄Cl for 15 min decreased CgA-EAP release by 52 % (NH₄) and this was reversed by NH₄Cl washout (w). Washing carried out in the presence of concanamycin A (w+C) led to partial reversion. B) Dose-dependence of the effect of NH₄Cl on CgA-EAP release. Release was 64.2 ± 3.1 (n=10), 55.2 ± 2.5 (n= 13) and 44.4 ± 2.2 % (n=19) of control release at 5, 10 and 20 mM NH₄Cl, respectively. C) A 15 min pre-incubation with 5 μ M nigericin (nig) markedly reduced CgA-EAP release: 24.4 ± 1.2 % (n=19) of control release. This effect was not reversed after removal of nigericin (w), 20.8 ± 1.5 % (n=11), unless the K⁺ ionophore valinomycin (5 μ M) was present (w+V), a partial reversion that was inhibited by 0.4 μ M concanamycin A (w+VC). D) Effects of 0.4 μ M v-ATPase inhibitors. Concanamycin A (C) or bafilomycin A1 (B) did not affect CgA-EAP release, 99.8 ± 2.5 (n=25) and 101.1 ± 3.1 % (n=21) of control release, respectively. Saliphenylhalamide A slightly but significantly depressed CgA-EAP release: 78.5 ± 6.5 % (n=12) of control release. E) Correlation of CgA-EAP release and intra-granular pH in the presence of vehicle (1); reversion of 20 mM NH₄Cl (2); 5, 10 and 20 mM NH₄Cl (3, 4, 5, respectively); nigericin (6); bafilomycin A1 (B) and saliphenylhalamide A (S).

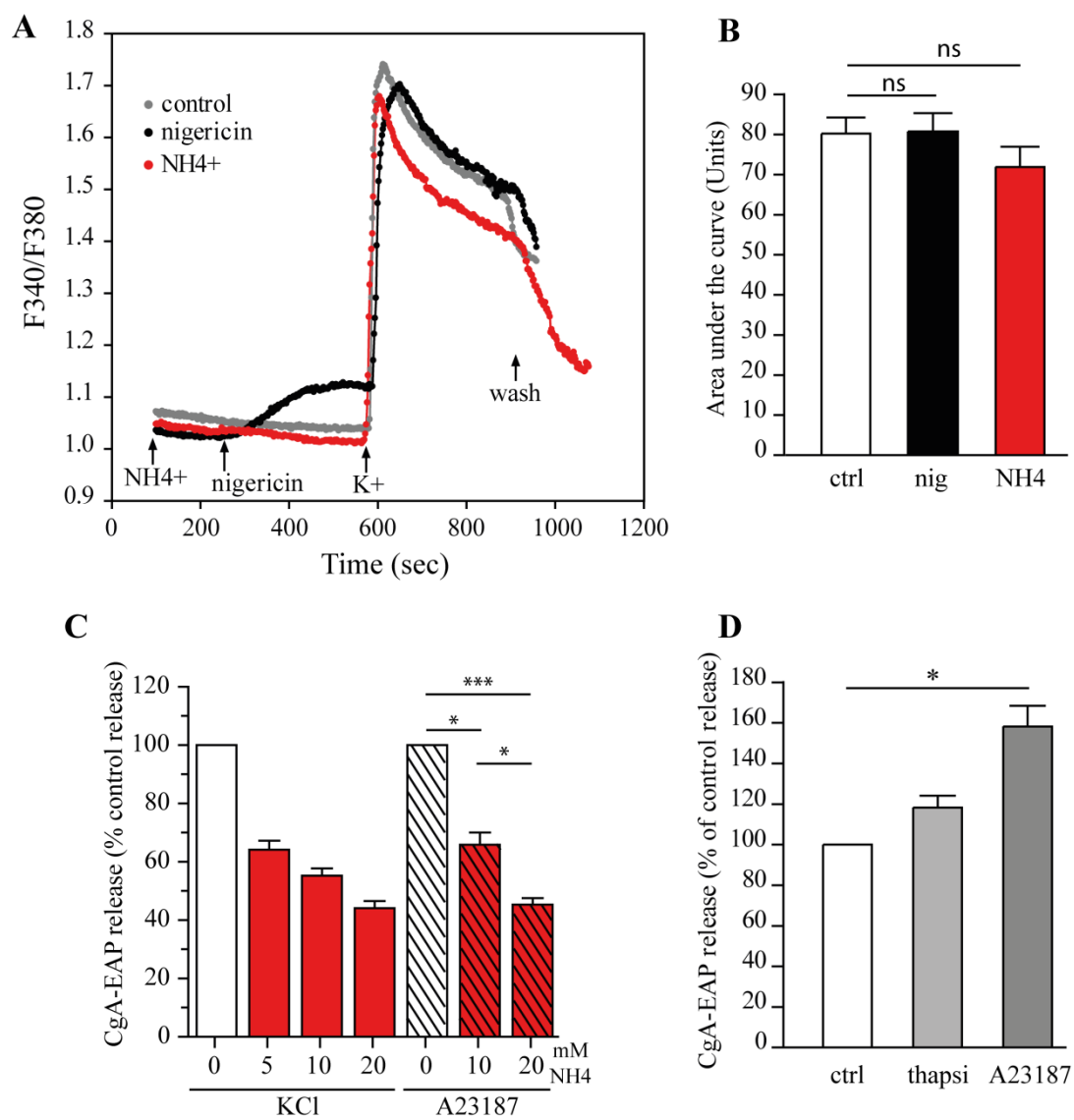


Figure 5

Figure 5: *Incubation with nigericin or 20 mM NH₄Cl does not affect exocytosis by impacting Ca²⁺ influx or calcium internal stores.* A) PC12 cells loaded with Fura-2 were used to estimate variations of the cytosolic Ca²⁺ concentration. The basal Ca²⁺ concentration in the cytosol was not affected by the presence 20 mM NH₄Cl. Nigericin (5 μM) elicited a progressive increase of cytosolic Ca²⁺ (probably from internal stores since no external Ca²⁺ was present). K⁺ depolarization in the presence of 2 mM external calcium induced a marked increase of the cytosolic Ca²⁺ concentration, that was not much affected by nigericin or NH₄Cl. Curves are means from 31 to 39 cells. B) Quantification of the Fura-2 signals resulting from a 5 min long K⁺ depolarization, without (ctrl) or in the presence of 5 μM nigericin (nig) or 20 mM NH₄Cl (NH₄). Mean ± SEM from 31 (nig), 37 (NH₄) and 39 (ctrl) cells from 3 to 4 different cell cultures. C) NH₄Cl (10 and 20 mM) similarly reduced CgA-EAP release induced by KCl depolarization or by the calcium ionophore A23187 (A23187) in the presence of 2 mM external calcium. D) PC12 cells expressing CgA-EAP were pre-incubated 15 min with 10 μM thapsigargin (Thapsi) or with 10 μM calcium ionophore A23187 (A23187) in the absence of external calcium before triggering CgA-EAP release by KCl. Data were obtained from 4 (A23187) or 3 (Thapsi) different cell cultures.

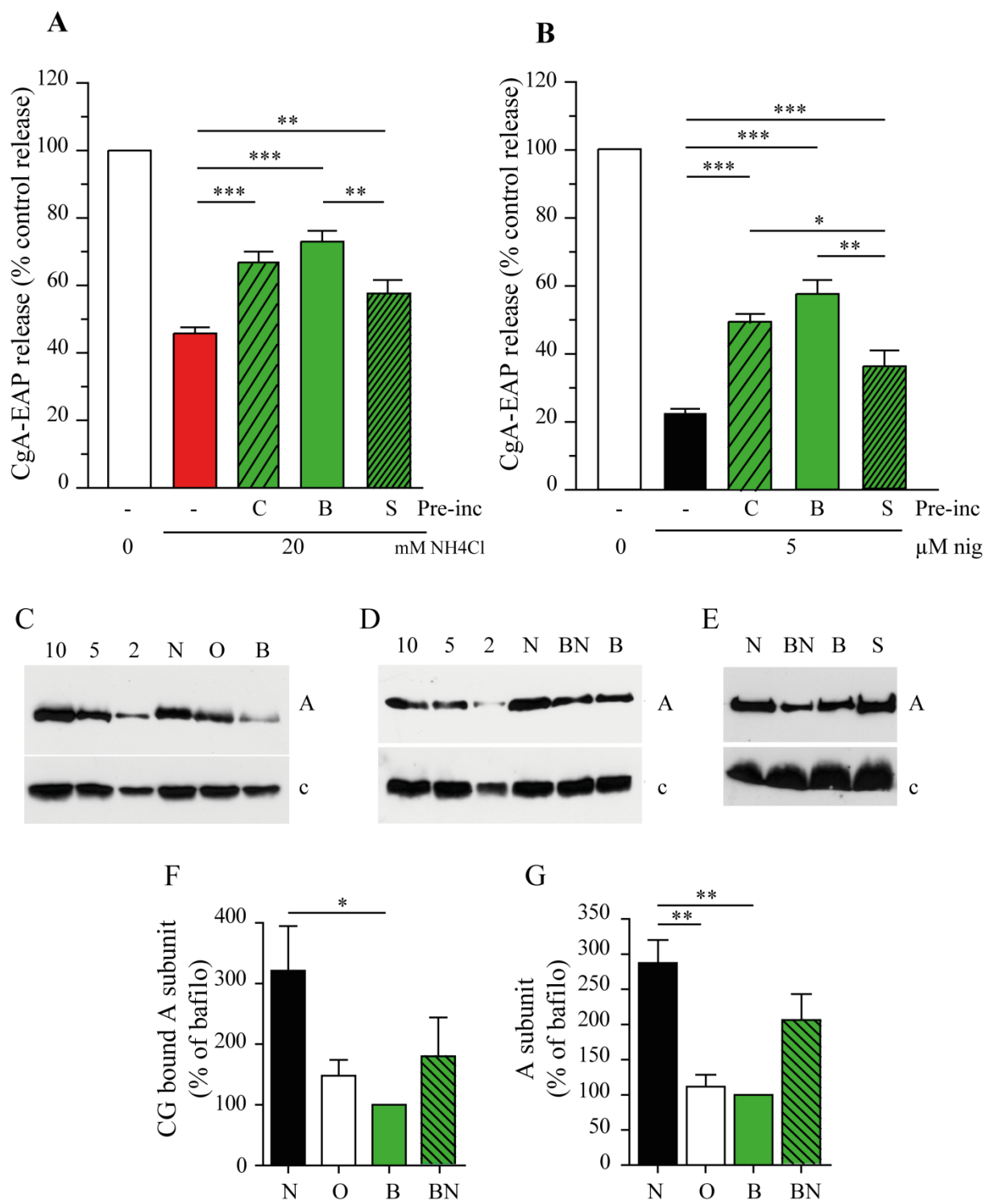


Figure 6

Figure 6: *v*-ATPase association acts as a sensor of intra-granular pH. A) CgA-EAP release after a 20 mM NH₄Cl incubation (45.9 ± 1.8 % of control release, n=31) was rescued by pre-incubation with 0.4 μ M bafilomycin A1 (B, 73.1 ± 3.2 %, n=15) or concanamycin A (C, 66.9 ± 3.2 %, n=16). Protection by 0.4 μ M saliphenylhalamide A was less effective (S, 57.6 ± 4.0 %, n=10). B) CgA-EAP release after 5 μ M nigericin incubation (22.5 ± 1.2 % of control release, n=29) was rescued by pre-incubation with 0.4 μ M bafilomycin A1 (B, 57.5 ± 4.1 %, n=9) or concanamycin A (C, 49.5 ± 2.6 %, n=19). Saliphenylhalamide A was less effective (S, 35.9 ± 4.7 %, n=8). C) PC12 cells stably expressing CgA-EAP and Flag-TC-a1-I V0 subunit were incubated with 5 μ M nigericin (N), 0.4 μ M bafilomycin A1 (B) or without treatment (O) for 15 min at 37°C. Cells were incubated with DSP to cross-link the V1-V0 domains prior to cell lysis and chromaffin granules isolation. The amount of V1 subunit A associated to granules (A) was estimated on western blots, normalized at equivalent amounts of the endogenous V0 c subunit (c) or Flag a1-I (not shown). Band intensities were quantified by comparison with increasing amounts of pooled granule fractions (2, 5, 10). D) Cells were pre-incubated for 30 min with 0.4 μ M bafilomycin A1 before nigericin treatment (BN) or in physiological medium and then treated with 5 μ M nigericin (N and BN) or bafilomycin A1 (B) and treated as in C). E) Cells treated with 0.4 μ M saliphenylhalamide A (S) and as described for D). F and G) Quantification of the amount of V1 subunit A bound to chromaffin granules, normalized at constant V0 endogenous c-subunit (F) or V0 Flag-a1-I subunit (G), expressed in % of bafilomycin A1 treated samples (from 3 to 5 different experiments).

The Coffin-Lowry Syndrome-Associated Protein *rsk2* and Neurosecretion

M. Zeniou-Meyer · F. Gambino ·
Mohamed-Raafet Ammar · Y. Humeau ·
N. Vitale

Received: 29 May 2010 / Accepted: 2 September 2010 / Published online: 9 November 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Coffin-Lowry syndrome (CLS) is a syndromic form of X-linked mental retardation, characterized in male patients by psychomotor and growth retardation and various skeletal anomalies. CLS is caused by mutations in the *RPS6KA3* gene, which encodes RSK2, a growth factor-regulated protein kinase. Cognitive deficiencies in CLS patients are prominent, but markedly variable in severity, even between siblings. However, the vast majority of patients are severely affected, with mental retardation ranging from moderate to profound. We used a RSK2-KO mouse model that shows no obvious brain abnormalities at the anatomical and histological levels to study the function of RSK2 in neurosecretion. Behavioral studies revealed normal motor coordination, but a profound retardation in spatial learning and a deficit in long-term spatial memory, providing evidence that RSK2 plays similar roles in mental functioning both in mice and human. We found that associative LTP at cortical inputs to the lateral amygdala was blocked in *Rsk2* KO mice. Using an RNA interference rescue strategy in PC12 cells, we were able to demonstrate that RSK2 regulates catecholamine release through the phosphorylation of PLD. These results provide the first molecular evidence that RSK2 could regulate neurotransmitter release

by activating PLD production of lipids required for exocytosis.

Keywords RSK2 · Exocytosis · PLD · Mental retardation · Coffin-Lowry syndrome

Introduction

Coffin-Lowry syndrome (CLS, MIM#303600) is a rare syndromic form of mental retardation that shows X-linked inheritance. Major features of CLS are growth and psychomotor retardation, characteristic facial and digital abnormalities, and progressive skeletal alterations (reviewed by Stephenson et al. 2005). Using a positional cloning approach, CLS has been shown to be caused by heterogeneous loss-of-function mutations in the *hRSK2* (90-kDa ribosomal S6 kinase) gene (*RPS6KA3*) that maps to Xp22.2 (Trivier et al. 1996). The diagnosis of CLS is established in males with moderate to severe developmental delay, characteristic craniofacial, and hand alteration. Although difficult to estimate because of the heterogeneity of symptoms, the actual prevalence of CLS has been proposed to range from 1:50,000 to 1:100,000.

RSK2 is a growth factor-regulated serine-threonine protein kinase of 740 amino acids (90 kDa) that acts at the distal end of the Ras-Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) signaling pathway. In humans, RSK2 belongs to a family that includes four members, RSK1-4 (known also as p90rsk or MAPKAP-K1 family), which share a highly conserved structure and are encoded by four different genes. RSK orthologs have been identified in mouse, rat, chicken, *Xenopus laevis*, and *Drosophila* (Hauge and Frodin 2006). The various RSK proteins are all widely expressed in mammals and many cell types express several

A commentary to this article can be found at doi:
[10.1007/s10571-010-9607-8](https://doi.org/10.1007/s10571-010-9607-8).

Authors Humeau Y, Vitale N both contributed equally to this work.

M. Zeniou-Meyer · F. Gambino · M.-R. Ammar · Y. Humeau ·
N. Vitale (✉)
Département Neurotransmission and Sécrétion Neuroendocrine,
Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives
(UPR-3212), Centre National de la Recherche Scientifique
and Université de Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal,
67084 Strasbourg, France
e-mail: vitalen@unistra.fr

members. In both embryonic and adult brains of humans and mice, the highest levels of RSK2 expression are observed in regions with high synaptic activity, including the neocortex, the hippocampus, the cerebellar, and Purkinje cells, which are essential components in cognitive functions and learning (Zeniou et al. 2002). In addition, the CLS symptoms may be linked to developmental disorders and altered hormonal release and/or neurosecretion.

RSK proteins are composed of an N-terminal kinase domain that belongs to the AGC kinase family and a C-terminal kinase domain that belongs to the CamK family. A 100-amino-acid linker region containing a PDK docking site connects these two kinase domains. RSK proteins are directly phosphorylated and activated by ERK1/2 in response to growth factors, many polypeptide hormones and neurotransmitters. A docking site for ERK1/2 is located at the C-terminal end of RSK. The N-terminal kinase domain phosphorylates downstream targets and is activated through a sequential phosphorylation cascade involving PDK1, the C-terminal kinase domain of RSK and ERK1/2 (Hauge and Frodin 2006).

In the cytosol, RSK proteins have been shown to phosphorylate many substrates including GSK3, L1CAM, the Ras GEF-Sos, IκB, the p34cdc2-inhibitory kinase Myt1, the translation factors eEF2, eIF4B, and the pro-apoptotic protein BAD (reviewed in Carriere et al. 2008). Moreover, upon activation a fraction of the cytosolic RSK molecules translocates to the nucleus where it is thought to regulate gene expression through phosphorylation of transcription factors such as CREB 1, ERα, Nurr 77, and SRF, as well as histones (Hauge and Frodin 2006). Compelling evidence suggests that RSKs play an important role in cell cycle progression, differentiation, and cell survival, but the respective contributions of each RSK family member to the in vivo activation of most of these substrates are currently not well defined. To further investigate the implication of RSK2 in cognitive functions, a mouse invalidated for the expression of the *Rsk2* gene has been generated as an animal model for CLS (Poirier et al. 2007). These mice display skeletal abnormalities with delay in bone formation and reduced body mass (15–20%). Although no obvious brain abnormalities at the anatomical and histological levels were observed, significant cognitive deficits such as alteration of spatial learning and long-term memory was observed, indicate that RSK2 may have similar roles in brain function both in mice and humans (Poirier et al. 2007). A comprehensive picture of the role of RSK2 at synapses has to integrate reported interactions of RSK2 with synaptic partners, which are yet present in both synaptic compartments (Humeau et al. 2009). For example, RSK2 is likely to participate and possibly modulate a post-synaptic complex containing NMDARs (Poteet-Smith et al. 1999). In addition, following activation of ERK signaling,

RSK2 phosphorylates post-synaptic PDZ-containing proteins such as Shank1 and 3 (Thomas et al. 2005). This kinase activity may be essential for the establishment of long-term post-synaptic plasticity as overexpression of kinase-dead RSK2 in primary cortical neurons leads to a decrease in AMPAR-mediated miniature excitatory post-synaptic current frequency (mEPSC; Thomas et al. 2005). This suggests a role for post-synaptic RSK2 in the maintenance and/or consolidation of excitatory synapses. In this report, we will review the latest data indicating that RSK2 may also participate in the learning process by regulating synaptic transmission at the presynaptic level and that RSK2 is a specific modulator of phospholipase D (PLD) activity in calcium-regulated exocytosis.

RSK2 Regulates Presynaptic Function at Cortical Excitatory Projections to the Lateral Amygdala

RSK2 is prominent in brain regions involved in learning and memory such as the hippocampus and the cortex (Zeniou et al. 2002). This is in good accordance with the reported deficits in learning and memory in mice invalidated for *Rsk2* (Poirier et al. 2007). Even if not yet formally confirmed using immuno-cytochemistry experiments, in situ hybridization has shown that there is little RSK2 expression in other brain structures such as the lateral amygdala (LA) (Zeniou et al. 2002). Hence, we investigated the role of RSK2 at Cortico-LA excitatory projections as a model to study the presynaptic function of RSK2. The physiology at these synapses was examined using LA-containing acute slices of mouse brain (Humeau et al. 2003, 2005; Fourcaudot et al. 2008). As a genetic model, we used transgenic mice bearing null mutations in the *rsk2* gene (Poirier et al. 2007) maintained in a C57Bl6 background. We then systematically compared several synaptic parameters in homogenous groups of *Rsk2*^{-/-} and *Rsk2*^{+/-} littermates. By focusing on LA synapses in these experimental models, we believe that the post-synaptic impact of RSK2 deletion has been limited due to the modest expression of RSK2 in the LA (Zeniou et al. 2002), enabling us to reveal the role of RSK2 at a pre-synapse in which it is highly expressed in normal conditions.

First, we examined spontaneous excitatory transmission received by LA principal cells using a classical whole cell patch-clamp technique (Humeau et al. 2003, 2005) in the presence of GABA_A receptor blockers. In control conditions, we observed a consistent decrease of both the amplitude and frequency of spontaneous EPSCs in *Rsk2*^{-/-} mice as compared to their ^{+/-} littermates (manuscript in preparation). Since the average amplitude reflects multi-site release synchronized by an incoming action potential, we also recorded miniature EPSCs in presence of 10 μM Tetrodotoxin (TTX) to avoid multi-quantal events

(Humeau et al. 2007). Under these conditions, while the frequency of mEPSCs was lower, the mean amplitude and amplitude distribution of miniature events were unaffected by RSK2 depletion (manuscript in preparation). These results resemble previous observations of primary cell cultures when the phosphorylation activity of post-synaptic RSK2 was abolished (Thomas et al. 2005). Thus, although this effect on spontaneous transmission clearly argues for the implication of RSK2 in neurotransmission it is not possible at this stage to discriminate between a pre- or post-synaptic effect of RSK2.

Next, using an external electrode to stimulate within the external capsule (Humeau et al. 2003, 2005), action potentials were evoked at incoming cortical inputs while recording LA principal cells (Fig. 1a). We first applied stimulations of increasing intensity and duration in order to reconstruct the so-called input/output curves which allow examination of global synaptic transmission between the two brain structures. In *Rsk2*^{-/-} mice, we observed a ~40% reduction in the EPSC size at each stimulation intensity, corroborating a reduction in the number of functional excitatory synapses in LA principal cells suggested by

spontaneous and miniature EPSC analysis (manuscript in preparation).

The physiology at the remaining functioning synapses was then examined by focusing on discriminative parameters, which allow one to distinguish between presynaptic and postsynaptic functions of RSK2. Paired pulse ratio (PPR) has been classically used to examine the pre-synaptic release probability in various synaptic systems (Humeau et al. 2001, 2003; Fourcaudot et al. 2008), and has been correlated with behavioral learning (Tsvetkov et al. 2002). The absence of RSK2 was not associated with a change of PPR at Cortico-LA pre-synapses (manuscript in preparation). Next, we examined the evolution of the post-synaptic response to trains of high frequency stimulation, which is often used to evaluate the size of the so-called ready-releasable pool of synaptic vesicles and the refilling rate of active release sites (Schneggenburger et al. 2002). We applied 20 Hz, 4 s-long iterative trains to Cortico-LA synapses from *Rsk2*^{-/-} and ^{+/+} animals. In WT and KO, the RRP size and refilling rate extracted from cumulative plot of EPSC amplitudes (Schneggenburger et al. 2002) were similar, thus excluding a role for RSK2 in these important synaptic parameters (manuscript in preparation). Thus, the examination of the role of RSK2 at these cortical pre-synapses excluded a significant role for this protein in the control of release probability and vesicular cycling at remaining synapses. Some other post-synaptic parameters such as the respective contributions of AMPAR and NMDAR to the postsynaptic responses at polarized and depolarized potentials were also not affected in *Rsk2* mutant mice (manuscript in preparation).

Although the above arguments suggest a pre-synaptic origin of the deficit in synaptic efficacy in the absence of RSK2, it remains to be firmly established that RSK2 does not also play a contribution to postsynaptic function in this model. An adequate methodology to address this question will require electrophysiological recordings of pre- and post-synaptic neuronal pairs in culture (expressing distinct fluorescent marker for RSK2 expression or deletion).

We recently reported that Cortico-LA pre-synapses were capable of adapting their release probability to the past activity of the synapse (Humeau et al. 2003; Shaban et al. 2006). A combination of pharmacological and genetic studies allowed us to decipher the underlying mechanisms requiring activation of presynaptic PKA, Rim1a, and L-type Ca²⁺-channels (Fourcaudot et al. 2008, 2009). We thus tested whether *Rsk2*-deficient preparations expressed presynaptic LTP at these synapses. We applied single pairing protocols combining presynaptic stimulations (80 at 10 Hz) with post-synaptic depolarization (+30 mV during 8 s, Gambino et al. 2010). Whereas a robust ~100% LTP was observed in *Rsk2*^{+/+} animals, this induction protocol failed to trigger a significant potentiation at RSK2-deficient

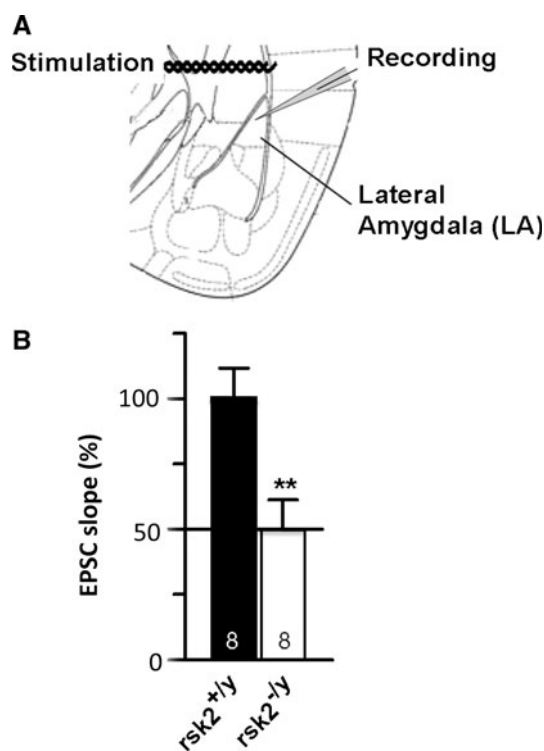


Fig. 1 Cortico-LA LTP maintenance is affected in *Rsk2*^{-/-} mice. **a** Scheme of the experimental preparation, **b** EPSCs were recorded before and after LTP induction. LTP was induced using a single train of 80 stimuli at 10 Hz paired with sustained postsynaptic depolarization to +30 mV (Gambino et al. 2010). EPSC slope was normalized to values observed in baseline conditions ($n = 8$ different preparations for each genotype). Statistical analysis was performed using the Student's *t* test. ** $P < 0.01$

synapses (Fig. 1b, manuscript in preparation). Importantly, LTP expression rather than LTP induction is likely to be impaired in *Rsk2*^{-/-} animals as the potentiation was similar between genotypes after 2 min, but different after 30 min (Fig. 1b). This absence of presynaptic LTP was rather surprising given the absence of PPR changes in RSK2 mutant mice in basal conditions, but these observations strongly support a role for presynaptic RSK2 in the control of key steps leading to the activity-dependent setting of presynaptic neurotransmitter release.

RSK2 Phosphorylates PLD1 and Regulates Large Dense-Core Vesicle Exocytosis in Neuroendocrine Cells

To study the implication of RSK2 in synaptic function at the molecular level, we used the well-characterized neuroendocrine chromaffin/PC12 cells. These cells have been used for over 20 years as a model to study neurosecretion (Bader et al. 2002, 2004; Rettig and Neher 2002). In these cells, neurosecretory activity can be measured electrophysiologically on single cells and on a transfected cell population using the growth hormone (GH) release assay.

The implication of RSK family members on exocytosis was tested using BI-D1870, a specific inhibitor of RSKs. A 30 min pre-incubation with BI-D1870 significantly inhibited GH secretion from PC12 cells stimulated with high K⁺, whereas staurosporine a PKC inhibitor had little effect (Zeniou-Meyer et al. 2008). This result indicates that a phosphorylation step by a member of the RSK family is important for exocytosis. To test more directly the implication of RSK2, we examined the effect of two dominant-negative mutants of RSK2 lacking a phosphorylation site necessary for activation on PC12 cells exocytosis. Expression of both RSK mutants potently inhibited K⁺-evoked GH secretion (Zeniou-Meyer et al. 2008). The functional importance of RSK2 in exocytosis was then addressed directly by RNA interference. Selective knockdown of RSK2 did not modify basal GH release, but strongly decreased the amount of GH secreted in response to 59 mM K⁺ (Zeniou-Meyer et al. 2008). On the contrary, a mutated siRNA sequence that did not affect endogenous RSK2 levels had no effect on secretion. Furthermore, expression of human RSK2 (insensitive to the siRNA) in RSK2-depleted PC12 cells completely rescued K⁺-evoked GH release, confirming the specificity of the silencing effect. Altogether, these results strongly argue for an important positive regulatory function of RSK2 in calcium-dependent exocytosis.

Phospholipase D1, a lipid modifying enzyme that has been shown to synthesize key fusogenic lipids in neuroendocrine cells (Vitale et al. 2001; Zeniou-Meyer et al. 2008; Bader and Vitale 2009), and in neurons (Humeau

et al. 2001) presents a consensus signal sequence for RSK2. Indeed, threonine 147 of PLD1 which can be phosphorylated by PKC also lies within a consensus phosphorylation site for RSKs. Using an antibody that specifically recognizes the Thr-147-phosphorylated form of PLD1, we were able to detect a significant increase in Thr-147 phosphorylation of PLD1 in cells stimulated with 59 mM K⁺ (Zeniou-Meyer et al. 2008). Depletion of endogenous RSK2 by siRNA strongly reduced the amount of Thr-147-phosphorylated PLD1, in line with the idea that RSK2 is the upstream kinase that phosphorylates PLD1 in stimulated cells. Accordingly, a 30 min pre-incubation with the RSK inhibitor BI-D1870, but not with the PKC inhibitor staurosporine, inhibited Thr-147-phosphorylation of PLD1.

The relevance of PLD1 phosphorylation to exocytosis was tested in endogenous PLD1-depleted PC12 cells which expressed ectopically PLD1 proteins carrying a phosphorylation-deficient mutation (T147A) or a phospho-mimetic mutation (T147D). Inhibition of endogenous PLD1 expression strongly decreased K⁺-stimulated PLD activity and GH release from PC12 cells in line with a crucial role for PLD1 in exocytosis (Zeniou-Meyer et al. 2007). This inhibition could be completely rescued by expression of a wild-type PLD1 protein insensitive to siRNA-mediated degradation, whereas the Thr-147 phosphorylation-deficient mutant (T147A) was not able to restore normal levels of PLD activity and secretion. On the other hand, expression of the Thr-147 phospho-mimetic mutant T147D completely restored PLD1 activation and GH release. These results suggest that phosphorylation of the Thr-147 residue of PLD is required for both secretagogue-evoked PLD1 activation at the plasma membrane and the functioning of the exocytotic machinery (Zeniou-Meyer et al. 2008).

To further probe the idea that PLD1 phosphorylation by RSK2 regulates its enzymatic activity, we examined whether the reduction of endogenous RSK2 affected PLD1 activation in PC12 cells stimulated with a secretagogue. Reduction of endogenous RSK2 levels by siRNA resulted in a strong inhibition of K⁺-induced PLD stimulation compared to control cells (Zeniou-Meyer et al. 2008). This inhibition could be completely rescued by expression of the siRNA-insensitive human RSK2. Interestingly, in RSK2 siRNA treated cells, the PLD1 phosphomimetic mutant was activated in stimulated cells and fully restored secretion despite the low levels of endogenous RSK2 (Zeniou-Meyer et al. 2008). These results support a sequence of events in which elevated K⁺ and rise in cytosolic calcium activates RSK2, which in turn phosphorylates and stimulates PLD1 to produce the PA required for the exocytotic reaction. In other words, RSK2 appears to be a critical upstream signaling element for PLD1 activation and the production of fusogenic lipids required for exocytosis.

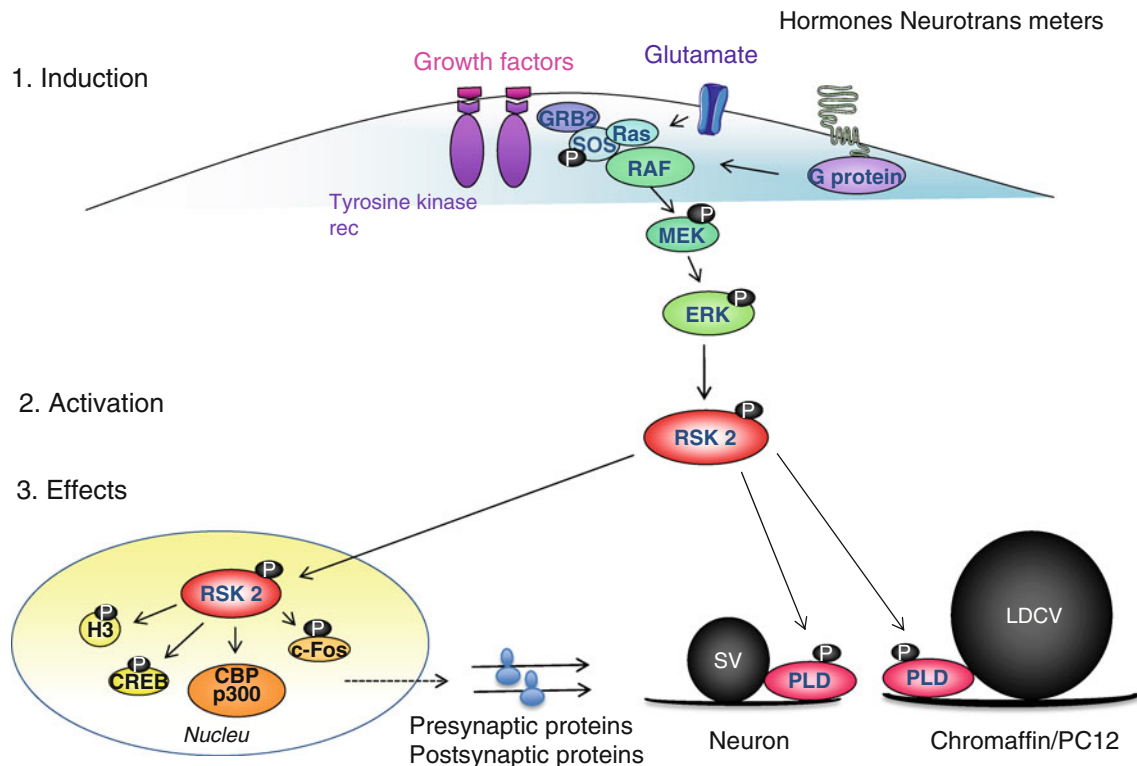


Fig. 2 Model for the involvement of RSK2 in neurosecretion. Growth factors, neurotransmitters and hormones, through their respective receptors activate the MAP-kinase pathway that leads to ERK phosphorylation. Phospho-ERK contributes to RSK2 activation by autophosphorylation. Part of the activated RSK2 translocates to the nucleus where it regulates the activity of transcription factors and

possibly modulates the expression level of presynaptic and postsynaptic proteins. The activated RSK2 regulates the PLD activity through phosphorylation of Thr147-PLD1. The activated PLD1 generates phosphatidic acid, a fusogenic lipid, near the vesicular (LDCV large dense-core vesicle, SV synaptic vesicle) membrane fusion sites in neuroendocrine cells and neurons

We recently reported the use of GFP-Spo20p as a specific sensor for PA production in neuroendocrine cells (Zeniou-Meyer et al. 2007). GFP-Spo20p specifically binds to PA in vitro and is partially recruited to the plasma membrane after chromaffin cell stimulation. A detailed morphometric analysis further revealed that PA synthesis occurred preferentially at the granule-docking sites on the plasma membrane (Zeniou-Meyer et al. 2007). To assess whether the PA produced at the plasma membrane upon cell stimulation requires activation of PLD1 by RSK2 phosphorylation, we studied the distribution of the GFP-Spo20p-PA sensor in cells expressing the RSK2 siRNA. The accumulation of GFP-Spo20p at the cell periphery seen in control cells was largely inhibited in cells expressing RSK2 siRNA (Zeniou-Meyer et al. 2009). Taken together, our results show that RSK2 is involved in the PA biosynthetic pathway activated in secretagogue-stimulated cells. Hence, RSK2 appears to be a critical upstream signaling element for PLD1 activation and the production of plasma membrane-bound fusogenic lipids required for exocytosis.

Conclusion

Despite intensive research, the physiological roles of RSK2 are still unclear. However, the identification of a growing number of substrates is uncovering the impact of RSK2 on various aspects of cell functions. The cellular bases and physiopathological mechanisms underlying mental retardation in CLS patients have not yet been fully elucidated, but there is growing evidence for the implication of RSK2 in neuronal survival, neurite growth, functional maturation, and synaptic plasticity. Binding of RSK2 to PDZ domain proteins and phosphorylation of these proteins or their binding partners may post-synaptically regulate synaptic transmission. In addition, the data reviewed here strongly support the idea that RSK2, in addition to its post-synaptic function, is also important for neurosecretion at the pre-synaptic level. Among the various potential actions of RSK2, the regulation of fusogenic lipid dynamics at the exocytotic site in neurosecretory cells by the phosphorylation of PLD is an attractive hypothesis (Fig. 2). In addition, nuclear targets for RSK2 include transcription

factors and histones, in accordance with a major role in regulation of gene expression. Ongoing research is focused on the characterization of the molecular pathways controlled via RSK2 and in particular on the identification of target genes whose expression is directly influenced by RSK2 in various regions of the brain. The RSK2 knockout mouse will undoubtedly be very useful to clarify the function of RSK2 in neurosecretion (Fig. 2)

Acknowledgments We wish to thank Dr André Hanauer for providing us with the RSK2 KO mice and Drs Jens Rettig and Ute Becherer for the capacitance recording of bovine chromaffin cells. We wish to thank Dr Nancy Grant for critical reading of the manuscript. This work was supported by ANR grants (ANR-09-BLAN-0264-01) to NV and (ANR-06-003-Neuro-01) to YH.

References

- Bader MF, Vitale N (2009) Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1791:936–941
- Bader MF, Holz RW, Kumakura K, Vitale N (2002) Exocytosis: the chromaffin cell as a model system. *Ann NY Acad Sci* 971:178–183
- Bader MF, Doussau F, Chasserot-Golaz S, Vitale N, Gasman S (2004) Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1742:37–49
- Carriere A, Ray H, Blenis J, Roux PP (2008) The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. *Front Biosci* 13:4258–4275
- Fourcaudot E, Gambino F, Humeau Y, Casassus G, Shaban H, Poulain B, Lüthi A (2008) cAMP/PKA signaling and RIM1 α mediate presynaptic LTP in the lateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15130–15135
- Fourcaudot E, Gambino F, Casassus G, Poulain B, Humeau Y, Lüthi A (2009) L-type voltage-dependent Ca(2+) channels mediate expression of presynaptic LTP in amygdala. *Nat Neurosci* 12:1093–1095
- Gambino F, Khelfaoui M, Poulain B, Bienvenu T, Chelly J, Humeau Y (2010) Synaptic maturation at cortical projections to the lateral amygdala in a mouse model of Rett syndrome. *PLoS One* 5:e11399
- Hauge C, Frodin M (2006) RSK, MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* 119:3021–3023
- Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont JL, Du G, Frohman MA, Bader MF, Poulain B (2001) A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15300–15305
- Humeau Y, Shaban H, Bissiere S, Lüthi A (2003) Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* 426:841–845
- Humeau Y, Herry C, Kemp N, Shaban H, Fourcaudot E, Bissière S, Lüthi A (2005) Dendritic spine heterogeneity determines afferent-specific Hebbian plasticity in the amygdala. *Neuron* 45:119–131
- Humeau Y, Reisel D, Johnson AW, Borchardt T, Jensen V, Gebhardt C, Bosch V, Gass P, Bannerman DM, Good MA, Hvalby Ø, Sprengel R, Lüthi A (2007) A pathway-specific function for different AMPA receptor subunits in amygdala long-term potentiation and fear conditioning. *J Neurosci* 27:10947–10956
- Humeau Y, Gambino F, Chelly J, Vitale N (2009) X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. *J Neurochem* 109:1–14
- Poirier R, Jacquot S, Vaillend C, Souththiphong AA, Libbey M, Davis S, Laroche S, Hanauer A, Welzl H, Lipp HP, Wolfer DP (2007) Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene *Rsk2* in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior. *Behav Genet* 37:31–50
- Poteet-Smith CE, Smith JA, Lannigan DA, Freed TA, Sturgill TW (1999) Generation of constitutively active p90 ribosomal S6 kinase in vivo. Implications for the mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 274:22135–22138
- Rettig J, Neher E (2002) Emerging roles of presynaptic proteins in calcium-triggered exocytosis. *Science* 298:781–785
- Schneggenburger R, Sakaba T, Neher E (2002) Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends Neurosci* 25:206–212
- Shaban H, Humeau Y, Herry C, Casassus G, Shigemoto R, Ciochi S, Berbieri S, Van der Putten H, Kaupmann K, Bettler B, Lüthi A (2006) Generalization of amygdala LTP and conditioned fear in the absence of presynaptic inhibition. *Nat Neurosci* 9:1028–1035
- Stephenson JB, Hoffman MC, Russell AJ, Falconer J, Beach RC, Tolmie JL, McWilliam RC, Zuberi SM (2005) The movement disorders of Coffin-Lowry syndrome. *Brain Dev* 27:108–113
- Thomas GM, Rumbaugh GR, Harrar DB, Haganir RL (2005) Ribosomal S6 kinase 2 interacts with and phosphorylates PDZ domain-containing proteins and regulates AMPA receptor transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:15006–15011
- Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A (1996) Mutations in the kinase *Rsk-2* associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* 384:567–570
- Tsvetkov E, Carlezon WA, Benes FM, Kandel ER, Bolshakov VY (2002) Fear conditioning occludes LTP-induced presynaptic enhancement of synaptic transmission in the cortical pathway to the lateral amygdala. *Neuron* 34:289–300
- Vitale N, Caumont AS, Chasserot-Golaz S, Du G, Wu S, Sciorra VA, Morris AJ, Frohman MA, Bader MF (2001) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J* 20:2424–2434
- Zeniou M, Ding T, Trivier E, Hanauer A (2002) Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning. *Hum Mol Genet* 11:2929–2940
- Zeniou-Meyer M, Zabari N, Ashery U, Chasserot-Golaz S, Haeberle AM, Demais V, Bailly Y, Gottfried I, Nakanishi H, Neiman AM, Du G, Frohman MA, Bader MF, Vitale N (2007) Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J. Biol. Chem.* 282:21746–21757
- Zeniou-Meyer M, Liu Y, Béglé A, Olanish M, Hanauer A, Becherer U, Rettig J, Bader MF, Vitale N (2008) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8434–8439
- Zeniou-Meyer M, Béglé A, Bader MF, Vitale N (2009) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 controls neuroendocrine secretion through the regulation of phospholipase D1 at the exocytotic sites. *Ann NY Acad Sci* 1152:201–208



LIPIDS IN REGULATED EXOCYTOSIS: WHAT ARE THEY DOING?

Mohamed Raafet Ammar, Nawal Kassas, Sylvette Chasserot-Golaz, Marie-France Bader and Nicolas Vitale

Journal Name:	Frontiers in Endocrinology
ISSN:	1664-2392
Article type:	Review Article
First received on:	18 Jun 2013
Frontiers website link:	www.frontiersin.org

LIPIDS IN REGULATED EXOCYTOSIS: WHAT ARE THEY DOING?

Ammar M.R.¹, Kassas N.¹, Chasserot-Golaz S.¹, Bader M.F.¹, & Vitale N.^{1,2}

¹ Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UPR-3212 Centre National de la Recherche Scientifique & Université de Strasbourg, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France.

² Corresponding author: vitalen@inci-cnrs.unistra.fr

Running Title: Fusogenic lipids

Abstract

The regulated secretory pathway in neuroendocrine cells ends with the release of hormones and neurotransmitters following a rise in cytosolic calcium. This process known as regulated exocytosis involves the assembly of soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) proteins, the synaptic vesicle VAMP (synaptobrevin) and the plasma membrane proteins syntaxin and SNAP-25. Although there is much evidence suggesting that SNARE proteins play a key role in the fusion machinery, other cellular elements regulating the kinetics, the extent of fusion, and the preparation of vesicle for release have received scant attention. Among those factors, lipids have more recently been proposed to play important functions both at the level of secretory vesicle recruitment and late membrane fusion steps. Here, we will review the latest evidence supporting the concept of the fusogenic activity of lipids, and also discuss how this may be achieved. These possibilities include the recruitment and sequestration of the components of the exocytotic machinery, regulation of protein function and direct effects on membrane topology.

1. Introduction: a role for lipid in exocytosis?

Release of hormones from neuroendocrine cells occurs through exocytosis, a process in which specialized vesicles (secretory granules) fuse with the plasma membrane in response to extrinsic stimuli leading to elevated cytosolic calcium. Chromaffin cells have proven to be a valuable model for unraveling the molecular mechanisms underlying this fundamental membrane fusion event (Bader et al., 2004). In these cells, secretory granules are first transported from the Golgi area to the cell periphery where they are then docked at the plasma membrane in two apparent stages: a non-primed (fusion incompetent) and a primed (fusion competent) state. Details of the molecular machinery underlying some of these steps have been described. For instance, interaction of granules with the plasma membrane is mediated by soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors (SNAREs) found on granules (v-SNAREs) and on the plasma membrane (t-SNAREs). Through coiled-coil interactions, these proteins form a stable complex that provides the energy necessary to pull membranes into close proximity rendering them fusion competent (Sutton et al., 1998). The mechanism of membrane fusion *per se* is an aspect that continues to be debated. SNAREs are able to drive membrane fusion *in vitro* (Weber et al., 1998), but with relatively slow kinetics suggesting that additional factors are required for physiological membrane fusion. Recently, the SNARE accessory protein Munc18 was shown to increase the speed of SNARE-mediated fusion (Jahn and Fasshauer, 2012). Lipids, the prime constituents of the fusing membranes, are also obvious candidates to accelerate the fusion process. The first lipid firmly demonstrated to be critical for exocytosis was phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂), for review see (Martin, 2012), and more recently fatty acids have been suggested to play an important function in neurotransmitter release from synaptic vesicles (Darios et al., 2007). Growing evidence also support a role for cholesterol and phosphatidic acid during exocytosis, for review see (Chasserot-Golaz et al., 2010). Hence, many observations are in agreement with the notion that lipids play an active role in exocytosis. The issues now arising concern the precise step in the dynamic exocytotic process in which a given lipid actually functions.

2. Lipids are involved throughout the sequential stages underlying exocytosis

a) Cholesterol and phosphatidylserine for defining exocytosis sites

Cholesterol and sphingolipids cluster into discrete microdomains in cellular membranes to form lipid ordered domains. This clustering is triggered by secretagogues at the level of exocytotic sites in chromaffin cells (Chasserot-Golaz et al., 2005). Although cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin provided the initial evidence for a positive role of cholesterol in exocytosis (Chamberlain et al., 2001), these experiments are subjected to caution because of the brought structural role of cholesterol in most cellular functions. More compelling evidence supporting a direct role for cholesterol relies on both biochemical and high-resolution imaging observations indicating that SNAREs concentrate in cholesterol-dependent clusters (Lang, 2007). Additionally, a cholesterol-sequestering agent, the polyene antibiotic filipin, induces a dose-dependent inhibition of catecholamine secretion and the release from the plasma membrane of annexin A2 which participates in the formation and/or stabilization of GM1-PtdIns(4,5)P₂ enriched domains required for granule recruitment. (Chasserot-Golaz et al., 2005; Umbrecht-Jenck et al., 2010). Altogether these findings support the notion that cholesterol is involved in the spatial definition of exocytotic sites.

In the plasma membrane, phosphatidylserine (PS) mostly resides in the inner cytoplasmic leaflet. In non-apoptotic cells, several biological functions are accompanied by a disruption of this phospholipid asymmetry resulting in the externalization of PS on the outer leaflet of the plasma membrane. This is the case for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine chromaffin and PC12 cells (Ceridono et al., 2011; Vitale et al., 2001). However the functional importance of PS scrambling for secretion is still under debate and the precise kinetics of this translocation is not established. An interesting possibility lies in the fact that PS contributes substantially to the negative charge of the inner leaflet of the plasma membrane. Consequently, PS scrambling at exocytotic sites could modify the protein/lipid interactions occurring during either the course of exocytosis or the early phases of endocytosis, as suggested recently (Ory et al., 2013).

b) Phosphoinositides for priming secretory vesicles

Phosphoinositides are a class of phospholipids characterized by an inositol head group that can be phosphorylated on the 3, 4, and 5 position to generate 7 distinct species key in cell signaling and trafficking. Much of the work carried out on exocytosis have focused on the role played by PtdIns(4,5)P₂. Indeed a number of pioneer studies indicated that PtdIns(4,5)P₂ positively modulates secretion in neuroendocrine cells (Aikawa and Martin, 2003; Eberhard et al., 1990; Holz et al., 2000). Using patch clamp experiments on intact chromaffin cells and in parallel analyzing images of plasma membrane lawns, it was subsequently shown that over-expression of the kinase that generates PtdIns(4,5)P₂ causes an increase in the plasmalemmal PtdIns(4,5)P₂ level and secretion, whereas over-expression of a membrane-tagged PtdIns(4,5)P₂ phosphatase eliminates plasmalemmal PtdIns(4,5)P₂ and inhibits secretion (Milosevic et al., 2005). Thus, the balance between the generation and degradation rates of the plasmalemmal PtdIns(4,5)P₂ directly regulates the extent of exocytosis from chromaffin cell. Using the PI3kinase inhibitor LY294002, a correlation between the level of the plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ and the size of the primed vesicle pool was found (Chasserot-Golaz et al., 1998; Milosevic et al., 2005). More recently, a functional link between PtdIns(4,5)P₂ signaling and secretory vesicle dynamics through *de novo* remodeling of the actin cytoskeleton was described (Wen et al., 2011). These observations are consistent with a function of PtdIns(4,5)P₂ as an acute regulator of secretion. PtdIns(4,5)P₂ seems to lie in a key position controlling the size and refilling rate of the primed vesicle pools, but not the fusion rate constants *per se*. In line with this model, we recently reported that the HIV PtdIns(4,5)P₂-binding protein Tat is able to penetrate neuroendocrine cells and accumulate at the plasma membrane through its binding to PtdIns(4,5)P₂. By sequestering plasma membrane PtdIns(4,5)P₂, Tat alters neurosecretion, reducing the number of exocytotic events without significantly affecting kinetic parameters (fusion pore opening, dilatation and closure) of individual events (Tryoen-Toth et al., 2013).

Other phosphoinositides seem to act as signaling or recruitment factors to prime secretory vesicles for exocytosis. For instance, experiments carried out on permeabilized chromaffin cells reveal that PtdIns(3)P located on a subpopulation of chromaffin granules positively regulates secretion (Wen et al., 2008). Extending these observations, PIKfyve kinase that produces PtdIns(3,5)P₂ from PtdIns(3)P on secretory granules was shown to negatively affect exocytosis (Osborne et al., 2008). Hence, these studies highlight a complex regulation of neuroexocytosis by phosphoinositides, with PtdIns(4,5)P₂ and PtdIns(3)P being

essential factors promoting ATP-dependent priming in neurosecretory cells. It is intriguing that PtdIns(3,5)P₂ displays an opposite effect, but reveals how fine-tuning of exocytosis by phosphoinositides could potentially control the number of vesicles undergoing priming in response to a stimulation.

c) Phosphatidic acid for fusion

The local formation of phosphatidic acid (PA) is a recurring theme in intracellular membrane traffic and its involvement in regulated exocytosis has been suggested in various models, including neuroendocrine cells (Bader and Vitale, 2009; Vitale et al., 2001). The development of molecular tools has enabled the identification of phospholipase D1 (PLD1) as the key enzyme responsible for PA synthesis during exocytosis (Vitale et al., 2001; Waselle et al., 2005). Capacitance recordings from chromaffin cells silenced for PLD1 suggest that PLD1 controls the number of fusion competent secretory granules at the plasma membrane without affecting earlier recruitment or docking steps, leading to the idea that PA, as a fusogenic lipid acts directly in membrane fusion (Zeniou-Meyer et al., 2007). In agreement with this concept, a molecular sensor for PA revealed local PA accumulation at the plasma membrane near morphologically docked granules at sites of active exocytosis (Zeniou-Meyer et al., 2007).

d) Other lipids

Various other lipids are suspected to take part in regulated exocytosis. Although most of them have been implicated based on *in vitro* membrane fusion assays, some have also been studied in neuroendocrine cells. For instance, diacylglycerol (DAG) increases stimulus-coupled secretion by recruiting vesicles to the immediately releasable pool through the regulation of the vesicle priming protein Munc13-1 (Bauer et al., 2007). Modulating PS levels also directly affects the rate of exocytosis in PC12 cells. It was shown that PS influences exocytosis by enhancing fusion pore opening and slowing fusion pore dilatation (Zhang et al., 2009). Finally, arachidonic acid produced from different phospholipids by phospholipase A2 and from DAG by DAG-lipase potentiates exocytosis from chromaffin cells (Latham et al., 2007; Vitale, 2010).

3. Lipids as regulators of the exocytotic machinery

As stated in the previous section, PtdIns(4,5)P₂ binds to a large subset of proteins from the exocytotic machinery. *In vitro* experiments revealed that at physiological concentrations PtdIns(4,5)P₂ regulates exocytosis by recruiting protein priming factors such as CAPS which facilitate SNARE-dependent liposome fusion (James et al., 2008). PtdIns(4,5)P₂ is also a necessary cofactor for PLD1 activity and PA synthesis during exocytosis (Du et al., 2003). Finally, the activity of the actin-binding proteins scinderin and gelsolin, two F-actin severing proteins that are constituents of the exocytotic machinery, is regulated by PtdIns(4,5)P₂ (Trifaro et al., 2008).

DAG production through hydrolysis of PtdIns(4,5)P₂ by phospholipase C is mandatory for exocytosis (Hammond et al., 2006). DAG is essential in the priming of exocytosis, owing to the activation of protein kinase C and Munc13, which then modulate the function of syntaxin-1A (Davletov and Montecucco, 2010).

Several constituents and regulators of the exocytotic machinery have also been shown to bind to PA, including small GTPases, NSF and syntaxin-1A (Jang et al., 2011). PA directly activates these proteins, but evidence that this activation directly contributes to exocytosis remains scarce. PA is also an essential cofactor of PI4P5-kinase which produces PtdIns(4,5)P₂, suggesting a possible positive feedback loop in the synthesis of PA and PtdIns(4,5)P₂ (Honda et al., 1999). Additionally, *in vitro* reconstituted fusion assays with purified yeast vacuolar SNAREs, the SNARE chaperones Sec17p/Sec18p, the multifunctional HOPS complex including a subunit of the Sec1-Munc18 family and vacuolar lipids suggest that PA is equally essential for SNARE complex assembly and for fusion. PA has been proposed to facilitate functional interactions among SNAREs and SNARE chaperones (Fig. 1). Interestingly, in this system, PA could not be replaced by either lipids with small headgroups, such as DAG or acidic lipids, such as PS or PI (Mima and Wickner, 2009).

Arachidonic acid has been described to directly promote the assembly of syntaxin-3 with SNAP25 and the formation of the ternary SNARE complex (Darios and Davletov, 2006). Interestingly, omega-3 and omega-6 fatty acids, which play important roles in human health, have been shown to recapitulate this *in vitro* effect of arachidonic acid on SNARE complex formation, suggesting that syntaxins may represent crucial targets of polyunsaturated lipids (Darios and Davletov, 2006). In other words, polyunsaturated lipids may physiologically regulate SNARE complex assembly and thus exocytosis. Along this same line, sphingosine a releasable backbone of sphingolipids, activates vesicular synaptobrevin facilitating the

assembly of SNARE complexes required for membrane fusion (Darios et al., 2009).

4. Lipids as recruiting components of the exocytotic machinery

Within membranes, the ability of microdomains to sequester specific proteins and exclude others makes them ideally suited to spatially organize cellular pathways. Cholesterol-enriched microdomains seem to concentrate components of the exocytotic/fusion machinery. For instance, numerous studies of the distribution of SNARE proteins in various cell types suggest that SNAREs partially associate with detergent resistant, cholesterol-enriched microdomains (Lang, 2007). Palmitoylation appears to be the major targeting signal in these microdomains, as in the case of SNAP-25, although it is likely that other elements contribute to the enrichment of constituents of the exocytotic machinery within these cholesterol microdomains.

Twenty proteins potentially involved in regulated exocytosis have been reported to bind PtdIns(4,5)P₂ (Koch and Holt, 2012). These include synaptotagmin (Schiavo et al., 1996), syntaxin (Lam et al., 2008), Ca²⁺-dependent activator protein for secretion (CAPS) (Loyet et al., 1998) and members of the PLD signaling pathway (Aikawa and Martin, 2003; Du et al., 2003; Liao et al., 2007). Using immunogold labeling of plasma membrane sheets combined with spatial point pattern analysis, we recently observed that PtdIns(4,5)P₂ microdomains co-localize with SNARE clusters and docked secretory granules (Umbrecht-Jenck et al., 2010). Translocation of the PtdIns(4,5)P₂-binding protein annexin A2 to the plasma membrane following cell stimulation is a hallmark of chromaffin cell exocytosis (Chasserot-Golaz et al., 1996). Annexin A2 plays an essential role in calcium-regulated exocytosis by promoting PtdIns(4,5)P₂ and cholesterol-enriched domains containing SNAREs in the vicinity of docked granules (Chasserot-Golaz et al., 2005; Umbrecht-Jenck et al., 2010). Altogether these observations raise the notion that functional exocytotic sites defined by specific lipids such as cholesterol, GM1 and PtdIns(4,5)P₂ are able to recruit and sequester components to build a machine that drives fast and efficient membrane fusion (Fig. 1).

Molecular details of how PtdIns(4,5)P₂ forms a platform for vesicle recruitment have recently been proposed (Honigsmann et al., 2013). In this study, synaptotagmin-1 was shown to interact independently of Ca²⁺ with the polybasic linker region of syntaxin-1A already associated with PtdIns(4,5)P₂ at the plasma membrane. When then triggered by Ca²⁺, this interaction allows the Ca²⁺-binding sites of synaptotagmin-1 to bind PS in the vesicle membrane, thereby bridging the vesicle membrane close enough for SNARE assembly and

subsequent membrane fusion. Interestingly, this polybasic juxtamembrane domain of syntaxin-1A which binds PtdIns(4,5)P₂ has also been shown to tightly bind both PA (Lam et al., 2008) and PtdIns(3,4,5)P₃ (Khuong et al., 2013). Like PtdIns(4,5)P₂, these anionic lipids can probably recruit syntaxin 1A, and it is tempting to propose that the selective recruitment of syntaxin isoforms may depend on the type of lipid present. Furthermore, the fact that these lipids can be quickly converted into different forms using kinases, lipases and phosphatases, such a protein-recruiting mechanism offers a supplementary level of control to adapt the exocytotic machinery to the physiological demands put on the cell.

5. Lipids affect membrane topology during membrane fusion: the concept of fusogenic lipids

The most widely accepted model for membrane fusion, the stalk pore model proposes that the merging of *cis* contacting monolayers gives rise to a negatively curved lipid structure called a stalk. The structure of this stalk depends on the composition of the *cis* monolayers (the outer leaflet of the vesicle and the inner leaflet of the plasma membrane). This model implies that cone-shaped lipids such as cholesterol, DAG, or PA, which have intrinsic negative curvatures, in the *cis* leaflets of contacting bilayers would enhance membrane fusion (Chernomordik and Kozlov, 2005). *Vice versa* inverted cone-shaped lipids (such as PS, gangliosides or lysophospholipids) should prevent membrane fusion in the *cis* leaflets, but promote fusion when present in the outer leaflets (Chernomordik and Kozlov, 2005). Interestingly, GM1 was found enriched in the outer leaflet of the plasma membrane at the sites of exocytosis in stimulated chromaffin cells (Chasserot-Golaz et al., 2005). These GM1 domains may induce positive membrane-curvature in the outer leaflet (Mrowczynska et al., 2012), thereby promoting fusion (Fig 1). Reconstituted fusion assays and direct addition of lipids on cultured cells validate the concept that PA, DAG and cholesterol might promote membrane fusion by changing the spontaneous curvature of membranes (reviewed in (Chasserot-Golaz et al., 2010). At physiological concentrations, PtdIns(4,5)P₂ inhibits SNARE-dependent liposome fusion (James et al., 2008), most likely due to its intrinsic positive curvature-promoting properties. However, PtdIns(4,5)P₂ has been described to be converted from an inverted cone-shaped structure to a cone-shaped form in the presence of calcium (Zimmerberg and Chernomordik, 1999). Thus, in stimulated cells, a local accumulation of PA and PtdIns(4,5)P₂ at granule docking sites where GM1 is in the outer leaflets may well have a synergistic effect on membrane curvature and promote fusion (Fig.

1). In an alternate mode of changing membrane topology, synaptotagmin has been proposed to facilitate membrane fusion by phase separating PS, a process that is expected to locally buckle bilayers and disorder lipids due to the curvature tendencies of PS (Lai et al., 2011).

6. Conclusion

As genuine components of the exocytotic machinery, lipids have several advantages over proteins for this task: lipids can directly change the intrinsic fusion properties of membranes, recruit and/or activate a large number of different proteins to create a local environment in which exocytosis takes place (Fig. 1). As illustrated in this review, a given lipid can play multiple functions, acting either individually or successively or even simultaneously in concert with other lipids. At the same time, the rapid enzymatic production and degradation of lipids at exocytotic sites allows the cell to remain flexible: by changing the lipid levels, physiological function can be modified within seconds or minutes without the need for protein synthesis or degradation. Over the last decade, *in vitro* reconstituted membrane fusion combined with precise methods to quantify specific lipid species and improved molecular and pharmacological tools to manipulate cellular levels of a given lipid, have lead to a better understanding of the capacities of lipids to promote exocytosis at different steps of the process. For different kinds of vesicles in different cell types, it is likely that the local lipid environment may differentially regulate fusion pore formation, enlargement and duration, which may in part explain the great variety of fusion kinetics observed *in vivo*. Finally, lipids could also contribute to the tight coupling between exocytosis and the early stages of membrane retrieval and endocytosis as highlighted in a review of this issue (Houy et al., 2013). Undoubtedly, the next challenge will be to follow individual lipid dynamics at the speed of pore formation and expansion.

Acknowledgment

We wish to thank Dr Nancy Grant for critical reading of the manuscript. This work is supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR-09-BLAN-0264-01 grant) to NV.

References

- Aikawa, Y. and Martin, T. F.** (2003). ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bispophosphate required for regulated exocytosis. *J Cell Biol* **162**, 647-59.
- Bader, M. F., Doussau, F., Chasserot-Golaz, S., Vitale, N. and Gasman, S.** (2004). Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. *Biochim Biophys Acta* **1742**, 37-49.
- Bader, M. F. and Vitale, N.** (2009). Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 936-41.
- Bauer, C. S., Woolley, R. J., Teschemacher, A. G. and Seward, E. P.** (2007). Potentiation of exocytosis by phospholipase C-coupled G-protein-coupled receptors requires the priming protein Munc13-1. *J Neurosci* **27**, 212-9.
- Ceridono, M., Ory, S., Momboisse, F., Chasserot-Golaz, S., Houy, S., Calco, V., Haeberle, A. M., Demais, V., Bailly, Y., Bader, M. F. et al.** (2011). Selective recapture of secretory granule components after full collapse exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. *Traffic* **12**, 72-88.
- Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D. and Gould, G. W.** (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5619-24.
- Chasserot-Golaz, S., Coorssen, J. R., Meunier, F. A. and Vitale, N.** (2010). Lipid dynamics in exocytosis. *Cell Mol Neurobiol* **30**, 1335-42.
- Chasserot-Golaz, S., Hubert, P., Thierse, D., Dirrig, S., Vlahos, C. J., Aunis, D. and Bader, M. F.** (1998). Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in regulated exocytosis: studies in chromaffin cells with inhibitor LY294002. *J Neurochem* **70**, 2347-56.
- Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., Sagot, I., Delouche, B., Dirrig, S., Pradel, L. A., Henry, J. P., Aunis, D. and Bader, M. F.** (1996). Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol* **133**, 1217-36.
- Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., Umbrecht-Jenck, E., Knight, D., Gerke, V. and Bader, M. F.** (2005). Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* **16**, 1108-19.
- Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M.** (2005). Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell* **123**, 375-82.
- Darios, F., Connell, E. and Davletov, B.** (2007). Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J Physiol* **585**, 699-704.
- Darios, F. and Davletov, B.** (2006). Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature* **440**, 813-7.
- Darios, F., Wasser, C., Shakirzyanova, A., Giniatullin, A., Goodman, K., Munoz-Bravo, J. L., Raino, J., Jorgacevski, J., Kreft, M., Zorec, R. et al.** (2009). Sphingosine facilitates SNARE complex assembly and activates synaptic vesicle exocytosis. *Neuron* **62**, 683-94.
- Davletov, B. and Montecucco, C.** (2010). Lipid function at synapses. *Curr Opin Neurobiol* **20**, 543-9.

Du, G., Altshuler, Y. M., Vitale, N., Huang, P., Chasserot-Golaz, S., Morris, A. J., Bader, M. F. and Frohman, M. A. (2003). Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs. *J Cell Biol* **162**, 305-15.

Eberhard, D. A., Cooper, C. L., Low, M. G. and Holz, R. W. (1990). Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase C and removal of ATP. *Biochem J* **268**, 15-25.

Hammond, G. R., Dove, S. K., Nicol, A., Pinxteren, J. A., Zicha, D. and Schiavo, G. (2006). Elimination of plasma membrane phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate is required for exocytosis from mast cells. *J Cell Sci* **119**, 2084-94.

Holz, R. W., Hlubek, M. D., Sorensen, S. D., Fisher, S. K., Balla, T., Ozaki, S., Prestwich, G. D., Stuenkel, E. L. and Bittner, M. A. (2000). A pleckstrin homology domain specific for phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PtdIns-4,5-P₂) and fused to green fluorescent protein identifies plasma membrane PtdIns-4,5-P₂ as being important in exocytosis. *J Biol Chem* **275**, 17878-85.

Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A. et al. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* **99**, 521-32.

Houy, S., Croisé, P., Gubar, O., Calco, V., Chasserot-Golaz, S., Tryoen-Tóth, P., Ory, S., Bader, M-F. and Gasman, S. (2013) Exocytosis and endocytosis in neuroendocrine cells: two unseparable friends ! *Frontiers in Neuroendocrine Science*, This issue.

Jahn, R. and Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201-7.

James, D. J., Khodthong, C., Kowalchyk, J. A. and Martin, T. F. (2008). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *J Cell Biol* **182**, 355-66.

Jang, J. H., Lee, C. S., Hwang, D. and Ryu, S. H. (2011). Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog Lipid Res* **51**, 71-81.

Khuong, T. M., Habets, R. L., Kuenen, S., Witkowska, A., Kasprovicz, J., Swerts, J., Jahn, R., van den Bogaart, G. and Verstreken, P. (2013). Synaptic PI(3,4,5)P₃ is required for Syntaxin1A clustering and neurotransmitter release. *Neuron* **77**, 1097-108.

Koch, M. and Holt, M. (2012). Coupling exo- and endocytosis: an essential role for PIP(2) at the synapse. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 1114-32.

Lai, A. L., Tamm, L. K., Ellena, J. F. and Cafiso, D. S. (2011). Synaptotagmin 1 modulates lipid acyl chain order in lipid bilayers by demixing phosphatidylserine. *J Biol Chem* **286**, 25291-300.

Lam, A. D., Tryoen-Toth, P., Tsai, B., Vitale, N. and Stuenkel, E. L. (2008). SNARE-catalyzed fusion events are regulated by Syntaxin1A-lipid interactions. *Mol Biol Cell* **19**, 485-97.

Lang, T. (2007). SNARE proteins and 'membrane rafts'. *J Physiol* **585**, 693-8.

Latham, C. F., Osborne, S. L., Cryle, M. J. and Meunier, F. A. (2007). Arachidonic acid potentiates exocytosis and allows neuronal SNARE complex to interact with Munc18a. *J Neurochem* **100**, 1543-54.

Liao, H., Ellena, J., Liu, L., Szabo, G., Cafiso, D. and Castle, D. (2007). Secretory carrier membrane protein SCAMP2 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interactions in the regulation of dense core vesicle exocytosis. *Biochemistry* **46**, 10909-20.

Loyet, K. M., Kowalchuk, J. A., Chaudhary, A., Chen, J., Prestwich, G. D. and Martin, T. F. (1998). Specific binding of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS), a potential phosphoinositide effector protein for regulated exocytosis. *J Biol Chem* **273**, 8337-43.

Martin, T. F. (2012). Role of PI(4,5)P(2) in Vesicle Exocytosis and Membrane Fusion. *Subcell Biochem* **59**, 111-30.

Milosevic, I., Sorensen, J. B., Lang, T., Krauss, M., Nagy, G., Haucke, V., Jahn, R. and Neher, E. (2005). Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci* **25**, 2557-65.

Mima, J. and Wickner, W. (2009). Complex lipid requirements for SNARE- and SNARE chaperone-dependent membrane fusion. *J Biol Chem* **284**, 27114-22.

Mrowczynska, L., Lindqvist, C., Iglic, A. and Hagerstrand, H. (2012). Spontaneous curvature of ganglioside GM1--effect of cross-linking. *Biochem Biophys Res Commun* **422**, 776-9.

Ory, S., Ceridono, M., Momboisse, F., Houy, S., Chasserot-Golaz, S., Heintz, D., Calco, V., Haerberle, A. M., Espinoza, F. A., Sims, P. J. et al. (2013). Phospholipid scramblase-1-induced lipid reorganization regulates compensatory endocytosis in neuroendocrine cells. *J Neurosci* **33**, 3545-56.

Osborne, S. L., Wen, P. J., Boucheron, C., Nguyen, H. N., Hayakawa, M., Kaizawa, H., Parker, P. J., Vitale, N. and Meunier, F. A. (2008). PIKfyve negatively regulates exocytosis in neurosecretory cells. *J Biol Chem* **283**, 2804-13.

Schiavo, G., Gu, Q. M., Prestwich, G. D., Sollner, T. H. and Rothman, J. E. (1996). Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13327-32.

Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-53.

Trifaro, J. M., Gasman, S. and Gutierrez, L. M. (2008). Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 165-72.

Tryoen-Toth, P., Chasserot-Golaz, S., Tu, A., Gherib, P., Bader, M. F., Beaumelle, B. and Vitale, N. (2013). HIV-1 Tat protein inhibits neurosecretion by binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Sci* **126**, 454-63.

Umbrecht-Jenck, E., Demais, V., Calco, V., Bailly, Y., Bader, M. F. and Chasserot-Golaz, S. (2010). S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis. *Traffic* **11**, 958-71.

Vitale, N. (2010). Synthesis of fusogenic lipids through activation of phospholipase D1 by GTPases and the kinase RSK2 is required for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *Biochem Soc Trans* **38**, 167-71.

Vitale, N., Caumont, A. S., Chasserot-Golaz, S., Du, G., Wu, S., Sciorra, V. A., Morris, A. J., Frohman, M. A. and Bader, M. F. (2001). Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J* **20**, 2424-34.

Waselle, L., Geron, R. R., Vitale, N., Martin, T. F., Bader, M. F. and Regazzi, R. (2005). Role of phosphoinositide signaling in the control of insulin exocytosis. *Mol Endocrinol* **19**, 3097-106.

Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H. and Rothman, J. E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-72.

Wen, P. J., Osborne, S. L., Morrow, I. C., Parton, R. G., Domin, J. and Meunier, F. A. (2008). Ca²⁺-regulated pool of phosphatidylinositol-3-phosphate produced by

phosphatidylinositol 3-kinase C2alpha on neurosecretory vesicles. *Mol Biol Cell* **19**, 5593-603.

Wen, P. J., Osborne, S. L., Zanin, M., Low, P. C., Wang, H. T., Schoenwaelder, S. M., Jackson, S. P., Wedlich-Soldner, R., Vanhaesebroeck, B., Keating, D. J. et al. (2011). Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate coordinates actin-mediated mobilization and translocation of secretory vesicles to the plasma membrane of chromaffin cells. *Nat Commun* **2**, 491.

Zeniou-Meyer, M., Zabari, N., Ashery, U., Chasserot-Golaz, S., Haeberle, A. M., Demais, V., Bailly, Y., Gottfried, I., Nakanishi, H., Neiman, A. M. et al. (2007). Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J Biol Chem* **282**, 21746-57.

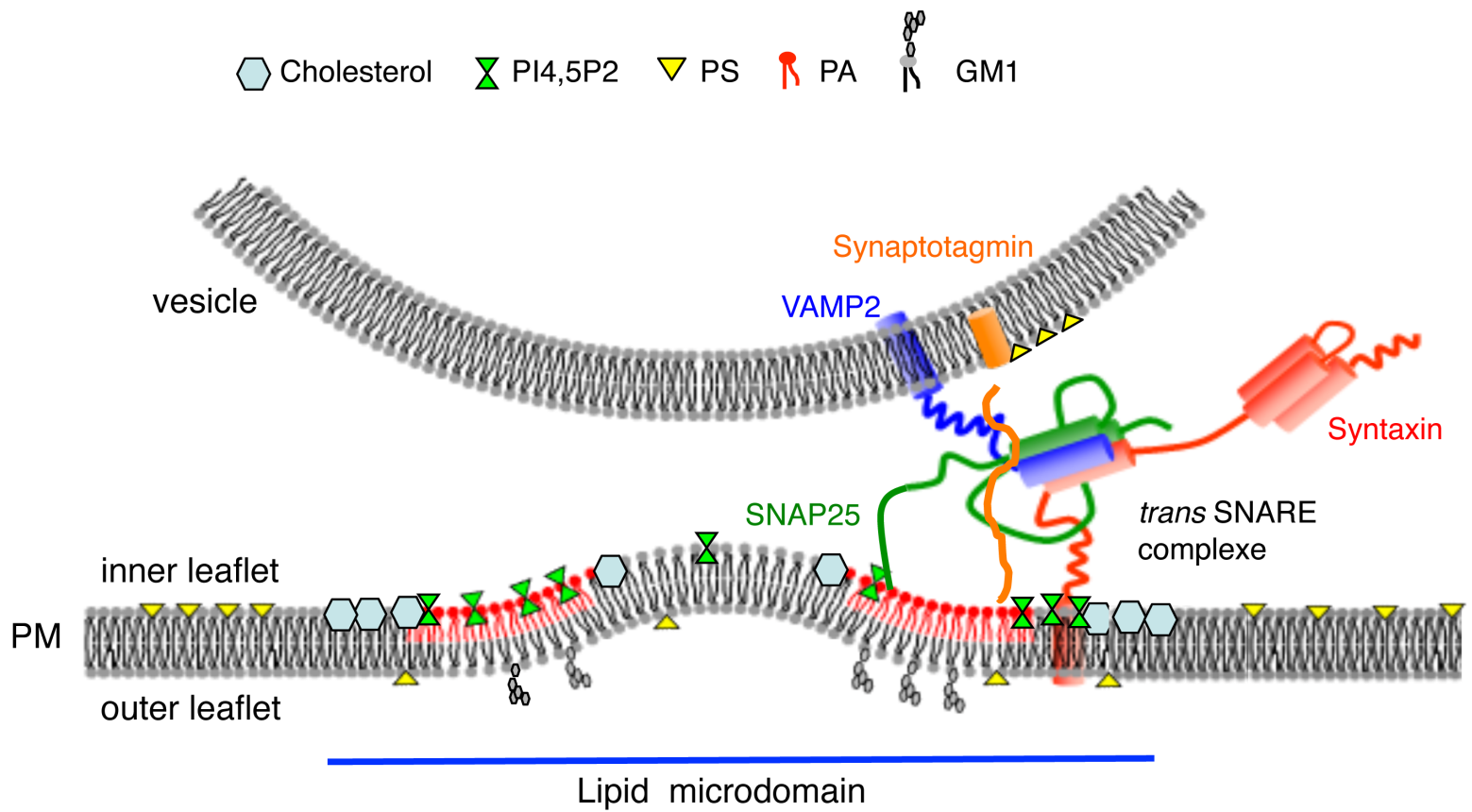
Zhang, Z., Hui, E., Chapman, E. R. and Jackson, M. B. (2009). Phosphatidylserine regulation of Ca²⁺-triggered exocytosis and fusion pores in PC12 cells. *Mol Biol Cell* **20**, 5086-95.

Zimmerberg, J. and Chernomordik, L. V. (1999). Membrane fusion. *Adv Drug Deliv Rev* **38**, 197-205.

Legend

Fig. 1: Model highlighting the importance of lipids for membrane fusion. Exocytotic sites defined as cholesterol, PtdIns(4,5)P₂ and PA enriched microdomains recruit constituents of the docking/fusion machinery and create membrane curvature of the inner leaflet of the plasma membrane prior to promote membrane merging. PtdIns(4,5)P₂ and PA may also regulate SNARE complex assembly and structure.

Figure 1.TIF



ROLE OF PHOSPHOLIPASE D1 IN MEMBRANE TRAFFICKING: INVOLVEMENT IN NEURAL DEVELOPMENT AND REGULATED EXOCYTOSIS.

Neurite outgrowth is a complex mechanism that is still the subject of intense investigation. Current given helped to highlight the involvement of three main mechanisms in neurite growth : i) the dynamics of the cytoskeleton, ii) the intracellular membrane trafficking and membrane supply at the growth cone and iii) cell signaling , mainly via the MAPK-ERK1 / 2, which resulted in the regulation of transcription.

The PLD1 and its product the phosphatidic acid (PA) appear to be at the center of the major pathways involved in neuronal development. My work has deepened our understanding of the cellular role of PLD1 during neurite outgrowth. I showed that PLD1 together with the protein kinase RSK2 regulates the fusion of vesicles positive for Ti-VAMP/VAMP7 during neurite outgrowth. On the other hand, I have determined that PLD1 plays an important role in maintaining the endosomal signaling pathway MAPK-ERK1/2-RSK2-CREB induced by neurotrophin. I also showed that PLD1 regulates the activation of mTOR/p70S6K in response to BDNF. Deregulation of MAP -ERK1 / 2 and mTOR/p70-S6K pathways could be the basis for the reduction of dendritic arborization and maturation of dendritic spines observed in cortical neurons *Pld1*^{-/-} culture.

In addition to the involvement of RSK2 in the regulation of PLD1, I also showed that PLD1 regulates RSK2 activation in response to neurotrophin, possibly via a feedback loop. Thus given obtained suggest a strong link between the two proteins during neuronal development. In the light of these data, alteration of this mechanism could explain the mental retardation observed in patients with Coffin -Lowry syndrome caused by loss of the kinase activity of RSK2. On the other hand, our results suggest a role for PLD1 in exocytosis of vesicles.

Rôle de la PLD1 dans le trafic membranaire :

Implication dans le développement neuronal et l'exocytose régulée.

La croissance neuritique est un mécanisme complexe qui fait toujours l'objet d'intenses investigations. Les données actuelles ont permis de mettre en évidence l'implication de trois mécanismes principaux dans la croissance neuritique : i) la dynamique du cytosquelette, ii) le trafic intracellulaire et l'apport membranaire au niveau du cône de croissance et iii) la signalisation cellulaire, principalement via la voie MAPK-ERK1/2, qui aboutit à la régulation de la transcription.

La PLD1 et son produit l'acide phosphatidique semblent être au centre de voies majeures impliquées dans le développement neuronal. Mes travaux ont permis d'approfondir nos connaissances sur le rôle cellulaire de la PLD1 au cours de la croissance neuritique. J'ai montré que la PLD1 en collaboration avec la kinase RSK2 régule la fusion des vésicules positives pour Ti-VAMP/VAMP7 au cours de la croissance neuritique. D'autre part, j'ai établi que la PLD1 joue un rôle important dans le maintien de la signalisation endosomale de la voie MAPK-ERK1/2-RSK2-CREB induite par les neurotrophines. J'ai également montré que la PLD1 régule l'activation de mTOR/p70S6K en réponse au BDNF. La dérégulation des voies MAPK-ERK1/2 et mTOR/p70-S6K pourraient être à la base de la réduction de l'arborisation dendritique et de la maturation des épines dendritique observée dans les neurones corticaux *Pld1*^{-/-} en culture.

En plus de l'implication de RSK2 dans la régulation de la PLD1, j'ai également montré que la PLD1 régule l'activation de RSK2 en réponse aux neurotrophines, probablement via une boucle de rétrocontrôle. Ainsi les données obtenues suggèrent un lien fort entre les deux protéines au cours du développement neuronal. A la lumière de ces données, un dysfonctionnement de ce mécanisme pourrait expliquer le retard mental observé chez les patients atteints du syndrome de Coffin-Lowry causé par la perte de l'activité kinase de RSK2. D'autre part, les résultats obtenus suggèrent un rôle de la PLD1 dans l'exocytose des vésicules.

Mots-Clefs : PLD1, RSK2, Ti-VAMP, acide phosphatidique, croissance neuritique et développement neuronal.