



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes moléculaires controlant la biogenèse des granules de sécrétion : Role de la chromogranine A, du complexe actomyosine et des lipides de la membrane golgienne

Ophélie Carmon

► **To cite this version:**

Ophélie Carmon. Etude des mécanismes moléculaires controlant la biogenèse des granules de sécrétion : Role de la chromogranine A, du complexe actomyosine et des lipides de la membrane golgienne. Neurobiologie. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR015 . tel-02148306

**HAL Id: tel-02148306**

**<https://theses.hal.science/tel-02148306v1>**

Submitted on 5 Jun 2019

**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.



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

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

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

**Etude des mécanismes moléculaires contrôlant la biogenèse des granules de sécrétion : Rôle de la chromogranine A, du complexe actomyosine et des lipides de la membrane golgienne**

**Présentée et soutenue par  
Ophélie CARMON**

**Thèse soutenue publiquement le 30 mai 2018  
devant le jury composé de**

Mr DELEVOYE Cédric	Chargé de Recherche Inserm, Institut des sciences biologiques (INSB), CNRS UMR144 Compartimentation et dynamique cellulaire (CDC), Institut Curie, Paris	Rapporteur
Mr GOUMON Yannick	Chargé de Recherche Inserm, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), CNRS UPR 3212, Université de Strasbourg	Rapporteur
Mme BARDOR Muriel	Professeure, Laboratoire de Glycobiologie et Matrice Extracellulaire Végétale (Glyco-MEV), EA4358, Université de Rouen Normandie	Examineur
Mr VITALE Nicolas	Directeur de recherche Inserm, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), CNRS UPR 3212, Université de Strasbourg	Examineur
Mr ANOUAR Youssef	Directeur de Recherche Inserm, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), INSERM U1239, Université de Rouen Normandie	Examineur
Mme MONTERO-HADJADJE Maité	Professeure, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), INSERM U1239, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par Maité MONTERO-HADJADJE, Unité INSERM 1239, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Université de Rouen**









*A la source de toute connaissance, il y a une idée, une pensée, puis  
l'expérience vient confirmer l'idée.*

Claude Bernard



# Table des matières

---

Table des matières .....	1
Remerciements .....	3
Liste des publications relatives à ma formation doctorale .....	7
Résumé .....	9
Abstract .....	11
Liste des abréviations .....	13
Liste des figures .....	15
PREAMBULE.....	19
INTRODUCTION .....	25
1) La sécrétion cellulaire .....	25
1.1) La sécrétion constitutive.....	26
1.2) La sécrétion régulée.....	27
1.2.1) Maturation et transport des granules de sécrétion.....	28
1.2.2) Mécanisme d'exocytose.....	31
2) Réseau <i>Trans</i> -golgien et formation des granules de sécrétion.....	35
2.1) L'appareil de Golgi, compartiment clé de la voie de sécrétion régulée .....	35
2.2) Rôle des granines, du pH et du calcium dans l'agrégation des protéines.....	36
2.2.1) Présentation des granines.....	36
Revue 1 : Chromogranins as Molecular Coordinators at the Crossroads between Hormone Aggregation and Secretory Granule Biogenesis .....	37
2.2.2) La chromogranine A (CgA).....	49
a) Modifications post-traductionnelles .....	53
b) Rôle de la CgA dans la sécrétion régulée .....	53
2.2.3) Rôle du pH et du calcium .....	56
2.3) Rôle des protéines membranaires et solubles en tant que signaux d'adressage ....	58
2.4) Rôle des modifications post-traductionnelles dans l'adressage .....	62



2.5) Rôle des lipides membranaires.....	64
2.5.1) Structure lipidique de la membrane golgienne.....	64
2.5.2) Rôle des lipides dans la formation des GS .....	66
Revue 2 : Lipids implicated in the journey of a secretory granule : from biogenesis to fusion .....	66
a) Le cholestérol .....	77
b) L'acide phosphatidique .....	77
3) Protéines cytosoliques et formation des granules de sécrétion.....	80
3.1) Rôle des GTPases .....	80
3.2) Rôle des protéines du manteau.....	81
3.3) Rôle des myosines.....	82
Objectifs de l'étude .....	85
RESULTATS : Article 1 .....	91
RESULTATS : Article 2 .....	107
DISCUSSION .....	149
La CgA interagit avec l'acide phosphatique.....	151
La CgA provoque le recrutement du complexe acto-myosine 1b pour assurer la formation des granules de sécrétion.....	154
Implication des mécanismes moléculaires de la formation des GS dans la compréhension de la physiologie et de la physiopathologie de la sécrétion hormonale.....	157
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	163
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	169

# Remerciements

---

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Unité INSERM 1239, dirigé par le Dr Youssef Anouar, au sein de l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB) de l'Université de Rouen.

Ces études ont été financées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et ont également bénéficié de l'aide généreuse des organismes suivants :

- ✓ L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)
- ✓ L'Université Rouen Normandie
- ✓ L'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB)
- ✓ L'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNbise)
- ✓ La Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)

**Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse,**

En premier lieu, je tiens à remercier le **Dr Cédric Delevoye**, Chargé de recherche au CNRS, à Paris, et le **Dr Yannick Goumon**, Chargé de recherche au CNRS, à Strasbourg, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce mémoire de thèse. Je tiens à les remercier très sincèrement pour leur présence aujourd'hui et l'expertise qu'ils pourront apporter à nos travaux.

Merci également au **Pr Muriel Bardor**, Professeure à l'Université de Rouen, d'avoir bien voulu examiner ce mémoire. Merci pour sa présence aujourd'hui dans mon jury.

Je remercie également notre collaborateur le **Dr Nicolas Vitale**, Directeur de recherche à l'INSERM, à Strasbourg, pour ses conseils, son regard critique et le temps consacré qui nous a permis de mener à bien ce projet. Je le remercie chaleureusement d'avoir accepté d'examiner mes travaux de recherche.

Un grand merci au **Dr Youssef Anouar**, Directeur de Recherche et responsable de l'unité 1239 pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail. Je tiens à lui témoigner ici toute ma gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée, ses encouragements et les critiques constructives qu'il m'a apportés tout au long de ma thèse.

Je souhaiterais également remercier le **Pr Maité Montero-Hadjadje** de m'avoir encadrée durant toutes ces années. Merci de m'avoir fait confiance à mon arrivée en L3 et de m'avoir offert la possibilité d'effectuer une thèse au sein de team CgA ! Tu as été une chef formidable, toujours pleine d'encouragements, disponible que ce soit pour m'aider dans les aléas des manip ou pour préparer mes différentes communications, mais surtout tu as toujours été à l'écoute de mes besoins et tu as su faire de ma thèse une expérience des plus agréables. Une de tes phrases m'a beaucoup servie durant ces années : « la thèse c'est un peu comme une deuxième adolescence » et au fur à mesure de l'avancée de mes travaux, j'ai vraiment compris ce que tu voulais dire. Grâce à toi, j'ai beaucoup muri tant d'un point de vue scientifique mais également humain ; et cette évolution je te la dois en grande partie. Alors encore un grand merci Maité pour avoir été toi et pour tout ce que tu as fait pour moi.

### **Je voudrais remercier par la suite les membres de la Team CgA,**

*Lydie qui a rejoint durant ma thèse notre petite équipe, merci pour tes conseils, ton aide en manip mais également les discussions scientifiques. Merci également pour ces discussions et pauses plus light ayant permis de m'aérer l'esprit dans les journées difficiles.*

*Merci également à toi Fanny, ma jeune Padawan. J'ai été ravie d'avoir pu être ton mini maître durant tes différents stages. Cela a toujours été un plaisir d'être à la paillasse avec toi ! ☺ Pardonne moi pour toutes ces chansons débiles que j'ai pu te mettre en tête, surtout lors de mes craquages du vendredi après-midi ☺ ! J'espère avoir réussi à te transmettre certaines bases qui te permettront de pouvoir réussir ta thèse dans les meilleures conditions possibles et de toute manière je ne serais jamais très loin si tu en as besoin. On ne se débarrasse pas aussi facilement de moi ;)*

*Merci à Lina, qui a rejoint récemment notre petite team. Tu as amené du sang neuf dans l'équipe ;)*

### **Je n'oublie pas les anciens,**

*Merci à mon petit stagiaire Florian d'avoir participé à ce projet et d'avoir été mon cobaye dans mon premier rôle d'encadrement !*

*Je remercie également du fond du cœur mon Maître Jedi Charlène. Merci de m'avoir fait profiter de tes connaissances quand je n'étais encore qu'une toute jeune L3 influençable (oui je me souviens encore des menaces de la chambre froide du sous-sol en cas de manip ratées...). Merci pour ton soutien lors de mes différents stages et surtout pour ma candidature en thèse. Merci pour tes encouragements ; tu as vu, l'aventure de la thèse a également eu lieu pour moi ;)*

*Merci également à Maité Courel, merci de m'avoir accueillie au sein du bureau et de vos pauses café, et pour m'avoir permis de mettre enfin un nom sur la fille aux cheveux roses que tous les étudiants de la fac connaissent.*

### **Je voudrais particulièrement remercier les membres de l'équipe 1 dont j'ai fait partie,**

*Merci à mes voisines de bureau du CURIB : Isabelle, Christine et Dorthe. Merci pour votre aide au quotidien que ce soit en manip, ou pour les discussions scientifiques qui m'ont beaucoup aidée au cours de ma thèse, mais également pour votre bonne humeur au quotidien. Un merci particulier à toi Dorthe qui m'a beaucoup aidée dans ma gestion des stocks et des commandes, tu m'as fait gagner un temps précieux ☺. Merci à toi Christophe pour ces discussions sur la sécrétion et d'avoir toujours été disponible en cas de besoin. Merci à Hugo, ce fût un plaisir de devenir ta voisine dans le CURIB ;) Nos conversations en morse vont me manquer :p. Merci également à Audrey, nouvelle arrivée dans l'équipe mais qui a déjà fait sa place avec sa bonne humeur (et oui sauver une thésarde de l'imprimante maudite ça mérite bien un compliment ☺). Merci Lisa, bon courage à toi pour la suite et je compte sur toi pour surveiller Fanny ! Merci également aux autres membres de l'équipe : Anthony, Luca, Alex (ton humour vaseux me manquera, ou pas... ^^), David, Loubna, Ifat, Maria, Emmanuelle et Cédric.*

### **Je tiens également à remercier,**

*Les membres du laboratoire, trop nombreux pour être cités, qui ont été présents pour moi durant toutes ces années et qui m'ont permis de mener cette thèse dans de bonnes conditions avec toujours le moyen d'avoir une aide au sein du laboratoire.*

*Un merci particulier aux secrétaires, Sabrina, Laurence et Catherine pour leur aide précieuse. Nous serions perdus sans votre aide, nous, pauvres petits thésards découvrant les joies administratives ! Et également merci à Huguette qui a été une vraie maman poule pour les stocks au sein du laboratoire.*

### **Je remercie également mes compagnons de thèse,**

*Tout d'abord un grand merci à vous le groupe des **TJTB** ♥ !! Merci à Zezette Auriane (tu nous as montré la lumière Dr ☺), notre énergique Julie (bon courage à toi pour la suite), notre petite Karimouche (oui je sais, mes blagues ne vont pas te manquer !!), mon petit Benji (merci pour l'accès au garde-manger dans ton bureau ! :p) et enfin Aurélien (oui nos chemins se séparent désormais ^^).*

*Merci également aux autres doctorants et post-doc que j'ai pu côtoyer au cours de ma thèse : Alexandre M, Sarah, Paulo, Carmine, Daniele, Ilhem, Damien, Julien, Alexandre N, Mahmoud, Mouna et Roxane.*

*A tous les thésards, post-Doc, stagiaires que j'ai côtoyés au cours de ma thèse et que je n'ai pas cités, je vous remercie pour tous les moments que nous avons partagés ensemble.*

*Un grand merci aux anciens que je n'oublie pas et qui m'ont toujours soutenu à mon arrivée en thèse : Abdallah, Houssni, Vadim, Cynthia, Maria, Matthieu, Rhita, Jane, Pierre-Mickael et Marion. Un merci particulier à mon poto Alexis. Merci pour ces moments passés en BM1, d'avoir toujours été à l'écoute et d'être toujours disponible quand j'en ai besoin. Merci d'avoir été mon ami et d'avoir embelli mes manips au labo avec ta bonne humeur et nos moments pétage de câble ;)*

### **Je tiens enfin à remercier ma famille et mes proches,**

*Merci à mes amis, Emilie, Sophie, Heidi, Noémie, Fred, Elodie et Cédric qui m'ont toujours soutenue et, merci à vous d'avoir été là pour me faire prendre l'air et voir autre chose que le laboratoire. Un merci particulier au Dr Séverine et au futur Dr Aline, pour votre soutien, pour m'avoir supportée dans ces grandes périodes de stress et surtout pour avoir toujours eu une oreille attentive. « Ce n'est pas tant l'intervention de nos amis qui nous aide mais le fait de savoir que nous pourrons toujours compter sur eux », Epicure.*

*Un grand merci à ma famille qui m'a toujours encouragée et soutenue dans mes études, merci à vous d'avoir toujours été là. Merci à vous d'avoir toujours été fière de votre petite sœur : Karine, Xavier, Laure, Florian et Aurélien. Merci également aux autres membres qui se sont greffés : Djelloul, Laurent et Marie. Merci également de m'avoir donné de magnifiques neveux et nièces qui ont toujours su me redonner le sourire quoi qu'il arrive : Anissa (et ta petite famille : Steven, Léanne, Nolan et notre petit dernier Soan), Joris, Angèle, Louis, Lou et Hugo. Merci également aux autres membres de ma famille pour votre soutien.*

*Enfin, je terminerai mes remerciements par mes parents. Merci à toi Maman de m'avoir toujours encouragée et soutenue dans mes études et m'avoir toujours poussée à donner le meilleur de moi-même, si je suis arrivée jusqu'ici aujourd'hui c'est en grande partie grâce à toi. Merci à toi papa, j'espère que de là où tu es tu es fière du travail accompli, « Tu n'es plus là où tu étais, mais tu es toujours là où je suis », Victor Hugo.*



# Liste des publications relatives à ma formation doctorale

---

## ~ 2016 ~

Tanguy E\*, **Carmon O\***, Wang Q, Jeandel L, Chasserot-Golaz S, Montero-Hadjadje M, & Vitale N.\* Authors equally contributed to this work.

Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion.  
*Journal of Neurochemistry* 2016 Feb 14. doi: 10.1111/jnc.13577.

## ~ 2017 ~

Delestre-Delacour C\*, **Carmon O\***, Laguerre F, Estay-Ahumada C, Courel M, Elias S, Jeandel L, Rayo MV, Peinado JR, Sengmanivong L, Gasman S, Coudrier E, Anouar Y & Montero-Hadjadje M. \* Authors equally contributed to this study.

Myosin 1b and F-actin are involved in the control of secretory granule biogenesis.

*Scientific Reports* 2017 Jul 12;7(1):5172. doi: 10.1038/s41598-017-05617-1.

**Carmon O**, Laguerre F, Jeandel L, Anouar Y & Montero-Hadjadje M.

Chromogranins as molecular coordinators at the crossroads between hormone aggregation and secretory granule biogenesis.

UNIPA SPRINGER SERIES : *Chromogranins: from Cell Biology to Physiology and Biomedicine*, 978-3-319-58337-2, 370411\_1\_En, (3).

## ~ Article en préparation ~

**Carmon O\***, Laguerre F\*, Delestre-Delacour C, Tahouly T, Jeandel L, Fouillen L, Bernard S, Leprince J, Renard P.Y, Vitale N, Anouar Y & Montero-Hadjadje M.

Secretory granule budding depends on Chromogranin A interaction with phosphatidic acid at the TGN membrane. \* Authors equally contributed to this study.

Pour une soumission dans la revue *EMBO Journal*



## Résumé

---

Les cellules neuroendocrines possèdent d'une part la voie de sécrétion constitutive, existant dans tous les types cellulaires, qui permet le renouvellement continu de la membrane plasmique et de la matrice extracellulaire, et d'autre part la voie de sécrétion régulée, spécifique aux cellules sécrétrices, qui permet la sécrétion d'hormones suite à la stimulation de la cellule. Les organites impliqués dans cette dernière voie sont les granules de sécrétion à cœur dense (GS), qui stockent les hormones ainsi que des glycoprotéines solubles, les granines. Parmi ces dernières, la chromogranine A (CgA) joue un rôle majeur dans la biogénèse des GS mais les mécanismes moléculaires ne sont pas clairement définis. Dans une lignée de cellules non-endocrines COS7 (dépourvues de granines et donc de voie de sécrétion régulée), mon équipe d'accueil a démontré que l'expression de la CgA induit la formation de vésicules présentant une structure et des fonctions caractéristiques des GS. L'analyse du protéome des GS purifiés à partir d'une lignée de cellules COS7 exprimant de manière stable la CgA (COS7-CgA) a révélé la présence de protéines liant les éléments du cytosquelette et le calcium. Durant ma thèse, nous avons focalisé notre attention sur la myosine 1b (myo1b), l'actine et le complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 du fait de leur capacité à induire le bourgeonnement de compartiments post-golgiens dans des cellules non-endocrines. Nous avons montré (i) que la myo1b contrôle la formation des GS ainsi que la sécrétion régulée au sein des cellules COS7-CgA et des cellules neuroendocrines PC12, et (ii) que la myo1b et le complexe Arp2/3 permettent le recrutement d'actine fibrillaire dans la région golgienne et la formation des GS. Ces travaux montrent pour la première fois l'implication du complexe actomyosine dans la formation des GS. Afin d'identifier le lien moléculaire entre la CgA lumineuse et la myo1b cytosolique, nous avons recherché les interactions potentielles de la CgA avec les lipides de la membrane du réseau *trans*-golgien (TGN). Nous avons montré (i) que la CgA interagit avec l'acide phosphatidique (PA), (ii) que les espèces de PA prédominantes sont communes dans les membranes golgienne et granulaire, (iii) que la CgA est capable d'interagir spécifiquement avec ces espèces de PA intégrées dans des membranes artificielles et (iv) que l'inhibition de la production du PA au niveau golgien altère significativement la formation des GS et la sécrétion régulée dans les cellules neuroendocrines.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ma thèse suggère que l'interaction entre la CgA et le PA est cruciale pour la biogénèse de GS à partir de la membrane du TGN. Nous émettons l'hypothèse que cette interaction est à l'origine de la formation de microdomaines enrichis en PA qui contrôleraient la courbure de la membrane du TGN et le recrutement du complexe actomyosine.





## Abstract

---

Neuroendocrine cells exhibit the constitutive secretory pathway, which is common to all cell types and allows the continuous renewal of the plasma membrane and the extracellular matrix, and the regulated secretory pathway, which is specific to secretory cells and allows hormone secretion following cell stimulation. The organelles supporting the latter pathway are dense-core secretory granules (SG), which store hormones and soluble glycoproteins, called granins. Among these, chromogranin A (CgA) plays a major role in the biogenesis of SG but the molecular mechanisms underlying this process are not clearly understood. Using non-endocrine COS7 cell line (which are devoid of granins and regulated secretory pathway), my host team has demonstrated that the CgA expression induces the formation of vesicles with structural and functional characteristics of SG. The proteome analysis of purified SG from a COS7 cell line stably expressing CgA (COS7-CgA) revealed the presence of cytoskeleton- and calcium-binding proteins. During my thesis, we focused our attention on myosin 1b (myo1b), actin and actin nucleation complex Arp2/3 due to their ability to induce the budding of post-Golgi compartments in non-endocrine cells. We have shown (i) that myo1b controls SG formation as well as the regulated secretion in COS7-CgA and PC12 neuroendocrine cells, (ii) that myo1b and Arp2/3 complex are required to recruit fibrillar actin (F-actin) to the Golgi region and to SG formation. These results highlight for the first time the involvement of the actomyosin complex in SG formation. In order to identify the molecular link between luminal CgA and cytosolic myo1b, we investigated the potential interactions of CgA with lipids of the trans-Golgi network (TGN) membrane. We showed (i) that CgA interacts with phosphatidic acid (PA), (ii) that the predominant PA species are common in Golgi and granular membranes, (iii) that CgA is able to interact specifically with these PA species included in artificial membranes, and (iv) that inhibition of PA production at the Golgi level significantly alters SG formation and regulated secretion in neuroendocrine cells.

All these results obtained during my thesis suggest that the interaction between CgA and PA is crucial for SG biogenesis from the TGN membrane. We suggest that this interaction is at the origin of the formation of PA-enriched microdomains that could control the curvature of the TGN membrane and the recruitment of the actomyosin complex.



## Liste des abréviations

Abréviations	Significations
<b>ACTH</b>	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> = Hormone corticotrope
<b>AG</b>	Appareil de Golgi
<b>AP</b>	<i>Adaptor protein complexes</i>
<b>AtT20</b>	Cellules corticotropes anté-hypophysaires
<b>BDNF</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>CgA</b>	Chromogranine A
<b>CgB</b>	Chromogranine B
<b>COS7</b>	Lignée cellulaire fibroblast-like issue d'une tumeur rénale de singe
<b>COS7-CgA</b>	Lignée COS7 exprimant de manière stable la chromogranine A
<b>CPE</b>	Carboxypeptidase E
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>GGA</b>	<i>Golgi-localising, Gamma-adaptin ear homology, ARF-binding proteins</i>
<b>GS</b>	Granule de sécrétion
<b>GSI</b>	Granule de sécrétion immature
<b>GSM</b>	Granule de sécrétion mature
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol (1,4,5) –trisphosphate
<b>MP</b>	Membrane plasmique
<b>Myo1b</b>	Myosine 1b Vacuolar-type H <sup>+</sup> -ATPase
<b>PA</b>	<i>Phosphatidic acid</i> = Acide phosphatidique
<b>PAM</b>	<i>Peptidyl-<math>\alpha</math>-amidating monooxygenase</i>
<b>PC</b>	Pro-hormone convertase
<b>PC12</b>	Lignée cellulaire issue d'un phéochromocytome de rat
<b>PE</b>	Phosphatidyléthanolamine
<b>PIP<sub>2</sub></b>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

<b>PLD</b>	Phospholipase D
<b>POMC</b>	Pro-opiomélanocortine
<b>PtdCho</b>	Phosphatidylcholine
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>SgII</b>	Sécrétogranine II
<b>SgIII</b>	Sécrétogranine III
<b>SNARE</b>	<i>Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>
<b>TGN</b>	Trans-Golgi Network = Réseau <i>trans</i> -golgien
<b>V-ATPase</b>	<i>Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase</i>

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique du système endocrine.....	<b>21</b>
<b>Figure 2</b> : Localisation et structure des glandes surrénales.....	<b>21</b>
<b>Figure 3</b> : Cellules chromaffines.....	<b>22</b>
<b>Figure 4</b> : Les voies de sécrétion de la cellule neuroendocrine.....	<b>26</b>
<b>Figure 5</b> : Différentes étapes permettant la formation des granules de sécrétion.....	<b>29</b>
<b>Figure 6</b> : Biogenèse des GS dans les cellules neuroendocrines.....	<b>30</b>
<b>Figure 7</b> : Résumé des différentes étapes de l'exocytose.....	<b>34</b>
<b>Figure 8</b> : Résumé des découvertes des mécanismes et la caractérisation des protéines impliquées lors de la fusion réalisées par Thomas Südhof, James Rothman et Randy Schekman.....	<b>34</b>
<b>Figure 9</b> : Hypothèses présentant le tri des protéines de la voie de sécrétion régulée.....	<b>36</b>
<b>Figure 10</b> : Structure du gène, du transcrit, de la protéine et des peptides dérivés de la chromogranine A.....	<b>50</b>
<b>Figure 11</b> : Modèle présentant les signaux de transduction suite à une stimulation nicotinique ou peptidergique de l'expression génique des granines et de la sécrétion de catécholamines.....	<b>52</b>
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles présentes au niveau de la CgA bovine.....	<b>53</b>
<b>Figure 13</b> : Diminution du nombre de GS dans des cellules PC12 suite à l'inhibition de l'expression de la CgA.....	<b>54</b>
<b>Figure 14</b> : Modèle illustrant l'interaction entre le récepteur à l'IP <sub>3</sub> et les CgA et CgB.....	<b>58</b>
<b>Figure 15</b> : Rôle de la CPE dans la voie de sécrétion régulée.....	<b>60</b>
<b>Figure 16</b> : Sites de synthèse lipidique et composition des membranes cellulaires en lipides.....	<b>65</b>
<b>Figure 17</b> : Structure chimique et représentation simplifiée de l'acide phosphatidique.....	<b>78</b>
<b>Figure 18</b> : Les différentes voies permettant la synthèse d'acide phosphatidique.....	<b>79</b>
<b>Figure 19</b> : Déformation membranaire basée sur la forme des lipides.....	<b>80</b>
<b>Figure 20</b> : Modèle montrant le rôle des régions terminales de la CgA dans l'adressage hormonal....	<b>86</b>
<b>Figure 21</b> : Modèle d'action de la myosine 1b et de la F-actine au niveau de la membrane du TGN pour former des compartiments post-golgiens dans des cellules non-endocrines HeLa.....	<b>87</b>
<b>Figure 22</b> : Schéma récapitulatif des objectifs de mes travaux de thèse.....	<b>88</b>
<b>Figure 23</b> : Schéma hypothétique du mode d'action du PA et du complexe acto-myo1b dans la formation des GS au niveau du TGN.....	<b>156</b>



# Préambule





# PREAMBULE

---

La neuroendocrinologie est une discipline à l'interface entre les neurosciences et l'endocrinologie. L'histoire de la neuroendocrinologie est intimement liée à une des questions clés de la vie : comment le cerveau arrive-t-il à nous maintenir en vie et permettre à notre espèce de survivre ?

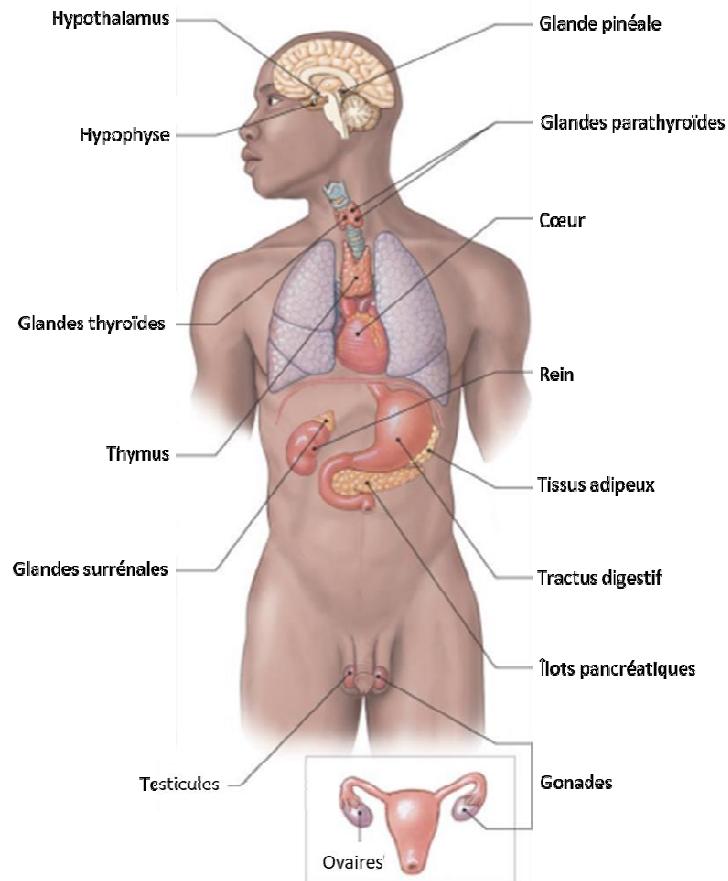
La neuroendocrinologie permet l'étude des interactions entre le système nerveux et le système endocrinien, en étudiant la production d'hormones par les neurones, la sensibilité des neurones aux hormones et les échanges entre les neurones et les glandes endocrines qui permettent à l'organisme de s'adapter aux fluctuations du milieu intérieur et de l'environnement.

Ces interactions ne sont pas exclusivement contrôlées par les hormones, et sont en partie exécutées par le système nerveux parasympathique, qui est quant à lui, régulé par l'hypothalamus. Les premiers travaux de neuroendocrinologie datent de l'antiquité, durant laquelle différents philosophes, tels qu'Hippocrate (460-370 avant JC) ou encore Aristote (384-322 avant JC), ont observé que tous les systèmes biologiques sont en équilibre constant entre différents facteurs étant soit opposés soit alliés les uns aux autres. Ceci a donné naissance à la théorie des humeurs. Ces humeurs reflètent l'harmonie entre le corps et l'environnement. Tout déséquilibre mineur entraîne des « sautes d'humeur », tout déséquilibre majeur menace la santé du sujet. Cette théorie primitive a introduit le concept « d'équilibre dynamique », terme que nous utilisons encore aujourd'hui pour caractériser les interactions complexes de l'organisme. Ce nouveau concept pose les premières bases de l'homéostasie qui résulte d'une balance entre les conditions intérieures et extérieures. Il faudra attendre les travaux de Claude Bernard (1813-1878) et de Walter Bradford Cannon (1871-1945) pour qu'apparaisse le terme d'homéostasie de l'organisme. Claude Bernard, en 1865 crée le concept de milieu intérieur et d'équilibre à l'intérieur de celui-ci : "Tous les mécanismes vitaux, quelques variés qu'ils soient, n'ont toujours qu'un but, celui de maintenir l'unité des conditions de la vie dans le milieu intérieur" (Introduction à l'étude de la médecine expérimentale, Claude Bernard, 1865). Par la suite, Walter Bradford Cannon, en 1926, forgea le mot homéostasie à partir des deux mots grecs stasis (état, position) et homolos (égal, semblable à) (The Wisdom of the Body, Walter Bradford Cannon, 1926).

L'activité permanente de certains organes tels que les glandes endocrines concourt au maintien de cet équilibre. Les hormones correspondent à des substances sécrétées par ces glandes, libérées dans la circulation sanguine et destinées à agir de manière spécifique sur un ou plusieurs organes cibles afin d'en modifier le fonctionnement.

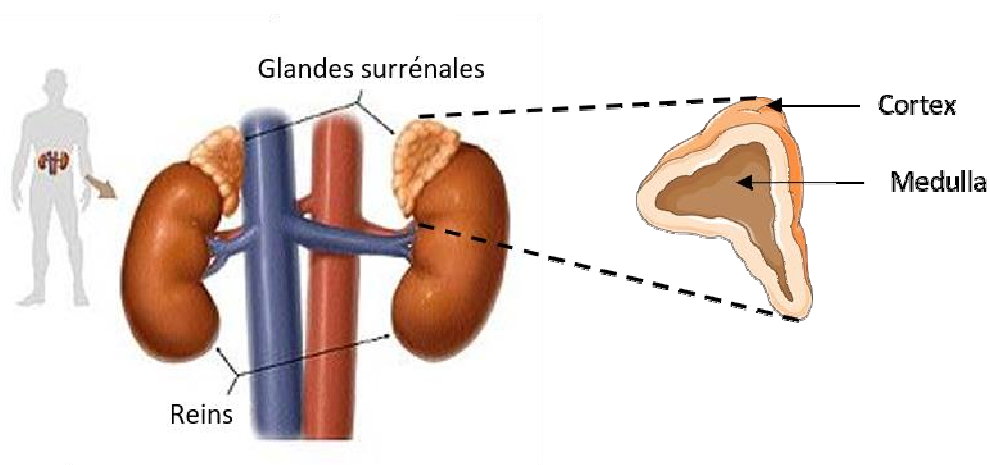
Le système neuroendocrinien est constitué d'un réseau de cellules disséminées dans tout l'organisme. Il a été décrit pour la première fois en 1870 lorsque Martin Heidenhain observe une population de cellules chromaffines au sein de l'épithélium de l'intestin grêle. En 1938, Friedrich Feyrter démontra, par coloration argentique, la présence de cellules dans d'autres organes comme la thyroïde, le thymus ou encore l'appareil respiratoire, qu'il décrit comme constituant « un système de cellules claires », appelé également système endocrinien diffus, et auxquelles il attribue une origine endodermique. Plus tard, Antony Pearse démontra que ces cellules claires ont des propriétés chimiques particulières (captation de précurseurs d'amines et décarboxylation), et les regroupa dans un ensemble nommé le système APUD (Amine Precursor Uptake and subsequent Decarboxylation) (Pearse, 1969). Ces cellules peuvent être regroupées en organes, associées sous forme d'amas cellulaires, ou dispersées dans l'organisme (Polak et Bloom, 1979).

Il est maintenant établi, à la suite des travaux de Le Douarin et collaborateurs, que les cellules endocrines digestives, pancréatiques et pulmonaires sont d'origine endodermique alors que les neurones du système nerveux autonome, les cellules C thyroïdiennes et les cellules chromaffines de la médullosurrénale dérivent des crêtes neurales (Montuenga *et al.*, 2003 ; Le Douarin *et al.*, 1990). De nos jours, le concept de système APUD est abandonné au profit du système neuroendocrine regroupant des cellules sur la base de propriétés sécrétoires communes et non sur leur localisation ou leur origine embryologique. Ainsi le système des cellules neuroendocrines regroupe des neurones et des cellules endocrines ayant un phénotype commun caractérisé par la présence de granules de sécrétion à cœur dense (GS), par l'expression de marqueurs protéiques généraux (chromogranine, synaptophysine...) et par des produits de sécrétion spécifiques (peptides, amines...) (**Figure 1**).



**Figure 1. Représentation schématique du système neuroendocrine.** Localisation des cellules neuroendocrines dans l'organisme humain (source : 2009 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings).

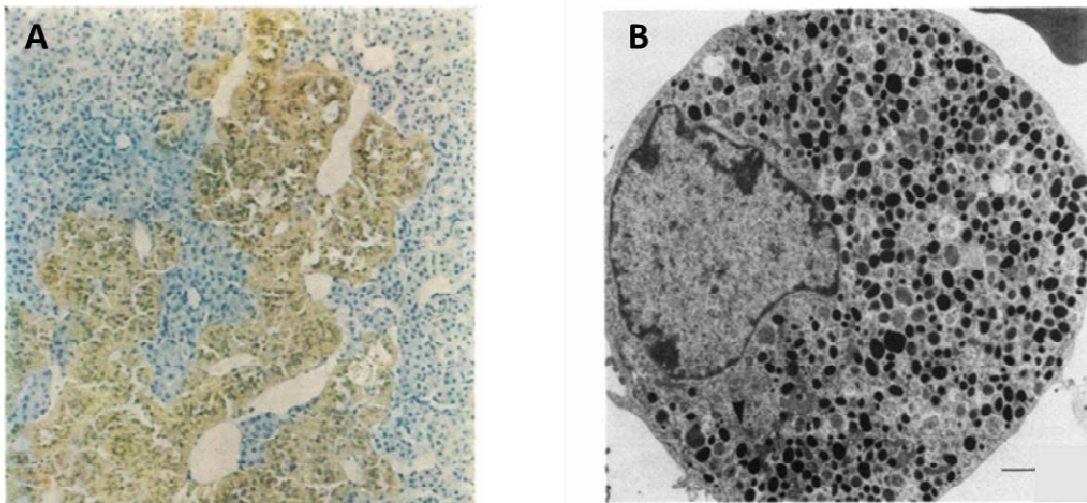
Un exemple de cellule du système neuroendocrine est la cellule chromaffine. Les cellules chromaffines sont retrouvées au niveau de la médullosurrénale, partie centrale des glandes surrénales, organes neuroendocrines associés au système nerveux autonome et situés au pôle supérieur de chaque rein (**Figure 2**).



**Figure 2. Localisation et structure des glandes surrénales.** La médullosurrénale compose la partie médiane des glandes surrénales, glandes neuroendocrines paires situées au-dessus des reins. (Adapté de : [www.nichd.gov](http://www.nichd.gov))

L'appellation cellules chromaffines est due au fait qu'en présence de sels de chrome, les catécholamines qu'elles contiennent précipitent et leur donnent une coloration brune (**Figure 3A**).

En effet, ces cellules chromaffines sécrètent des catécholamines, telles que la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline, ainsi que des peptides (neuropeptide Y, enképhaline...) (Pérez-Alvarez *et al.*, 2010). Au sein des cellules du système neuroendocrine, on retrouve dans le cytoplasme des granules de sécrétion dits « à cœur dense » (GS). Cette appellation est due à leur aspect en microscopie électronique résultant de la très forte concentration des protéines qu'ils contiennent comme les catécholamines dans le cas des cellules chromaffines (**Figure 3B**).



**Figure 3. Cellules chromaffines.** A) Glande surrénale d'un lapin de 4 semaines fixée par perfusion dans du formol-dichromate, colorée avec de l'hématoxyline d'Ehrlich. Les cellules de la medulla apparaissent en jaune-brun et le cortex en bleu. x 120. D'après Coupland, 1954. B) Cellule chromaffine isolée en microscopie électronique, les GS sont reconnaissables par leur aspect dense. Barre d'échelle : 1 µm. D'après Aunis et Garcia, 1981.

# Introduction



# INTRODUCTION

---

## 1) La sécrétion cellulaire

Chez les organismes pluricellulaires, la communication cellulaire est basée sur la sécrétion d'un important arsenal de molécules bioactives.

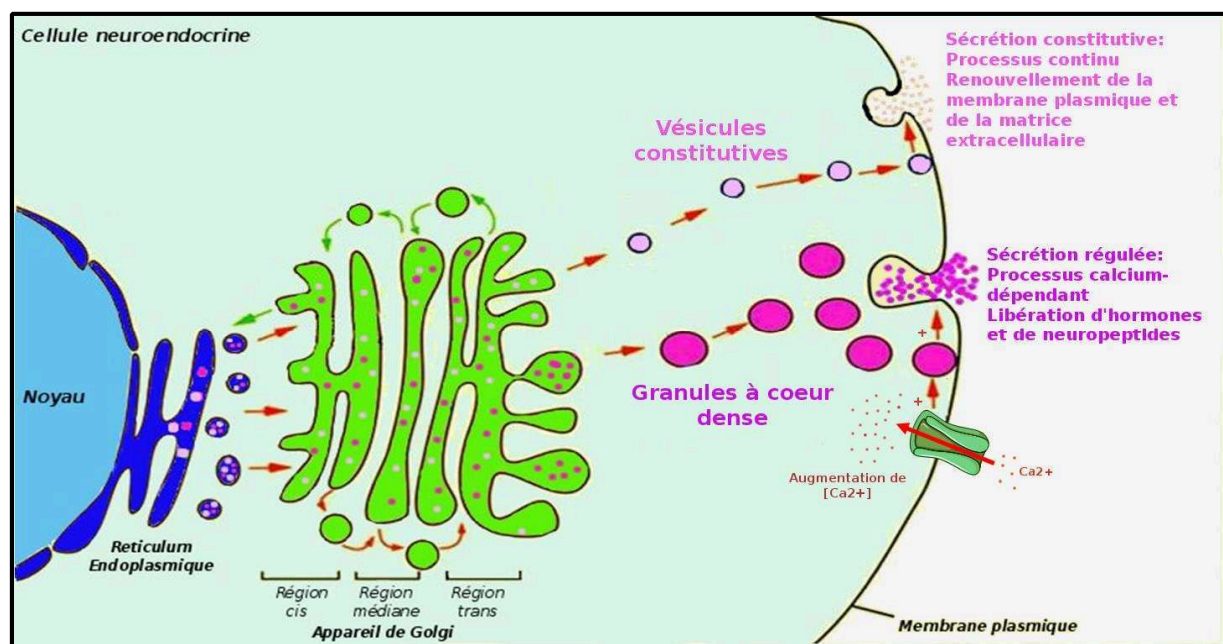
La cellule est une structure hautement compartimentée. La membrane plasmique délimite le cytoplasme au sein duquel se trouvent plusieurs organites, telles que le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi (AG). Ces compartiments, indispensables à l'homéostasie cellulaire, sont également délimités par des membranes. L'appareil de Golgi, riche réseau membranaire, a été identifié par histologie à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par Camillo Golgi. Au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, le développement de la microscopie électronique a permis l'étude fine des systèmes endomembranaires. Très tôt, l'existence d'un tel réseau soulève la question de la biogenèse, du maintien et de la communication des structures membranaires.

Certaines cellules spécialisées dans la sécrétion présentent de large quantité de protéines dans leurs cytoplasmes contenu dans des GS caractéristique de la voie de sécrétion régulée et qui nécessite un stimulus de la cellule pour libérer leurs contenus. En plus de cette voie régulée, ces cellules possèdent une voie de sécrétion constitutive, existant chez tous les types cellulaires, qui permet le renouvellement continu de la membrane plasmique et de la matrice extracellulaire (Park et Loh, 2008) **(Figure 4)**.

George Palade publie en 1964 la première description de la voie de sécrétion régulée (Caro et Palade, 1964). A l'aide de la microscopie électronique, il suit le devenir des protéines destinées à être sécrétées. Les protéines en cours de synthèse sont transloquées dans le RE, puis transportées vers l'AG afin d'y subir des modifications post-traductionnelles avant de rejoindre leur destination finale. Ces protéines sont triées et incluses dans les vésicules des voies de sécrétion. Ces vésicules doivent être formées à partir de l'AG, transportées puis doivent fusionner avec la membrane plasmique, processus qui impliquent des actions concomitantes d'un grand nombre de partenaires moléculaires lipidiques et protéiques. Pour la biogénèse des vésicules de sécrétion, les lipides membranaires permettent d'influencer la courbure et l'agrégation de cargo, processus nécessaires à l'initiation du bourgeonnement des



vésicules. Puis, une fois les vésicules formées, leur transport est permis par les éléments du cytosquelette par l'intermédiaire de moteurs moléculaires qui contrôlent la dynamique, la localisation, la vitesse et la direction des mouvements des vésicules (l'implication de ces partenaires sera développée dans un chapitre ultérieur). Suite à ces mécanismes de bourgeonnement et de transport, a lieu le processus d'exocytose qui, par arrimage et fusion des vésicules à la membrane plasmique, consiste en la libération des molécules contenues dans ces vésicules dans le milieu extracellulaire.



**Figure 4. Les voies de sécrétion de la cellule neuroendocrine.** La voie de sécrétion constitutive est un processus continu, permettant le renouvellement de la matrice extracellulaire et de la membrane plasmique (rose). La voie de sécrétion régulée est caractérisée par des granules de sécrétion à cœur dense qui fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent leur contenu suite à la stimulation de la cellule induisant un influx calcique (violet). Adapté de *Molecular biology of the cell*, 4th edition, Alberts *et al.*, 2002.

### 1.1) La sécrétion constitutive

La voie de sécrétion constitutive est commune à tous les types cellulaires. Elle permet d'une part le renouvellement de la matrice extracellulaire en délivrant des protéines solubles (comme par exemple l'albumine, des facteurs de croissance), et d'autre part celui de la membrane plasmique en délivrant des lipides et protéines membranaires pour maintenir la croissance, la survie et la différenciation des cellules (Kelly, 1985). Les vésicules de sécrétion de la voie constitutive sont de petites vésicules (entre 80 et 100 nm de diamètre), de contenu

non condensé ce qui leur confère un aspect clair en microscopie électronique. Les vésicules de la voie de sécrétion constitutive peuvent bourgeonner indifféremment à partir des régions médiane ou trans de l'AG (Emr *et al.*, 2009). Une fois formées, ces vésicules sont transportées le long des microtubules vers la membrane plasmique, avec laquelle elles fusionnent pour décharger leur contenu à l'extérieur de la cellule par un processus continu. La vitesse de sécrétion dépend donc de la vitesse à laquelle les vésicules de la voie constitutive sont produites et transportées, leur trajet depuis l'AG jusqu'à la membrane plasmique durant en moyenne 10 minutes (Gondré-Lewis *et al.*, 2012).

### 1.2) La sécrétion régulée

La voie de sécrétion régulée est caractéristique des cellules à fonction sécrétrice telles que les cellules endocrines, exocrines et les neurones. Elle est caractérisée par des granules de sécrétion dits à cœur dense (GS) du fait de leur aspect en microscopie électronique. La densité de ces GS est due à l'importante concentration en protéines solubles, telles que les hormones et les granines, protéines présentant une importante capacité d'agrégation avec les peptides et protéines destinées à emprunter la voie de sécrétion régulée, sous conditions de pH acide et de forte concentration calcique rencontrées dans l'AG et les GS (Meldolesi *et al.*, 2004). La formation de ces GS au sein des différentes populations cellulaires nécessite des étapes communes telles que le bourgeonnement à partir de l'AG, suivi d'une étape de maturation pour permettre aux GS de devenir fonctionnels (Kim *et al.*, 2006). Leur taille varie entre 60 et 300 nm selon les types cellulaires. Lors de leur transit dans le RE et l'AG, les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée subissent des modifications post-traductionnelles telles que la formation de ponts disulfure, la glycosylation, la sulfatation, l'amidation et la phosphorylation (Gondré-lewis *et al.*, 2012). Au niveau du TGN, les protéines de la voie de sécrétion régulée sont séparées des autres protéines car elles s'aggrègent dans des conditions de pH acide et de forte concentration calcique locales, puis sont dirigées vers la membrane golgienne pour former les GS par bourgeonnement (Orci *et al.*, 1987) (ces mécanismes seront précisés plus loin au cours de ce manuscrit). Le tableau 1 présente les différentes caractéristiques des voies de sécrétion constitutive et régulée.

Tableau 1 : Comparaison des voies de sécrétion constitutive et régulée

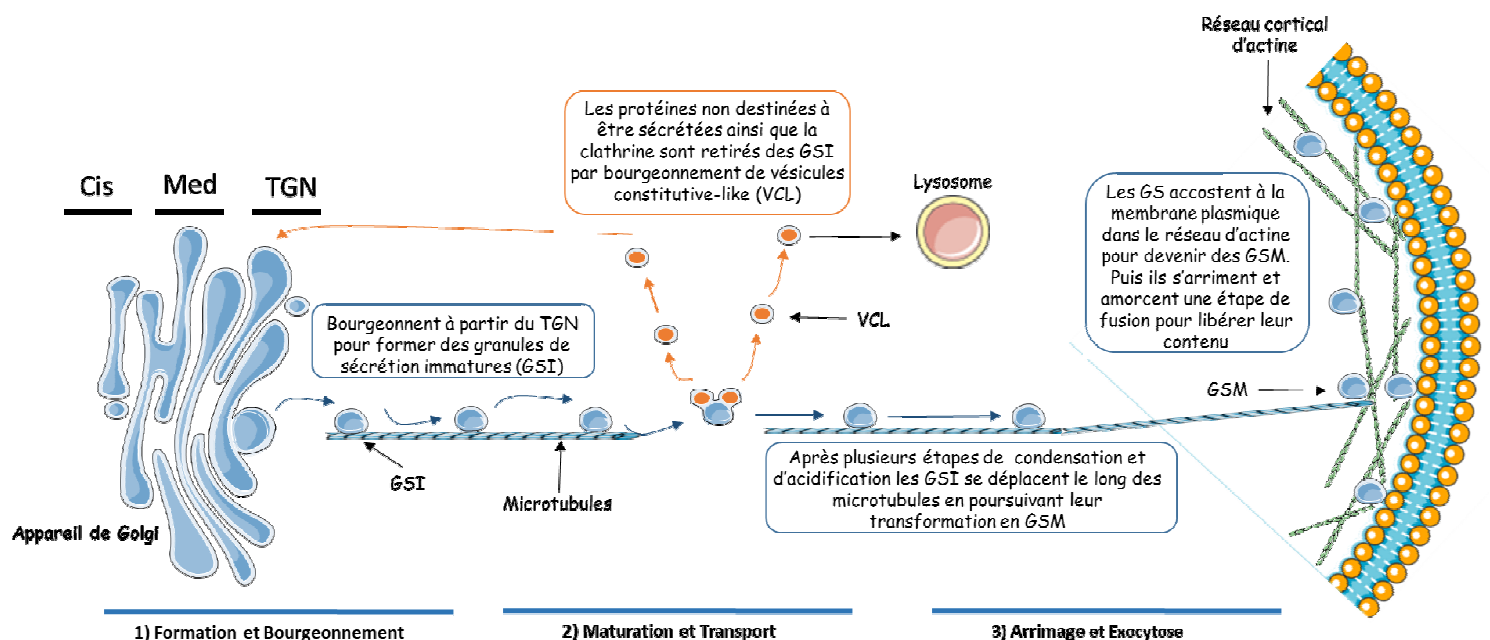
	Vésicules constitutives	Granules de sécrétion à cœur dense
<b>Propriétés morphologiques</b>	-Claires -Diamètre : 80-100 nm	-Cœur dense -Diamètre : 60-300 nm
<b>Assemblage</b>	-Pas de signaux pour l'entrée du cargo dans les vésicules -Pas d'agrégation des protéines avant bourgeonnement -Formation indépendante du pH au niveau du TGN	-Signaux d'adressage/ motifs nécessaires pour l'entrée du cargo dans les GS -Agrégation des protéines nécessaire dans le TGN avant bourgeonnement -Manteau de clathrine nécessaire au bourgeonnement -Formation et maturation dépendantes du pH au niveau du TGN
<b>Sécrétion</b>	-Transport depuis le TGN vers la membrane plasmique <i>via</i> les microtubules -Pas de stimulus externe requis -Phénomène indépendant de la concentration calcique intracellulaire -Transit et libération rapide depuis l'appareil de Golgi ~10min, pas de pool de réserve -Pas de recyclage des composants de la membrane plasmique après exocytose	-Transport du TGN vers le cortex d'actine membranaire <i>via</i> les microtubules -Stockage et transport vers les sites d'exocytose dépendants de l'actine -Exocytose dépendante de signaux extérieurs entraînant un influx calcique -Temps de résidence de 7 à 10h -Recyclage des composants de la membrane plasmique au TGN après exocytose

Adapté de la revue de Gondré-lewis *et al.*, 2012

### 1.2.1) Maturation et transport des granules de sécrétion

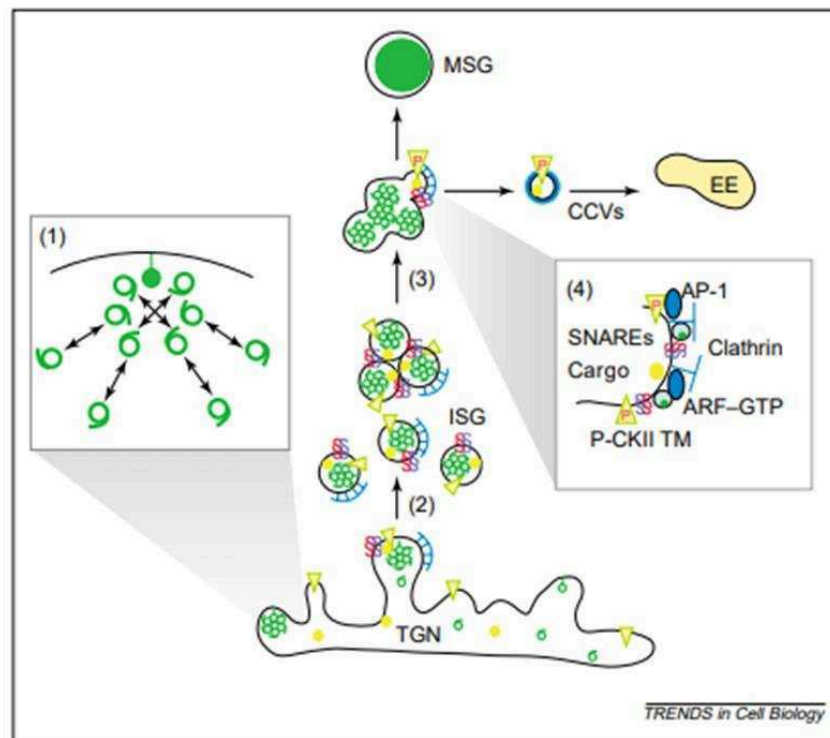
Les granules formés à partir du TGN ne sont pas fonctionnels et sont nommés granules de sécrétions immatures (GSI). Le transport des GSI est assuré le long des microtubules qui les dirigent vers la périphérie cellulaire, où ils seront recrutés par le réseau de filaments d'actine cortical (Rudolf *et al.*, 2001). Suite au bourgeonnement, une acidification progressive a lieu au

cours de la maturation des GS : le pH est de 6.2-6.5 au sein du TGN et passe progressivement à un pH de 5.0-5.5 au cours de la maturation des GS grâce à l'action d'une pompe à protons (V-ATPase) (Wu *et al.*, 2001). Cette acidification du contenu intra-granulaire est nécessaire pour l'activation d'enzymes telles que les pro-hormones convertases (PC) et carboxypeptidases qui assurent la conversion de pro-hormones inactives en hormones biologiquement actives (Urbé *et al.*, 1998). Lors de la formation des GS, certaines protéines de la voie constitutive, enzymes lysosomales et protéines membranaires sont entraînées dans les GSI. Leur élimination par bourgeonnement de vésicules de la voie constitutive-like est l'une des étapes caractérisant la maturation des GS. La maturation des GS implique également l'élimination des protéines du manteau (clathrine et protéines adaptatrices AP) (Tooze et Tooze, 1986) (Figure 5).



**Figure 5. Différentes étapes permettant la formation des granules de sécrétion.** Les GS formés à partir du TGN sont nommés GSI (1). Au cours de la maturation et du transport des GS, une acidification du contenu a lieu et les protéines non destinées à être sécrétées de manière régulée sont extraites par bourgeonnement de vésicules constitutive-like (VCL) et recyclées vers le TGN ou les lysosomes (2). Puis les GS sont recrutés au cortex d'actine périphérique et deviennent des GSM prêt à libérer leur contenu (3). Adapté de (Kim *et al.*, 2006).

La maturation des GS implique également des événements de fusion homotypique faisant intervenir la syntaxine 6 et la synaptotagmine 4, responsables de l'augmentation de la taille des GSI (Wendler et Tooze, 2001 ; Ahras *et al.*, 2006). Ces protéines font partie de la famille des SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) qui sont des protéines aidant à favoriser les fusions membranaires (Wang *et al.*, 2017) (Figure 6).



**Figure 6. Biogenèse des GS dans les cellules neuroendocrines.** Les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée (cercle verts) sont associées à une région spécifique du TGN et assemblées entre elles dans la lumière du TGN (1). D'autres composants tels que les SNARE (S bleu et rouge), des protéines solubles non destinées à être sécrétées (cercle jaunes) et des protéines membranaires (triangles jaunes) sont incluses dans le GSI (2). Après formation du GSI, celui-ci subit des fusions homotypiques contrôlées par les SNARE (3), suivi d'un remodelage membranaire réalisé par les facteurs ARF, AP-1 et la clathrine qui éliminent les protéines non destinées à être sécrétées de manière régulée. Ces processus sont souvent dépendants de la déphosphorylation par la caséine kinase II (P-CKII) (4). Abréviations: EE, endosome précoce. D'après Tooze *et al.*, 2001.

Le rôle de la clathrine a été essentiellement associé au bourgeonnement des GSI en permettant la déformation de la membrane golgienne, puis à l'extraction des protéines non destinées à être sécrétées des GSI. Par ailleurs, la clathrine et les protéines adaptatrices à la clathrine (APs) seraient également impliquées dans le recrutement des protéines cargos dans les GSI. En effet, il a été montré par exemple que la mutation du signal de liaison aux APs dans la région cytosolique de la protéine transmembranaire phogrine entraîne la retenue de celle-ci dans l'AG ainsi qu'une localisation aberrante au sein de la membrane plasmique (Torii *et al.*, 2005). Par ailleurs, la déplétion de la clathrine et/ou d'AP-1 dans deux modèles (cellules HEK et cellules des glandes salivaires larvaires de drosophile) abolit complètement la formation des GS (Lui-Roberts *et al.*, 2005 ; Burgess *et al.*, 2011). Une étude plus récente va également dans ce sens en montrant que l'inhibition de la clathrine par une stratégie d'ARN anti-sens

dans des cellules PC12 entraîne une diminution du nombre de GS matures (GSM) et un blocage quasi complet de la sécrétion régulée (Sahu *et al.*, 2017). Tous ces travaux suggèrent un rôle incontournable de la clathrine dans la biogenèse des GS.

### 1.2.2) Mécanisme d'exocytose

Suite à leur maturation, les GS traversent différentes étapes avant de fusionner avec la membrane plasmique (MP) pour libérer leur contenu par exocytose. Ces étapes correspondent à : l'accostage, l'arrimage, l'amorçage puis la fusion de la membrane des GS avec la MP. Ces étapes étant finement régulées par l'entrée de calcium dans la cellule.

L'étape d'accostage permet de positionner correctement les GS au niveau des sites d'exocytose de la membrane plasmique, en effet les GS sont « emprisonnés » dans le réseau d'actine corticale, suite à une stimulation la dépolymérisation de l'actine puis une repolymérisation locale de celle-ci est nécessaire pour une sécrétion efficace. RhoA, Rac1, Cdc42 et TC10 ont été montré comme contrôlant différents aspects de l'exocytose en modulant la dynamique de l'actine, mais également la production de phosphoinositides dans différents types cellulaires. Par exemple dans les cellules chromaffines, la GTPase RhoA permet d'empêcher le recrutement des GS à la MP *via* son contrôle sur le cytosquelette d'actine. Ce mécanisme est dépendant de la phosphatidylinositol 4-kinase (PI 4-kinase), située sur les GS, cette kinase permet la synthèse locale de PIP2 au niveau de la membrane granulaire (Gasman *et al.*, 1998). Ainsi, l'activation de la voie RhoA /PI 4-kinase et la formation de PIP2 résidant sur les membranes granulaires peuvent favoriser la formation de filaments d'actine associés aux granules et/ou contribuer à la stabilisation de la barrière d'actine périphérique en diminuant l'activité de la scinderine connue pour être impliquée dans la réorganisation de l'actine lors de l'exocytose (Bader *et al.*, 2004). La scinderine activée par le calcium, coupe les filaments d'actine, permettant la destruction de la barrière d'actine responsable de la rétention des GS (Trifaro *et al.*, 2000).

En plus de RhoA, d'autres GTPases sont également impliquées telles que Rab3A et Rab27A (Darchen *et al.*, 1995 ; Desnos *et al.*, 2003). Rab3A lie plusieurs acteurs ayant un rôle clé dans l'exocytose, en particulier les protéines SNARE ou la protéine Rim, localisés à la MP (Johannes *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 1997). La myosine VI intervient également, elle est recrutée de

manière calcium dépendante au niveau des GS et permet de les transporter activement le long des filaments d'actine jusqu'à la MP (Tomatis *et al.*, 2013). D'autres protéines nommées facteurs d'accostage (tethering factor) sont également impliquées dans cette étape. Ces facteurs d'accostages contiennent notamment le complexe de l'exocyste identifié chez la levure grâce à des mutants thermosensibles présentant des défauts de sécrétion. Ce complexe multiprotéique est conservé chez les mammifères et comprend huit sous-unités (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10p, Sec15, Exo70 et Exo84) réparties entre le site de fusion et la membrane des vésicules. Ce complexe permettrait aux vésicules d'être rerutées et stabilisées à la MP en se liant avec des protéines de la vésicule et de la membrane cible. Ces protéines peuvent également interagir avec le complexe SNARE (Yu *et al.*, 2010).

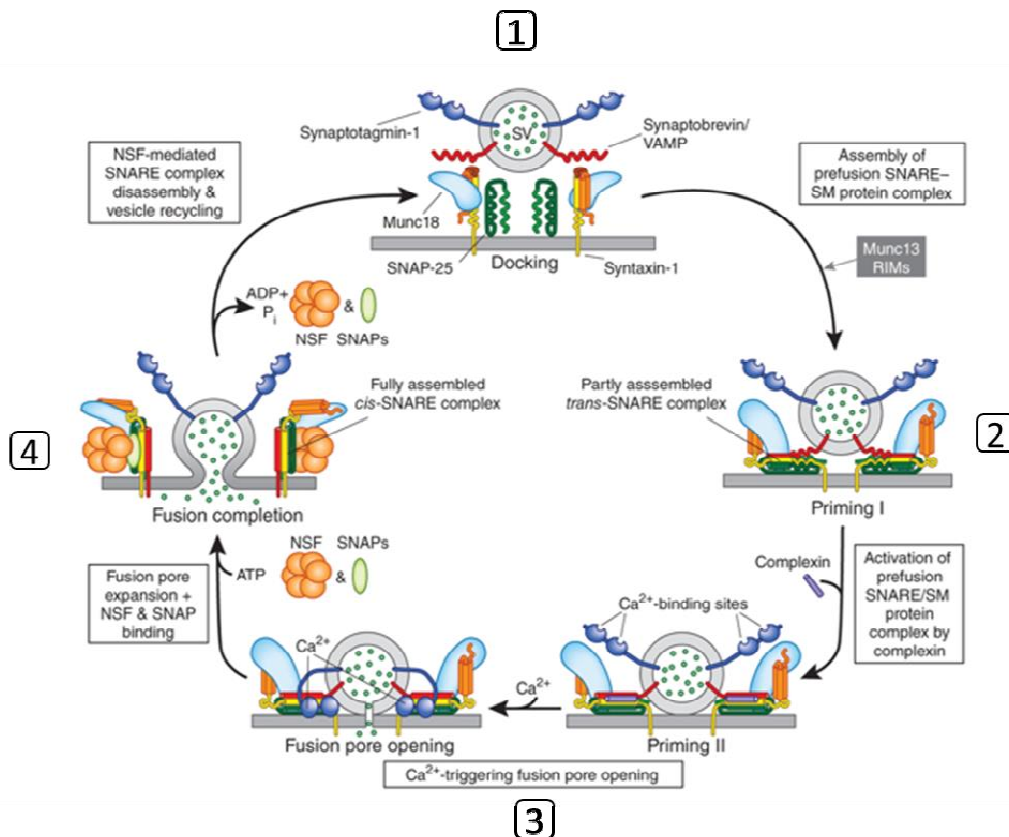
L'étape d'arrimage permet de rapprocher les GS accostés à proximité des sites d'exocytose de la membrane plasmique. Cette étape est permise grâce à la formation d'un complexe multiprotéique, le complexe SNARE. Il est formé à la fois de protéines situées au niveau des GS (synaptobrevine/VAMP) nommées R-SNARE et de la MP (SNAP-25/ syntaxine) nommées Q-SNARE. Les complexes SNARE peuvent s'associer en cis ou en trans. C'est la formation du complexe SNARE en trans qui permet l'association active entre la membrane des GS et la MP pendant l'étape d'arrimage (Burgoyne et Morgan, 2003 ; Sudhof et Rothman, 2009). Au sein des cellules neuroendocrines, ce sont les isoformes syntaxine-1, SNAP-25 et VAMP2 qui sont impliquées dans la formation du complexe (Hong et Lev, 2014). Ces protéines vont s'assembler en hétérotrimère, *via* leurs domaines en hélice  $\alpha$ , et permettre le rapprochement de la membrane du GS et de la MP.

Les stades tardifs de l'exocytose (de la maturation au site de fusion à la dilatation des pores) impliquent environ une douzaine de protéines, dont beaucoup sont essentielles. Munc13 est un facteur d'amorçage important qui coopère avec Munc18 pour diriger l'assemblage des SNARE (Rizo et Xu, 2015 ; Baker et Hughson, 2016). La synaptotagmine-1 (syt-1) et la complexine (cpx) coopèrent pour inhiber la fusion au repos en faible concentration calcique et pour induire une fusion rapide lors d'une élévation du calcium (Chapman, 2008 ; Diao *et al.*, 2012 ; Rizo et Xu, 2015). La syt-1 et la cpx peuvent contribuer à la création de pores (Martens *et al.*, 2007 ; Hui *et al.*, 2009 ; Kyoung *et al.*, 2011 ; Brunger *et al.*, 2015), la syt-1 couplant le calcium lors de la fusion (Rizo et Xu, 2015) et la cpx permettant d'augmenter l'efficacité du processus (Lai *et al.*, 2016).

Dans les conditions physiologiques, l'exocytose est stimulée par un influx de calcium par l'intermédiaire de canaux calciques voltage-dépendants. Ainsi, afin de déclencher l'étape de fusion, un senseur calcique doit être recruté au niveau du site d'exocytose. Les candidats proposés pour tenir ce rôle appartiennent à la famille des synaptotagmines, qui possèdent deux domaines C2 pouvant lier les lipides et le calcium. Les synaptotagmines peuvent également interagir avec le complexe SNARE, les canaux calciques, la calmoduline et la protéine adaptatrice à la clathrine (AP2) (Marquèze *et al.*, 2000).

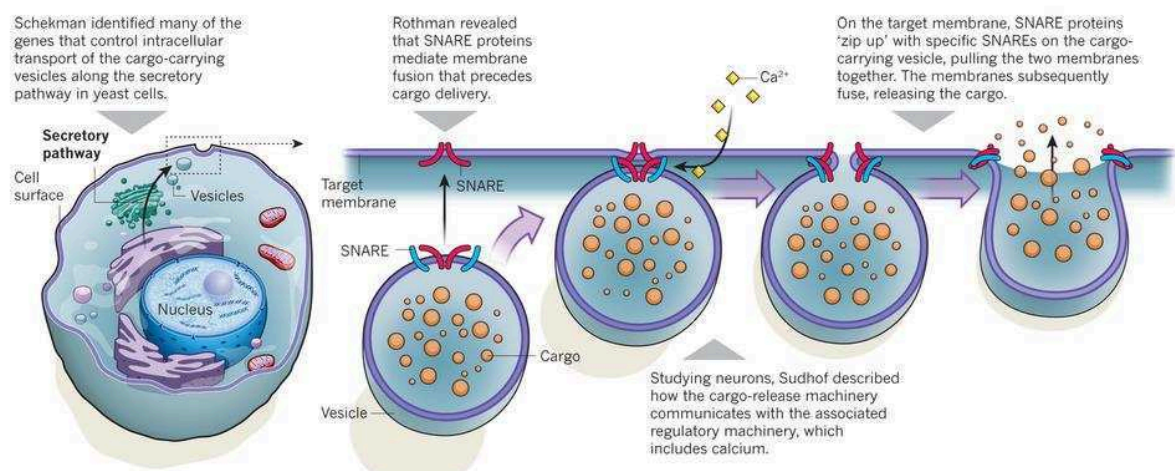
A la fin de l'étape d'amorçage, le complexe SNARE, est en conformation lâche, ne permettant pas la fusion. L'entrée de calcium permet à la synaptotagmine de déplacer la complexine pour favoriser un changement de conformation du complexe SNARE selon un concept de « fermeture éclair » permettant de rapprocher les membranes et l'étape de fusion (Jahn et Scheller, 2006). Après la fusion, les protéines SNARE sont localisées sur la membrane plasmique et forment un complexe en cis qui sera dissocié *via* l'intervention de l'ATPase NSF combinée à son co-facteur SNAP (Hatsuzawa *et al.*, 2003). Cette dissociation est nécessaire pour la réactivation des protéines SNARE devant être à nouveau disponible pour initier un autre cycle de fusion (**Figure 7**).





**Figure 7. Résumé des différentes étapes de l'exocytose.** Au cours de l'étape 1, les vésicules synaptiques amorcent leurs fusions. La syntaxine passe en conformation ouverte permettant sa liaison avec Munc18 et le complexe t-SNARE se forme partiellement. Au cours de l'étape 2, le pore de fusion s'ouvre, le complexe t-SNARE est alors complètement assemblé. Au cours de l'étape 3, le pore de fusion se développe suite à l'action du calcium. Dans l'étape 4, NSF et SNAP permettent le désassemblage du complexe SNARE, conduisant au recyclage des vésicules. D'après Südhof, 2013.

L'identification de ces différents mécanismes et la caractérisation des protéines impliquées lors de la fusion ont été réalisées par Thomas Südhof, James Rothman et Randy Schekman, ce qui leur a valu le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2013 (**Figure 8**).



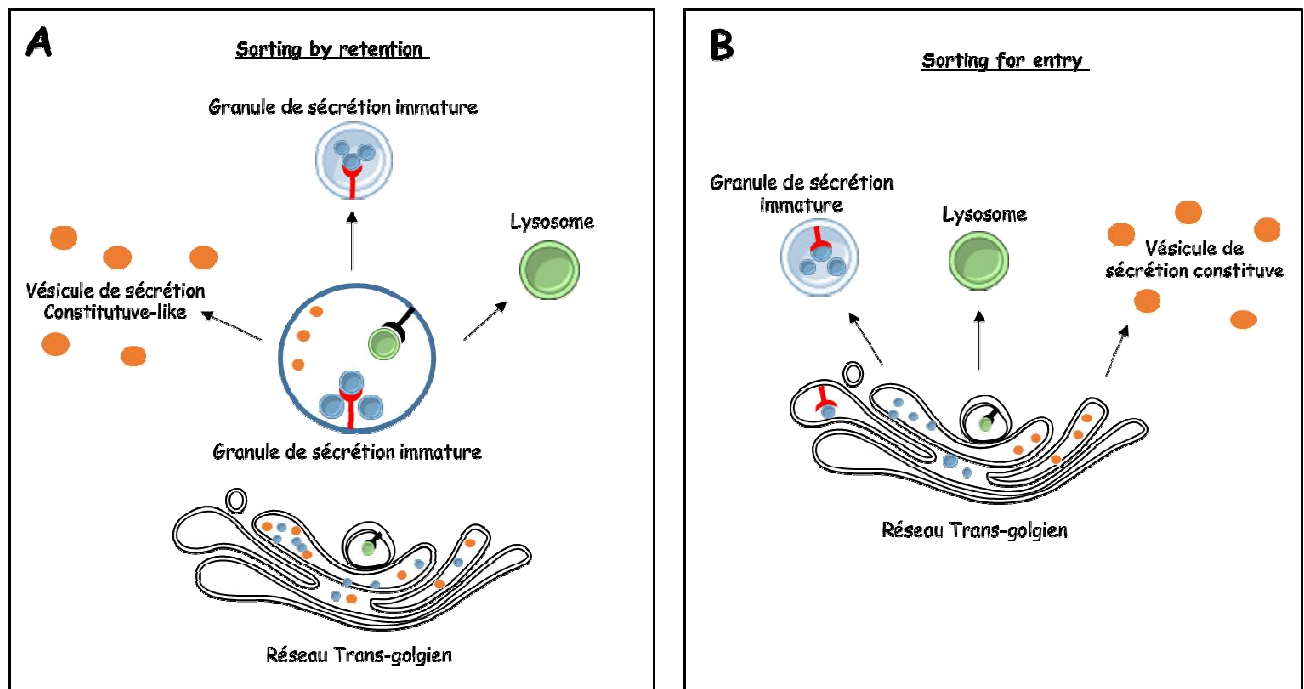
**Figure 8. Résumé des découvertes des mécanismes et la caractérisation des protéines impliquées lors de la fusion réalisées par Thomas Südhof, James Rothman et Randy Schekman.** (Source :<http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/3CoursdeBiochSTRUCT/9TraficVesiculaire/1TraficVesiculaire.htm>)

## 2) Réseau *Trans*-golgien et formation des granules de sécrétion

### 2.1) L'appareil de Golgi, compartiment clé de la voie de sécrétion régulée

La formation des GS est initiée par bourgeonnement de la membrane du TGN. Ce mécanisme nécessite l'intervention de protéines et de lipides membranaires, ainsi que de protéines solubles et cytosoliques (Kim *et al.*, 2006).

Une première étape préalable à la biogenèse des GS est l'agrégation des différentes protéines destinées à la voie de sécrétion régulée. Deux grandes hypothèses sont avancées quant aux mécanismes de tri des protéines au niveau du TGN (Kelly, 1985 ; Chanat, 1993). La première correspond à un mécanisme passif, nommé « *sorting by retention* », c'est-à-dire que toutes les protéines agrégées seraient adressées dans les GSI, puis les protéines non destinées à être sécrétées de manière régulée seraient extraites pendant la maturation des GS soit par bourgeonnement de vésicules issues de la voie dites « *constitutive-like* » (qui seraient soit recyclées au TGN *via* les endosomes ou sécrétées de manière constitutive) ou adressées aux lysosomes grâce à un récepteur d'adressage, les protéines restantes étant dirigées vers les GSM (**Figure 9A**). La deuxième hypothèse soutient quant à elle un mécanisme actif, nommé « *sorting for entry* », c'est-à-dire que les protéines destinées à être sécrétées de manière régulée seraient triées par agrégation et interaction avec des récepteurs d'adressage insérés dans la membrane du TGN, facilitant ainsi leur entrée dans les GSI, alors que les autres protéines sont destinées soit à la voie de sécrétion constitutive soit aux lysosomes *via* d'autres récepteurs d'adressage (**Figure 9B**) (Dikeakos et Reudelhuber, 2007). Au regard des dernières études sur les mécanismes impliqués, il semblerait que les 2 processus soient nécessaires pour un adressage optimal des protéines vers la voie de sécrétion régulée.



**Figure 9. Hypothèses présentant le tri des protéines de la voie de sécrétion régulée.** A) Modèle « Sorting by retention » : toutes les protéines sont agrégées et adressées vers les GSI ; les protéines non destinées à être sécrétées sont soit recyclées vers des vésicules constitutive-like (orange), ou adressées aux lysosomes (vert) grâce à un récepteur d'adressage (noir). Les protéines destinées aux GS restent dans le granule qui deviendra par la suite mature (bleu). B) Modèle « Sorting for entry » : les protéines (bleu) destinées au GS sont triées par agrégation et interaction avec des récepteurs au niveau de la membrane du TGN (rouge), alors que les autres protéines présentes au TGN sont destinées soit à la voie de sécrétion constitutive (orange) soit aux lysosomes (vert) *via* des récepteurs d'adressage (noir). Adapté d'après Tooze, 1998.

## 2.2) Rôle des granines, du pH et du calcium dans l'agrégation des protéines

### 2.2.1) Présentation des granines

Les chromogranines font partie de la famille des glycoprotéines acides et solubles. Elles constituent le composant majoritaire des GS des cellules endocrines, neuroendocrines et neuronales. Les trois membres principaux de cette famille sont : la chromogranine A (CgA), la chromogranine B (CgB) et la sécrétogranine II (SgII) parfois appelée chromogranine C. Elles partagent des caractéristiques et des propriétés structurales communes et sont à l'origine de l'agrégation et du tri des pro-hormones dans les GS. En effet, les chromogranines ont une forte proportion d'acides aminés acides et une capacité élevée à lier le calcium, propriétés qui soutiennent leur capacité à s'agréger les unes avec les autres et avec des neuropeptides dans les conditions de faible pH et de calcium élevé caractéristiques du TGN (Elias *et al.*, 2010). Les chromogranines présentent également plusieurs sites dibasiques qui sont les cibles des PCs, conduisant à la formation de peptides biologiquement actifs (Montero-Hadjadje *et al.*, 2008)

mais agissant également comme récepteurs de tri des agrégats induits par les chromogranines afin de les diriger vers les GS (Elias *et al.*, 2010). Ces phénomènes sont possibles grâce à l'interaction des chromogranines avec des récepteurs de tri comme la carboxypeptidase E (CPE) ou bien avec des lipides tel que le cholestérol (Hosaka *et al.*, 2004). La diversité des chromogranines partageant des caractéristiques structurales communes, mais avec des fonctions possibles différentes, implique une variété de populations de granules de sécrétion dont l'existence et la fonction restent à établir dans un type de cellule neuroendocrine donné (Carmon *et al.*, 2017).

Les rôles des différents membres de la famille des chromogranines dans les processus d'agrégation d'hormones, de la biogenèse des granules de sécrétion et du tri des hormones grâce à leur interaction avec la membrane du TGN, ainsi que la place des chromogranines dans l'altération de la sécrétion régulée dans des conditions physiopathologiques sont synthétisés dans la revue ci-dessous, sa rédaction ayant constitué une partie de mes activités de thèse.

Revue 1 : [Chromogranins as Molecular Coordinators at the Crossroads between Hormone Aggregation and Secretory Granule Biogenesis](#)



# Chromogranins as Molecular Coordinators at the Crossroads between Hormone Aggregation and Secretory Granule Biogenesis

O. Carmon, F. Laguerre, L. Jeandel, Y. Anouar, and M. Montero-Hadjadje

**Abstract** Chromogranins are members of a family of soluble glycoproteins sharing common structural features and properties, known to be inducers of prohormone aggregation and sorting into secretory granules. There is now increasing evidence for a key role of chromogranins in hormone sorting to the regulated secretory pathway, resulting from the interaction of chromogranin-induced aggregates with the TGN membrane through either sorting receptors such as carboxypeptidase E, or lipids such as cholesterol. These molecular interactions would contribute to the TGN membrane remodeling, a prerequisite to the recruitment of cytosolic proteins inducing membrane curvature and consecutive secretory granule budding. The identification of the molecular cues involved in the biogenesis of secretory granules is currently under intense investigation. The diversity of chromogranins sharing common structural features but with possible non-redundant functions implies a variety of secretory granule populations whose existence and function remain to be established in a given neuroendocrine cell type.

The present chapter deals with the role of the different members of the chromogranin family in the processes of hormone aggregation, secretory granule biogenesis, and hormone sorting through their interaction with the TGN membrane. Finally, the alteration of chromogranin secretion is described in pathophysiological conditions linked to dysregulated hormone secretion.

## 1 Introduction

The production and release of neurohormones by neuroendocrine cells are crucial for the coordination of the physiological functions governing organisms. Neurohormones are molecular mediators that are stored in vesicular organelles, called secretory granules, generated by budding of the trans-Golgi network (TGN)

---

O. Carmon • F. Laguerre • L. Jeandel • Y. Anouar (✉) • M. Montero-Hadjadje  
Inserm U1239, University of Rouen-Normandy, UNIROUEN, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Mont-Saint-Aignan, France  
e-mail: [youssef.anouar@univ-rouen.fr](mailto:youssef.anouar@univ-rouen.fr)

© Springer International Publishing AG 2017

T. Angelone et al. (eds.), *Chromogranins: from Cell Biology to Physiology and Biomedicine*, UNIPA Springer Series, DOI 10.1007/978-3-319-58338-9\_3

membrane. The predominant components found in secretory granules are chromogranins including chromogranin A (CgA), chromogranin B (CgB) also named secretogranin I (SgI), secretogranin II (SgII), SgIII, 7B2 (SgV), NESP55 (SgVI), VGF (SgVII), and proSAAS (SgVIII), which constitute a family of soluble phospho-glycoproteins with similar structural features that confer to these proteins common functional attributes in the biogenesis of secretory granules and the sorting of prohormones. Indeed, chromogranins exhibit a high proportion of acidic amino acids and a high capacity to bind calcium, which support their ability to aggregate with each other and with neuropeptides in the low pH and high calcium conditions found in the TGN (Elias et al. 2010). Chromogranins also exhibit several dibasic sites which are the targets of processing enzymes, leading to the formation of biologically active peptides (Metz-Boutigue et al. 1993; Montero-Hadjadje et al. 2008) but also acting as sorting receptors for chromogranin-induced aggregates in order to direct them to secretory granules (Elias et al. 2010). These proteins are also able to concentrate catecholamines inside the secretory granules to control their release during the exocytotic process (Machado et al. 2010). In this chapter, we will provide a brief update on the central role of chromogranins in the concomitant molecular phenomena involved in the formation of secretory granules (molecular aggregation, sorting of hormone aggregates and budding of the TGN membrane) and leading to the establishment of the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells.

## **2 I/ The Twenty-First Century, the Advent of Chromogranins as Critical Regulators of Secretory Granule Biogenesis**

To date, several members of the chromogranin family are known to play an active role in the formation of secretory granules. The pioneer study was performed using an antisense RNA strategy to knockdown CgA expression in neuroendocrine PC12 cells, which showed a drastic reduction of secretory granule number (Kim et al. 2001). Following this initial observation, two strains of CgA knockout mice were generated which diverged for the outcome of secretory granules but which both exhibited hypertension due to an increase in circulating catecholamine levels (Mahapatra et al. 2005, Hendy et al. 2006). These data suggested therefore the existence of a link between CgA expression and the biogenesis of functional secretory granules. Interestingly, disruption of the CgB gene in mice revealed a similar phenotype in pancreatic and chromaffin cells regarding the secretory granule number, with a defective secretion of islet hormones and catecholamines (Obermüller et al. 2010, Díaz-Vera et al. 2010). Similarly, knockdown of SgII expression leads to a decrease in the number of secretory granules in PC12 cells (Courel et al. 2010).

Genetic ablation of SgIII in mice caused no apparent defects despite the ubiquitous expression of SgIII in neuroendocrine cells and tissues (Kingsley et al. 1990). In SgIII-deficient AtT20 cells, the intracellular retention of CgA and proopiomelanocortin (POMC) were impaired, but residual adrenocorticotrophic hormone (ACTH)/POMC together with SgII were still localized to the remaining secretory granules, and were secreted in a regulated manner (Sun et al. 2013). The role of a less known member of the chromogranin family, VGF, in secretory granule biogenesis has been investigated more recently (Fargali et al. 2014). In this study, VGF-knockout mice exhibited decreased secretory granule size in noradrenergic chromaffin cells, decreased adrenal CgB and increased plasma epinephrine leading to hypertension, while knock-in of human VGF1–615 rescued the hypertensive knockout phenotype. Interestingly, knock-in of human VGF1–524, that lacks C-terminal peptide TLQP-21, resulted in a significant increase in blood pressure and infusion of TLQP-21 normalized hypertension. Together, these studies indicate that chromogranins and chromogranin-derived peptides may have redundant and non-redundant roles in the regulated secretory pathway, and in the regulation of catecholamine levels and blood pressure.

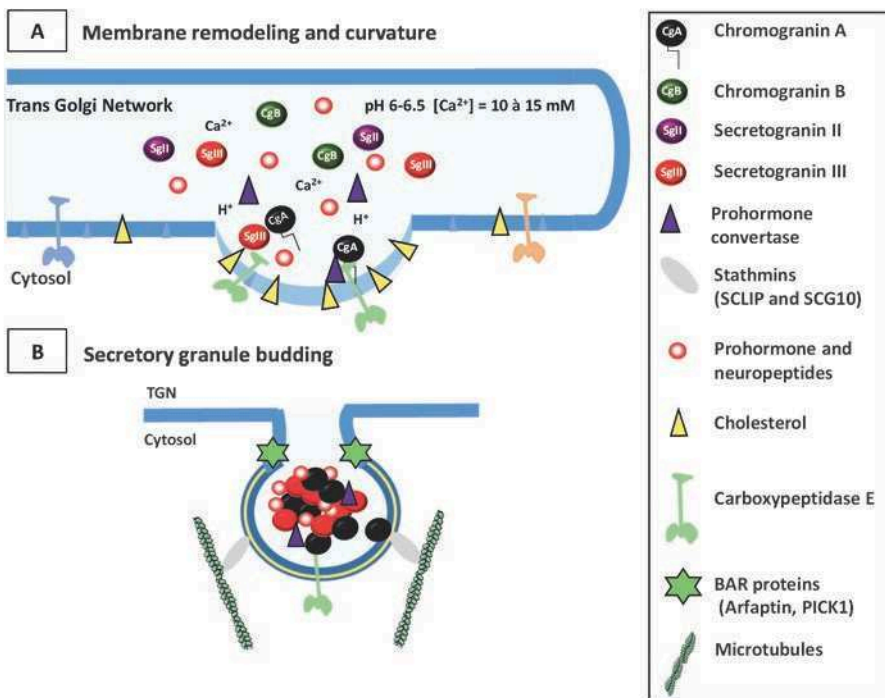
### **3 II/ Hormone Aggregation as the First Function Assigned to Chromogranins**

After their biosynthesis in the rough endoplasmic reticulum, chromogranins are transported and stored as soluble glycoproteins in the TGN lumen which exhibits high calcium concentration (10–15 mM) and low pH (6–6.5) (Kim et al. 2006). Chromogranins share several structural properties that are conserved during evolution, such as global acidity that enables them to bind calcium with low affinity and high capacity (Taupenot et al. 2003). A structural analysis of CgA revealed that in the conditions of the TGN lumen, CgA can adopt a coiled-coil structure which promotes the initiation of a core for aggregate nucleation (Mosley et al. 2007). Besides, CgA and CgB exhibit a N-terminal disulfide-bonded loop which has been shown to contribute to the aggregation with prohormones at low pH (Chanat and Huttner 1991, Thiele and Huttner 1998). On the other hand, the C-terminal domain of CgA is involved in calcium/pH-dependent homodimerization/homotetramerization (Yoo and Lewis 1993), allowing the aggregation-mediated sorting of CgA to secretory granules (Cowley et al. 2000). These aggregates of high molecular weight sort away prohormones from constitutively secreted proteins (Dannies 2001). Homophilic or heterophilic aggregation is related to the tertiary conformation of the prohormones which direct specific interactions to give rise to various secretory granule populations in a same cell type (Kim et al. 2006).



#### 4 III/ Hormone Sorting through Interaction of Chromogranins with the TGN Membrane

Concomitant to the process of hormone aggregation, chromogranin-induced aggregates interact with the TGN membrane through either sorting receptors or lipids (Fig. 1a). Indeed, secretogranin III (SgIII) interacts with cholesterol in lipid rafts (Hosaka et al. 2004) and with the modifying enzyme and membrane-associated carboxypeptidase E (CPE) (Hosaka et al. 2005). Since CgA has been shown to bind to SgIII (Hosaka et al. 2002), SgIII-cholesterol interaction results in the sorting of CgA-induced aggregates to the granules of the regulated secretory pathway. A recent work by Sun et al. (2013) has suggested a role for SgII as a protein with potential for sorting POMC, suggesting that endocrine cells may have developed a system of redundancy with multiple sorting systems that can partially or completely compensate for each other with the ultimate capacity of ensuring hormone delivery, as also proposed for CPE and SgIII in CgA and POMC sorting (Cawley et al. 2016).



**Fig. 1** Proposed model of chromogranin involvement in secretory granule biogenesis from TGN compartment. (a) Chromogranins induce the remodeling of the TGN membrane by interacting with distinct components: SgIII interacts with CgA, cholesterol and carboxypeptidase E. CgA also interacts with CPE. (b) At the cytosolic side of the TGN membrane, BAR proteins and stathmins are recruited to facilitate respectively the fission and the transfer to microtubules of nascent CgA-containing secretory granules for their transport towards the cell periphery

Their primary sequence exhibiting several dibasic sites, chromogranins are the substrates for intragranular prohormone-converting enzymes. Prohormone convertases are associated with cholesterol-rich lipid microdomains through  $\alpha$  helices-rich hydrophobic domain(s) identified in their C-terminal part, thus acting as receptors that carry chromogranin-induced hormone aggregates to secretory granules (Dikeakos and Reudelhuber 2007).

Surprisingly, using a transcriptome/proteome-wide approach and co-immunoprecipitation experiments, SCLIP and SCG10 stathmins, cytosolic proteins known as regulators of microtubule polymerization, were identified as partners of CgA (Mahapatra et al. 2008). In this study, SCLIP and SCG10 were colocalized to the Golgi apparatus of chromaffin cells and their down-regulation altered chromaffin cell granules and abolished the level of secretion of endogenous CgA, SgII and CgB. Other cytosolic proteins are capable of sensing, inducing, and/or stabilizing membrane curvature through Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) domains which are crescent-shaped, dimeric  $\alpha$ -helical modules and could thus participate to secretory granule formation (Frost et al. 2009, Rao and Haucke 2011). Recently, two members of this family, arfaptin 1 and PICK1, were related to the biogenesis of CgA-containing secretory granules through their binding to TGN membrane lipids (Fig. 1b) (Gehart et al. 2012, Cruz-Garcia et al. 2013, Holst et al. 2013, Pinheiro et al. 2014). Altogether, these data suggest that chromogranins influence the molecular organization of the TGN membrane to induce the recruitment of membrane and cytosolic proteins necessary for the budding of functional secretory granules, but the mechanism of action and the chronology of induced molecular events remain to be elucidated.

## 5 IV/ Are Chromogranins Linked to Hypersecretory Endocrine Pathologies?

Ubiquitous distribution of chromogranins in endocrine and neuroendocrine tissue from which they are secreted into the bloodstream, makes chromogranins useful markers of normal and tumoral neuroendocrine cells. In fact, multiple studies have documented the clinical value of detecting chromogranins and their derived peptides in tissues and measuring their circulating levels (Taupenot et al. 2003, Bartolomucci et al. 2011). Measurement of plasma chromogranins and derived peptide levels can be used to diagnose or monitor the progression of neuroendocrine tumors, the highest accuracy being observed in tumors characterized by an intense secretory activity (Guérin et al. 2010, Guillemot et al. 2006, 2014). This is the case of pheochromocytomas which are catecholamine-producing neoplasms arising from chromaffin cells of the adrenal medulla, leading to several clinical manifestations due to the actions of excess catecholamines, such as essential hypertension. Interestingly, the SgII-derived peptide EM66 has been established as a valuable

marker to distinguish benign and malignant pheochromocytomas (Yon et al. 2003, Guillemot et al. 2006). Serum CgA has been also well documented as a marker for sympathoadrenal activity underlying cardiovascular regulation and essential hypertension (O'Connor and Bernstein 1984; Takiyyuddin et al. 1994) along with catecholamines, as well as severe inflammatory diseases such as sepsis and systemic inflammatory response syndrome (Zhang et al. 2008). Moreover, it has been shown that CgA genetic variants may cause profound changes in human autonomic activity, and may associate with the risk of developing hypertension (Rao et al. 2007, Chen et al. 2008), suggesting a link between CgA expression, catecholamine secretion and blood pressure regulation.

Furthermore, Colombo et al. (2002) have shown that CgA expression in neoplastic cells affects tumor growth and morphogenesis in mouse models, suggesting that abnormal secretion of CgA by neuroendocrine neoplastic cells could affect tumorigenic processes. A very interesting study based on the comparison of normotensive and hypertensive patients with pheochromocytoma revealed lower urinary catecholamines and a global decreased chromaffin gene expression, including SgII, in tumors from normotensive patients (Haissaguerre et al. 2013). In line with a potential link between SgII, hormone secretion and tumorigenesis, we have recently demonstrated that SgII is expressed in prostate cancer, that its increased levels correlate with high grade tumors and that its expression triggers a neuroendocrine differentiation of prostatic tumor cells as revealed by the appearance of secretory granules and a secretory activity. Because neuroendocrine differentiation is associated with a poor prognosis, these data suggest that SgII-induced secretion may play a pivotal role in prostate cancer progression (Courel et al. 2014).

Chromogranins seem to be also implicated in the alteration of hormone secretion observed in the context of metabolic disorders. Indeed, CgA knockout mice display increased adiposity and high levels of circulating leptin and catecholamines. As in diet-induced obese mice, desensitization of leptin receptors caused by hyperleptinemia is believed to contribute to the obese phenotype of these KO mice (Bandyopadhyay et al. 2012). In small bowel Crohn's disease, glucagon-like peptide 1 and CgA-immunopositive cells were significantly increased with appreciable mRNA increases for CgA, glucagon-like peptide 1 and Neurogenin 3, an enteroendocrine transcription factor, indicating an enhanced enteroendocrine cell activity (Moran et al. 2012). In accordance, modifications of CgA-immunoreactive cell density were also observed in the small intestine epithelium of patients with irritable bowel syndrome (IBS) after receiving dietary guidance, which may reflect a change in the densities of the small intestinal enteroendocrine cells, suggesting the contribution of their secretory activity to the improvement in the IBS symptoms (Mazzawi and El-Salhy 2016). Furthermore, the knockout of the CgB gene in mice provoked a reduction in stimulated secretion of insulin, glucagon and somatostatin in pancreatic islets, and consequently CgB-KO animals display some hallmarks of human type-2 diabetes (Obermüller et al. 2010).

## 6 Concluding Remarks

While aggregation ability of chromogranins allows the segregation of secretory granule cargo proteins, the anchor of the chromogranin-bound cargo proteins to the TGN membrane as the secretory granule forms or matures seems to result from a less universal mechanism. The study of chromogranin-expressing cells, which possess multiple types of secretory granules and thus the ability to selectively secrete different cocktails of biologically active components (Dannies 2001), may be informative on the variety of existing chromogranin-mediated sorting mechanisms. The identification of the membrane patches into the TGN recognized by the protein cargo, and the understanding of their interactions with cytosolic proteins would help to describe the transport, docking at the membrane, and exocytosis of secretory granules. What is already known is that chromogranins and their conserved domains are not only important for promoting the biogenesis of secretory granules, but also for the targeting and release of hormones through the regulated secretory pathway (Gondré-Lewis et al. 2012). These findings raise the interesting possibility that chromogranins could be relevant factors in the formation of secretory granules, probably by promoting the interactions between the secretory granule membrane and cytosolic proteins. Because several studies performed on neuroendocrine cells have provided clues regarding the redundant and non-redundant roles of chromogranins and chromogranin-derived peptides in the regulated secretory pathway, non-endocrine cell models or endocrine cell models devoid of a regulated secretory pathway expressing chromogranins could constitute useful and appropriate tools to further characterize the molecular mechanisms by which each chromogranin contributes to or establishes a regulated secretory pathway. The increasing evidence showing that chromogranins are crucial actors impacted in many diseases related to endocrine disruption indicates that chromogranins should be considered more than disease markers and warrants further studies to unravel their molecular mechanism of action and thereby to identify novel therapeutical strategies for the treatment of various pathologies including neuroendocrine tumors, essential hypertension and/or metabolic disorders which are increasingly affecting the populations.

## References

- Bandyopadhyay GK, Vu CU, Gentile S, Lee H, Biswas N, Chi N-W, O'Connor DT, Mahata SK (2012) Catestatin (chromogranin A(352-372)) and novel effects on mobilization of fat from adipose tissue through regulation of adrenergic and leptin signaling. *J Biol Chem* 287:23141–23151
- Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK, Fischer-Colbrie R, Loh YP, Salton SRJ (2011) The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev* 32:755–797

- Cawley NX, Rathod T, Young S, Lou H, Birch N, Loh YP (2016) Carboxypeptidase E and secretogranin III coordinately facilitate efficient sorting of proopiomelanocortin to the regulated secretory pathway in AtT20 cells. *Mol Endocrinol* 30:37–47
- Chanat E, Huttner WB (1991) Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 115:1505–1519
- Chen Y, Rao F, Rodriguez-Flores JL et al (2008) Naturally occurring human genetic variation in the 3'-untranslated region of the secretory protein chromogranin A is associated with autonomic blood pressure regulation and hypertension in a sex-dependent fashion. *J Am Coll Cardiol* 52:1468–1481
- Colombo B, Curnis F, Foglieni C, Monno A, Arrigoni G, Corti A (2002) Chromogranin A expression in neoplastic cells affects tumor growth and morphogenesis in mouse models. *Cancer Res* 62:941–946
- Courel M, Soler-Jover A, Rodriguez-Flores JL, Mahata SK, Elias S, Montero-Hadjadje M, Anouar Y, Giuly RJ, O'Connor DT, Taupenot L (2010) Pro-hormone secretogranin II regulates dense core secretory granule biogenesis in catecholaminergic cells. *J Biol Chem* 285:10030–10043
- Courel M, El Yamani F-Z, Alexandre D et al (2014) Secretogranin II is overexpressed in advanced prostate cancer and promotes the neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Eur J Cancer* 50:3039–3049
- Cowley DJ, Moore YR, Darling DS, Joyce PB, Gorr SU (2000) N- and C-terminal domains direct cell type-specific sorting of chromogranin A to secretory granules. *J Biol Chem* 275:7743–7748
- Cruz-Garcia D, Ortega-Bellido M, Scarpa M, Villeneuve J, Jovic M, Porzner M, Balla T, Seufferlein T, Malhotra V (2013) Recruitment of arfaptins to the trans-Golgi network by PI(4)P and their involvement in cargo export. *EMBO J* 32:1717–1729
- Dannies PS (2001) Concentrating hormones into secretory granules: layers of control. *Mol Cell Endocrinol* 177:87–93
- Díaz-Vera J, Morales YG, Hernández-Fernaud JR, Camacho M, Montesinos MS, Calegari F, Huttner WB, Borges R, Machado JD (2010) Chromogranin B gene ablation reduces the catecholamine cargo and decelerates exocytosis in chromaffin secretory vesicles. *J Neurosci* 30:950–957
- Dikeakos JD, Reudelhuber TL (2007) Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out: Figure 1. *J Cell Biol* 177(2):191–196
- Elias S, Delestre C, Ory S, Marais S, Courel M, Vazquez-Martinez R, Bernard S, Coquet L, Malagon MM, Driouich A, Chan P, Gasman S, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (2012) Chromogranin A Induces the Biogenesis of Granules with Calcium- and Actin-Dependent Dynamics and Exocytosis in Constitutively Secreting Cells. *Endocrinol* 153(9):4444–4456
- Fargali S, Garcia AL, Sadahiro M et al (2014) The granin VGF promotes genesis of secretory vesicles, and regulates circulating catecholamine levels and blood pressure. *FASEB J* 28:2120–2133
- Frost A, Unger VM, De Camilli P (2009) The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* 137:191–196
- Gehart H, Goginashvili A, Beck R, Morvan J, Erbs E, Formentini I, De Matteis MA, Schwab Y, Wieland FT, Ricci R (2012) The BAR domain protein Arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network. *Dev Cell* 23:756–768
- Gondré-Lewis MC, Park JJ, Loh YP (2012) Cellular mechanisms for the biogenesis and transport of synaptic and dense-core vesicles. *Int Rev Cell Mol Biol* 299:27–115
- Guérin M, Guillemot J, Thouënon E et al (2010) Granins and their derived peptides in normal and tumoral chromaffin tissue: implications for the diagnosis and prognosis of pheochromocytoma. *Regul Pept* 165:21–29
- Guillemot J, Anouar Y, Montero-Hadjadje M et al (2006) Circulating EM66 is a highly sensitive marker for the diagnosis and follow-up of pheochromocytoma. *Int J Cancer* 118:2003–2012
- Guillemot J, Guérin M, Thouënon E, Montéro-Hadjadje M, Leprince J, Lefebvre H, Klein M, Muresan M, Anouar Y, Yon L (2014) Characterization and plasma measurement of the WE-14 peptide in patients with pheochromocytoma. *PLoS One* 9:e88698
- Haissaguerre M, Courel M, Caron P et al (2013) Normotensive incidentally discovered pheochromocytomas display specific biochemical, cellular, and molecular characteristics. *J Clin Endocrinol Metab* 98:4346–4354

- Hendy GN, Li T, Girard M, Feldstein RC, Mulay S, Desjardins R, Day R, Karaplis AC, Tremblay ML, Canaff L (2006) Targeted ablation of the chromogranin a (Chga) gene: normal neuroendocrine dense-core secretory granules and increased expression of other granins. *Mol Endocrinol* 20:1935–1947
- Holst B, Madsen KL, Jansen AM et al (2013) PICK1 deficiency impairs secretory vesicle biogenesis and leads to growth retardation and decreased glucose tolerance. *PLoS Biol* 11:e1001542
- Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Uchiyama Y, Takeuchi T (2002) Identification of a chromogranin A domain that mediates binding to secretogranin III and targeting to secretory granules in pituitary cells and pancreatic beta-cells. *Mol Biol Cell* 13:3388–3399
- Hosaka M, Suda M, Sakai Y, Izumi T, Watanabe T, Takeuchi T (2004) Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J Biol Chem* 279:3627–3634
- Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Kato T, Takeuchi T (2005) Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. *J Cell Sci* 118:4785–4795
- Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP (2001) Chromogranin A, an “on/off” switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* 106:499–509
- Kim T, Gondré-Lewis MC, Arnaoutova I, Loh YP (2006) Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology (Bethesda)* 21:124–133
- Kingsley DM, Rinchik EM, Russell LB, Ottiger HP, Sutcliffe JG, Copeland NG, Jenkins NA (1990) Genetic ablation of a mouse gene expressed specifically in brain. *EMBO J* 9:395–399
- Machado JD, Díaz-Vera J, Domínguez N, Alvarez CM, Pardo MR, Borges R (2010) Chromogranins A and B as regulators of vesicle cargo and exocytosis. *Cell Mol Neurobiol* 30:1181–1187
- Mahapatra NR, O’Connor DT, Vaingankar SM et al (2005) Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J Clin Invest* 115:1942–1952
- Mahapatra NR, Taupenot L, Courel M, Mahata SK, O’Connor DT (2008) The trans-Golgi proteins SCLIP and SCG10 interact with chromogranin A to regulate neuroendocrine secretion. *Biochemistry* 47:7167–7178
- Mazzawi T, El-Salhy M (2016) Changes in small intestinal chromogranin A-immunoreactive cell densities in patients with irritable bowel syndrome after receiving dietary guidance. *Int J Mol Med* 37:1247–1253
- Metz-Boutigue MH, Garcia-Sablone P, Hogue-Angeletti R, Aunis D (1993) Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur J Biochem* 217:247–257
- Montero-Hadjadje M, Vaingankar S, Elias S, Tostivint H, Mahata SK, Anouar Y (2008) Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf)* 192:309–324
- Moran GW, Pennock J, McLaughlin JT (2012) Enteroendocrine cells in terminal ileal Crohn’s disease. *J Crohns Colitis* 6:871–880
- Mosley CA, Taupenot L, Biswas N et al (2007) Biogenesis of the secretory granule: chromogranin A coiled-coil structure results in unusual physical properties and suggests a mechanism for granule core condensation. *Biochemistry* 46:10999–11012
- O’Connor DT, Bernstein KN (1984) Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *N Engl J Med* 311:764–770
- Obermüller S, Calegari F, King A et al (2010) Defective secretion of islet hormones in chromogranin-B deficient mice. *PLoS One* 5:e8936
- Pinheiro PS, Jansen AM, de Wit H, Tawfik B, Madsen KL, Verhage M, Gether U, Sørensen JB (2014) The BAR domain protein PICK1 controls vesicle number and size in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 34:10688–10700
- Rao Y, Haucke V (2011) Membrane shaping by the Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein superfamily. *Cell Mol Life Sci* 68:3983–3993
- Rao F, Wen G, Gayen JR et al (2007) Catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A(352-372)): naturally occurring amino acid variant Gly364Ser causes profound changes in human autonomic activity and alters risk for hypertension. *Circulation* 115:2271–2281

- Sun M, Watanabe T, Bochimoto H, Sakai Y, Torii S, Takeuchi T, Hosaka M (2013) Multiple sorting systems for secretory granules ensure the regulated secretion of peptide hormones. *Traffic* 14:205–218
- Takiyyuddin MA, Brown MR, Dinh TQ, Cervenka JH, Braun SD, Parmer RJ, Kennedy B, O'Connor DT (1994) Sympatho-adrenal secretion in humans: factors governing catecholamine and storage vesicle peptide co-release. *J Auton Pharmacol* 14:187–200
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003) The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 348:1134–1149
- Thiele C, Huttner WB (1998) The disulfide-bonded loop of chromogranins, which is essential for sorting to secretory granules, mediates homodimerization. *J Biol Chem* 273:1223–1231
- Yon L, Guillemot J, Montero-Hadjadje M, Grumolato L, Leprince J, Lefebvre H, Contesse V, Plouin P-F, Vaudry H, Anouar Y (2003) Identification of the secretogranin II-derived peptide EM66 in pheochromocytomas as a potential marker for discriminating benign versus malignant tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2579–2585
- Yoo SH, Lewis MS (1993) Dimerization and tetramerization properties of the C-terminal region of chromogranin A: a thermodynamic analysis. *Biochemistry* 32:8816–8822
- Zhang D, Lavaux T, Voegeli AC, Lavigne T, Castelain V, Meyer N, Sapin R, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F (2008) Prognostic value of chromogranin A at admission in critically ill patients: a cohort study in a medical intensive care unit. *Clin Chem* 54:1497–1503

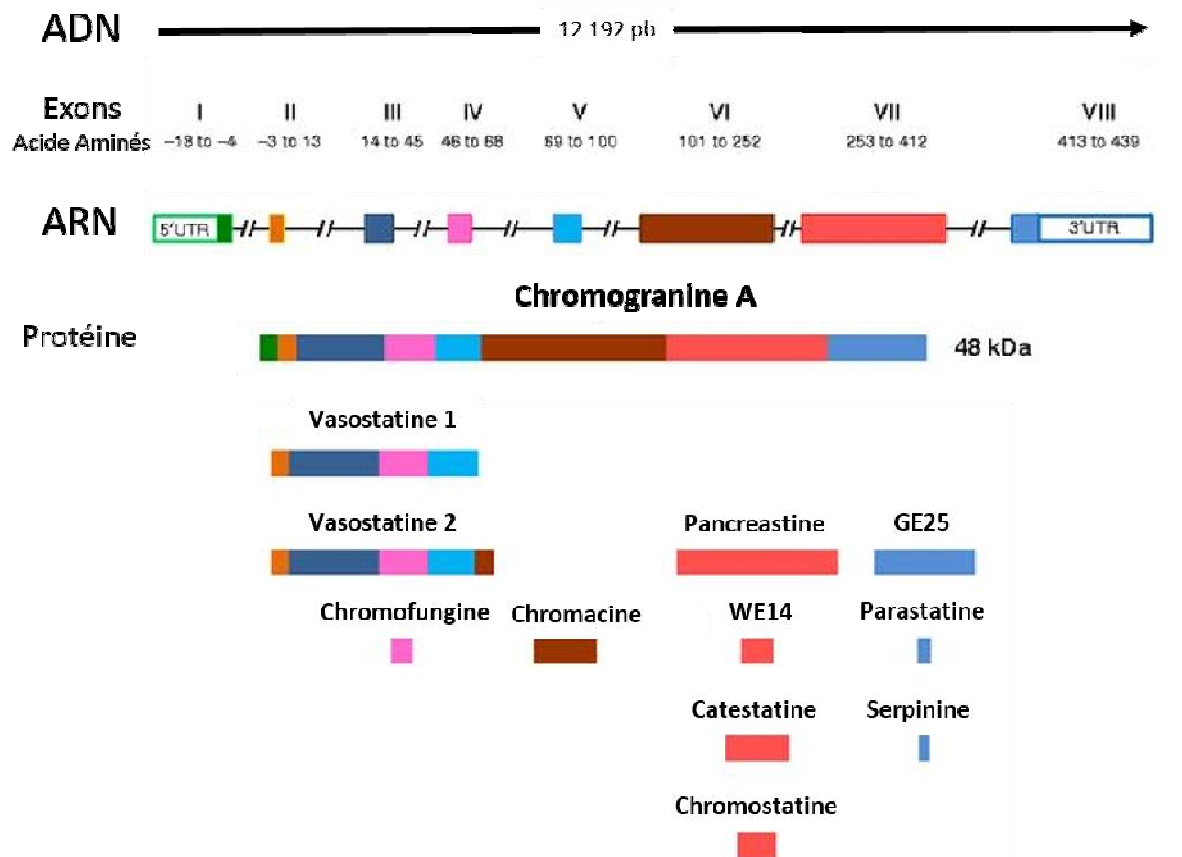
### 2.2.2) La chromogranine A (CgA)

Découverte dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale bovine (Blaschko, 1967), la CgA est la granine la plus exprimée dans les tissus endocrines et neuroendocrines et elle est notamment présente en grande quantité dans la médullosurrénale où elle est sécrétée avec les catécholamines par les GS des cellules chromaffines.

La CgA (hCgA) humaine est une protéine de 439 acides aminés et d'un poids moléculaire d'environ 50 kDa (Winkler et Fischer-Colbrie, 1992). Elle possède 10 sites dibasiques, qui sont des sites potentiels pour le clivage protéolytique (Konecki *et al.*, 1987), ainsi qu'une structure hélicoïdale (Mosley *et al.*, 2007). L'organisation du gène *CHGA* a été étudiée chez plusieurs espèces telles que le bovin (Iacangelo *et al.*, 1991), l'humain (Mouland *et al.*, 1994) et la souris (Wu *et al.*, 1991). Le gène humain *CHGA* codant pour la hCgA est localisé en position 14q32.12 (Bartollomucci *et al.*, 2011). Il est organisé en 8 exons et 7 introns. L'exon I code pour la région 5' non traduite ou 5'-UTR (Untranslated Transcribed Region) (260 pb) de l'ARNm de la CgA ainsi que pour la plus grande partie du peptide signal de la CgA. Les exons II-V codent pour le peptide vasorelaxant et cardiosuppresseur vasostatine (vasostatine I : hCgA1-76) (Aardal *et al.*, 1993).

L'exon III contient des résidus cystéines hautement conservés formant le pont disulfure de la CgA. L'exon IV contient la partie de la séquence peptidique la plus variable entre les espèces. L'exon VII code pour la majorité des peptides biologiquement actifs de la CgA, incluant l'hormone dysglycémique pancréastatine (PST : hCgA250-301) (Tatemoto *et al.*, 1986), le peptide inhibiteur de la libération des catécholamines et antihypertensif catestatine (CST : hCgA352-372) (Mahata *et al.*, 1997), et le peptide WE14 (hCgA324-337), qui agit comme un auto-antigène dans le diabète de type I (Stadinski *et al.*, 2010). L'exon VIII contient la partie C-terminale de la protéine, incluant le dernier site dibasique, et la région 3'-UTR (407pb) de l'ARNm de la CgA. Codé par une partie de l'exon VII et VIII, on retrouve également un autre peptide hautement conservé la serpinine (bCgA403-428), avec une homologie de 90% chez l'humain, le bovin et la souris et environ 70% avec le poisson zèbre (Koshimizu *et al.*, 2010) **(Figure 10).**

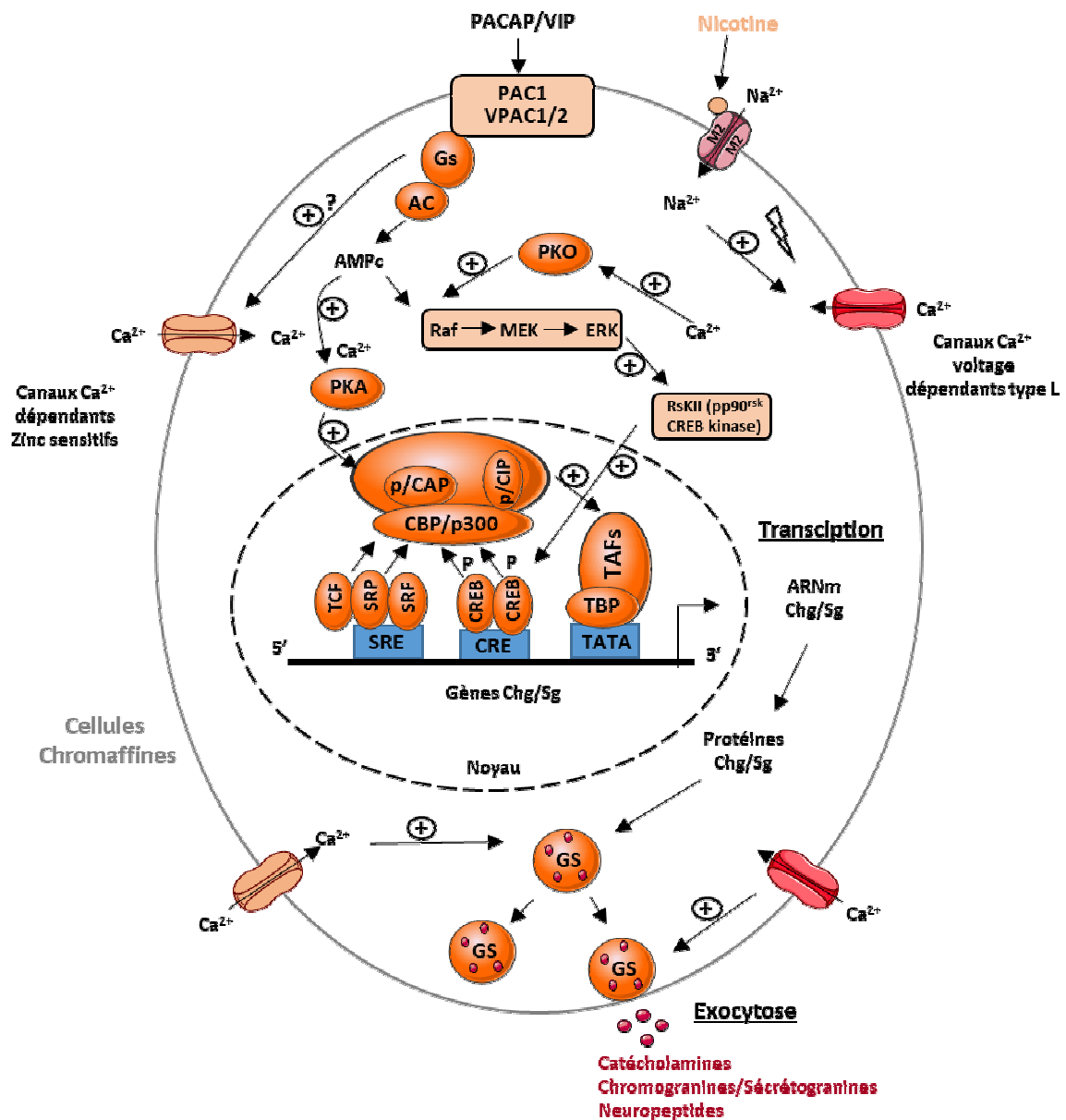




**Figure 10. Structure du gène, du transcrit, de la protéine et des peptides dérivés de la chromogranine A.** Schéma des régions exoniques et des peptides dérivés de la CgA. Le gène humain de la CgA est organisé en 8 exons et 7 introns. Le transcrit est traduit en protéine CgA avec un poids moléculaire de 48 à 52 kDa. Le clivage protéolytique de séquence spécifique de la CgA par les pro-hormones convertases génère plusieurs peptides biologiquement actifs. Les chiffres romains indiquent la séquence exonique de l'ARNm et les chiffres arabes indiquent les acides aminés dans la protéine mature sans le peptide signal. Adapté D'Amico *et al.*, 2014.

L'organisation et la séquence des gènes de la CgA et de la CgB présentent des similitudes au niveau des régions codant pour les domaines amino- et carboxy-terminaux. En effet, leurs premiers exons codent pour le peptide signal et leur troisième exon code pour la région de la protéine qui contiendra le pont disulfure (Winkler et Fischer-Colbrie, 1992). Ces analogies de structure suggèrent que les gènes de la CgA et de la CgB pourraient dériver d'un ancêtre commun (Montero-Hadjadje *et al.*, 2008). Les gènes des granines sont exprimés dans la majorité des cellules neuroendocrines (Fischer-Colbrie *et al.*, 1995 ; Winkler et Fischer-Colbrie, 1992). Néanmoins, l'expression de chacune des granines diffère d'un type cellulaire à l'autre. Un grand nombre d'études ont donc été menées *in vivo* et *in vitro* afin de comprendre les

mécanismes d'expression des granines dans les cellules neuroendocrines, et notamment dans les cellules chromaffines, cellules au sein desquelles elles ont été initialement décrites. La sécrétion des catécholamines par les cellules chromaffines est principalement induite par des stimuli cholinergiques et peptidergiques issus du nerf splanchnique. De fait, différentes études ont mis en évidence une activation de la transcription des gènes de la CgA, CgB et SgII suite à des stimuli cholinergiques et peptidergiques (Mahata *et al.*, 2002). Ces travaux ont permis de mettre en évidence dans les promoteurs proximaux des gènes de la CgA, de la CgB et de la SgII des sites CRE (cAMP response element) dont la présence est essentielle pour la transcription des gènes de ces granines dans les cellules neuroendocrines. Ces études ont également permis de caractériser les voies de transduction impliquées dans la transcription des gènes des granines suite à une stimulation. Par exemple, dans les cellules PC12, la nicotine, le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) et la sécrétine induisent la transcription du gène codant la CgA *via* l'activation des protéines kinases A et C, des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et du facteur de transcription CREB (CRE-Binding protein) (Mahapatra *et al.*, 2003 ; Tang *et al.*, 1998 ; Taupenot *et al.*, 1998) (**Figure 11**). Par ailleurs, l'oestradiol est également capable d'inhiber l'expression de la SgII et de la CgA dans les cellules adénohypophysaires gonadotropes influençant ainsi la sécrétion de LH par ces cellules (Anouar *et al.*, 1991).

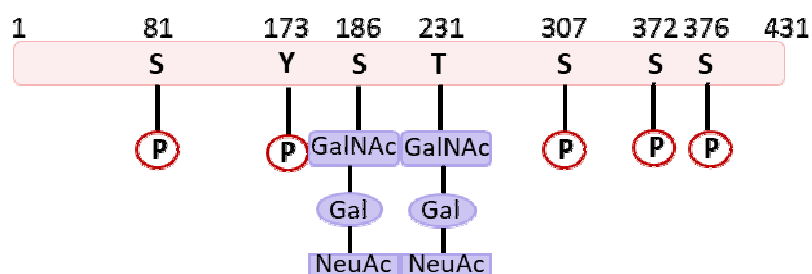


**Figure 11. Modèle présentant les signaux de transduction suite à une stimulation nicotinique ou peptidergique de l'expression génique des granines et de la sécrétion de catécholamines.**

AC : Adenylate cyclase ; CRE : cAMP response element ; CREB : C-AMP Response Element-binding protein ; CBP : CREB binding-protéine ; ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases ; Chg/Sg : Chromogranine/Sécrétogranine ; Gs : protéine G stimulatrice ; M2 : Sous-domaine du récepteur nicotinique de l'acétylcholine ; MEK : MAP kinase ; PAC1/VPAC1 : Récepteur du PACAP/VIP ; p/CAP : CBP associated factor ; p/CIP : CBP interacting factor ; PKA : Protéine kinase A , PKC : Protéine kinase C ; Raf1 : MAP kinase ; RskII : protéine serine kinase II S6 ribosomale ; SRE : serum response element ; SRF/TCF : complexe ternaire ; TAFs : TATA-associated factor ; TBP : TATA binding protéin ; GS : Granule de sécrétion. D'après Mahata et al., 2002.

## a) Modifications post-traductionnelles

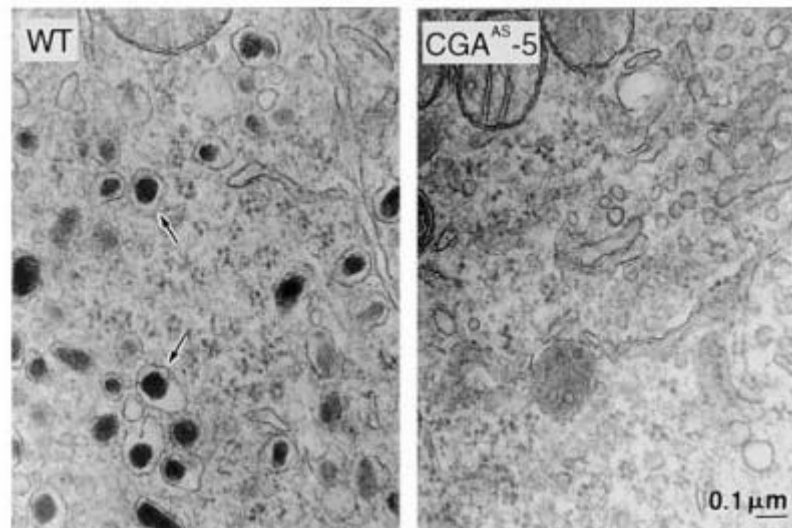
Après leur synthèse, les granines subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles. Le clivage du peptide signal, la formation du pont disulfure et les N-glycosylations ont lieu dans le réticulum endoplasmique rugueux alors que les O-glycosylations, phosphorylations et sulfatations ont lieu au niveau de l'AG (Fischer-Colbrie *et al.*, 1995 ; Taupenot *et al.*, 2003 ; Winkler et Fischer-Colbrie, 1992). L'analyse de la CgA bovine a révélé l'existence de 7 modifications de type glycosylation/phosphorylation sur cette protéine (Strub *et al.*, 1997) (**Figure 12**).



**Figure 12. Représentation schématique des modifications post-traductionnelles présentes au niveau de la CgA bovine.** S, T et Y représentent les résidus sérine, thréonine et tyrosine. P : Sites de phosphorylation sur la Ser<sup>81</sup>, Tyr<sup>173</sup>, Ser<sup>307</sup>, Ser<sup>372</sup> et Ser<sup>376</sup>. GalNAc, Gal et NeuAc : sites de O-glycosylation sur la Ser<sup>186</sup> et Thr<sup>231</sup>. Adapté de Strub *et al.*, 1997.

## b) Rôle de la CgA dans la sécrétion régulée

Une étude pionnière menée par Kim et collaborateurs en 2001 a permis de mettre en évidence l'implication de la CgA dans la biogenèse des GS des cellules neuroendocrines. En effet, ce travail a montré dans un premier temps que l'inhibition de l'expression de la CgA par des techniques d'ARN anti-sens diminue de manière significative le nombre de GS dans des cellules PC12 (issues d'un phéochromocytome de rat). Il a également montré que l'expression de la CgA dans des cellules 6T3 (variantes des cellules AtT20 dépourvues de sécrétion régulée) augmente la sécrétion régulée de POMC et enfin que l'expression de la CgA dans un modèle de cellules non-endocrines, la lignée de fibroblastes CV-1, induit la formation de structures vésiculaires denses contenant la CgA (Kim *et al.*, 2001) (**Figure 13**).



**Figure 13. Diminution du nombre de GS dans des cellules PC12 suite à l'inhibition de l'expression de la CgA.** Photos de cellules PC12 obtenues en microscopie électronique. L'inhibition de l'expression de la CgA dans les cellules PC12 par des ARN anti-sens (CgA<sup>AS</sup>-5) entraîne une nette diminution du nombre de GS par rapport aux cellules contrôles (WT). Les flèches indiquent les GS (Kim *et al.*, 2001).

Malosio et collaborateurs ont quant à eux montré que l'expression de la CgA dans les cellules CV-1 n'induit pas la formation de nouvelles structures granulaires, mais que la CgA s'accumule dans le TGN et fuit vers la voie de sécrétion constitutive (Malosio *et al.*, 2004). Courel et collaborateurs ont en revanche démontré que l'expression de CgA dans des cellules A35C (clone issu de cellules PC12 dépourvues de voie de sécrétion régulée) entraîne la formation de structures granulaires à cœur dense, différentes des lysosomes, contenant la CgA et des hormones co-exprimées, et capables de libérer leur contenu de manière régulée (Courel *et al.*, 2006). De fait, l'expression de la CgA dans les cellules non-endocrines COS7 induit la formation de granules à cœur dense contenant la CgA mais dépourvues à la fois de VSVG-GFP, un marqueur des vésicules de la voie constitutive, et de lamp-1, une protéine lysosomale (Montero-Hadjadje *et al.*, 2009). Par la suite, un modèle de souris dont le gène codant la CgA a été invalidé a permis l'observation d'une nette diminution du nombre de GS associée à un défaut de stockage des catécholamines dans les cellules chromaffines. L'expression de la CgA humaine dans ces souris KO permet de restaurer le phénotype neuroendocrine initial (Mahapatra *et al.*, 2005). Parallèlement, une autre lignée de souris KO pour la CgA a été développée par Hendy et collaborateurs, dans laquelle, de manière surprenante, l'inhibition de l'expression de la CgA n'induit pas d'effet notable sur la granulogénèse. Les auteurs ont

émis l'hypothèse de l'existence d'un phénomène de compensation par la surexpression des autres granines, même si une augmentation des taux de catécholamines urinaires a été détectée chez ces animaux, traduisant un défaut de stockage des catécholamines (Hendy *et al.*, 2006). Montesinos et collaborateurs ont quant à eux étudié par ampérométrie la sécrétion de catécholamines des cellules chromaffines provenant des souris KO-CgA de Mahapatra (Mahapatra *et al.*, 2005) et ont montré une altération du stockage et de la sécrétion régulée des catécholamines (Montesinos *et al.*, 2008). Ainsi, le défaut d'expression de la CgA se traduirait par un défaut de stockage hormonal.

En ce qui concerne le mécanisme d'action de la CgA, il a été montré qu'une fraction des molécules de CgA est associée à la membrane des GS *via* la région N-terminale (Kang et Yoo, 1997), ce qui suggère que les agrégats CgA/hormones pourraient interagir avec la membrane du TGN *via* la CgA. Par ailleurs, la déplétion du cholestérol altère la formation des GS dans la lignée de cellules corticotropes AtT20 et dans des cellules pancréatiques de modèle de souris possédant un défaut de synthèse du cholestérol (Gondré-Lewis *et al.*, 2006). Ceci va de pair avec le fait que le cholestérol interagisse avec des protéines jouant un rôle prépondérant dans la biogenèse des GS, telles que la synaptophysine (Thiele *et al.*, 2000), la CPE (Dhanvantari et Loh, 2000), la SgIII (Hosaka *et al.*, 2005), PC1/3 et PC2 (Arnaoutova *et al.*, 2003 ; Assadi *et al.*, 2004). Or, dans les cellules PC12, AtT20 et  $\beta$ -pancréatiques, la CgA interagit avec la SgIII, ce qui suggère que la CgA est adressée à la voie de sécrétion régulée dans un complexe multimérique (Han *et al.*, 2008 ; Hosaka *et al.*, 2002, 2004, 2005). Néanmoins, le domaine d'interaction de la CgA avec la SgIII n'est pas conservé au cours de l'évolution, et la SgIII n'est pas exprimée dans toutes les cellules endocrines. Ainsi, l'adressage de la CgA et des hormones avec lesquelles elle se lie impliquerait d'autres partenaires moléculaires. La CgA présente des sites de clivage dibasiques ce qui indique qu'elle constitue un substrat des PCs. De manière intéressante, la mutation de ces sites de clivage provoque l'adressage de la CgA vers la voie de sécrétion constitutive, ce qui suggère que les sites de clivage représentent des signaux d'adressage (Brechler *et al.*, 1996). En ce sens, l'inhibition de PC1/3 dans les cellules AtT20 bloque non seulement le clivage de la CgA, mais également sa sécrétion régulée (Eskeland *et al.*, 1996), et la surexpression de PC1/3 chez des patients atteints de diabète de type 2 augmente le clivage et la sécrétion de CgA et d'insuline (Lankat-Buttgereit *et al.*, 2008). Ainsi, la CgA pourrait être adressée vers le GS en cours de bourgeonnement soit par une interaction

directe avec la membrane du TGN, soit par une interaction indirecte *via* la SglII ou les PCs (Elias *et al.*, 2010). De plus, le domaine C-terminal de la CgA est impliqué dans l'homo- ou l'hétéro-dimérisation des protéines (Yoo et Lewis, 1993) permettant ainsi l'agrégation et l'adressage des protéines aux GS (Cowley *et al.*, 2000). Dans les conditions physico-chimiques propres au TGN, la CgA adopte une conformation hélicoïdale qui lui permet d'initier l'agrégation entre les protéines et le bourgeonnement d'un GS (Mosley *et al.*, 2007). Les protéines PC1/3, PC2 et PC5/6 sont adressées aux GS grâce à une hélice  $\alpha$  située en région C-terminale, qui va leur permettre d'interagir avec la membrane du TGN (Jutras *et al.*, 2000). Il en est de même pour l'adressage de la CPE (Dhanvantari *et al.*, 2002). En ce qui concerne la CgA, une première hélice  $\alpha$  a été identifiée en N-terminal (Taupenot *et al.*, 2002). Puis l'analyse de la séquence de la CgA par un algorithme de prédiction des structures secondaires a révélé une deuxième hélice  $\alpha$  en C-terminal. Ces régions sont donc des domaines potentiels d'interaction de la CgA avec la membrane du TGN permettant son adressage dans les GS (Elias *et al.*, 2010). La délétion des régions N- ou C- terminales altère l'adressage de la CgA dans différents modèles de cellules endocrines (Courel *et al.*, 2006 ; Hosaka *et al.*, 2002 ; Taupenot *et al.*, 2002). La CgA de grenouille, qui présente une homologie de séquence avec les formes de CgA mammaliennes au niveau de ses régions terminales, induit la formation de granules contenant la CgA dans les cellules non-endocrines COS7. De manière intéressante, dans cette même étude, il a été montré que l'expression de la CgA de grenouille dépourvue de ses régions terminales provoque sa fuite vers la voie de sécrétion constitutive, ce qui suggère que ces régions conservées au cours de l'évolution jouent un rôle majeur dans l'adressage de la CgA vers la voie de sécrétion régulée (Montero-Hadjadje *et al.*, 2009).

### 2. 2.3) Rôle du pH et du calcium

Des études réalisées par Orci et collaborateurs ont permis de démontrer à l'aide de la microscopie électronique la présence d'agrégats protéiques au niveau du TGN dans des cellules endocrines (Orci *et al.*, 1987 ; Dannies, 2012). D'autres études menées *in vitro* par des études d'agrégations ou par études sur cellules (AtT20) ont également démontré que les prohormones et les granines peuvent s'agréger entre-elles ou avec des protéines destinées à la voie constitutive dans un milieu où le pH est acide (Rindler, 1998 ; Sobota *et al.*, 2009). Or il est connu que le pH du TGN est légèrement acide (pH 6.0-6.5) (Hutton, 1982 ; Orci, 1986 ;

Demaurex *et al.*, 1998 ; Rindler, 1998 ; Machen *et al.*, 2003). L'acidification du pH est permise par des pompes à protons membranaires (V-ATPases) présentes au niveau des membranes du TGN et des GS (Wu *et al.*, 2001). Une étude menée par Taupenot et collaborateurs a permis de montrer que le traitement de cellules PC12 par la bafilomycine A (inhibiteur spécifique des V-ATPases) entraîne une diminution du nombre de GS et de la sécrétion régulée (Taupenot *et al.*, 2005). Une étude récente implique la protéine HID-1 (protéine membranaire associée au TGN) dans la régulation du pH du TGN. En effet, l'inactivation du gène de HID-1 par une stratégie de CRISPR/Cas9 dans des cellules PC12 a permis à Hummer et collaborateurs de montrer un défaut de sécrétion et de stockage de la SgII et des monoamines dans ces cellules, liés à une alcalinisation du pH du TGN. Ceci serait dû à une altération de la localisation de la sous-unité  $\alpha 2$  de la pompe V-ATPase suite à l'inhibition de l'expression de HID-1 (Hummer *et al.*, 2017).

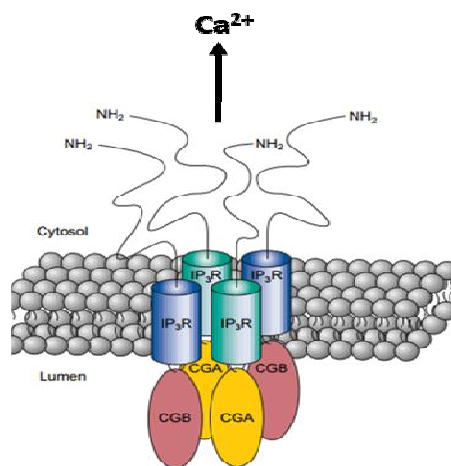
Le calcium présent dans les GS est également nécessaire pour l'agrégation des protéines, comme cela a été montré pour les PC, la CPE et les granines (Shennan *et al.*, 1994 ; Rindler 1998, Dikeakos *et al.*, 2009). Cependant, toutes les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée n'ont pas besoin de calcium pour s'auto-agrégérer (Cawley *et al.*, 2000). Dans les GS, le calcium existe à la fois sous forme libre ou liée, mais le mécanisme de transfert du calcium dans des compartiments acides tels que les GS ou le complexe golgien n'est pas clair contrairement à ce qui est connu chez les plantes, les levures et les protozoaires (Rosado, 2011). Les pompes calciques semblent proches des pompes ATPases calcium-dépendantes de la membrane plasmique des cellules mammaliennes, et les échangeurs  $\text{Ca}^{2+}\text{-H}^+$  ont été perdus dans le génome des mammifères au cours de l'évolution. Cependant, des activités des transporteurs de calcium ATP-dépendants  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  et des échanges entre le  $\text{Ca}^{2+}$  et les  $\text{H}^+$  ont été détectés dans des compartiments acides suggérant une possible conservation du mécanisme, peut-être par des homologues restant à identifier au niveau moléculaire (Patel et Muallem, 2011).

En revanche, la libération de calcium intragranulaire est quant à elle assurée par les membres de la famille des canaux TRP (transient receptor potential) et le récepteur à l' $\text{IP}_3$  (Inositol (1,4,5) -trisphosphate) (Yoo, 2011 ; Yoo et Hur, 2012). Il a été montré que la CgA et la CgB sont toutes les deux capables d'interagir avec et d'activer le récepteur à l' $\text{IP}_3$  au pH intra-granulaire de 5.5. Ces granines forment des hétérotétramères à pH acide. Les hétérotétramères CgA/CgB



induisent des changements de conformation des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> avec pour conséquence une augmentation de l'affinité de l'IP<sub>3</sub> pour son site de liaison, engendrant une libération accrue de calcium intragranulaire vers le cytosol (Yoo, 2000).

Ce couplage est proposé comme ayant un rôle clé dans la signalisation du calcium régulée par l'IP<sub>3</sub> au sein du cytoplasme (**Figure 14**). Ainsi, le calcium présent dans le complexe golgien et les GS, impliqué dans l'agrégation des protéines, serait une importante source pour les mécanismes de signalisation.



**Figure 14. Modèle illustrant l'interaction entre le récepteur à l'IP<sub>3</sub> et les CgA et CgB.** L'interaction des tétramères CgA/CgB avec le récepteur à l'IP<sub>3</sub> a lieu *via* leurs régions N-terminales, fixation qui entraîne une augmentation de la libération de Ca<sup>2+</sup> du GS vers le cytosol. D'après (Yoo, 2000)

### 2. 3) Rôle des protéines membranaires et solubles en tant que signaux d'adressage

Un grand nombre de signaux a été proposé pour expliquer les mécanismes de tri et de sortie des protéines destinées aux GS au niveau du TGN (Dikeakos et Reudelhuber, 2007). Ces signaux sont complexes et peuvent varier selon les différents types cellulaires et protéiques. Les protéines peuvent être séparées en deux types, les protéines solubles/luminales et les protéines membranaires.

Les signaux mis en évidence dans les protéines solubles sont par exemple ceux des pro-hormones dans les cellules endocrines, du BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) dans les neurones et des granines présentes dans ces deux types cellulaires. Les protéines membranaires quant à elles comprennent par exemple les PC, la CPE, la phogrine et la mucine.

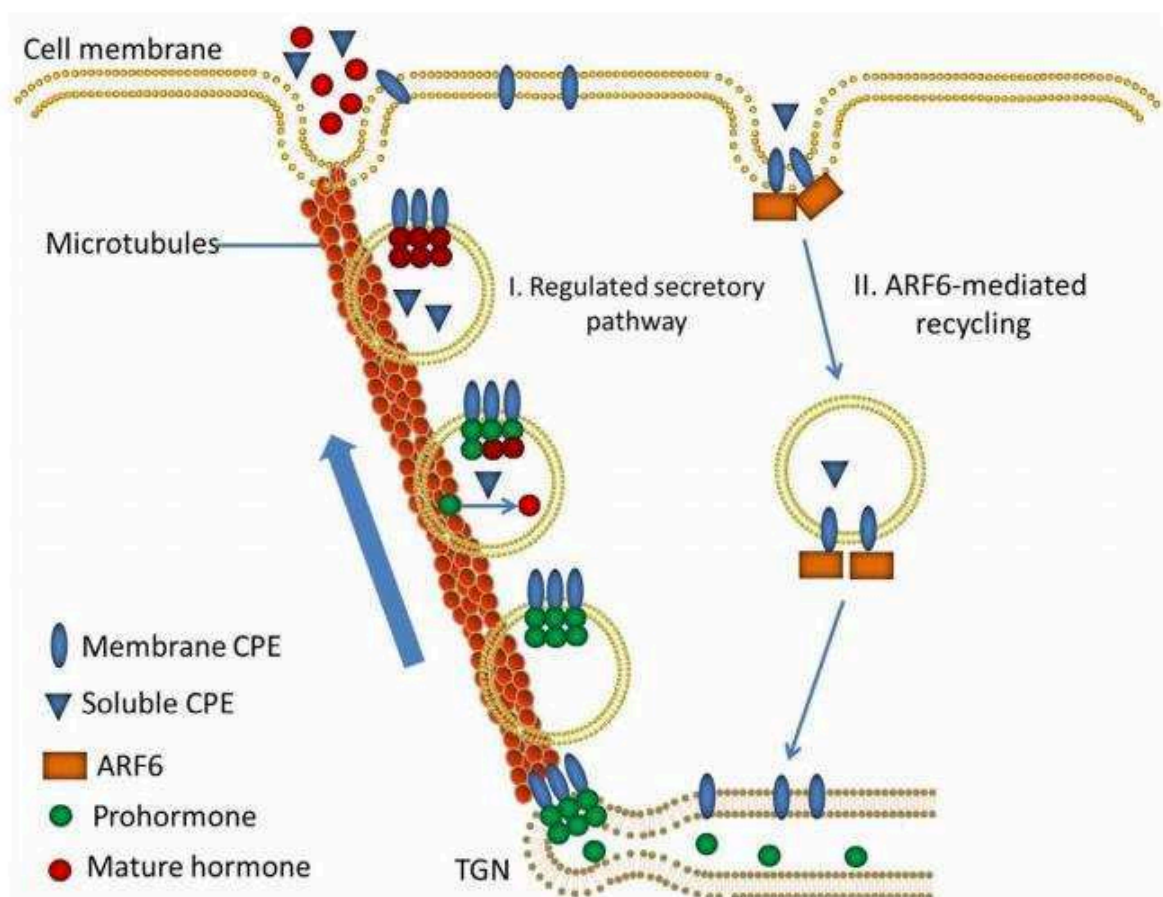
Actuellement ce sont les signaux de tri des pro-hormones, des pro-neuropeptides et des granines qui ont été les plus étudiés. Des études de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier un motif de tri consensus tri-dimensionnel dépendant de la conformation suivante : deux résidus acides (espacés de 12 à 15 Å), exposés à la surface de la molécule, et deux résidus hydrophobes disposés de 5 à 7 Å des résidus acides. Cette conformation est nécessaire pour le tri de la pro-opiomélanocortine (POMC), de la pro-insuline et de la pro-enképhaline vers la voie de sécrétion régulée, ce motif étant capable d'interagir avec la CPE pour contrôler la sortie de ces prohormones vers la voie de sécrétion régulée (Cool *et al.*, 1997 ; Dhanvantari *et al.*, 2003). Par exemple pour la POMC, ce motif se trouve dans le pont disulfure situé dans la région N-terminale (Cool *et al.*, 1995). Pour la pro-enképhaline, le motif se trouve au niveau des résidus N-terminaux 1-32 (Loh *et al.*, 2002). Il est à noter que ce motif de tri ne peut être reconnu que sur des molécules ayant un modèle de conformation ou une structure cristallisée disponible, ne permettant son identification que dans un nombre limité de prohormones et de proneuropeptides.

Par ailleurs, il a été suggéré que les résidus basiques appariés agissent comme des signaux de tri pour cibler certains neuropeptides vers la voie de sécrétion régulée. C'est le cas par exemple de la pro-rénine (Brechler *et al.*, 1996), la pro-neurotensine (Felicangeli *et al.*, 2001), la pro-gastrine (Bundgaard *et al.*, 2004) et l'hormone libérant la pro-thyrotropine (Mulcahy *et al.*, 2006).

Ce mécanisme n'est cependant pas clair. L'hypothèse retenue est que les résidus basiques de la protéine à adresser doivent être clivés par une des PC (qui agit normalement dans le GS à un pH acide) avant de pouvoir être correctement triée/retenue dans les GS. En effet, il a été montré que la mutation d'une séquence de clivage spécifique de la furine (PC qui clive les pro-protéines au début de la vie d'un GS) dans un pro-peptide non destiné à la voie de sécrétion régulée redirige ce pro-peptide vers celle-ci (Brechler *et al.*, 1996). Divers domaines de tri ont également été identifiés au sein de la famille des granines telles que la CgA, la CgB et les sécrétogranines (Voir chapitre granines 2.2.1).

Pour ce qui est des protéines associées à la membrane des GS, le tri vers la voie régulée se produit suite à leur interaction avec la membrane du TGN. Un domaine de liaison membranaire contenant une structure en hélice  $\alpha$  dans la région C-terminale s'est révélé

important pour induire le recrutement de certaines enzymes vers la voie de sécrétion régulée, comme par exemple la CPE (Zhang *et al.*, 2003), et les pro-hormones convertases PC1 / 3 (Jutras *et al.*, 2000 ; Lou *et al.*, 2007) et PC2 ( Assadi *et al.*, 2004). Dans le cas de la CPE membranaire, le domaine de liaison traverserait la membrane du GS malgré l'absence d'une séquence typique d'acides aminés transmembranaires (Dhanvantari et Loh, 2002 ; Zhang *et al.*, 2003). En effet, il a été montré que la CPE existe sous deux formes : une forme soluble, ayant un rôle d'enzyme processive qui élimine les résidus lysine ou arginine en position C-terminale des neuropeptides pour produire des hormones et des neuropeptides actifs ; et une forme membranaire qui agit comme un récepteur pour différentes pro-hormones et pro-neuropeptides les dirigeant ainsi vers la voie de sécrétion régulée (Ji *et al.*, 2017) (**Figure 15**).



**Figure 15. Rôle de la CPE dans la voie de sécrétion régulée.** La CPE sert de récepteur de tri pour de nombreux neuropeptides tels que la pro-insuline, pro-énképhaline, la POMC et le BDNF. Au niveau du TGN, les conditions de pH et de calcium activent la CPE qui va pour une partie se lier à la membrane des GS. Une fois dans les GSM, la CPE atteint son activité maximum et une majorité de celle-ci est liée à la membrane. La CPE soluble quant à elle clive les résidus basiques en C-ter des pro-hormones pour permettre leur maturation. Quand le GS fusionne à la membrane plasmique, l'augmentation du pH entraîne une inactivation de l'activité de la CPE. Après exocytose, la CPE membranaire est recyclée au TGN grâce à l'intervention de la GTPase Arf-6. D'après Ji *et al.*, 2017.

Il est clair que le tri des protéines solubles telles que les pro-hormones, les pro-neuropeptides ou les granines pour l'entrée dans les GS nécessite une interaction avec un récepteur membranaire au niveau du TGN. Il a été montré que la SgIII est un récepteur de tri de la CgA lui permettant un adressage vers la voie de sécrétion régulée dans les cellules AtT20 (Hosaka *et al.*, 2002).

Un tel domaine de tri a également été décrit pour la POMC, la pro-insuline, la pro-enképhaline et le BDNF. Dans la séquence du BDNF, deux résidus acides dans ce motif de tri-consensus, présenté en début de paragraphe, interagissent spécifiquement avec deux résidus basiques, (R255 et K260) de la CPE, pour permettre l'adressage vers la voie de sécrétion régulée (Cool *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a été montré que l'inactivation du gène de la CPE chez la souris altère l'adressage du BDNF vers la voie de sécrétion régulée (Lou *et al.*, 2005), le BDNF étant alors sécrété de manière constitutive dans les neurones corticaux et hippocampiques. La sécrétion constitutive de pro-insuline par les îlots pancréatiques isolés de souris KO pour la CPE est augmentée ainsi que le taux d'insuline plasmatique chez ces souris, ce qui suggère un rôle de la CPE dans le tri de la pro-insuline vers la voie de sécrétion régulée (Naggert *et al.*, 1995 ; Cawley *et al.*, 2004 ; Irminger *et al.*, 1997). Des études de tri de la POMC dans des cellules de l'antéhypophyse de souris KO pour la CPE ont montré une sécrétion régulée défectueuse de l'hormone corticotrope (ACTH), compatible avec l'hypothèse que la CPE agisse comme un récepteur de tri pour la POMC. Cependant, la sécrétion stimulée de POMC est toujours observée dans ces cellules. Des travaux ont montré que la SgIII se lie à la POMC et peut potentiellement agir comme un récepteur de tri pour la POMC (Hosaka *et al.*, 2005). Ainsi, la surexpression de SgIII dans les souris KO pour la CPE pourrait compenser l'absence de CPE et agir comme récepteur pour le tri de la POMC.

Les aquaporines (AQPs) qui sont des protéines transmembranaires, peuvent également jouer un rôle dans la formation des GS. Ces AQPs permettent des échanges bidirectionnels de molécules d'eau et contribuent ainsi à éliminer l'eau du TGN et des GS pour faciliter l'agrégation des protéines lors du bourgeonnement et de la maturation des GS. L'AQP1 a été décrite dans les GS des cellules hypophysaires, chromaffines et pancréatiques. Des études ont montré que son inhibition dans la lignée de cellules adénohypophysaires AtT20 provoque une diminution significative du nombre de GS contenant l'ACTH. De plus, les cellules hypophysaires des souris KO pour AQP1 présentent une diminution de l'expression de la

POMC et de ses enzymes de maturation. Ces données suggèrent donc que les AQP1 sont des facteurs clés de la condensation protéique, permettant la formation de GS dans les cellules endocrines (Arnaoutova *et al.*, 2008).

#### 2.4) Rôle des modifications post-traductionnelles dans l'adressage

Les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée peuvent subir des N-glycosylations durant leur transfert à travers le RE et les différents saccules de l'AG. Au niveau du TGN, certaines protéines glycosylées (Fisher et Ungar, 2016) sont de nouveau modifiées par sulfatation (Makowski *et al.*, 2017). La glycosylation, phosphorylation et/ou la sulfatation des protéines pourrait affecter les interactions protéine-protéine nécessaires à leur tri vers la voie de sécrétion régulée. Par exemple, dans les cellules acineuses pancréatiques, la muclin est sulfatée et O-glycosylée lui permettrait ainsi de se lier aux pro-enzymes agrégées dans le TGN pour faciliter leur tri vers la voie de sécrétion régulée. Le blocage de la sulfatation et de la glycosylation de la muclin inhibe le tri des pro-enzymes vers la voie de sécrétion régulée (Boulatnikov et Lisle, 2004). Une autre molécule, le transporteur de monoamines de type 2 (VMAT2), a un domaine N-glycosylé dans la boucle luminale nécessaire pour le tri. En effet, l'inhibition de la glycosylation de la boucle luminale conduit à une modification de l'adressage de VMAT2 depuis les GS vers les vésicules constitutives dans les cellules PC12 (Yao et Hersh, 2007). Cependant, la glycosylation des protéines n'affecte pas toujours le tri des protéines. Le tri de la cathepsine G vers les GS pour sa maturation, son activation et sa sécrétion ne dépend pas de sa glycosylation (Garwicz *et al.*, 1995). En effet, la forme mutante de la cathepsine G (qui ne possède pas de site de glycosylation fonctionnel) peut être transformée en une forme enzymatiquement active et libérée de manière régulée par les granulocytes neutrophiles. Le tri de la POMC et de l'ACTH n'est pas non plus affecté par l'inhibition de la glycosylation ou de la sulfatation (Moore, 1987). De plus, le tri du facteur neurotrophique dopaminergique cérébral (Sun *et al.*, 2011), des enzymes lysosomales pancréatiques (Kuliawat et Arvan, 1994) et de la rénine (Chu *et al.*, 1990) n'est pas inhibé lorsque leur glycosylation est altérée. Ainsi, le tri des protéines basé sur la glycosylation ne semble pas être un mécanisme ubiquiste.

En ce qui concerne la phosphorylation des protéines en tant que facteur de tri, les avis sont discordants. Dans les neurones cholinergiques classiques le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT) est adressé de manière constitutive vers la membrane plasmique et

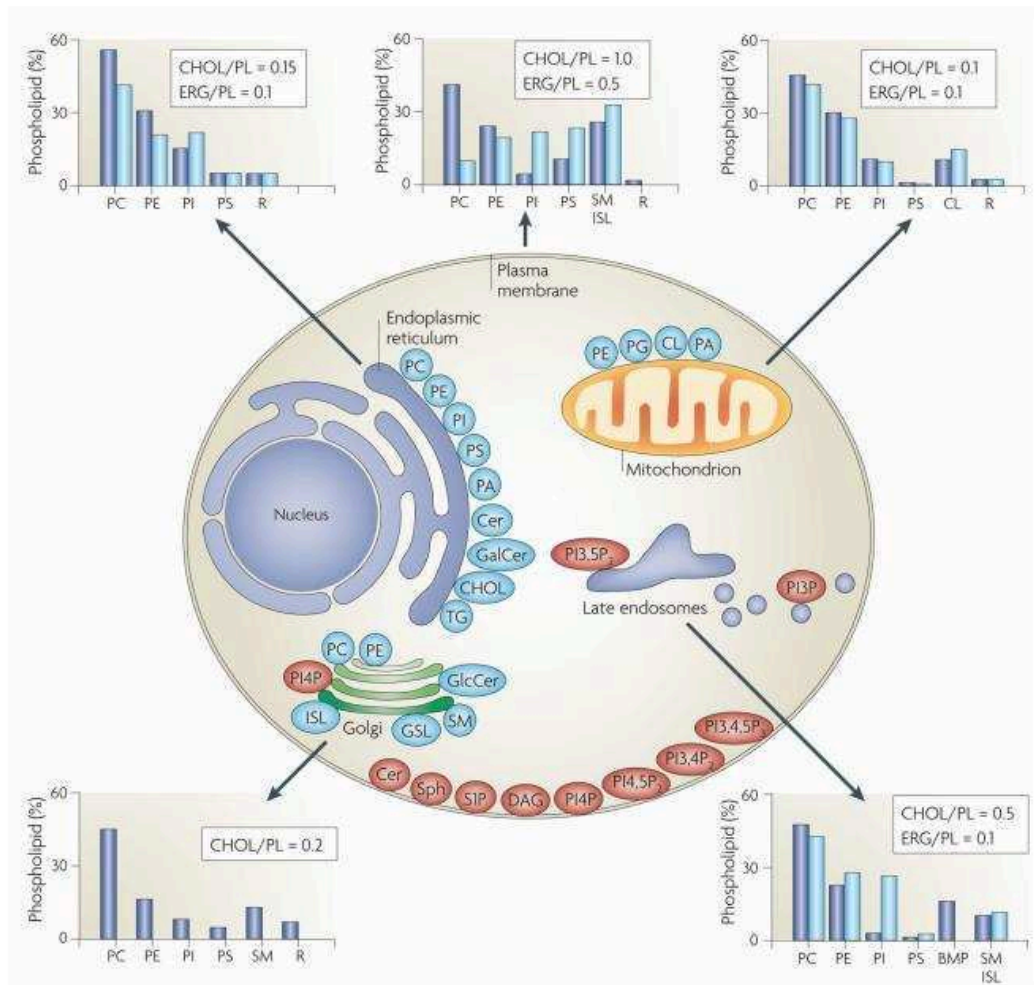
recyclé dans des microvésicules de type synaptique (MVTs), tandis que dans les cellules chromaffines et les cellules PC12, le transporteur vésiculaire des monoamines 2 (VMAT2) se trouve principalement dans les GS (Fei *et al.*, 2008). Dans les cellules PC12 déficientes en protéine kinase A (PKA), les VMAT sont localisés dans les MVTs. Le traitement des cellules PC12 avec un inhibiteur pharmacologique de la PKA (H89) provoque une accumulation de VMAT dans les MVTs (Yao *et al.*, 2004). Toutefois, bien que les VMAT subissent une phosphorylation au niveau de leur extrémité cytoplasmique (Krantz *et al.*, 1997), il ne semble pas qu'elle soit réalisée par la PKA mais plutôt par la caséine kinase II. La PKA faciliterait le tri de VMAT vers les GS de manière indirecte. D'autre part, la phosphorylation médiée par la PKC d'un résidu sérine dans le domaine cytoplasmique (RSERDVLL) des VACHT empêche l'adressage de VACHT vers les MVTs (Cho *et al.*, 2000 ; Krantz *et al.*, 2000). Une mutation phospho-mimétique de la sérine en glutamate dans la queue cytoplasmique des VACHT provoque le tri de VACHT vers les GS, peut-être dû au fait que la mutation rend le domaine de tri de VACHT similaire à celui de VMAT2 (KEEKMAIL). Malgré ces études, il n'y a pas de preuve claire indiquant que la phosphorylation coordonne l'adressage de VACHT et de VMAT respectivement vers les MVTs et les GS. Dans un autre exemple, la furine, une protéine résidente de l'AG qui entre dans des GSI, peut être exclue des GSI par l'intermédiaire d'une voie de sécrétion constitutive-like de type clathrine. Le domaine cytoplasmique de la furine interagit avec la protéine adaptatrice AP-1 ou avec la protéine GGA (protéine de liaison au facteur d'ADP-ribosylation), qui, à leur tour, recrutent un manteau de clathrine permettant l'élimination de la furine des GSI (Park et Loh, 2008). La caséine kinase II assure la phosphorylation de l'extrémité cytoplasmique de la furine, qui est une étape préalable à l'interaction avec AP-1 ou GGA (Dittie *et al.*, 1997). Par conséquent, la phosphorylation de la furine est importante pour son tri et son élimination des GSI. En résumé, tous les résultats présentés ci-dessus indiquent que le tri de diverses protéines depuis l'AG vers les GS est médié par des mécanismes impliquant l'agrégation et des signaux / domaines de tri présents au sein des protéines interagissant avec des récepteurs de tri associés aux membranes. Ces mécanismes sont donc dépendants des protéines présentes dans les GS, ainsi que du type cellulaire, rendant ainsi l'analyse de ces mécanismes complexe.

## 2.5) Rôle des lipides membranaires

Les cellules utilisent 5 % de leurs gènes pour la synthèse de lipides, ceci implique qu'il y ait des avantages évolutifs dépendants de ce répertoire lipidique complexe. Actuellement, nous commençons à comprendre plus précisément les fonctions spécifiques des différents lipides mais l'utilité de tous ces lipides dans les cellules eucaryotes reste à découvrir. Les lipides, en plus de servir de barrière pour les cellules, procurent aux membranes les capacités de bourgeonnement, de déformation, de fission et de fusion. Toutes ces caractéristiques sont essentielles pour la division cellulaire, la reproduction et le trafic intracellulaire fonctions indispensables pour le maintien de l'homéostasie cellulaire (van Meer, 2008).

### 2.5.1) Structure lipidique de la membrane golgienne

Une grande partie de la synthèse des lipides a lieu au niveau de l'AG. Plus spécifiquement, l'AG des mammifères est spécialisée dans la synthèse des sphingolipides, et produit des sphingomyélines, des glucosylcéramides, des lactosylcéramides et des glycosphingolipides (Futerman et Riezman, 2005), tous ces lipides étant principalement destinés à être exportés vers la membrane plasmique. La production des sphingolipides semble avoir un rôle important pour le transfert de protéines et de lipides membranaires entre le réticulum endoplasmique (RE), la membrane plasmique et les endosomes/vacuoles par l'intermédiaire des radeaux lipidiques (Zhou et Blom, 2015). La dernière étape de synthèse de la phosphatidylcholine (PtdCho) peut s'effectuer à la fois dans le RE et l'AG. L'isoenzyme spécifique de l'AG pourrait quant à elle avoir un rôle spécifique pour réguler les mécanismes de sécrétion en contrôlant les niveaux de Diacylglycérol (DAG) dans ce compartiment (Henneberry *et al.*, 2002), le DAG ayant un rôle important pour les phénomènes de formation de vésicules au niveau du TGN (Xie *et al.*, 2015). La composition lipidique membranaire des différents compartiments cellulaires rapportée par van Meer en 2008 est reportée dans la figure ci dessous (**Figure 16**).



**Figure 16. Sites de synthèse lipidique et composition des membranes cellulaires en lipides.** La composition lipidique des différentes membranes varie en fonction des compartiments. Les données sont exprimées en pourcentage de phospholipide total (PL) chez les mammifères (bleu) et les levures (bleu clair). Le rapport du taux de cholestérol (CHOL, chez les mammifères) et de l'ergostérol (ERG, dans la levure) par rapport aux phospholipides est également indiqué. Le panneau principal montre le site de synthèse des principaux phospholipides (bleu) et des lipides impliqués dans les voies de signalisation et de reconnaissance des organites (rouge). Les principaux glycérophospholipides présents dans le réticulum endoplasmique (RE) sont la phosphatidylcholine (PtdCho, PC), la phosphatidyléthanolamine (PtdEtn, PE), le phosphatidylinositol (PtdIns, PI), la phosphatidylsérine (PtdSer, PS) et l'acide phosphatidique (PA). En outre, l'ER synthétise le Cer, le galactosylcéramide (GalCer), le cholestérol et l'ergostérol. Le RE et les gouttelettes lipidiques participent tous deux à la synthèse de l'ester stérylique et du triacylglycérol (TG). La lumière de Golgi est le site de synthèse de la sphingomyéline (SM), des glycosphingolipides complexes (GSL) et de la synthèse de la levure inositol sphingolipide (ISL). La PtdCho est également synthétisée dans le Golgi, et peut être couplée à la sécrétion de protéines au niveau de son précurseur le diacylglycérol (DAG). Environ 45% des phospholipides dans les mitochondries (principalement la phosphatidylethanolamine PtdEtn, le PA et la cardiolipine (CL)) sont synthétisés de manière autonome par celle-ci. Le BMP (bis (monoacylglycéro) phosphate) est un phospholipide majeur dans les membranes internes des endosomes tardifs. PI (3,5) P2, phosphatidylinositol- (3,5) -bisphosphate; PI (4,5) P2, phosphatidylinositol- (4,5) -bisphosphate; PI (3,4,5) P3, phosphatidylinositol- (3,4,5) -trisphosphate; PI4P, phosphatidylinositol-4-phosphate; R, lipides restants; S1P, sphingosine-1-phosphate. D'après van meer, 2008.



### 2.5.2) Rôle des lipides dans la formation des GS

Suite à la formation des agrégats protéiques et à leur interaction avec la membrane du TGN, cette dernière doit se courber pour pouvoir initier le bourgeonnement d'un GSI. Les lipides membranaires jouent un rôle prépondérant dans ce processus. Dans la revue présentée ci-dessous nous avons détaillé les dernières évidences impliquant le rôle des lipides durant la formation des GS, le recrutement et les étapes de l'exocytose. Nous avons mis en lumière l'hypothèse selon laquelle les lipides jouent un rôle important dans les fonctions de biogenèse des GS, la maturation, le recrutement et les étapes de fusion membranaire. Ces effets incluent la régulation de différentes protéines que ce soit au niveau de leur distribution ou bien de leur activité mais également en modulant directement la topologie membranaire. Un grand challenge actuel est de comprendre les différentes fonctions des lipides durant la vie d'un GS. Nous avons choisi de présenter cette revue dans ce manuscrit car elle contient un résumé des connaissances actuelles sur le rôle des lipides dans la voie de sécrétion régulée et sa rédaction a également constitué une partie de mes activités de thèse.

Deux lipides nécessaires au bourgeonnement des vésicules constitutives ou des GS au niveau du TGN, l'acide phosphatidique (PA) et le cholestérol (Siddhanta et Shields, 1998 ; Wang *et al.*, 2000) sont plus particulièrement évoqués dans la suite de ce paragraphe.

Revue 2 : Lipids implicated in the journey of a secretory granule : from biogenesis to fusion

## REVIEW

## Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion

Emeline Tanguy,<sup>\*,1</sup> Ophélie Carmon,<sup>†,1</sup> Qili Wang,<sup>\*</sup> Lydie Jeandel,<sup>†</sup> Sylvette Chasserot-Golaz,<sup>\*</sup> Maité Montero-Hadjadje<sup>†</sup> and Nicolas Vitale<sup>\*</sup><sup>\*</sup>*Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (INCI), UPR-3212 Centre National de la Recherche Scientifique & Université de Strasbourg, Strasbourg, France*<sup>†</sup>*INSERM U982, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine,**Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, Université de Rouen, Mont-Saint-Aignan, France***Abstract**

The regulated secretory pathway begins with the formation of secretory granules by budding from the Golgi apparatus and ends by their fusion with the plasma membrane leading to the release of their content into the extracellular space, generally following a rise in cytosolic calcium. Generation of these membrane-bound transport carriers can be classified into three steps: (i) cargo sorting that segregates the cargo from resident proteins of the Golgi apparatus, (ii) membrane budding that encloses the cargo and depends on the creation of appropriate membrane curvature, and (iii) membrane fission events allowing the nascent carrier to separate from the donor membrane.

These secretory vesicles then mature as they are actively transported along microtubules toward the cortical actin network at the cell periphery. The final stage known as regulated exocytosis involves the docking and the priming of the mature granules, necessary for merging of vesicular and plasma membranes, and the subsequent partial or total release of the secretory vesicle content. Here, we review the latest evidence detailing the functional roles played by lipids during secretory granule biogenesis, recruitment, and exocytosis steps.

**Keywords:** exocytosis, lipid, membrane, microdomain, secretion, secretory granule budding.

*J. Neurochem.* (2016) **137**, 904–912.

*This article is part of a mini review series on Chromaffin cells (ISCCB Meeting, 2015).*

The secretory pathway is an essential cellular activity that requires synthesis, modification, sorting, and release of secretory proteins/molecules outside cells, as well as transport of cell surface components. These proteins are first created on endoplasmic reticulum (ER)-bound ribosomes and translocated into the ER lumen, where they are folded, assembled, and N-glycosylated (Braakman and Bulleid 2011). Cargo proteins (either membrane associated or soluble) are conveyed from the ER exit sites to the entry side of the Golgi apparatus and then successively pass through the different Golgi stacks, where the proteins undergo maturation and processing (Wilson *et al.* 2011). At the trans-Golgi network (TGN), proteins are sorted into specific vesicular carriers for transport and distribution to their ultimate destinations, including the endolysosomal system and the plasma membrane, by the constitutive or regulated exocytosis pathway (Gerdes 2008). On one side, all cell types recycle membranes, proteins, and extracellular matrix components through constitutive secretory vesicles that are transported directly to the cell surface where they

Received December 24, 2015; revised manuscript received January 20, 2016; accepted February 3, 2016.

Address correspondence and reprint requests to 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@unistra.fr  
Maité Montero-Hadjadje, INSERM U982, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France. E-mail: maite.montero@univ-rouen.fr

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

**Abbreviations used:** AA, arachidonic acid; AP, adaptor protein; AQP, aquaporin; BAR, Bin/amphiphysin/Rvs; CAPS, calcium-activator protein for secretion; CERT, ceramide transport protein; DAG, diacylglycerol; ER, endoplasmic reticulum; ISG, immature secretory granules; LPA, lysophosphatidic acid; LPC, lyso-phosphatidylcholine; MSG, mature secretory granules; PA, phosphatidic acid; PE, phosphatidylethanolamine; PI(3)P, phosphatidylinositol-3-phosphate; PI(3,5)P<sub>2</sub>, phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate; PI(4)P, phosphatidylinositol 4-phosphate; PI(4,5)P<sub>2</sub>, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKD, protein kinase D; PLD, phospholipase D; PS, phosphatidylserine; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor; TGN, trans-Golgi network; VAMP, vesicle-associated membrane protein; V-ATPase, vacuolar H-ATPase.

fuse with the plasma membrane in the absence of any kind of stimuli. On the other side, the regulated pathway is a trademark of specialized secretory cells, such as neurons, endocrine, and exocrine cells, and requires the accumulation of the secretory material into dedicated organelles, the secretory granules (Vázquez-Martínez *et al.* 2012). The latter are transported through the cytoplasm toward the cell periphery, where they are exocytosed after stimulation of the cell (Burgess and Kelly 1987).

In addition to the function of important protein players in the journey of a secretory granules, lipids also contribute to key steps. Cell membranes are indeed composed of a broad spectrum of lipids with specific properties that can directly influence membrane topology, dynamics, and tasks. In addition, the lipid composition and transbilayer arrangement vary strikingly between organelles and there is compelling evidence that the collective properties of bulk lipids profoundly define organelle identity and function (Holthuis and Menon 2014). Of particular interest are changes in the physical properties of the membrane that are directly under the control of lipids, and mark the transition from early to late organelles in the secretory pathway. These include bilayer thickness, lipid packing density, and surface charge. Here, we highlight the latest evidence supporting the notion that in addition to the collective action of bulk lipids, specific minor lipids directly control directionality and functionality of the secretory pathway.

## Lipids and biogenesis of secretory granules

### Lipids involved in formation of budding sites at the TGN membrane

The biogenesis of secretory granules destined for the regulated secretory pathway begins like other transport vesicles by active budding at the TGN membrane. This process needs several concomitant events: the sorting of cargo and membrane components, the membrane curvature, and the recruitment of cytosolic proteins. A role for lipids in the formation of post-Golgi carriers has long been proposed, including their interactions with enzymes and other membrane-associated proteins. The development of cellular lipidomic approaches (especially mass spectrometry) has revealed (i) that the Golgi membrane of the mammalian cell contains the same lipids as those found in the plasma membrane, but in different proportions and (ii) that the two leaflets of the Golgi membrane bilayers display specific lipid compositions, sphingolipids being enriched in the luminal leaflet, whereas phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine are concentrated in the cytosolic leaflet (van Meer and de Kroon 2011). Beside these lipids, the recruitment of enzymes at the cytosolic face of the TGN membrane contributes to its remodeling through the generation of lipid metabolites, such as diacylglycerol (DAG), phosphatidic acid (PA), and phos-

phoinositides (Ha *et al.* 2012). These lipids play a central role in the formation of secretory granules. For instance, the accumulation of PA in the TGN membrane is a key factor for the budding of secretory granules (Siddhanta and Shields 1998). At low pH and high calcium concentrations, PA adopts a conical shape that favors changes in membrane topology (Kooijman *et al.* 2003). DAG also exhibits a conical shape and its accumulation in the TGN membrane has been found to facilitate membrane curvature leading to the budding of secretory granules (Asp *et al.* 2009).

The Golgi membrane also exhibits a dynamic lipid asymmetry, with the ability of cholesterol, DAG, and other glycerophospholipids to translocate spontaneously or in P4-ATPase-stimulated manner (Tang *et al.* 1996). Flippases generally maintain lipid asymmetry, but their lipid transfer activity between the two leaflets can also potentially lead to membrane curvatures that drive the budding of post-Golgi vesicles (Leventis and Grinstein 2010).

Cells are able to maintain differences in lipid composition between their organelles despite the lateral diffusion of lipids in cellular membranes. The physical differences between glycerolipids and sphingolipids make them segregate in the presence of cholesterol (Marsh 2009). In the Golgi membrane, for example, domains with different lipid compositions are targeted with unique transmembrane proteins into separate secretory vesicles. This segregation of lipids and proteins forms the sorting mechanism which cells use to maintain the specific composition of their membranes (van Meer *et al.* 2008). Originally, lipid self-organization was considered to be the major driving force behind lateral membrane organization. The formation of such functional lipid micro- or nano-domains in the bilayer remains difficult to visualize because of the lack of effective lipid probes to study molecule dynamics in living cells. Although this self-organization plays an essential role, it is plausible that membrane proteins influence lipid organization, and conversely that protein function and clustering are under the control of lipids. Notwithstanding the so-called 'lipid rafts' in Golgi membrane have been predicted to regulate the function and clustering of proteins involved in the budding of secretory granules (Surma *et al.* 2012).

### Lipids involved in protein recruitment at the budding sites

The enrichment of secretory granule membrane in sphingolipids and cholesterol suggests their participation in the formation of functional microdomains involved in the budding of these organelles from the Golgi membrane (Wang and Silviu 2000). Lipid microdomains are implicated in the sorting of proteins destined for the regulated secretory pathway (Tooze *et al.* 2001), as they possess the ability to attract peripheral proteins such as carboxypeptidase E (Dhanvantari and Loh 2000), prohormone convertase PC2 (Blázquez *et al.* 2000), and secretogranin III (Hosaka *et al.*

2004). These proteins act as chaperones by tethering soluble or aggregated proteins to the secretory granule membrane (Dikeakos and Reudelhuber 2007). In secretory cells, lipid microdomains also attract aquaporins (AQP), which are transmembrane proteins that remove water, thereby allowing the condensation of aggregated granule proteins in the TGN (Arnaoutova *et al.* 2008). In the low pH and high calcium conditions found in the Golgi compartment, members of a family of soluble proteins called chromogranins induce aggregation of proteins destined to the regulated secretory pathway (Montero-Hadjadje *et al.* 2008). TGN acidification is achieved by proton pumps of the vacuolar H-ATPase (V-ATPase) family (Schapiro and Grinstein 2000). Interestingly, Li *et al.* (2014) have demonstrated that the signaling lipid phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P<sub>2</sub>) is a significant regulator of V-ATPase assembly and activity. Furthermore, phosphoinositides on the cytosolic surface recruit organelle-specific effector proteins of vesicle trafficking and signal transduction (Di Paolo and De Camilli 2006). For example, the serine/threonine protein kinase D (PKD) is recruited by binding to DAG and the GTPase ARF1, and this promotes the production of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P) by activating the lipid kinase PI(4)-kinase III $\beta$ . At the TGN, PI(4)P can recruit lipid transfer proteins, such as oxysterol-binding protein 1 and ceramide transport protein that control sphingolipid and sterol levels, respectively. Ceramide transport protein-mediated transport of ceramide to the TGN has been proposed to increase the local production of DAG, which is converted into PA and lysophosphatidic acid; all these lipids being necessary for fission of secretory vesicles. PKD also regulates the recruitment of Arfaptin-1 (a Bin/amphiphysin/Rvs domain protein) to PI(4)P at the TGN membrane (Cruz-Garcia *et al.* 2013). In this study, Arfaptin-1 also appears important for the sorting of chromogranin A, a member of the chromogranin family, to the regulated secretory pathway in human BON carcinoid tumor cells. These results suggest that DAG-dependent PKD recruitment is crucial for the biogenesis of secretory granules. Indeed, PKD-mediated Arfaptin-1 phosphorylation is necessary to ensure the fission of secretory granules at the TGN of pancreatic  $\beta$  cells (Gehart *et al.* 2012). Such a role is compatible with previous reports showing that other cellular components, such as chromogranin-induced prohormone aggregates are important for driving TGN vesicle budding after their association with membrane rafts (Gondré-Lewis *et al.* 2012).

### The journey of secretory granules begins

Hormone precursors, along with other proteins of the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells, are sorted and packaged into immature secretory granules that bud off from the TGN. These organelles are rapidly conveyed to the cell periphery through their interaction with microtubules via kinesin motors (Park *et al.* 2009).

The maturation process comprises an acidification-dependent processing of cargo, condensation of the secretory granule content, and removal of lipids and proteins not destined for mature secretory granules. The acidification process occurs along the regulated secretory route resulting in a decrease in pH from the TGN (6.5–6.2), to immature secretory granules (6.3–5.7), and finally to mature secretory granules (5.5–5.0). In chromaffin cells, an increase in the proton pump density and a diminution in proton permeability of the granule membrane allow a pH drop (Apps *et al.* 1989). Moreover, the selective V-ATPase inhibitor bafilomycin A1 demonstrated the role of acidification on trafficking of specific granule proteins through the regulated secretory pathway in PC12 cells (Taupenot *et al.* 2005), a process potentially under the control of phosphoinositide levels.

During maturation in endocrine and exocrine cells, granules decrease in size as their content undergoes condensation, along with the concomitant efflux of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, and water from the granules. Water removal is ensured by the lipid microdomain-associated AQP. AQP1 is found in secretory granules of pituitary and chromaffin cells, as well as in synaptic vesicles and pancreatic zymogen granules, whereas AQP5 is found in parotid gland secretory vesicles (Ishikawa *et al.* 2005; Arnaoutova *et al.* 2008). They facilitate condensation of granular content during maturation. Upon their arrival at the cell periphery, secretory granules are trapped in the dense cortical actin network. Myosin Va together with Rab3D regulate distinct steps of the granule maturation, with an essential role of myosin Va in membrane remodeling (Kögel and Gerdes 2010) and a crucial function of Rab3D in the cargo processing (Kögel *et al.* 2013). Interestingly in yeast, oxysterol-binding protein Osh4p-recruited PI(4)P and Rab proteins are in association with a myosin V type (Myo2p) in the membrane of secretory compartments and are implicated in vesicle maturation (Santiago-Tirado *et al.* 2011).

Membrane remodeling also induces a decrease of the size of secretory granules. The presence of a clathrin coat on patches of secretory granule membrane causes shrinkage of material, mediated by the clathrin adaptator protein (AP)-1 (Dittie *et al.* 1996). As a result, membrane proteins like vesicle-associated membrane protein 4 (VAMP4), furin, and mannose 6-phosphate receptors, which have a canonical AP-1-binding site in their cytosolic domain, are present in immature secretory granules, but not anymore in mature secretory granules (Klumperman *et al.* 1998; Teuchert *et al.* 1999; Hinners *et al.* 2003). AP-1 accumulates at the cytosolic face of TGN membrane likely through PI(4)P interaction (Wang *et al.* 2003). Their transport along microtubules toward the cortical actin, a step that has not been linked to lipid yet, and the concomitant granular modifications result in the maturation and storage of secretory granules, competent for exocytosis.

## Lipids and exocytosis of secretory granules

### And the journey of secretory granules ends

The final stage of the secretory pathway is regulated exocytosis, a well-defined multistep process triggered by an exocytotic stimulus (Pang and Südhof 2010). The molecular machinery underlying regulated exocytosis involves assembly of a tripartite soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex between plasma and granular proteins as well as accessory proteins (Jahn and Fasshauer 2012). Extensive work over the last two decades has also shed light on the importance of lipids in the exocytosis process. In the following sections, the major contributions of membrane lipids for each step of secretory granule exocytosis will be described.

### Lipids involved in formation of exocytotic sites and the docking step

Mature granules, once tethered, are recruited to exocytotic sites and this represents the initial contact between secretory granules and plasma membrane. Some lipids, such as cholesterol, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>), and sphingolipids are clustered in ordered microdomains in plasma membrane, also called membrane rafts. Biochemical and high-resolution imaging observations indicate that these detergent-resistant microdomains serve to concentrate and regulate SNARE proteins, arguing for the constitution of active exocytotic sites (Salaün *et al.* 2005). Spatial definition of exocytotic sites is cholesterol dependent, as depletion of cholesterol from the plasma membrane negatively affects cluster integrity and results in reduced secretory activity by neuroendocrine cells (Lang *et al.* 2001). Furthermore, we have demonstrated that PI(4,5)P<sub>2</sub>-enriched microdomains co-localize with SNARE clusters and docked secretory granules from analysis of immunogold labeled plasma membrane sheets (Umbrecht-Jenck *et al.* 2010).

PI(4,5)P<sub>2</sub> plays a critical role in translocating secretory vesicles to the plasma membrane (Wen *et al.* 2011), but also binds and regulates a large subset of proteins involved in the docking step, and therefore plays an essential role in granule recruitment at exocytotic sites (recently reviewed by Martin 2015). For instance, by modulating actin polymerization, PI(4,5)P<sub>2</sub> controls actin-based delivery of secretory vesicles to exocytotic sites (Trifaró *et al.* 2008). Moreover, PI(4,5)P<sub>2</sub> clusters organized by syntaxin-1A could act as a platform for granule docking in membrane rafts (Honigsmann *et al.* 2013). Studies in chromaffin cells have demonstrated that generation of microdomains is positively regulated by recruitment of annexin A2, a calcium- and PI(4,5)P<sub>2</sub>-binding protein present at docking sites near SNARE complexes (Chasserot-Golaz *et al.* 2005; Umbrecht-Jenck *et al.* 2010). Using 3D electron tomography, we have recently shown that annexin A2 generates lipid domains sites by connecting cortical actin and docked secretory granules to active fusion

sites (Gabel *et al.* 2015). The actin-bundling activity of annexin A2 promotes the formation of ganglioside GM1-enriched microdomains, increases the number of morphologically docked granules at the plasma membrane, and controls the number and the kinetic of individual exocytotic events.

Altogether, these findings raise the possibility that exocytotic sites are defined by specific lipids, such as cholesterol and PI(4,5)P<sub>2</sub>, that contribute to sequestering or stabilizing components of the exocytotic machinery. There are also indications that other lipids contribute to the establishment of exocytotic sites. For instance, PS resides mostly in the cytosolic leaflet of plasma membrane in unstimulated conditions. However, during exocytosis of secretory granules in numerous secretory cell types, notably neuroendocrine cells, PS translocates to the outer leaflet (Vitale *et al.* 2001). An ultrastructural analysis has recently demonstrated that PS is externalized in the vicinity of the docking sites of secretory granules, although the functional relevance of this PS externalization for fusion is still under debate (Ory *et al.* 2013). Another lipid implicated in regulated exocytosis is PA. Silencing of the PA-producing enzyme phospholipase D1 (PLD1) and the ectopic expression of a catalytically dead PLD1 form in chromaffin cells affected the number of exocytotic events, as revealed by capacitance recordings and carbon fiber amperometry (Zeniou-Meyer *et al.* 2007). In line with these observations, PA has recently been proposed to regulate docking in sea urchin eggs (Rogasevskaia and Coorsen 2015). Finally, analysis of plasma membrane SNARE microdomains in chromaffin cells by total internal reflection fluorescent microscopy suggests that exogenous addition of the polyunsaturated fatty acid arachidonic acid (AA) enhances docking of granules (García-Martínez *et al.* 2013). Thus, investigations using novel high-resolution imaging techniques combined with acute modifications of individual lipid composition in a given membrane will probably further elucidate the contribution of lipids to the organization of the exocytotic platform.

### Lipids regulating molecular mechanisms of priming steps

Priming steps depend on molecular events, essentially involving SNARE complex assembly, and are necessary to render vesicles fusion competent (Klenchin and Martin 2000). There is also growing evidence that lipids are implicated in priming, as indicated by lipid reorganization provoked by inositol kinases and lipases during this step. Phosphoinositides such as PI(4,5)P<sub>2</sub> seem to be key regulators of secretion, not only by regulating the docking step but also by controlling the size and refilling rate of the readily releasable pool of granules. Electrophysiological studies modulating PI(4,5)P<sub>2</sub> levels and using over-expressed PI(4,5)P<sub>2</sub> fluorescent probes revealed that a high level of PI(4,5)P<sub>2</sub> in chromaffin cells positively modulates secretion by increasing the size of the primed vesicle pool,

whereas the constants of the fusion rate were not affected (Milosevic *et al.* 2005). In agreement with this concept, we recently found that the HIV protein Tat sequesters plasmalemmal PI(4,5)P<sub>2</sub> in neuroendocrine cells and subsequently reduces the number of exocytotic events, without significantly affecting the kinetics of fusion (Tryoen-Toth *et al.* 2013). Moreover, *in vitro* experiments using liposomes have previously reported that PI(4,5)P<sub>2</sub> can recruit priming factors such as calcium-activator protein for secretion (CAPS), which facilitates SNARE-dependent fusion (James *et al.* 2008). However, it seems that a well-regulated balance between plasmalemmal PI(4,5)P<sub>2</sub> synthesis and breakdown is mandatory for exocytosis. Indeed, DAG production through hydrolysis of PI(4,5)P<sub>2</sub> by phospholipase C is crucial for exocytosis in mast cells (Hammond *et al.* 2006). As for PI(4,5)P<sub>2</sub>, DAG formation is essential for priming, leading to activation of protein kinase C and Munc-13, which then modulate the function of syntaxin-1A (Sheu *et al.* 2003; Bauer *et al.* 2007).

On the granule membrane, phosphoinositides have also been implicated in priming. For instance, experiments on permeabilized chromaffin cells have shown that synthesis of phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P) on secretory granules positively regulates secretion. Formation of PI3P is mediated by an isoform of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), PI3K-C2 $\alpha$ , particularly enriched on chromaffin granule membranes, suggesting that PI3K-C2 $\alpha$  production of PI(3)P has a specific role in the ATP-dependent priming phase of exocytosis (Meunier *et al.* 2005). Genetic and pharmacological inhibition of PI3K-C2 $\alpha$  activity resulted in a complete inhibition of secretion, suggesting that PI(3)P synthesis is necessary for exocytosis to occur (Meunier *et al.* 2005). This notion has been validated by experiments showing that stimulation of exocytosis up-regulated PI(3)P levels on granules, whereas enzymatic conversion of PI3P in PI(3,5)P<sub>2</sub> negatively affected exocytosis (Osborne *et al.* 2008; Wen *et al.* 2008). A similar effect on insulin secretion has been reported in pancreatic  $\beta$  cells with impaired PI3K-C2 $\alpha$  activity (Dominguez *et al.* 2011). Taken together, PI(3)P production by PI3K-C2 $\alpha$  on chromaffin granule membrane can be proposed to act as an essential priming signal for secretory granules, although the effectors directly involved remain to be characterized. Altogether these observations suggest that phosphoinositide metabolism is finely regulated to control the number of fusion-competent granules.

Other lipids have recently emerged as additional modulators of the priming step. AA, a polyunsaturated fatty acid of the omega-6 family has been described to potentiate exocytosis from chromaffin cells (Vitale *et al.* 1994, 2010; Latham *et al.* 2007). *In vitro* assays on protein interactions have revealed that AA can directly interact with SNAREs, like syntaxin-1a or syntaxin-3, and potentiate their assembly with SNAP-25 (Darios and Davletov 2006). Interestingly, this effect of AA on SNARE complex formation *in vitro* can

be reproduced by other omega-3 and omega-6 fatty acids, suggesting that polyunsaturated lipids may physiologically regulate SNARE complex assembly by targeting syntaxin isoforms (Darios and Davletov 2006). Along this line, work with snake phospholipase acting as neurotoxin substantiates the notion that free fatty acids and lysophospholipids promote neurosecretion (Rigoni *et al.* 2005). Furthermore, production of sphingosine, *via* hydrolysis of vesicular membrane sphingolipids, also facilitated SNARE complex assembly by activating the vesicular SNARE synaptobrevin (Darios *et al.* 2009). Finally, *in vitro* fusion assays have demonstrated that PA binds syntaxin-1 and promotes SNARE complex assembly (Lam *et al.* 2008; Mima and Wickner 2009).

### 'Fusogenic lipids' for membrane merging and release of content

Many observations are in agreement that lipids have also a crucial role in the fusion reaction. Thus, the most widely accepted lipidic model for membrane fusion is the stalk pore model, defined by the merging of cis-contacting monolayers, leading to a negatively curved lipid structure called a stalk (Chernomordik and Kozlov 2008). During exocytosis, the outer leaflet of the granule and the inner leaflet of the plasma membrane seemingly form the stalk. As a result of differences in the geometry of lipids, lipid composition of membranes presumably influences the structure of the stalk and subsequently efficacy of exocytosis. Theoretically, cone-shaped lipids such as cholesterol, DAG, or PA, which have intrinsic negative curvatures when found in the inner (cis) leaflets of contacting bilayers could promote fusion. On the contrary, inverted cone-shaped lipids (PS, gangliosides, or lysophospholipids) are supposed to be present in the outer (trans) leaflets. This concept has been partially validated using reconstituted fusion assays and directly by adding lipids to cell cultures. These results indicate that PA, DAG, and cholesterol, may promote fusion by changing the spontaneous curvature of membranes (Ammar *et al.* 2013).

PA is present in the inner leaflet of the plasma membrane, but presumably in very small quantities in resting conditions. Based on the pivotal role of this lipid in exocytosis (Bader and Vitale 2009), the visualization of local formation of PA has been a recurring issue. Use of PA-specific probes coupled to ultrastructural analysis allowed us to visualize PA accumulation at the plasma membrane in stimulated chromaffin cells, near morphological docking sites (Zeniou-Meyer *et al.* 2007). Moreover, silencing of PLD1 has suggested that PA production is necessary to facilitate membrane fusion after early steps of exocytosis, probably by modifying membrane topology in the proximity of docking sites. In favor of this model, extracellular lyso-phosphatidylcholine (LPC) application partially rescued secretion from PLD1-depleted cells (Zeniou-Meyer *et al.* 2007). PLD1 activity at the plasma membrane, and subsequently PA

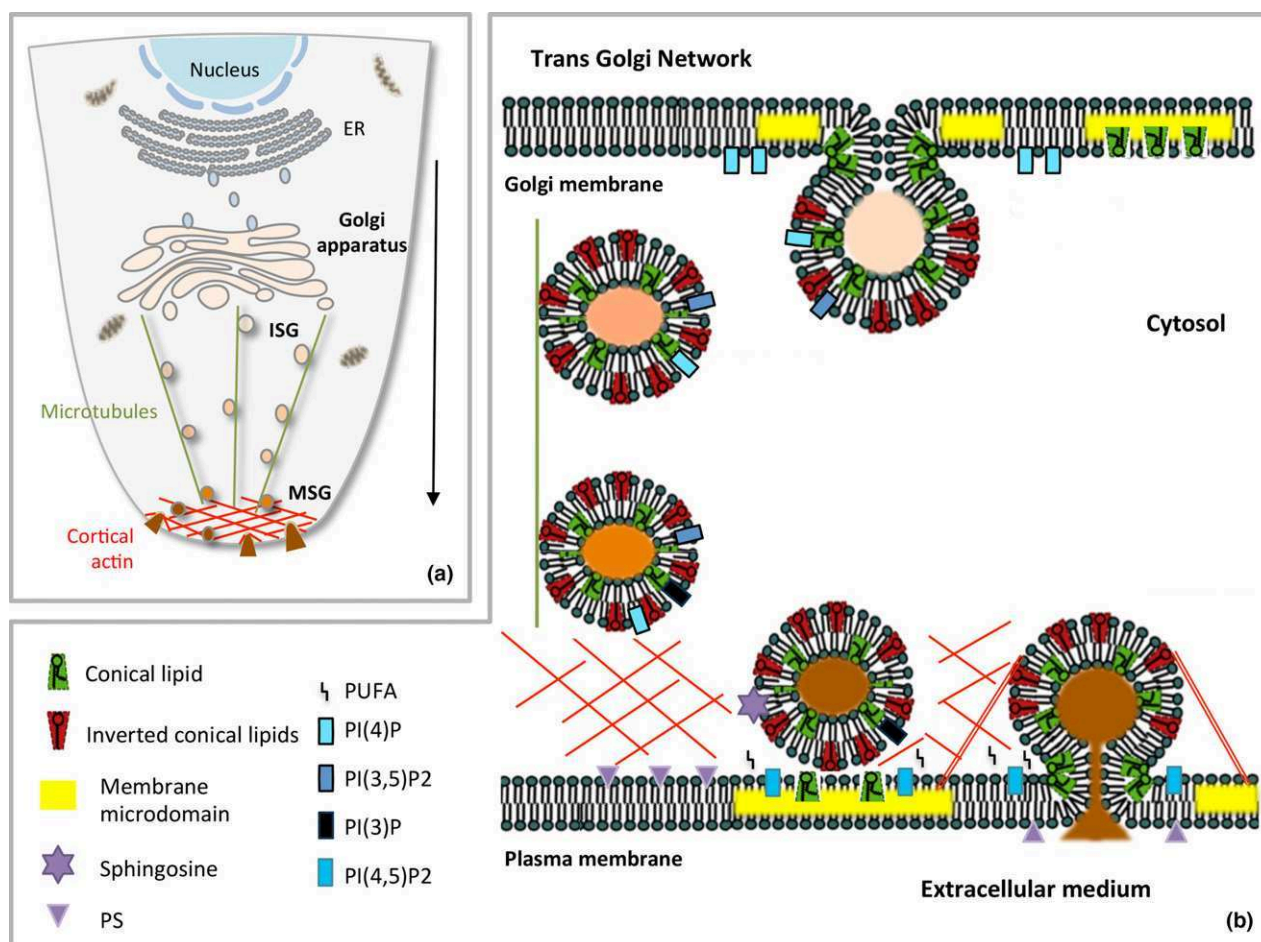
synthesis during exocytosis, is itself regulated by PI(4,5)P2 (Du *et al.* 2003). As PA is also an essential co-factor of PI5K, which produces PI(4,5)P2, a positive feedback loop for the synthesis of these two lipids may be activated during exocytosis (Cockcroft 2009).

In conclusion, the local accumulation of different fusogenic lipids, such as PA, PI(4,5)P2, DAG, and cholesterol at or near granule docking sites may have a synergistic effect on membrane curvature and thereby promote fusion. However, the precise localization of these lipids during the course of the fusion pore formation, expansion, and closure remains elusive and requires significant advances in imaging techniques and lipid sensors. Finally, a novel mass spectrometry method has recently revealed that saturated free fatty acids

are actively generated in stimulated neurosecretory cells and neurons (Narayana *et al.* 2015), but at present it is not known if these fatty acids have a direct role in exocytosis or if they are degradation products of fusogenic lipids.

#### Ending the journey or a new beginning?

Membrane fusion during exocytosis can occur through three different modes in secretory cells, depending on the physiological demand: kiss and run, cavicapture, or full-collapse fusion. After full-collapse fusion of the granules upon stimulation, the secretory granule membrane components can be entirely recycled by a clathrin-mediated compensatory endocytotic process (Ceridono *et al.* 2011). Molecular mechanisms underlying the preservation of granule mem-



**Fig. 1** Model highlighting the importance of lipids from secretory granule biogenesis to fusion. (a) The regulated secretory pathway from the Golgi apparatus to the plasma membrane. Immature secretory granules (ISG) are transported along microtubules from the trans-Golgi network (TGN) up to the cortical actin. During their active transport they are converted into mature secretory granules (MSG). (b) Lipids involved in the journey of secretory granules. Specific minor lipids directly control directionality and functionality of the regulated secretory

pathway. Conical lipids include cholesterol, diacylglycerol, phosphatidic acid, and phosphatidylethanolamine. Inverted conical lipids include lysophospholipids and PI(4,5)P2. Omega-6 and omega-3 forms of polyunsaturated fatty acids (PUFA) are released in the cytosol by phospholipases. Membrane microdomains enriched in cholesterol, gangliosides, and sphingolipids are highlighted at the budding membrane of the TGN and at the exocytotic sites of the plasma membrane.

brane identity after fusion with plasma membrane remains unclear, but it has been proposed that specific lipid microdomains might contribute to prevent diffusion of granular components. Hence, exo-endocytosis coupling leads then to recycling of post-exocytotic internalized granule membrane back to the Golgi apparatus, starting a new life for the secretory granule (Houy *et al.* 2013). Recently lipids generated upon exocytosis have been proposed to contribute to the exo-endocytosis coupling (Yuan *et al.* 2015).

## Conclusion

Lipids undoubtedly appear to contribute to almost every step along the regulated secretory pathway from the biogenesis of secretory granules to the exocytosis process (Fig. 1). However, despite the important advances in our understanding, many important answers remain far beyond our reach. The contribution of individual molecular lipid species is not known. Addressing this issue will require following the dynamics of individual lipid species at the nanometric scale, an aspect that may be achieved through the development of mass spectrometric imaging. Clearly this remains one of the most challenging issues in modern cell biology, given the large number of lipid molecules to analyze. Probing the physiological relevance of these lipids in different secretory processes is another challenging aspect for the near future. Indeed there is no doubt that an alteration of the fine cellular lipid balance, either as a consequence of an alteration of lipid metabolism or a bad diet, could contribute to dysfunction of the secretory pathway. On the other hand, determining the influence of lipid shape to membrane topology during the different steps of membrane remodeling across the secretory pathway will probably require better *in vitro* modeling of the different steps involved.

## Acknowledgements and conflict of interest disclosure

We thank Dr N. Grant for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, a grant from La Ligue contre le Cancer to NV, and by a grant from the Région Haute-Normandie to MM-H. The authors declare no conflict of interest.

## References

- Ammar M. R., Kassas N., Chasserot-Golaz S., Bader M.-F. and Vitale N. (2013) Lipids in regulated exocytosis: what are they doing? *Front. Endocrinol.* **4**, 125.
- Apps D. K., Percy J. M. and Perez-Castineira J. R. (1989) Topography of a vacuolar-type H<sup>+</sup>-translocating ATPase: chromaffin-granule membrane ATPase I. *Biochem. J.* **263**, 81–88.
- Arnaoutova I., Cawley N. X., Patel N., Kim T., Rathod T. and Loh Y. P. (2008) Aquaporin 1 is important for maintaining secretory granule biogenesis in endocrine cells. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1924–1934.
- Asp L., Kartberg F., Fernandez-Rodriguez J. *et al.* (2009) Early stages of Golgi vesicle and tubule formation require diacylglycerol. *Mol. Biol. Cell* **20**, 780–790.
- Bader M.-F. and Vitale N. (2009) Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 936–941.
- 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**, 212–219.
- Blázquez M., Thiele C., Huttner W. B., Docherty K. and Shennan K. I. (2000) Involvement of the membrane lipid bilayer in sorting prohormone convertase 2 into the regulated secretory pathway. *Biochem. J.* **349**, 843–852.
- Braakman I. and Bülleid N. J. (2011) Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 71–99.
- Burgess T. L. and Kelly R. B. (1987) Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **3**, 243–293.
- Ceridono M., Ory S., Momboisse F. *et al.* (2011) Selective recapture of secretory granule components after full collapse exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. *Traffic* **12**, 72–88.
- 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**, 1108–1119.
- Chemomordik L. V. and Kozlov M. M. (2008) Mechanics of membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 675–683.
- Cockcroft S. (2009) Phosphatidic acid regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 905–912.
- Cruz-García D., Ortega-Bellido M., Scarpa M., Villeneuve J., Jovic M., Porzner M., Balla T., Seufferlein T. and Malhotra V. (2013) Recruitment of arfaptins to the trans-Golgi network by PI(4)P and their involvement in cargo export. *EMBO J.* **32**, 1717–1729.
- Darios F. and Davletov B. (2006) Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature* **440**, 813–817.
- Darios F., Wasser C., Shakirzyanova A. *et al.* (2009) Sphingosine facilitates SNARE complex assembly and activates synaptic vesicle exocytosis. *Neuron* **62**, 683–694.
- Dhanvantari S. and Loh Y. P. (2000) Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 29887–29893.
- Di Paolo G. and De Camilli P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–657.
- Dikeakos J. D. and Reudelhuber T. L. (2007) Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out. *J. Cell Biol.* **177**, 191–196.
- Dittie A. S., Hajibagheri N. and Tooze S. A. (1996) The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor. *J. Cell Biol.* **132**, 523–536.
- Dominguez V., Raimondi C., Somanath S. *et al.* (2011) Class II Phosphoinositide 3-Kinase regulates exocytosis of insulin granules in pancreatic cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 4216–4225.
- 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**, 305–315.
- Gabel M., Delavoie F., Demais V., Royer C., Bailly Y., Vitale N., Bader M.-F. and Chasserot-Golaz S. (2015) Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J. Cell Biol.* **210**, 785–800.



- García-Martínez V., Villanueva J., Torregrosa-Hetland C. J., Bittman R., Higdon A., Darley-Usmar V. M., Davletov B. and Gutiérrez L. M. (2013) Lipid metabolites enhance secretion acting on SNARE microdomains and altering the extent and kinetics of single release events in bovine adrenal chromaffin cells. *PLoS ONE* **8**, e75845.
- Gehart H., Goginashvili A., Beck R., Morvan J., Erbs E., Formentini I., De Matteis M. A., Schwab Y., Wieland F. T. and Ricci R. (2012) The BAR domain protein arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network. *Dev. Cell* **23**, 756–768.
- Gerdes H.-H. (2008) Membrane traffic in the secretory pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2777–2780.
- Gondré-Lewis M. C., Park J. J. and Loh Y. P. (2012) Cellular mechanisms for the biogenesis and transport of synaptic and dense-core vesicles. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **299**, 27–115.
- Ha K. D., Clarke B. A. and Brown W. J. (2012) Regulation of the Golgi complex by phospholipid remodeling enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 1078–1088.
- Hammond G. R. V., 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**, 2084–2094.
- Hinners I., Wendler F., Fei H., Thomas L., Thomas G. and Tooze S. A. (2003) AP-1 recruitment to VAMP4 is modulated by phosphorylation-dependent binding of PACS-1. *EMBO Rep.* **4**, 1182–1189.
- Holthuis J. C. M. and Menon A. K. (2014) Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* **510**, 48–57.
- Honigsmann A., van den Bogaart G., Iraheta E. *et al.* (2013) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate clusters act as molecular beacons for vesicle recruitment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 679–686.
- Hosaka M., Suda M., Sakai Y., Izumi T., Watanabe T. and Takeuchi T. (2004) Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **279**, 3627–3634.
- Houy S., Croisé P., Gubar O., Chasserot-Golaz S., Tryoen-Tóth P., Bailly Y., Ory S., Bader M.-F. and Gasman S. (2013) Exocytosis and endocytosis in neuroendocrine cells: inseparable membranes!. *Front. Endocrinol.* **4**, 135.
- Ishikawa Y., Yuan Z., Inoue N., Skowronski M. T., Nakae Y., Shono M., Cho G., Yasui M., Agre P. and Nielsen S. (2005) Identification of AQP5 in lipid rafts and its translocation to apical membranes by activation of M3 mAChRs in interlobular ducts of rat parotid gland. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, 1303–1311.
- Jahn R. and Fasshauer D. (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201–207.
- James D. J., Khodthong C., Kowalchuk J. A. and Martin T. F. J. (2008) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *J. Cell Biol.* **182**, 355–366.
- Klenchin V. A. and Martin T. F. (2000) Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie* **82**, 399–407.
- Klumperman J., Kuliawat R., Griffith J. M., Geuze H. J. and Arvan P. (1998) Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. *J. Cell Biol.* **141**, 359–371.
- Kögel T. and Gerdes H. H. (2010) Roles of myosin Va and Rab3D in membrane remodeling of immature secretory granules. *Cell. Mol. Neurobiol.* **30**, 1303–1308.
- Kögel T., Rudolf R., Hodneland E., Copier J., Regazzi R., Tooze S. A. and Gerdes H. H. (2013) Rab3D is critical for secretory granule maturation in PC12 cells. *PLoS ONE* **8**, e75731.
- Kooijman E. E., Chupin V., de Kruijff B. and Burger K. N. J. (2003) Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic* **4**, 162–174.
- 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**, 485–497.
- Lang T., Bruns D., Wenzel D., Riedel D., Holroyd P., Thiele C. and Jahn R. (2001) SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* **20**, 2202–2213.
- 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**, 1543–1554.
- Leventis P. A. and Grinstein S. (2010) The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 407–427.
- Li S. C., Diakov T. T., Xu T., Tarsio M., Zhu W., Couoh-Cardel S. and Weisman L. S., Kane P. M. (2014) The signaling lipid PI(3,5)P<sub>2</sub> stabilizes V<sub>1</sub>-V(o) sector interactions and activates the V-ATPase. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1251–1262.
- Marsh D. (2009) Cholesterol-induced fluid membrane domains: a compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 2114–2123.
- Martin T. F. J. (2015) PI(4,5)P<sub>2</sub>-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 785–793.
- van Meer G. and de Kroon A. I. P. M. (2011) Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* **124**, 5–8.
- van Meer G., Voelker D. and Feigenson G. (2008) Membrane lipids - where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol.* **9**, 112–124.
- Meunier F. A., Osborne S. L., Hammond G. R., Cooke F. T., Parker P. J., Domin J. and Schiavo G. (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase C2 $\alpha$  is essential for ATP-dependent priming of neurosecretory granule exocytosis. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4841–4851.
- Milosevic I., Sørensen 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**, 2557–2565.
- Mima J. and Wickner W. (2009) Complex lipid requirements for SNARE- and SNARE chaperone-dependent membrane fusion. *J. Biol. Chem.* **284**, 27114–27122.
- Montero-Hadjadje M., Vaingankar S., Elias S., Tostivint H., Mahata S. K. and Anouar Y. (2008) Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. *Acta Physiol.* **192**, 309–324.
- Narayana V. K., Tomatis V. M., Wang T., Kvaskoff D. and Meunier F. A. (2015) Profiling of free fatty acids using stable isotope tagging uncovers a role for saturated fatty acids in neuroexocytosis. *Chem. Biol.* **22**, 1552–1561.
- Ory S., Ceridono M., Momboisse F. *et al.* (2013) Phospholipid scramblase-1-induced lipid reorganization regulates compensatory endocytosis in neuroendocrine cells. *J. Neurosci.* **33**, 3545–3556.
- 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**, 2804–2813.
- Pang Z. P. and Südhof T. C. (2010) Cell biology of Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 496–505.
- Park J. J., Koshimizu H. and Loh Y. P. (2009) Biogenesis and transport of secretory granules to release site in neuroendocrine cells. *J. Mol. Neurosci.* **37**, 151–159.
- Rigoni M., Caccin P., Gschmeissner S., Koster G., Postle A. D., Rossetto O., Schiavo G. and Montecucco C. (2005) Equivalent effects of snake PLA2 neurotoxins and lysophospholipid-fatty acid mixtures. *Science* **310**, 1678–1680.
- Rogasevskaia T. P. and Coorssen J. R. (2015) The role of phospholipase D in regulated exocytosis. *J. Biol. Chem.* **290**, 28683–28696.

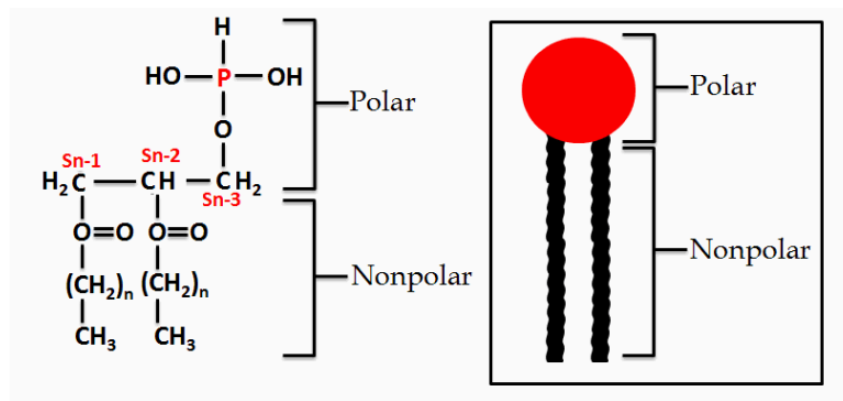
- Salaün C., Gould G. W. and Chamberlain L. H. (2005) Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 19449–19453.
- Santiago-Tirado F. H., Legesse-Miller A., Schott D. and Bretscher A. (2011) PI4P and Rab inputs collaborate in myosin-V-dependent transport of secretory compartments in yeast. *Dev. Cell* **20**, 47–59.
- Schapiro F. B. and Grinstein S. (2000) Determinants of the pH of the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 21025–21032.
- Sheu L., Pasyk E. A., Ji J., Huang X., Gao X., Varoquaux F., Brose N. and Gaisano H. Y. (2003) Regulation of insulin exocytosis by Munc13-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 27556–27563.
- Siddhanta A. and Shields D. (1998) Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J. Biol. Chem.* **273**, 17995–17998.
- Surma M. A., Klose C. and Simons K. (2012) Lipid-dependent protein sorting at the trans Golgi network. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 1059–1067.
- Tang X., Halleck M. S., Schlegel R. A. and Williamson P. (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* **272**, 1495–1497.
- Taupenot L., Harper K. L. and O'Connor D. T. (2005) Role of H<sup>+</sup>-ATPase-mediated acidification in sorting and release of the regulated secretory protein chromogranin A: evidence for a vesiculogenic function. *J. Biol. Chem.* **280**, 3885–3897.
- Teuchert M., Schäfer W., Berghöfer S., Hoflack B., Klenk H. D. and Garten W. (1999) Sorting of furin at the trans-Golgi network. Interaction of the cytoplasmic tail sorting signals with AP-1 Golgi-specific assembly proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 8199–8207.
- Tooze S. A., Martens G. J. M. and Huttner W. B. (2001) Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.* **11**, 116–122.
- Trifaró J.-M., Gasman S. and Gutiérrez L. M. (2008) Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells: cytoskeleton and the secretory vesicle cycle. *Acta Physiol.* **192**, 165–172.
- 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**, 454–463.
- 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**, 958–971.
- Vázquez-Martínez R., Díaz-Ruiz A., Almabouada F., Rabanal-Ruiz Y., Gracia-Navarro F. and Malagón M. M. (2012) Revisiting the regulated secretory pathway: from frogs to human. *Gen. Comp. Endocrinol.* **175**, 1–9.
- Vitale N., Thiersé D., Aunis D. and Bader M.-F. (1994) Exocytosis in chromaffin cells: evidence for a MgATP-independent step that requires a pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein. *Biochem. J.* **300**, 217–227.
- 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**, 2424–2434.
- Vitale N., Thiersé D. and Bader M.-F. (2010) Melittin promotes exocytosis in neuroendocrine cells through the activation of phospholipase A<sub>2</sub>. *Regul. Pept.* **165**, 111–116.
- Wang T. and Silvius J. R. (2000) Different sphingolipids show differential partitioning into sphingolipid/cholesterol-rich domains in lipid bilayers. *Biophys. J.* **79**, 1478–1489.
- Wang Y. J., Wang J., Sun H. Q., Martinez M., Sun Y. X., Macia E., Kirchhausen T., Albanesi J. P., Roth M. G. and Yin H. L. (2003) Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **114**, 299–310.
- Wen P. J., Osborne S. L., Morrow I. C., Parton R. G., Domin J. and Meunier F. A. (2008) Ca<sup>2+</sup>-regulated pool of phosphatidylinositol-3-phosphate produced by phosphatidylinositol 3-kinase C2 $\alpha$  on neurosecretory vesicles. *Mol. Biol. Cell* **19**, 5593–5603.
- Wen P. J., Osborne S. L., Zanin M. *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.
- Wilson C., Venditti R., Rega L. R., Colanzi A., D'Angelo G. and De Matteis M. A. (2011) The Golgi apparatus: an organelle with multiple complex functions. *Biochem. J.* **433**, 1–9.
- Yuan T., Liu L., Zhang Y. *et al.* (2015) Diacylglycerol guides the hopping of clathrin-coated pits along microtubules for exocytosis coupling. *Dev. Cell* **35**, 120–130.
- Zeniou-Meyer M., Zabari N., Ashery U. *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**, 21746–21757.

## a) Le cholestérol

Le cholestérol joue un rôle majeur dans le bourgeonnement des GS. Les membranes du TGN et des GS en sont particulièrement riches. Au niveau du TGN, il s'associe à des glycosphingolipides pour former des microdomaines qui seraient à l'origine du bourgeonnement des GS (Dhanvantari et Loh, 2000). De plus, l'inhibition de la synthèse de cholestérol dans les cellules hypophysaires AtT20 altère la formation des GS, les « cœurs denses » s'accumulant au niveau du TGN. La formation des GS est restaurée après ajout de cholestérol (Wang *et al.*, 2000). La structure conique du cholestérol permet, d'induire une courbure négative de la membrane pour favoriser le bourgeonnement et également favoriser le maintien de la structure des microdomaines (Bacia *et al.*, 2005 ; Rog et Vattulainen, 2014). Dans des modèles de souris présentant des maladies génétiques caractérisées par un défaut de synthèse du cholestérol telles que le syndrome de Spitz-Lemli-Opitz ou la lathostérolose, il a été observé une diminution du nombre de GS au niveau des cellules du pancréas, de l'hypophyse et des glandes surrénales. De plus, les GS du pancréas exocrine de ces animaux présentent des anomalies morphologiques dues à l'augmentation de la rigidité membranaire de ces organites (Gondre- Lewis *et al.*, 2006).

## b) L'acide phosphatidique

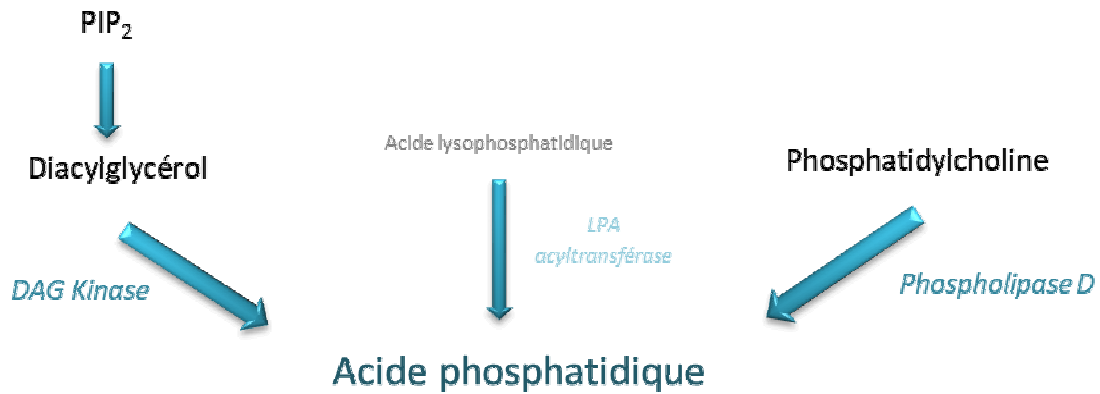
L'acide phosphatidique (PA) ou 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphate est le plus simple des diacyl-glycérophospholipides et le seul avec une tête de phosphomonoester. Le PA est composé de trois parties distinctes. La base de la molécule est un groupement glycérol formé de trois atomes de carbone. Les carbones 1 et 2 sont liés à l'aide de groupes esters à deux chaînes d'acides gras formant la partie hydrophobe du lipide. Les chaînes d'acides gras peuvent varier en longueur avec une chaîne allant de 14 à 22 atomes de carbone (Pettitt *et al.*, 2001), et selon le nombre de doubles liaisons présentes dans la chaîne de carbones (degré de saturation). Chez les mammifères, l'acide gras en position 1 est généralement saturé (C16:0 ou C18:0), alors que l'acide gras en position 2 est variable (de 14 à 22 carbones et de 0 à 6 insaturations). Le troisième carbone est lié à un groupe phosphate de charge négative formant une petite tête hydrophile (**Figure 17**).



**Figure 17. Structure chimique et représentation simplifiée de l'acide phosphatidique.** L'acide phosphatidique est composé d'un glycérol + 2 acides gras + acide phosphorique. D'après Valenzuela et Valenzuela , 2013.

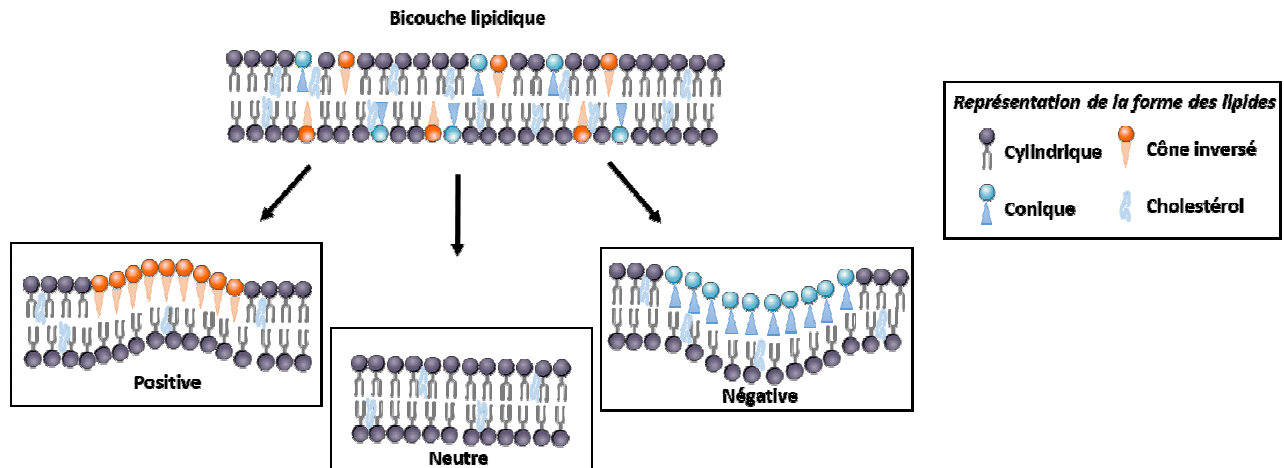
Le PA est présent en quantité limitée dans les membranes biologiques, mais il est pourtant crucial pour la survie des cellules. Ceci est lié à son rôle central dans la synthèse des glycérophospholipides, mais aussi à ses diverses fonctions dans le recrutement et la translocation des protéines, le remodelage du cytosquelette, la dynamique de la membrane, la signalisation cellulaire et le trafic membranaire. La phospholipase D (PLD) possède des propriétés de transphosphatidylation et l'emploi d'un alcool primaire permet alors de bloquer ses réponses physiologiques en formant un phosphatidylalcool, le produit formé reflétant ainsi l'activité de la PLD et montrant spécifiquement son implication (Cook et Wakelam, 1992).

En effet, l'inhibition de la synthèse de PA altère la morphologie de l'AG, et diminue significativement la sécrétion d'hormone de croissance (GH) dans les cellules adénohypophysaires GH3 (Siddhanta *et al.*, 2000). Le PA est produit principalement à partir de la phosphorylation du diacylglycérol (DAG) par la DAG kinase ou à partir de l'hydrolyse de la PtdCho par la PLD (**Figure 18**).



**Figure 18. Les différentes voies permettant la synthèse d'acide phosphatidique.** Il existe trois voies principales de synthèse d'acide phosphatidique (PA), dont deux ayant un rôle dans les phénomènes de trafic membranaire : la voie de la DAG (diacylglycerol) kinase et la voie de la phospholipase D (PLD). La première voie permet la phosphorylation du DAG en PA, et la seconde permet quant à elle l'hydrolyse de la phosphatidylcholine en PA. La troisième voie, dirigée par la LPA acyltransférase, permet la production de PA à partir d'acide lysophosphatidique, mais son rôle dans la sécrétion basale ou régulée n'est pas démontré à ce jour.

Le DAG est présent au niveau de la membrane du TGN et participe à la formation des vésicules de la voie de sécrétion constitutive (Yeaman *et al.*, 2004), mais son rôle dans la formation des GS n'est pas encore défini. Des expériences menées dans les cellules hypophysaires GH3 montrent que l'augmentation des taux de PA par la stimulation de la DAG kinase ou de la PLD1 provoque une augmentation significative des phénomènes de bourgeonnement des GS (Siddhanta et Shields, 1998). Le PA a une structure cylindrique à pH neutre, mais il adopte une structure conique en condition de pH acide et de forte concentration en calcium (Kooijman *et al.*, 2003). Cette structure conique permettrait d'induire une courbure négative de la membrane du TGN, ce qui la déstabiliserait et faciliterait le bourgeonnement des GS (**Figure 19**).



**Figure 19. Déformation membranaire basée sur la forme des lipides.** Une bicouche lipidique composée de lipides avec des structures géométriques variables telles que les cylindriques (gris), les coniques (turquoise) et les cônes inversés (orange) est représentée. Dans des conditions physiologiques, toutes les formes représentées de lipides peuvent être situées à la fois dans les feuillet externe et interne d'une membrane. La génération d'une déformation membranaire uniquement basée sur des structures lipidiques intrinsèques est visualisée dans les trois encarts, avec des courbures positives, neutres et négatives. L'accumulation d'une structure géométrique distincte des lipides et son influence sur la topologie de la membrane est illustrée. Pour des raisons de clarté, seule l'accumulation de lipides dans un feuillet de membrane est montrée. D'après Schubert et Römer, 2015.

### 3) Protéines cytosoliques et formation des granules de sécrétion

#### 3.1) Rôle des GTPases

Les GTPases ou petites protéines G sont une classe importante d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP) pour donner une guanosine diphosphate (GDP) et un ion phosphate. Les GTPases sont des protéines cytosoliques ayant un rôle important dans la régulation de toute une pléiade de processus subcellulaires, dont la formation des GS. Ces protéines ont un cycle d'activation/désactivation qui dépend de leur liaison au GTP/GDP, respectivement.

Les GTPases des familles Arf et Rab jouent un rôle important dans le bourgeonnement des vésicules de sécrétion. La GTPase de type Arf1 interagit avec FAPP-PI4P pour favoriser le bourgeonnement des vésicules constitutives au niveau de l'appareil de Golgi (Santiago-Tirado et Bretcher, 2011). Les protéines de la famille Arf (Arf1 et Arf6 notamment) favorisent la courbure membranaire par l'insertion de leur hélice  $\alpha$  dans le feuillet cytosolique de la membrane plasmique (Lundmark *et al.*, 2008). En ce qui concerne Arf1, ce processus est accentué par la dimérisation de la rotéine induite par sa liaison au GTP. (Beck *et al.*, 2008).

Pour les GTPases de la famille Rab, deux membres Rab2 et Rab6, sont impliqués dans le bourgeonnement de la membrane de l'AG. Chez *C.elegans*, unc-108 (équivalent de Rab2 chez les mammifères) est localisée dans le corps cellulaire des neurones, mais pas à la synapse. Elle colocalise avec des marqueurs de l'appareil de Golgi mais pas avec ceux du RE. Le mutant d'Unc108/Rab2 présente des déficits de déplacement, ainsi que des tailles variables des GS au sein des neurones peptidergiques. Leurs GS sont légèrement plus volumineux, mais le nombre, le diamètre et leur capacité à sécréter leur contenu ne sont pas différents de ceux des neurones d'organismes sauvages. Cependant, même si les GS mutants ont un contenu normal de neuropeptide, des études indiquent que 2/3 du contenu des GSI, à la fois soluble et membranaire sont déplacés vers les endosomes. Il semble que le déficit d'unc108 ne touche pas à la formation des GSI, mais plutôt dans sa fonction coopérative avec son effecteur RIC-19, et serait impliqué dans la rétention du contenu des GS pendant leur maturation (Edwards *et al.*, 2009 ; Sumakovic *et al.*, 2009). Par ailleurs, Rab6 a été montrée comme induisant la fission de vésicules de transport au niveau de l'appareil de Golgi (Miserey-Lenkei *et al.*, 2010).

Des études plus récentes ont révélé l'implication de différentes protéines cytosoliques dans la formation des GS. Par exemple, le complexe EARP (*endosome-associated recycling protein*) et son partenaire EIPR-1 (Topalidou *et al.*, 2016), ainsi que la protéine adaptatrice AP-3 (Asensio *et al.*, 2010 ; Sirkis *et al.*, 2013) et une protéine associée à AP-3, VPS41 (*Vacuolar protein sorting-associated protein 41*) (Asensio *et al.*, 2013), ont été impliqués dans le tri du cargo protéique vers les GS. D'autre part, la protéine BAR arfaptin-1 (Arf-1) a été proposée comme influençant la taille des GS contenant l'insuline en régulant la scission du GS par la protéine Arf-1 au niveau du TGN (Gehart *et al.*, 2012). De plus, d'autres protéines à domaine BAR, Pick1 et ICA69, sont capables d'interagir avec les GSI pour réguler leur nombre et leur taille (Cao *et al.*, 2013 ; Holst *et al.*, 2013).

### 3.2) Rôle des protéines du manteau

Des observations de cellules endocrines en microscopie électronique ont montré que la clathrine pouvait être impliquée dans le bourgeonnement des vésicules constitutives et des GS au niveau du TGN (Tooze et Tooze, 1986). La liaison du «manteau» de clathrine autour des vésicules constitutives et des GS se fait par l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles qu'AP-1 ou GGA (Dittié *et al.*, 1996 ; Kakhlon *et al.*, 2006). La liaison d'AP-1 avec les GSI est

régulée par Arf1 dans les cellules neuroendocrines PC12 (Dittie *et al.*, 1996). De nombreuses autres protéines cytosoliques, présentant un domaine de liaison à AP-1 ou GGA sont susceptibles de participer à la formation du manteau de clathrine lors de la granulogénèse. C'est le cas notamment de la protéine PACS-1 (phosphofurinacidic cluster sorting protein-1) qui permet la liaison d'AP-1 sur les acides aminés acides de la région cytosolique de la furine, protéine enchâssée dans la membrane du TGN (Crump *et al.*, 2001), ou encore l'epsine-R qui lie le phosphatidylinositol-4-phosphate, la clathrine et AP-1 (Mills *et al.*, 2003).

Un rôle a également été montré pour la protéine AP-3 pour la formation des GS au niveau du TGN, l'inhibition de son expression par une stratégie d'ARN interférent dans des cellules PC12 entraînant des défauts de taille, de morphologie et une diminution du nombre de GS (Asensio *et al.*, 2010). Une étude plus récente montre également que l'inactivation du gène codant pour AP-3 chez la souris entraîne un défaut de la sécrétion des peptides tels que l'insuline et le glucagon dans les cellules pancréatiques de ces souris (Sirkis *et al.*, 2013). Il a également été montré que la protéine VSP41 (Vacuolar protein sorting-associated protein 41) est associée à AP-3 pour la formation des GS. L'absence de VSP41 entraîne également un défaut de sécrétion, et des défauts du nombre et de la morphologie des GS ainsi que de la composition membranaire (Asensio *et al.*, 2013).

### 3.3) Rôle des myosines

Miserey-Lenkei et collaborateurs ont montré en 2010, que Rab6 s'associe à la myosine II et à la F-actine pour favoriser la fission de compartiments post-golgiens après leur bourgeonnement depuis le TGN dans les cellules HeLa. L'inhibition de l'expression de la myosine II et de la dépolymérisation des filaments d'actine altèrent le processus de fission, et font apparaître des structures tubulaires, marquées par Rab6 et liées au TGN. À ce phénotype, s'ajoute une nette diminution du nombre de compartiments marqués par Rab6. Rab6 est donc un effecteur de la myosine II et de la F-actine. Il semblerait que la myosine II, en interagissant avec l'actine, favorise la traction des vésicules en cours de bourgeonnement pour ensuite les diriger vers les microtubules, où elles seront prises en charge par les moteurs moléculaires tels que la kinésine 1 (Miserey-Lenkei *et al.*, 2010).



La F-actine entoure la face cytoplasmique du complexe golgien et a été proposée comme ayant un rôle dans la sortie des vésicules à partir du TGN (Godi *et al.*, 1998 ; Fucini *et al.*, 2000 ; Dubois *et al.*, 2005 ; De Matteis et Luini, 2008 ; Miserey-lenkey *et al.*, 2010). Dans les cellules AtT20, il a été montré un recrutement de la F-actine et de  $\gamma$ -adducine (protéine cytosolique associée à l'actine, liant la calmoduline) dans la région péri-golgienne, la protéine  $\gamma$ -adducine étant capable d'interagir avec la queue cytoplasmique de la CPE, et avec des GS contenant la POMC/ACTH des AtT20 (Lou *et al.*, 2010). La mutation de l'extrémité C-TER de la  $\gamma$ -adducine induit la perte de son interaction avec la CPE et une désorganisation de la F-actine, ce qui entraîne l'inhibition de la libération de la POMC/ACTH et l'accumulation de la POMC au sein du complexe golgien. Une diminution du nombre de GS (contenant POMC/ACTH) est également observée. La  $\gamma$ -adducine permettrait donc de recruter la F-actine au niveau des GSI pour faciliter leur fission au TGN (Lou *et al.*, 2013).

Ainsi, les protéines cytosoliques joueraient également un rôle important dans le bourgeonnement des GS à partir du complexe golgien.

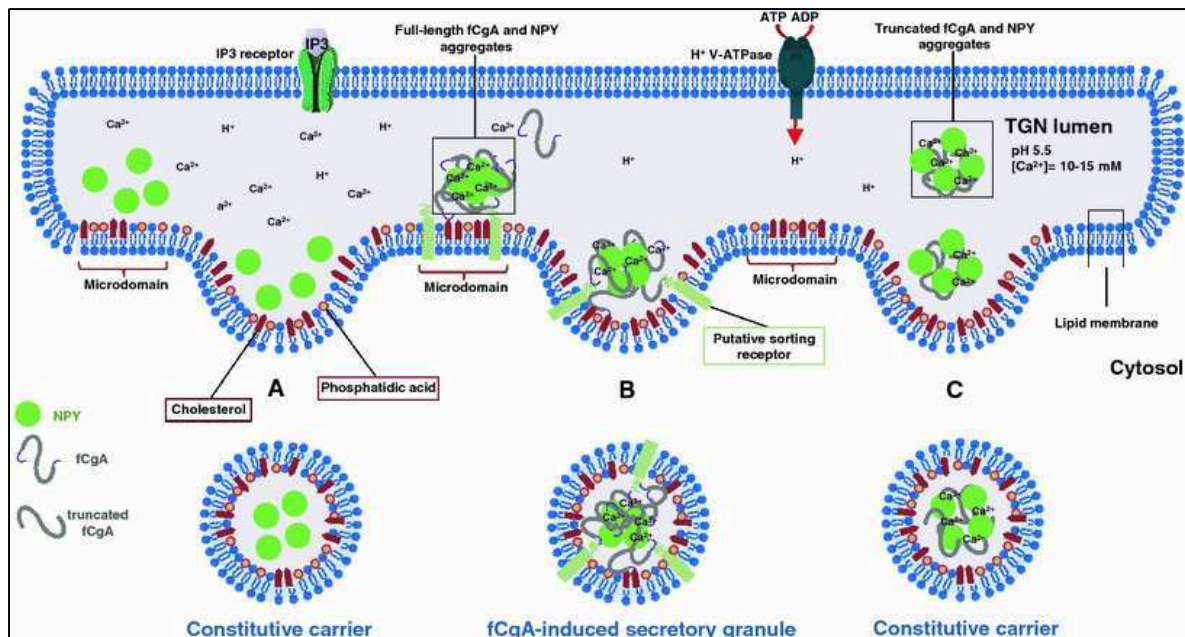


## Objectifs de l'étude

---

Dans les êtres pluricellulaires, la communication cellulaire est basée sur la sécrétion d'un important arsenal de molécules bioactives nécessaires à l'homéostasie de l'organisme. Un défaut de sécrétion hormonale peut être en lien avec de nombreuses pathologies telles que les tumeurs neuroendocrines, l'hypertension artérielle et certains troubles métaboliques, comme le diabète. Ainsi la compréhension des mécanismes impliqués lors de la sécrétion hormonale représente un enjeu majeur afin d'appréhender l'origine des défauts de sécrétion, d'améliorer la prise en charge des patients, et de mettre au point de nouvelles thérapies.

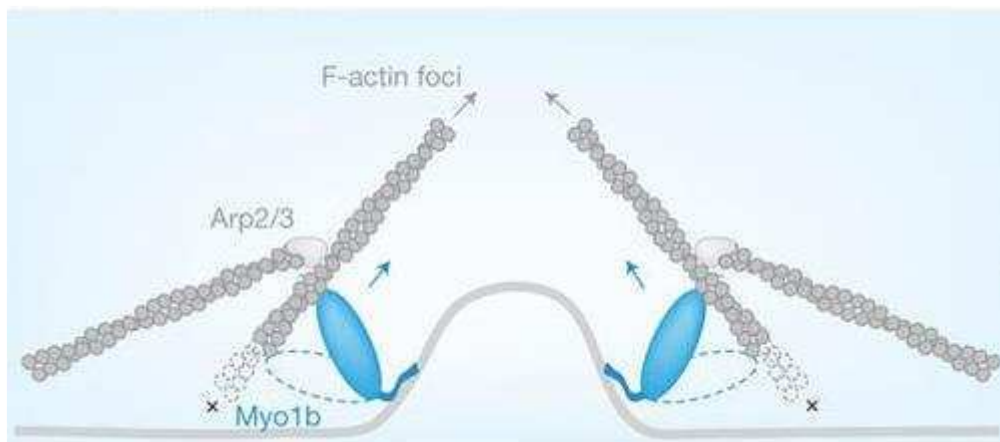
Dans cette optique, l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse cherche à identifier les mécanismes moléculaires des granines permettant la formation de GS dans les cellules neuroendocrines. Lors de mon projet de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au mode d'action de la CgA en raison de son expression ubiquiste dans les tissus spécialisés dans la sécrétion hormonale, et du nombre croissant d'études montrant que la CgA est un facteur clé de la biogenèse des GS. Le clonage de la CgA de grenouille au sein du laboratoire puis la comparaison de sa séquence avec celle de ses orthologues chez de nombreux vertébrés a mis en évidence la conservation des régions N- et C-terminales de cette protéine au cours de l'évolution (Montero-Hadjadje *et al.*, 2008; Turquier *et al.*, 1999). En 2009, Montero-Hadjadje et collaborateurs ont montré que l'expression de la CgA de grenouille dans les cellules non-endocrines de singe COS7 est suffisante pour induire un phénotype endocrine-like, caractérisé par la présence de structures vésiculaires denses aux électrons, contenant la CgA ainsi que des hormones co-exprimées. Ces structures nouvellement synthétisées sont mobiles, différentes des vésicules de la voie constitutive et des lysosomes, et capables de libérer leur contenu suite à une stimulation. Cette fonction granulogénique n'est efficace qu'en présence des régions terminales conservées au cours de l'évolution. En effet, l'expression d'une forme mutante de la CgA de grenouille, dépourvue de ses régions terminales, ne permet pas la formation des structures vésiculaires à cœur dense, la CgA mutée étant alors adressée par défaut vers la voie de sécrétion constitutive, de même que les hormones co-exprimées (Montero-Hadjadje *et al.*, 2009 ; Elias *et al.*, 2010) (**Figure 20**).



**Figure 20. Modèle montrant le rôle des régions terminales de la CgA dans l'adressage hormonal.** A) Le NPY est dirigé vers les vésicules constitutives en absence d'expression de la CgA de grenouille (fCgA) dans les cellules COS7. B) L'expression de la fCgA induit son agrégation avec le NPY et son chargement dans des granules de sécrétion. C) La délétion des régions terminales conservées de la fCgA altère ses fonctions granulogéniques, et provoque une fuite de la fCgA et du NPY vers la voie de sécrétion constitutive. D'après Elias *et al.*, 2010.

Les granules formés suite à l'expression de la CgA dans les cellules COS7 étant capables de libérer leur contenu de façon régulée, les travaux menés au sein de l'équipe ont ensuite porté sur la caractérisation de la dynamique de ces granules et l'analyse de leur protéome afin d'appréhender le mécanisme d'action de la CgA dans l'établissement de la voie de sécrétion régulée. Dans cette optique, une lignée de cellules COS7 exprimant de manière stable la CgA a été développée. À partir de ces cellules, les granules ont été purifiés par fractionnement subcellulaire puis leur protéome a été analysé par spectrométrie de masse LC-MS/MS. Ce modèle cellulaire présentant l'avantage de n'exprimer que la CgA comme granine, il a permis de s'affranchir de l'expression des autres granines généralement co-exprimées dans les cellules neuroendocrines, et d'identifier les partenaires moléculaires de la CgA dans le contrôle de la voie de sécrétion régulée (Elias *et al.*, 2012). Cette analyse protéomique a permis de mettre en évidence différents partenaires potentiels de la CgA dont un moteur moléculaire, la myosine 1b, et l'actine sur lesquels nous avons choisi de nous concentrer pour la première partie des travaux de ma thèse. En effet, l'implication de la myosine 1b et de l'actine filamenteuse venait d'être démontrée dans le bourgeonnement de structures au niveau de l'appareil de Golgi des cellules non-endocrines Hela par l'équipe d'Almeida et collaborateurs (Almeida *et al.*, 2011). **(Figure 21)**. Ainsi, nous avons entrepris de rechercher le

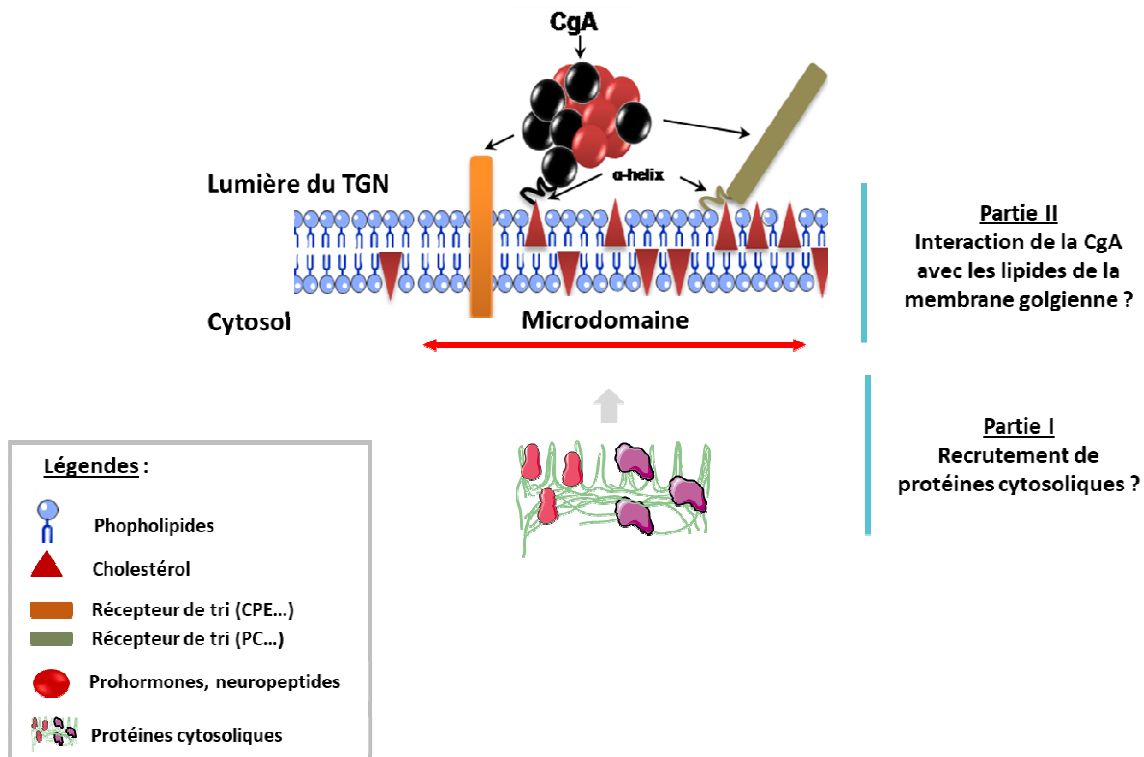
rôle de ce complexe actomyosine dans le bourgeonnement des GS au sein des cellules neuroendocrines.



**Figure 21. Modèle d'action de la myosine 1b et de la F-actine au niveau de la membrane du TGN pour former des compartiments post-golgiens dans des cellules non-endocrines HeLa.** La myosine 1b est impliquée dans le bourgeonnement de structures tubulaires à partir de la membrane du TGN dans des cellules HeLa, en interagissant avec les filaments d'actine afin d'induire la courbure membranaire et initier le bourgeonnement. D'après Almeida *et al.*, 2011

Ainsi, la formation des GS serait dirigée d'une part par la CgA, une protéine soluble résidente de la lumière du TGN, et d'autre part par des protéines cytosoliques. De ce fait, la suite de mon projet de thèse a été consacrée à l'étude des partenaires de ces protéines localisés au niveau de la membrane du TGN (**Figure 22**). En effet, différentes études ont mis en avant la capacité de la CgA à interagir avec les membranes. D'une part, il a été montré que la région N-terminale de la CgA est associée à la membrane des GS (Kang et Yoo, 1997). D'autre part, comme expliqué précédemment, mon équipe d'accueil a démontré que la CgA contrôle l'adressage d'hormones vers les GS ainsi que la formation des GS *via* ses régions N- et/ou C-ter (Montero-Hadjadje *et al.*, 2009). De manière intéressante, ces domaines terminaux possèdent des hélices  $\alpha$  conservées au cours de l'évolution, structures qui pourraient permettre l'interaction de la CgA avec les membranes (Elias *et al.*, 2010). Différentes études confortent cette hypothèse, puisque des peptides dérivés de la CgA possédant cette conformation en hélice  $\alpha$  sont capable d'interagir avec des lipides membranaires. C'est le cas de la vasostatine I avec la phosphatidylserine (PS) sur des monocouches de PtdCho, phosphatidylethanolamine (PE) et PS analysées à l'aide de film de Langmuir (Blois *et al.*, 2006), et de la catestatine qui interagit avec la PtdCho dans des micelles de DOPC analysés par dichroïsme circulaire et RMN (Résonance magnétique nucléaire) (Sugawara *et al.*, 2010).

Ainsi la seconde partie de ma thèse a porté sur la caractérisation de la capacité de la CgA à interagir avec des lipides membranaires spécifiques. Notre attention s'est particulièrement portée sur l'acide phosphatidique du fait de son rôle crucial dans la voie de sécrétion régulée (Chen *et al.*, 1997 ; Siddhanta et Shields, 1998 ; Zeniou-meyer *et al.*, 2007).



**Figure 22. Schéma récapitulatif des objectifs de mes travaux de thèse.** La CgA en interagissant avec la membrane du TGN serait capable d'induire un réarrangement de celle-ci ce qui provoquerait un recrutement de protéines cytosoliques, le tout entraînant le bourgeonnement des GS (Partie I). La CgA interagirait avec les lipides de la membrane golgienne pour induire son réarrangement et ainsi sa courbure selon les propriétés des lipides recrutés (Partie II).

# Résultats





## RESULTATS : Article 1

---

### **La myosine 1b et la F-actine sont impliquées dans la biogenèse des granules de sécrétion**

*Sci Rep. 2017 Jul 12;7(1):5172*


Dans de précédents travaux mon équipe d'accueil a développé une lignée de cellules COS7 exprimant de manière stable la CgA (COS7-CgA), leurs granules de sécrétion (GS) ont été purifiés et leur protéome analysé par spectrométrie de masse LC-MS/MS. Parmi les protéines identifiées, l'attention de l'équipe s'est focalisée sur l'actine et la myosine 1b (Myo1b), une protéine motrice liée à l'actine. En effet en 2011, Almeida et collaborateurs ont montré que la myosine 1b permet le bourgeonnement de vésicules de transport à partir du TGN dans les cellules HeLa (Almeida *et al.*, 2011). Dans le présent article, notre objectif a été de rechercher l'implication de la myosine 1b dans la biogenèse de granules contenant la CgA. Dans cette optique, en utilisant une stratégie d'ARN anti-sens, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de la Myo1b induit une diminution du nombre de GS contenant la CgA, à la fois dans le modèle de COS7-CgA, mais également dans les cellules neuroendocrines PC12. Associée à cette diminution, une dérégulation de la sécrétion a été constatée au sein de ces cellules. Ces travaux ont également montré un recrutement de la Myo1b et des filaments d'actine au niveau de l'appareil de golgi lors de la formation des granules de sécrétion.

Objectifs :

- ✓ L'inhibition de l'expression de la myosine 1b a-t-elle un impact sur la formation des granules contenant la CgA ?
- ✓ L'inhibition de l'expression de la myosine 1b influence-t-elle la sécrétion régulée de CgA ?
- ✓ Les filaments d'actine sont-ils impliqués, par l'intermédiaire de la myosine 1b, dans le bourgeonnement des granules contenant la CgA ?



# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## Myosin 1b and F-actin are involved in the control of secretory granule biogenesis

Charlène Delestre-Delacour<sup>1</sup>, Ophélie Carmon<sup>1</sup>, Fanny Laguerre<sup>1</sup>, Catherine Estay-Ahumada<sup>2</sup>, Maïté Courel<sup>1,7</sup>, Salah Elias<sup>1,8</sup>, Lydie Jeandel<sup>1</sup>, Margarita Villar Rayo<sup>3</sup>, Juan R. Peinado<sup>4</sup>, Lucie Sengmanivong<sup>5</sup>, Stéphane Gasman<sup>2</sup>, Evelyne Coudrier<sup>6</sup>, Youssef Anouar<sup>1</sup> & Maïté Montero-Hadjadje<sup>1</sup>

Hormone secretion relies on secretory granules which store hormones in endocrine cells and release them upon cell stimulation. The molecular events leading to hormone sorting and secretory granule formation at the level of the TGN are still elusive. Our proteomic analysis of purified whole secretory granules or secretory granule membranes uncovered their association with the actomyosin components myosin 1b, actin and the actin nucleation complex Arp2/3. We found that myosin 1b controls the formation of secretory granules and the associated regulated secretion in both neuroendocrine cells and chromogranin A-expressing COS7 cells used as a simplified model of induced secretion. We show that F-actin is also involved in secretory granule biogenesis and that myosin 1b cooperates with Arp2/3 to recruit F-actin to the Golgi region where secretory granules bud. These results provide the first evidence that components of the actomyosin complex promote the biogenesis of secretory granules and thereby regulate hormone sorting and secretion.

Besides the constitutive secretory pathway which is involved in the renewing of plasma membrane and extracellular matrix in all eukaryotic cell types, a regulated secretory pathway is specialized in hormone release in endocrine cells. The vesicular membrane structures at the origin of these secretory pathways, called constitutive vesicles and secretory granules respectively, arise by budding from the trans-Golgi network (TGN) membrane. However, the molecular mechanisms linking hormone sorting, TGN membrane and secretory granule formation are still poorly understood. Like all biological membranes, the TGN membrane is composed of a specific lipid and protein mix resulting in a proper lateral organization that supports the function of the TGN compartment<sup>1</sup>. Membrane-interacting cytosolic proteins are necessary to the dynamic morphology and to the functional organization of the TGN membrane, and include for example enzymes involved in the phospholipid remodeling<sup>2</sup> or proteins with Bin/Amphiphysin/Rvs domains capable of sensing and/or stabilizing membrane curvature<sup>3,4</sup>. Actin and its associated motors have also been shown to interact with the TGN membrane and to modulate its topology, as demonstrated for myosin II which promotes the fission of constitutive secretory vesicles<sup>5</sup>, and myosin 1b which induces the formation of post-Golgi carriers in HeLa cells<sup>6</sup>. Interestingly, proteomic studies of secretory granules identified many actin-interacting proteins, including myosins<sup>7,8</sup>, which could contribute to the control of different steps of endocrine secretion. Among these, myosin VI has been shown to control secretory granule exocytosis<sup>9</sup> whereas myosin 1b has currently no known function in endocrine cells.

<sup>1</sup>Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, 76000, Rouen, France.

<sup>2</sup>Université de Strasbourg, CNRS UPR 3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 67000, Strasbourg, France. <sup>3</sup>Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, Proteomics Core Facility, 13071, Ciudad Real, Spain.

<sup>4</sup>Laboratory of oxidative stress and neurodegeneration, Facultad de Medicina de Ciudad Real, 13071, Ciudad Real, Spain. <sup>5</sup>Institut Curie - PSL Research University, Membrane Dynamics and Mechanics of Intracellular Signaling Laboratory, Nikon Imaging Centre, 75005, Paris, France. <sup>6</sup>CNRS UMR 144 Cell Signaling and Morphogenesis, Institut Curie, 75005, Paris, France. <sup>7</sup>Present address: CNRS-UPMC FRE3402, Pierre et Marie Curie University, 75252, Paris, Cedex 05, France. <sup>8</sup>Present address: University of Oxford, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, Oxfordshire, United Kingdom. Charlène Delestre-Delacour and Ophélie Carmon contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.A. (email: [youssef.anouar@univ-rouen.fr](mailto:youssef.anouar@univ-rouen.fr)) or M.M.-H. (email: [maite.montero@univ-rouen.fr](mailto:maite.montero@univ-rouen.fr))

<sup>9</sup>Present address: University of Oxford, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, Oxfordshire, United Kingdom. Charlène Delestre-Delacour and Ophélie Carmon contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.A. (email: [youssef.anouar@univ-rouen.fr](mailto:youssef.anouar@univ-rouen.fr)) or M.M.-H. (email: [maite.montero@univ-rouen.fr](mailto:maite.montero@univ-rouen.fr))

Since myosin 1b binds to F-actin through its motor domain and to membrane phosphoinositides probably through its pleckstrin homology motif<sup>10, 11</sup> on the one hand, and on the other, facilitates the extraction of tubular structures under conditions of increasing membrane extension<sup>12</sup>, we postulated that this myosin and associated F-actin are good candidates to regulate the early steps of secretory granule formation in endocrine cells. In the present study, we observed the occurrence of myosin 1b (Myo1b) in the TGN area and on immature secretory granules of endocrine cells, and found that depletion of Myo1b using small interfering RNA (siRNA) significantly reduces (i) the number of secretory granules, (ii) regulated secretion and (iii) the distribution of F-actin in the Golgi region. In fact, F-actin depolymerization and Arp2/3 complex inhibition phenocopied the effect of Myo1b down-regulation on secretory granule formation. Collectively these results show for the first time the implication of the actomyosin system in the biogenesis of secretory granules and thus in hormone sorting through the regulated secretory pathway in endocrine cells.

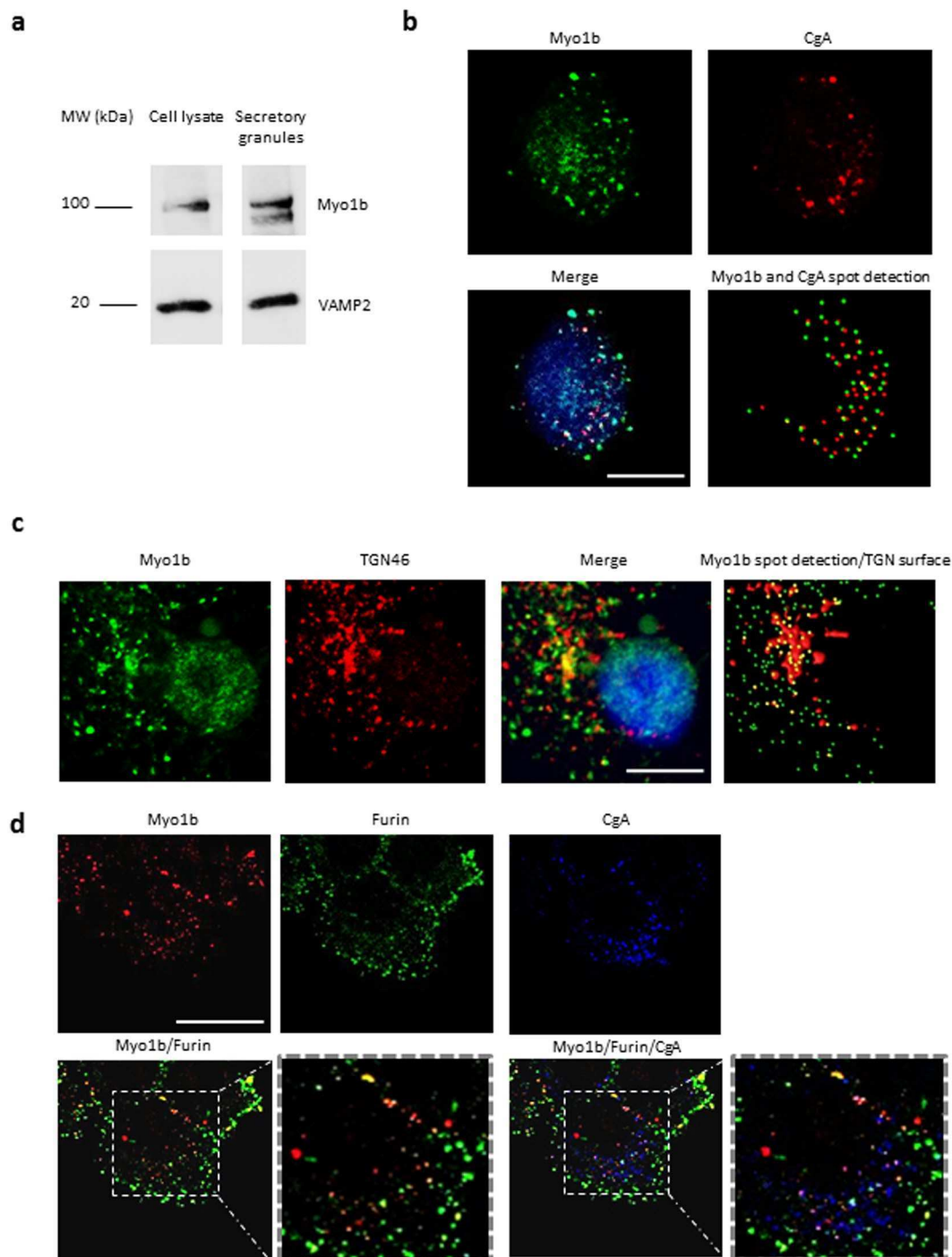
## Results

**Myosin 1b is associated with the trans-Golgi network and immature secretory granules in neuroendocrine PC12 cells.** We first analyzed the expression and distribution of myosin 1b (Myo1b) in neuroendocrine PC12 cells. Western blot analysis of PC12 cell lysates and purified secretory granules revealed the cofractionation of Myo1b and VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2), a specific marker of secretory granule membrane (Fig. 1a). Analysis of Myo1b distribution in PC12 cells by confocal microscopy coupled to immunofluorescence (IF) revealed that this protein is associated with 47 + 18% of secretory granules labeled with chromogranin A (CgA), a marker of secretory granules (Fig. 1b). Using antibodies raised against TGN46, a marker of the trans-Golgi network, and against furin, a prohormone convertase mainly localized in immature secretory granules just after their budding from the TGN membrane, we observed that Myo1b is mainly located in the TGN area (Fig. 1c) and in 89 + 8% of immature CgA-containing secretory granules (Fig. 1d). Together, these results show that Myo1b is associated with secretory granules at the level of the TGN, most likely to promote the budding of immature secretory granules.

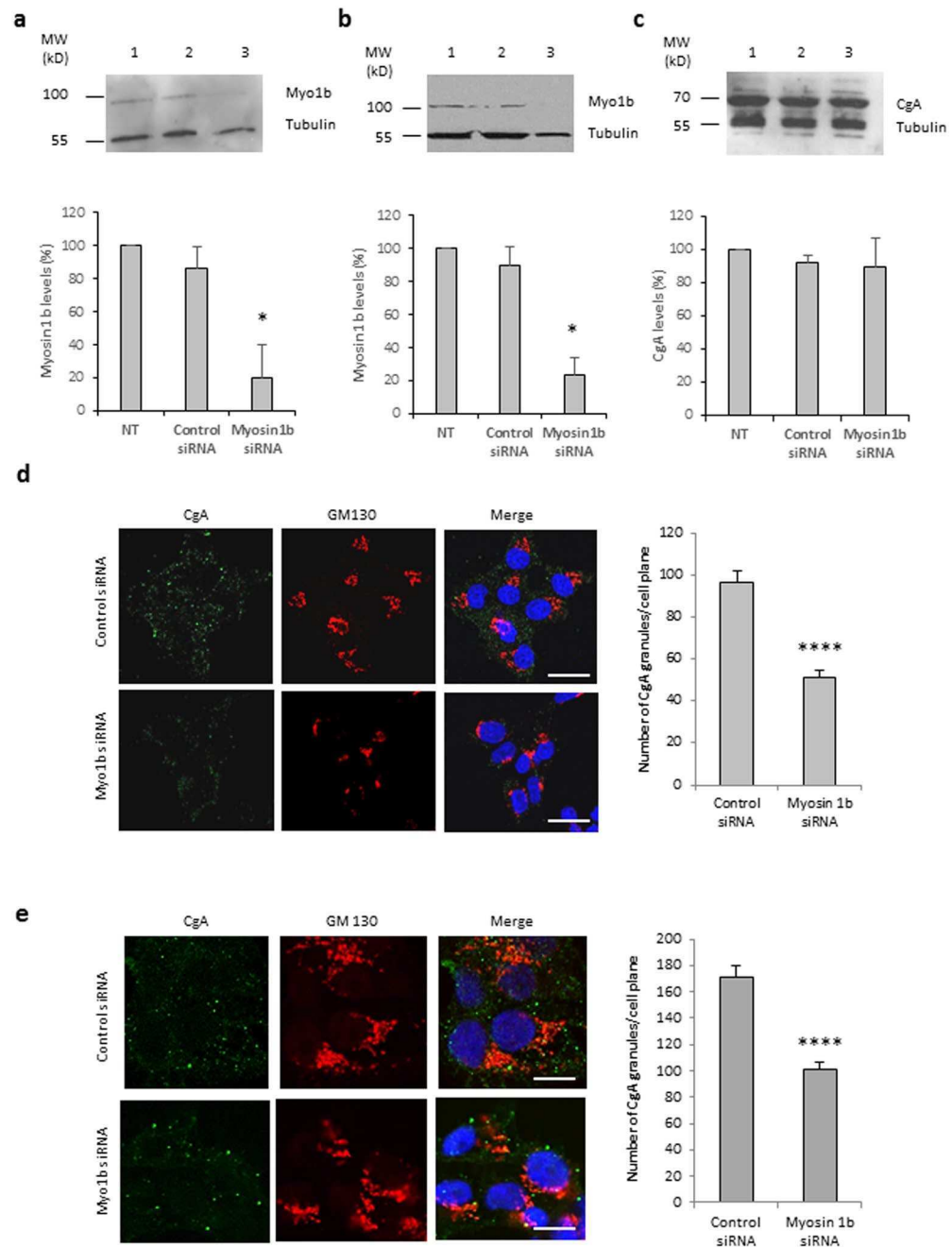
**Myosin 1b controls the biogenesis of secretory granules.** To demonstrate the implication of Myo1b in the biogenesis of secretory granules, we used the neuroendocrine PC12 cells as well as a simplified model consisting of COS7 cells expressing CgA which has been shown to induce secretory granule-like structures in these cells<sup>8, 13</sup>. Myosin 1b gene silencing in these cells was achieved through a home-designed short interfering RNA (Myo1bH siRNA) validated in the study of Almeida *et al.*<sup>6</sup>, which affords a strong reduction in Myo1b expression. Indeed, transfection of this siRNA significantly reduced Myo1b expression in both COS7-CgA (Fig. 2a) and PC12 (Fig. 2b) cells. This decrease in Myo1b expression did not alter CgA expression in PC12 cells (Fig. 2c), thus ruling out the possibility of an effect of Myo1b through altered CgA expression. Under these conditions and using confocal microscopy coupled to IF, we observed a significant reduction in the number of CgA-containing granules in both PC12 (Fig. 2d) and COS7-CgA (Fig. 2e) cells. This result shows that Myo1b could play a key role in the formation of secretory granules. We then investigated whether Myo1b knockdown alters the formation of secretory granules at the TGN level by fast time-lapse imaging of COS7 cells expressing CgA-GFP, using a spinning disc-equipped confocal microscope. Five hours after cell transfection, we observed numerous CgA-GFP-containing granules around the Golgi area moving towards the cytoplasm in control siRNA-treated cells (Fig. 3a; Movie 1), and we found that the number of CgA-GFP granules generated was significantly reduced in Myo1b siRNA-treated cells (Fig. 3b,c; Movie 2). Moreover, in the latter case, the granules generated moved faster than those observed in control cells treated with a scramble siRNA (Fig. 3d; Movies 1, 2). Thus, the absence of Myo1b alters not only the number but also the dynamics of CgA-GFP containing vesicles, which suggests together with the distribution data described above that the motor protein is involved in the initiation of secretory granule formation from the Golgi complex.

**Myosin 1b depletion increases basal secretion.** Given the impact of Myo1b expression on the number of secretory granules, we analyzed the effect of this myosin on the secretory competence of PC12 and COS7-CgA cells using CgA release as an index of the regulated secretory pathway. This analysis showed that Myo1b knockdown results in increased basal release of CgA in both cell models (Fig. 4a,b). We also studied the distribution of CgA in the constitutive and the regulated secretory pathways in the absence of Myo1b. Using an antibody raised against collagen III, a protein of the extracellular matrix of fibroblasts which is addressed to the constitutive secretory pathway, we found that Myo1b down-regulation provokes a significant increase in the number of vesicular organelles containing both collagen III and CgA (Fig. 4c). These results indicate that CgA is misrouted to the constitutive secretory pathway in the absence of Myo1b, leading to its increased release in basal conditions. Together, these data show that Myo1b controls secretory protein sorting toward the regulated pathway.

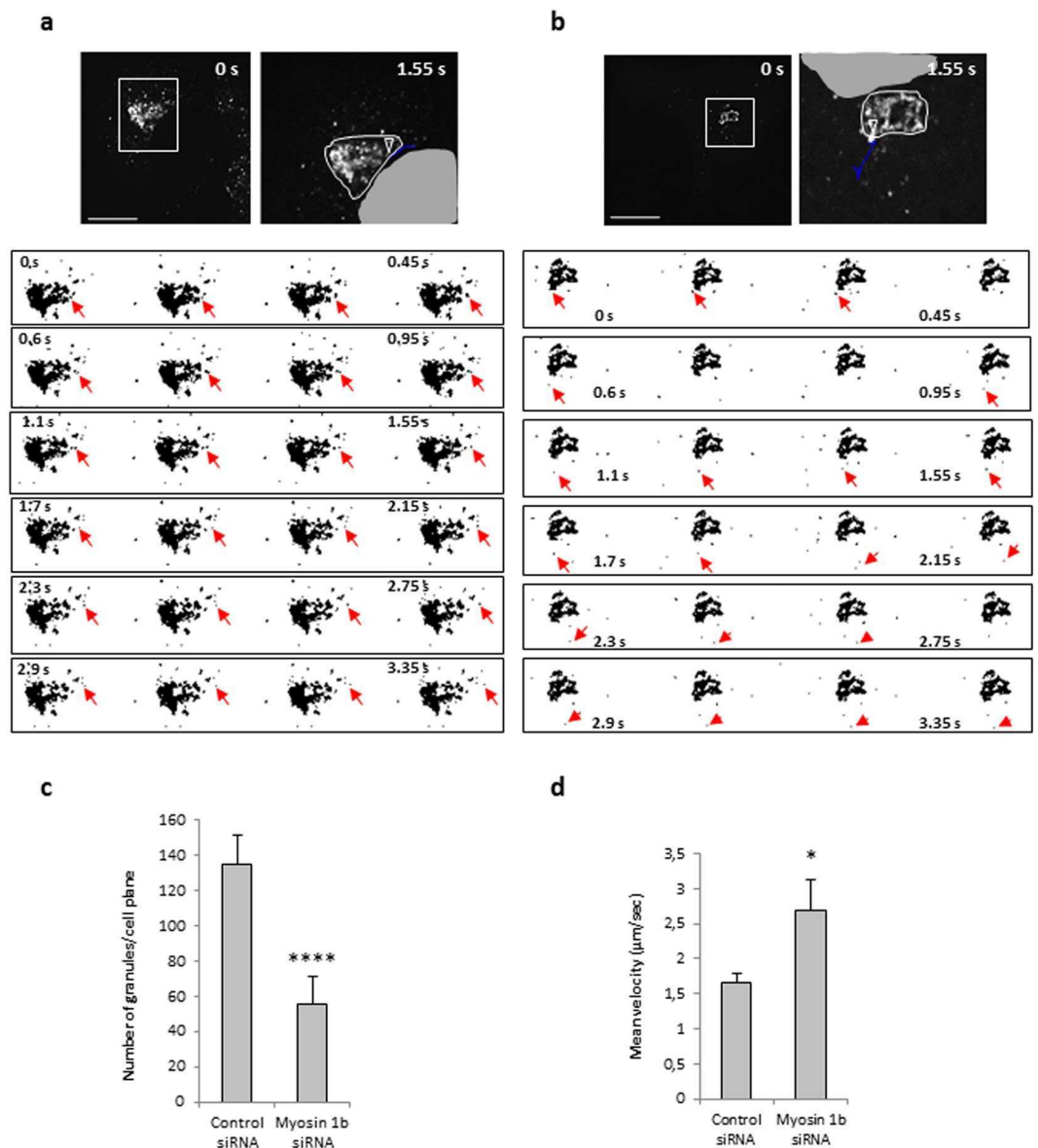
**Actin and actin-related proteins are also required for the biogenesis of secretory granules.** In addition to those previously identified through proteomic characterization of whole secretory granules<sup>8</sup>, further analysis of purified secretory granule membranes revealed the occurrence of several other F-actin components, effectors and regulators with known functions at the level of the Golgi complex (Table 1). Among these proteins, Arp2/3 and actin cytoplasmic 1 and 2 have been reported to promote the formation of post-Golgi carriers by regulating membrane remodeling at the TGN in HeLa cells<sup>6</sup>, suggesting that actin could cooperate with Myo1b at the level of the TGN membrane to regulate secretory granule formation. To determine the role of F-actin in secretory granules biogenesis, we depolymerized F-actin using latrunculin B and inhibited actin nucleation mediated by the Arp2/3 complex using CK-666, in COS7-CgA and PC12 cells. F-actin depolymerization led to a significant decrease in the number of CgA granules (up to 50% and 10% in COS7-CgA and PC12 cells, respectively) (Fig. 5a,b), thus revealing a key function of F-actin in the regulation of secretory granule formation. IF analysis of



**Figure 1.** Myosin 1b is associated with the trans-Golgi network and secretory granules in PC12 cells. **(a)** Cropped and color inverted blots showing protein expression levels of myosin 1b (Myo1b) and VAMP2 in a PC12 cell lysate and secretory granule-containing fraction. (Full image of each tested protein are reported in Supplementary Figure S1). **(b–d)** PC12 cells were immunolabeled with anti-TGN46, Myo1b, CgA and furin antibodies. **(b)** Representative confocal microscopy sections throughout the cell show a partial overlap of Myo1b and CgA-containing secretory granules ( $47 \pm 18\%$ , with a 0.409 Pearson correlation coefficient, from three independent experiments,  $n = 39$  cells). **(c)** Representative confocal microscopy sections throughout the cell show an overlap of Myo1b labeling and a TGN marker. **(d)** Representative confocal microscopy sections throughout the cell show an overlap of Myo1b and CgA-containing immature secretory granules labeled by furin ( $89 \pm 8\%$ , from three independent experiments,  $n = 66$  cells). Scale bar represents  $10 \mu\text{m}$ .

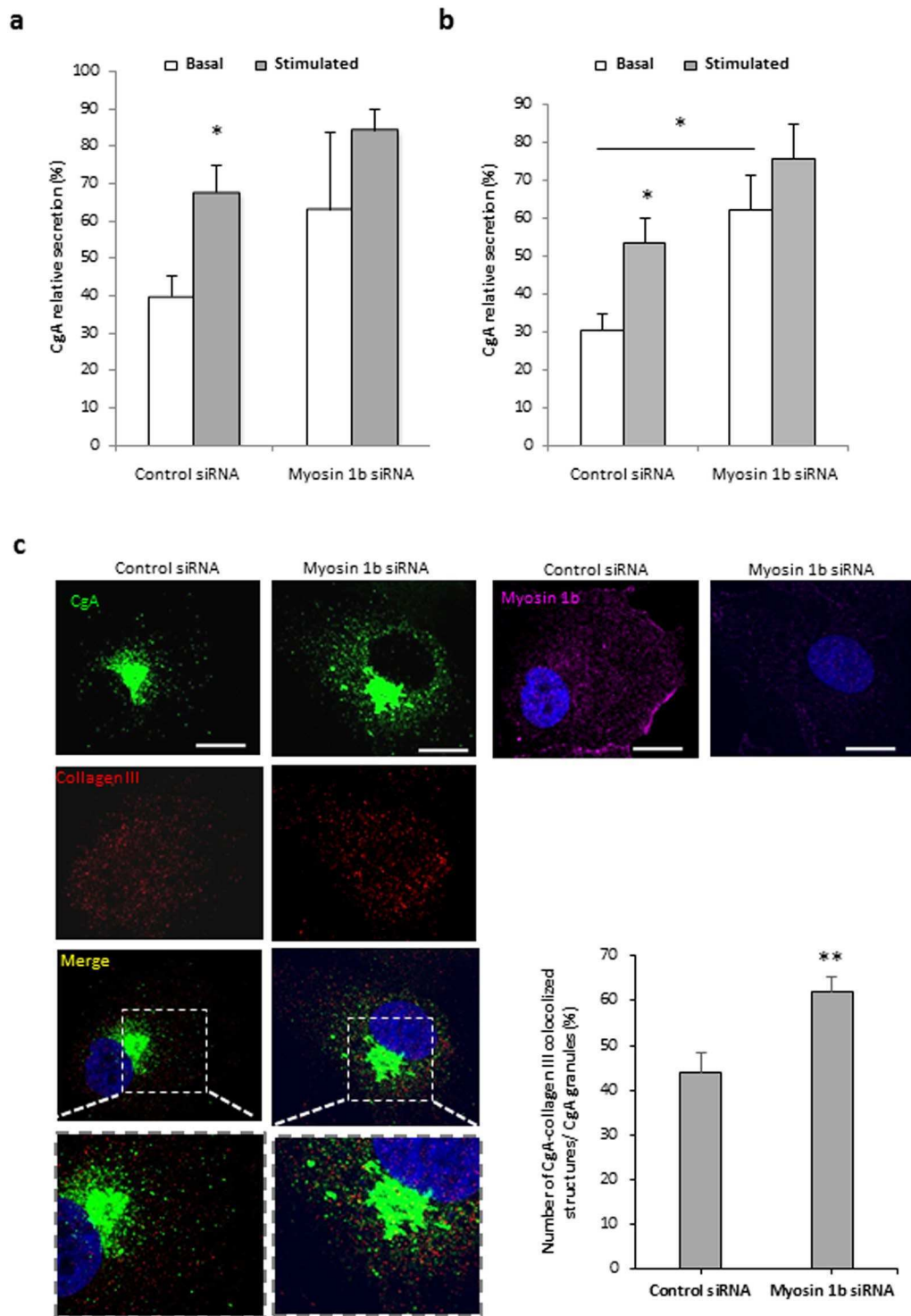


**Figure 2.** Myosin 1b depletion reduces the biogenesis of CgA-containing granules in PC12 and COS7 cells. (a–c) Protein extracts were analyzed by immunoblotting. Cropped blots showing protein expression levels of Myo1b and tubulin in lysates of COS7-CgA cells (a) or PC12 cells (b), non-transfected (lane 1), transfected with control siRNA (lane 2) or myosin 1b siRNA (lane 3). (c) Cropped blots showing protein expression levels of CgA and tubulin in lysates of PC12 cells, non-transfected (lane 1), transfected with control siRNA (lane 2) or myosin 1b siRNA (lane 3). Histograms represent a semi-quantitative analysis of the amount of myosin 1b or CgA found in cells transfected with control siRNA or myosin 1b siRNA from three independent experiments. \* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test). (Full-length blots of each tested protein are reported in Supplementary Figure S2). (d) PC12 cells were transfected with control siRNA or Myo1b siRNA, fixed, immunolabelled with anti-CgA and GM130 antibodies, and analyzed by confocal microscopy. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ . The number of CgA granules in PC12 cells transfected with control siRNA or Myo1b siRNA was quantified and expressed as mean + s.e.m. from three independent experiments ( $n = 36$  cells). \*\*\*\* $P < 0.0001$  (Student's  $t$ -test with Welch's correction). (e) COS7-CgA cells were transfected with control siRNA or Myo1b siRNA, fixed, immunolabelled with anti-CgA and GM130 antibodies, and the distribution of CgA was analyzed by confocal microscopy. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ . The number of CgA granules in COS7-CgA cells, transfected with control siRNA or myosin 1b siRNA, was quantified and expressed as mean + s.e.m. from three independent experiments ( $n = 43$  cells). \*\*\*\* $P < 0.0001$  (Mann-Whitney test).



**Figure 3.** Myo1b depletion alters the number and the velocity of CgA granules. COS7 cells were first transfected with control siRNA (a) or myosin1b siRNA (b), and 24 h later with a plasmid encoding CgA-GFP. CgA-GFP carriers were monitored 5 h later at 37 °C by time-lapse imaging using spinning-disc confocal microscopy (see Movies 1 and 2). The first frames of representative movies (that cover 3.5 s) revealing the sequence of events of granule formation TGN are shown. White boxes indicate the enlarged TGN region shown in image sequences. The right image in each panel corresponds to the enlarged region showing granule trajectory (in blue) along the image sequence, using the ‘manual tracking’ plugin of Image J. The arrow head indicates the position of the granule at the beginning of the tracking. The white line delimitates the Golgi region and the grey zone corresponds to part of the nucleus. The scale bars represent 10 μm. The red arrows indicate the position of the tracked granule every 150 ms. (c) The number of CgA-GFP granules was quantified, and expressed as mean + s.e.m. from three independent experiments (n = 20–24 cells). \*\*\*\*P < 0.0001 (Mann-Whitney test). (d) The mean velocities were calculated as the cumulated displacement of the granule from the location of its first observation to the end of the observation period with respect to the time of observation, and expressed as mean + s.e.m. from three independent experiments (N = 14–19 cells, n = 22–69 granules). \*P < 0.05 (Mann-Whitney test).

the Arp2/3 p34 subunit distribution confirmed that CK-666 treatment inhibits the recruitment of Arp2/3 complex and F-actin to the Golgi region (Fig. 6a). Inhibition of Arp2/3 complex also provoked a significant reduction in the number of secretory granules (up to 50% in COS7-CgA and PC12 cells) (Fig. 6b,c). Taken together, these observations demonstrate that Arp2/3-dependent recruitment of F-actin in the Golgi area is required for the regulation of secretory granule biogenesis.



**Figure 4.** Myosin 1b depletion leads to CgA leakage through the constitutive secretory pathway. Quantification after Western blot analysis of CgA secretion and content from COS7-CgA cells (**a**) and PC12 cells (**b**), transfected with control or myo1b siRNA, in basal or 2 mM Ba<sup>2+</sup>-stimulated conditions. Normalized CgA release in the medium relative to total CgA (medium + cell content) is determined. The values represent the means  $\pm$  s.e.m. from four independent experiments. \* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test). (**c**) COS7 cells were transfected with control siRNA or Myo1b siRNA and with a plasmid encoding CgA-GFP, fixed, immunolabeled with anti-collagen III or Myo1b antibody, and the distribution of CgA was analyzed by confocal microscopy. The scale bar represents 10  $\mu$ m. The number of CgA-GFP/collagen III colocalized structures in COS7-CgA cells, transfected with control or myosin 1b siRNAs, was quantified and expressed as percentages of CgA/collagen III colocalized structures relative to total CgA granules. The values represent the means  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments ( $n = 45$  cells). \*\* $P < 0.01$  (Student's t-test with Welch's correction).



Name	Access number	Function	References
Actin cytoplasmic 1	P60709	Golgi-derived transport carrier biogenesis and Golgi-to-ER protein transport	25
Actin cytoplasmic 2	P63261		26
Actin related protein 2/3 complex subunit 2	O15144	Associated to actin filaments and involved in TGN budding	6
		TGN budding	27
Cofilin-1	P23528	Signalling pathway that regulates actin assembly in neuronal Golgi membranes.	28
Profilin	P35080		
Secretory carrier membrane protein 3	O14828	Golgi-derived transport carrier biogenesis and Golgi-to-ER protein transport	29

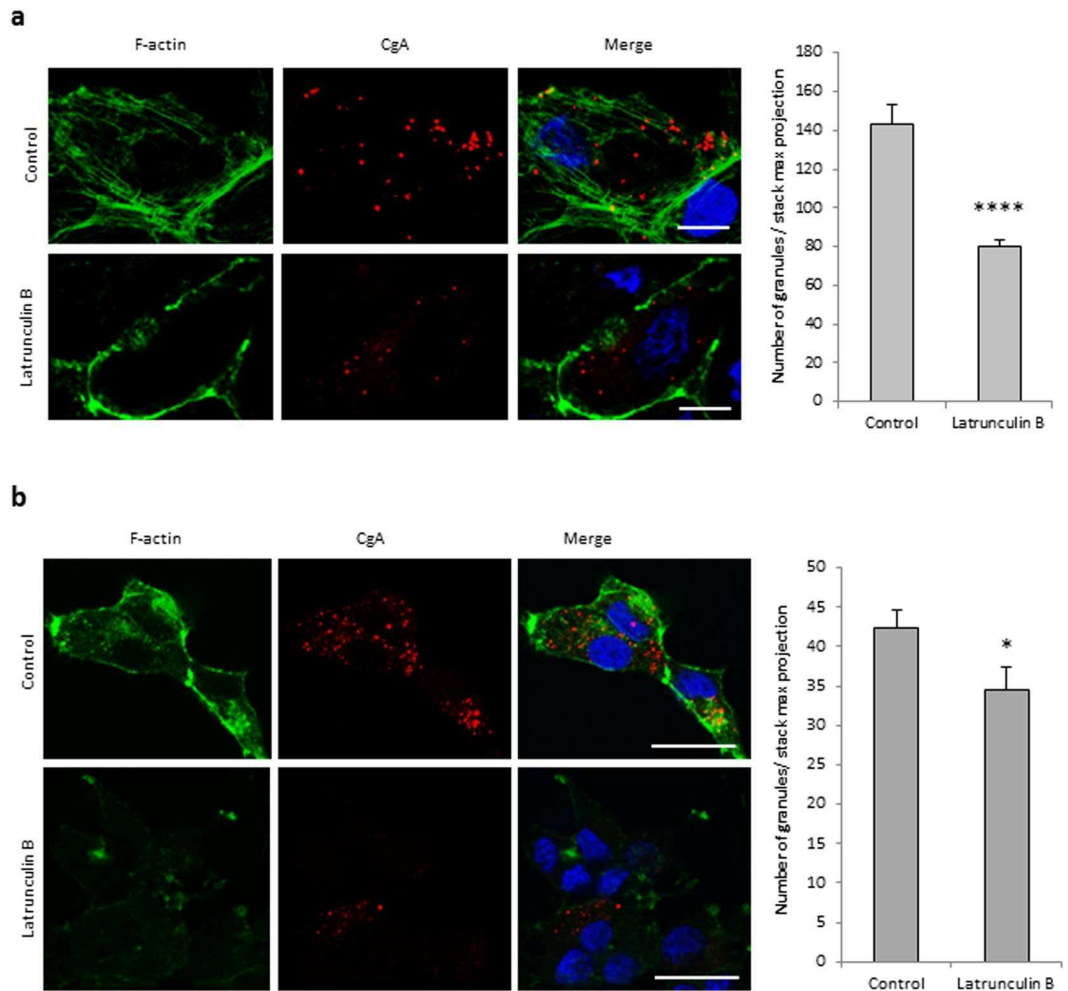
**Table 1.** F-actin components, effectors and regulators, with known functions at the Golgi complex, identified in the membrane fraction of purified granules from COS7-CgA cells. Identification was based on human sequences, as well as those of other mammalian species. Only proteins that were identified with one or more high scoring peptides from Mascot were considered to be true matches. “High scoring peptides” corresponded to peptides that were above the threshold in Mascot ( $P < 0.05$ ) searches. The table shows a non-redundant list of the proteins and the reference to the Uniprot-access number used in database searches (<http://uniprot.org>).

**Myosin 1b promotes the recruitment of Arp2/3-dependent F-actin to the Golgi area.** Myo1b has the ability to interact with actin *via* its motor domain and with the membrane *via* its pleckstrin homology motif<sup>11</sup>. Using Myo1b siRNA and the Arp2/3 inhibitor CK-666, we investigated the impact of Myo1b and Arp2/3 complex on F-actin distribution in the Golgi area of COS7-CgA cells. Fluorescent phalloidin and GM130 antibody allowed the analysis of actin distribution around the Golgi area. Analysis of line scans of fluorescence intensity taken through the cell showed that Myo1b depletion and Arp2/3 inhibition lead to F-actin decrease in the Golgi area (Fig. 7a). Quantification of actin and Golgi complex colocalization showed that both Myo1b knockdown and Arp2/3 complex inhibition lead to a 50% decrease in actin occurrence at the Golgi complex (Fig. 7b). These results show that blockade of Arp2/3 complex phenocopies Myo1b knockdown and that both Myo1b and Arp2/3 complex are involved in the recruitment of F-actin to the Golgi area in secretory cells.

## Discussion

Secretory granules are key organelles allowing regulated hormone release in endocrine cells. Although considerable efforts have been devoted to understand the molecular events underlying secretory granule formation, the complex mechanisms that allow the specific sorting of hormones and the budding of secretory granules remain incompletely understood. It has been proposed that the sorting of peptide hormones through the regulated secretory pathway is controlled by chromogranins, which aggregate with peptides in the TGN lumen and function as the core around which budding of secretory granules is initiated from the TGN membrane<sup>14</sup>. In a previous study, we used a simplified model of CgA-induced vesicles in COS7 cells to identify potential effectors of granulogenesis through proteomic analysis of the newly formed granules. This analysis allowed the identification of a panel of cytosolic proteins interacting with actin, including myosins<sup>8</sup>, some of which have been associated with vesicular formation and exocytosis. Indeed, we identified myosin VI which is known to be involved in the regulated exocytosis of neuroendocrine cells<sup>9,15,16</sup> and in the maintenance of the Golgi morphology<sup>17</sup>. We also identified Myo1b, which has been shown to have an anchoring role that allows TGN membrane deformation through its attachment to the actin cytoskeleton, leading to the biogenesis of post-Golgi carriers in HeLa cells<sup>6</sup>. A more detailed analysis by mass spectrometry of proteins associated with the membrane of newly formed granules allowed us to identify Arp2/3 complex and actin cytoplasmic 1 and 2, which could act in concert with myosins to regulate the formation of secretory granules in endocrine cells. Although several studies reported the implication of myosins and F-actin in the trafficking and exocytosis of secretory granules<sup>18</sup>, the role of these multi-functional proteins in the formation of secretory granules has never been reported. We found that Myo1b is associated with the TGN and immature secretory granules in PC12 cells, indicating that Myo1b could affect the early stages of secretory granule biogenesis by inducing the budding of immature vesicles from the TGN membrane. When Myo1b expression is knocked down, the number of secretory granules is significantly reduced, thus pointing out a possible direct role of this protein in the formation of secretory granules. In addition, time-lapse imaging revealed that Myo1b depletion impacts the dynamics of the formed granules. Since our previous studies showed that constitutive vesicles move faster than CgA-induced granules in COS7 cells<sup>8</sup>, our present observations suggest that the absence of Myo1b leads to misrouting of CgA toward the constitutive secretory pathway. In support of this finding, we observed higher basal secretion and a higher number of CgA-containing constitutive vesicles when Myo1b was knocked down. Taken together, these data strongly support a role of Myo1b in the biogenesis of functional secretory granules underlying hormone regulated release in endocrine cells.

In addition to myosins, we found that Arp2/3 complex and F-actin are associated to secretory granule membranes. But more than controlling the integrity of the Golgi complex, F-actin, together with Arp2/3, has been shown to mediate the effect of Myo1b on TGN membrane deformation in HeLa cells, as Myo1b actively tethers and orients polymerizing F-actin to generate the required mechanical force<sup>6</sup>. In the present study, we demonstrate for the first time that F-actin controls the biogenesis of secretory granules, most likely *via* its recruitment to the Golgi region through Arp2/3 activation. Indeed, the Arp2/3 complex binds to actin and was shown here to exert an active role in secretory granule formation, potentially by providing *de novo* actin tracks for membrane curvature, as demonstrated during secretory granule exocytosis<sup>19,20</sup>. Therefore, Myo1b depletion or Arp2/3 inhibition could disrupt the interaction between the TGN membrane and F-actin, hampering secretory granule formation.



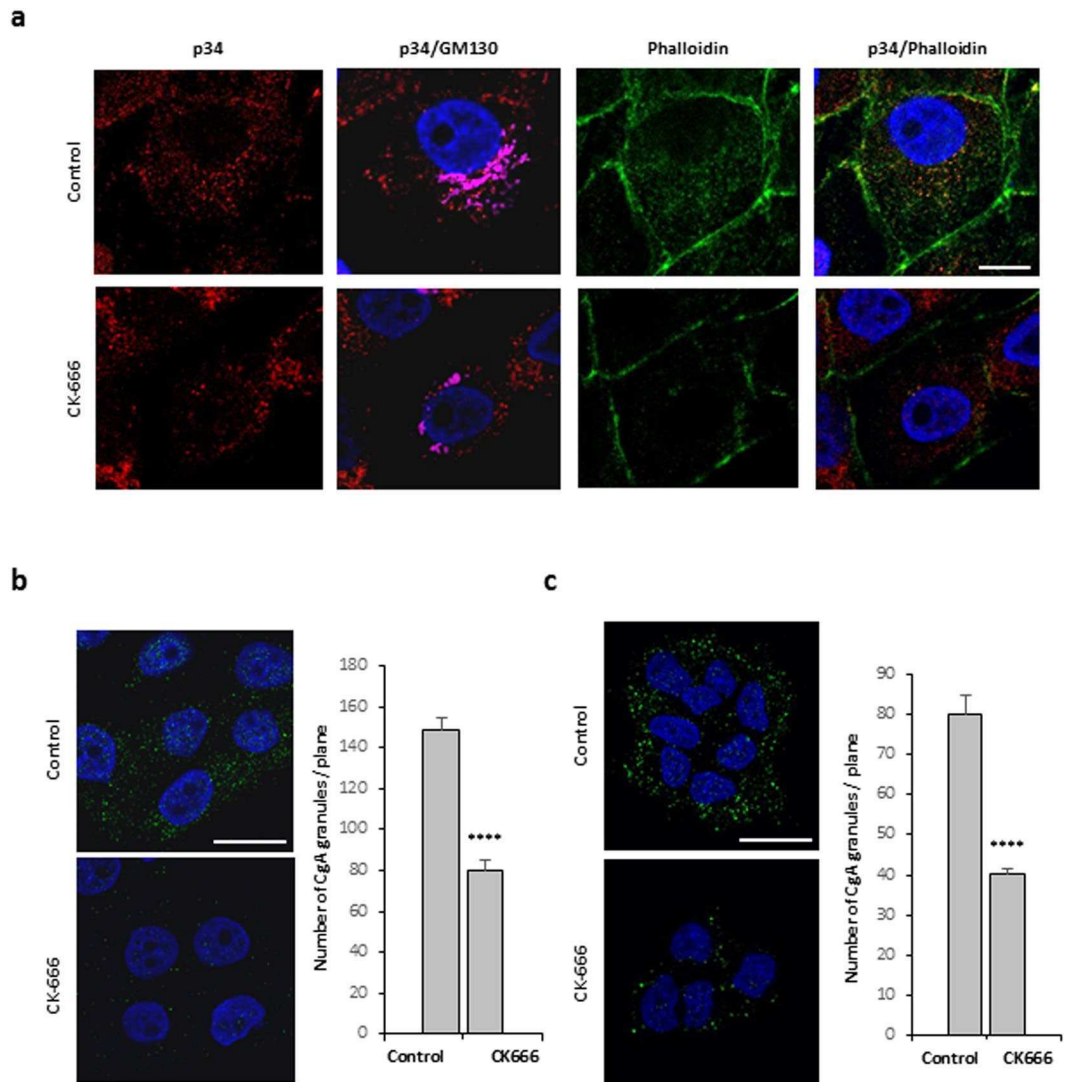
**Figure 5.** F-actin is required for the biogenesis of secretory granules. COS7-CgA cells (a) and PC12 cells (b) were treated using DMEM alone (control) or supplemented with latrunculin B. They were labeled with fluorescent phalloidin (F-actin), immunolabeled with anti-CgA antibody and analyzed by confocal microscopy. Projected images of 26 0.3  $\mu\text{m}$ -thick confocal sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ . The number of CgA granules in control and treated cells was quantified and expressed as mean  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments ( $n = 30$  cells). \* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  (Mann-Whitney test).

These results suggest that the actomyosin complex could contribute to secretory granule biogenesis by triggering membrane deformation, which could be stabilized in the nascent secretory granule by cytosolic BAR proteins, such as the protein interacting with C kinase 1 or arfaptin-1<sup>21,22</sup>, before the recruitment of scission proteins that will give rise to immature secretory granules.

The present work represents the first evidence that Myo1b and F-actin are involved in secretory granule formation and in the establishment of the regulated secretory pathway. The action of the actomyosin complex could require its recruitment at the TGN to induce membrane remodeling, a mandatory process for the biogenesis of secretory granules. Additional studies will be needed to establish the molecular mechanisms promoting the recruitment of actomyosin complex to the TGN membrane in order to trigger secretory granule biogenesis.

## Materials and Methods

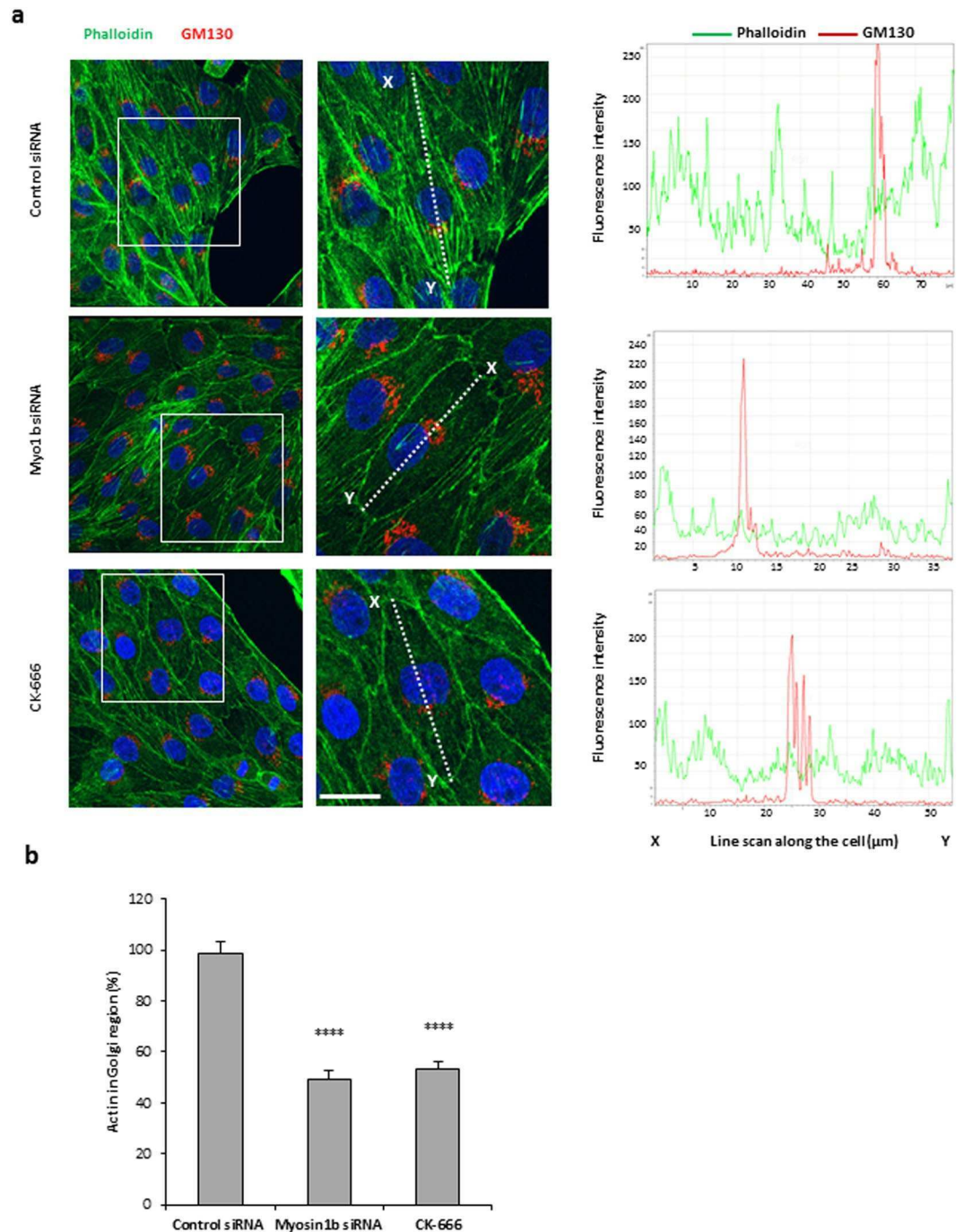
**Cell culture.** African green monkey kidney fibroblast-derived COS7 cells (American Type Culture Collection; CRL 1651), wild type (COS7-WT) and stably expressing CgA (COS7-CgA) developed previously<sup>8</sup>, were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (Life Technologies), 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin and 100  $\mu\text{g}$  ml<sup>-1</sup> streptomycin (Life Technologies), and 300  $\mu\text{g}$  ml<sup>-1</sup> geneticin (G-418 sulfate, Life Technologies) to maintain selection in COS7-CgA cells, at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Rat pheochromocytoma PC12 cells (American Type Culture Collection; CRL 1721) were routinely grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplemented with 5% sterile-filtered fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 10% sterile-filtered HyClone Donor Equine serum (Thermo Scientific), 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin and 100  $\mu\text{g}$  ml<sup>-1</sup> streptomycin (Life Technologies), 1% L-glutamine (Life Technologies), at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Most experiments with PC12 cells were performed on cells plated onto 10  $\mu\text{g}$  ml<sup>-1</sup> poly-D-lysine (Sigma) coated 15-mm round glass coverslips in 24-well plates. For IF and live experiments, COS7-WT cells were transfected with 0.8  $\mu\text{g}$  of DNA encoding GFP-tagged human CgA (CgA-GFP)<sup>8</sup> and 2  $\mu\text{l}$  Lipofectamine



**Figure 6.** Arp2/3 complex activation is required for the biogenesis of secretory granules. **(a)** COS7-CgA cells were treated with DMSO alone (control) or with the Arp2/3 inhibitor (CK-666). The distribution of the Arp2/3 complex and F-actin was assessed by immunofluorescence with anti-p34 antibody and by fluorescent phalloidin, respectively, and was analyzed by confocal microscopy. A single focal medial plane of GM130 (magenta), p34 (red) and F-actin (green) distribution is shown. Scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ . COS7-CgA cells **(b)** and PC12 cells **(c)** were treated with DMSO alone (control) or with the Arp2/3 inhibitor (CK-666). They were immunolabeled with anti-CgA antibody and analyzed by confocal microscopy. Representative confocal microscopy sections throughout the nucleus are shown. The scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ . The number of CgA granules in cells treated with DMSO alone (control) or with the Arp2/3 inhibitor (CK-666) was quantified and expressed as mean + s.e.m. from three independent experiments ( $n = 40$  cells). \*\*\*\* $P < 0.0001$  (Student's  $t$ -test with Welch's correction).

2000 (Invitrogen) per well (24-well plate or Mattek) according to the manufacturer's protocol. Four or five hours after the beginning of transfection, the culture medium was replaced by supplemented DMEM, and cells were additionally cultured for 24–48 h for IF experiments.

**Myosin 1b knockdown.** For transient Myo1b knockdown, a home-designed Myo1b siRNA (Myo1bH siRNA, 5'-GCTTACCTGGAAATCAACAAG-3') (Sigma Proligo) was used as previously described<sup>6</sup>. A non-targeting siRNA pool designed by Dharmacon-Thermo Scientific has been used as control siRNA. The non-targeting pool contains 2 siRNA which respectively reduces EGFR mRNA by  $\approx 50\%$  and targets firefly luciferase. COS7 cells were transfected with 10 nM siRNA and 1  $\mu\text{L}$  of Lipofectamine RNAimax (Life Technologies) per well, in 24-well plate, according to the manufacturer's protocol. PC12 cells were transfected with 30 nM siRNA, following the same protocol. Four hours after the transfection, the medium was replaced by supplemented DMEM, and cells were cultured for 48 h. Transfected cells were then analyzed by SDS-PAGE and Western blotting for Myo1b or CgA levels or fixed for IF.



**Figure 7.** Myosin 1b knockdown and depletion of the Arp2/3 complex reduce F-actin distribution in the Golgi area. **(a)** COS7-CgA cells were either transfected with control siRNA or Myo1b siRNA, or treated with the Arp2/3 inhibitor CK-666. F-actin and the Golgi complex were labeled with fluorescent phalloidin and immunolabelled with GM130 antibody, respectively, and cells were analyzed by confocal microscopy. Projected images of 20 0.3  $\mu\text{m}$ -thick confocal sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ . The fluorescence intensities along the white lines indicated in the merged pictures were quantified using the line scan mode of Leica software. Line scans taken through the cell are plotted in graphs in the right side of the corresponding images. **(b)** The localization of F-actin in the Golgi region was quantified and expressed as mean + s.e.m. from four independent experiments ( $n = 22$  cells). \*\*\*\* $P < 0.0001$  (Student's  $t$ -test with Welch's correction).

**Drug treatments.** Arp2/3 complex was inactivated by incubating cells in DMEM supplemented with 100  $\mu$ M DMSO-dissolved CK-666 (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Actin filaments were depolymerized by incubating cells in DMEM supplemented with 2.5  $\mu$ M latrunculin B (Calbiochem, La Jolla, CA) for 45 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Under these conditions, microtubules were not significantly affected (data not shown).

**Secretion analysis.** COS7 cells stably expressing CgA were cultured in 24-well plates, extensively washed with phosphate buffered saline and subsequently incubated in calcium secretion buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.4) (basal release of CgA) or in barium secretion buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM BaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.4) (stimulated release of CgA) for 15 min, at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Secretion media were collected, cleared by centrifugation (5 min, 14,000 g, 4 °C) and stored in Laemmli buffer for further analysis. Cells were lysed in NP40 cell lysis buffer (Invitrogen) containing protease inhibitor cocktail (Roche), and centrifuged (15 min, 15,000 g, 4 °C). Then, proteins from the supernatant were denatured in Laemmli buffer. Secretion media and cell homogenates were analyzed by Western blotting.

**Antibodies.** Primary antibodies used were monoclonal anti-synaptobrevin 2 (104211 from Synaptic system; 1:5,000); monoclonal  $\alpha$ -tubulin (T5168 from Sigma; 1:5,000); rabbit polyclonal anti-CgA (EL-35)<sup>23</sup> (1:500 for IF, 1:1,000 for Western blotting); goat polyclonal anti-CgA (sc-23556 from Santa Cruz Biotechnology inc; 1:200); rabbit polyclonal anti-Myo1b (HPA 013607 from Sigma prestige antibodies; 1:200 for IF, 1:250 for Western blotting); mouse monoclonal anti-GM130 (610822 from BDBiosciences; 1:1,000); rabbit polyclonal anti-furin (Ab3467 from Abcam; 1:200); sheep polyclonal anti-human TGN46 (AHP500 from AbD serotec; 1:500); rabbit polyclonal anti-p34-Arc/ARPC2 (07-227 from Millipore; 1:400); goat anti-type III collagen (1330-01 from Southern Biotech; 1:200). For IF, secondary antibodies used were Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG; Alexa 594-conjugated donkey anti-rabbit IgG; Alexa 647-conjugated donkey anti-rabbit IgG; Alexa 488-conjugated donkey anti-mouse IgG; Alexa 488-conjugated donkey anti-goat IgG; Alexa 594-conjugated donkey anti-goat IgG; Alexa 594-conjugated donkey anti-sheep IgG; Alexa 647-conjugated donkey anti-mouse IgG (Invitrogen; 1:500). For Western blotting, anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Santa Cruz biotechnologies; 1:2,000) were used.

**Protein electrophoresis and Western blotting.** Cells were harvested by scraping, homogenized, and proteins were separated by SDS-PAGE followed by Western blotting. Membranes were incubated in a blocking buffer containing 5% non-fat dry milk in phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (Sigma) (PBS-T) for 1 h at room temperature, and overnight with primary antibodies at 4 °C. Then, membranes were washed for 45 min with PBS-T. Blots were subsequently incubated for 1 h with appropriate HRP-conjugated secondary antibody in blocking buffer. Membranes were washed for 45 min with PBS-T. Immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence (Pierce Biotechnology). Quantification was performed using ImageJ software (Wayne Rasband National Institutes of Health) and Image Lab software (Bio-Rad). The mean intensity of each individual band of interest was calculated after background value subtraction. For validation of siRNA transfection, values were normalized to the mean intensity of the loading control band for each sample ( $\alpha$ -tubulin). For secretion studies, values of released CgA in the medium were normalized to those of total CgA (medium + cell content).

**Immunofluorescence labelling.** Cells cultured onto coated glass coverslips were transfected as described above and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 15 min. Cells were permeabilized and blocked for 30 min with 0.3% Triton X-100 in PBS containing normal donkey serum (1:50) and 1% BSA. Cells were then incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies, and, after washing with PBS, for 1 h with secondary antibodies. Phalloidin-FITC (Invitrogen, 500 nM) was used to detect actin filaments. Nuclei were stained with DAPI (Molecular probes #D3571, 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). To verify the specificity of the immunoreactions, the primary or secondary antibodies were substituted with PBS.

**Image acquisition.** Confocal microscopy was carried out with a TCS-SP8 upright confocal laser scanning microscope equipped with 63 $\times$  oil immersion objective (NA = 1.4; Leica, Microsystems). Alexa 488 and GFP were excited at 488 nm and observed in a 505–540 nm window. Alexa 594 was excited at 594 nm and observed in a 600–630 nm window. Alexa 647 was excited at 633 nm and observed in a 650–700 nm window. For dual color acquisition, images were sequentially acquired in line scan mode (average line = 2). Overlays were performed with post acquisition Leica Confocal Software functions to obtain the presented snapshots. Golgi exit of granules was monitored by time-lapse fluorescence microscopy using a spinning-disc confocal microscope. This microscopy was carried out with a Yokogawa CSU-22 spinning-disc head on a Nikon TE-2000 U microscope equipped with a 100 $\times$  NA 1.4 oil immersion objective and a Coolsnap HQ2 camera, a NanoScanZ piezo focusing stage (Prior Scientific) and a motorized scanning stage (Marzhauser). This microscope was steered with Metamorph 7.1 (Universal Imaging Corporation). The fast scan mode at 512  $\times$  512 pixel resolution was used. Video sequences were acquired at 5 frames s<sup>-1</sup> (100–200 ms exposures).

**Post-acquisition analysis.** The extent of colocalization of two labels was measured using the “Colocalization” module of Imaris 7.6.5. 64-bit version (Bitplane AG, [www.bitplane.com](http://www.bitplane.com)). This program analyzes plan of confocal sections acquired in two channels. Imaris colocalization analyzes the entire confocal plan by measuring the intensity of each label in each pixel. The program uses an iterative procedure to determine an intensity threshold (in the 0–255 scale of pixel intensity) for each of the two labels. Pixels with intensities above this threshold are considered to be above the background. A pixel is defined as having colocalization when the intensities of both labels are above their respective thresholds. The extent of colocalization was expressed by Pearson coefficient in pixels with colocalization. The Pearson coefficient is a number between +1 and -1, with

positive values indicating a direct correlation, negative values indicating an inverse correlation, and values near 0 indicating no correlation. In this case, the Pearson coefficient measures the correlation between the intensities of the two labels only in the pixels with colocalization. The following procedure was used to measure colocalization. A computer folder containing the stack of confocal sections for the two labels was generated by the Leica TCS-SP8 confocal microscope. This folder was opened with Imaris and converted into an Imaris file. A broad region of interest (ROI) was defined as all the pixels in which the intensity of one of the labels was above a pixel intensity defined in the 0–255 scale. Once the thresholds were set, the program outputs a canal of colocalization with channel statistics containing the Pearson coefficient. Then with the tool ‘spots detection’ on Imaris, the number of spots in each label (A, B and ‘coloc’ channel) was quantified to determine the percentage of colocalised granules. Spots statistics are automatically computed for each spot object. To each spot belongs a spatial position along the x- and y-axis, as well as the intensity of the point it represents. The spot object is available to model point-like structures in the data. It provides a procedure to automatically detect point-like structures, an editor to manually correct detection errors, a viewer to visualize the point-like structures as spheres, and statistics output. The rendering of the TGN surface was obtained using the Imaris ‘surface’ tool.

For the quantification of the number of CgA granules (Figs 2, 3, 5 and 6), the number of objects in the cytoplasm was counted automatically using the Imaris ‘spots’ function and a size filter (estimated xy diameter) of 0.5  $\mu\text{m}$ . For the quantification of F-actin in the Golgi region, the Golgi region was first outlined on the plane showing more GM130 staining; then F-actin was thresholded and the overlapping pixels between the two structures was calculated with the Imaris ‘coloc’ function. The distributions of GM130 and F-actin were analysed using post acquisition ‘line scan’ mode of the Leica Confocal Software. For the analysis of live cell images, each granule in the Golgi area was identified after background correction by ND-Safir software<sup>24</sup> (Inria Rennes). The mean velocity of detected granules was determined using the ImageJ “manual tracking” tool.

**Subcellular fractionation.** Cells were collected in PBS and sedimented by centrifugation at 400 g for 5 min at 4 °C. The cell pellet was disrupted by 5 pull/push through a 21- and then a 25-gauge needles attached to a syringe, in ice-cold buffer (0.32 M sucrose, 20 mM Tris-HCl, pH 8; 1 ml g<sup>-1</sup> of cells). The resulting lysate was centrifuged at 800 g for 30 min at 4 °C. Post-nuclear supernatants were centrifuged at 20,000 g for 20 min at 4 °C. Pellets containing dense core granules were centrifuged on a multi-step gradient of 1 to 2.2 M sucrose (1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2 and 2.2 M sucrose; 5 ml steps), at 100,000 g for 12 h at 4 °C. All gradient steps were collected from the top of the tube in 5 ml fractions, and analyzed by western blotting to check the granule-containing fractions and to verify their purity. The recovered granule fractions were used for liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry analysis.

**Proteomic analysis.** The fraction containing CgA granules purified from COS7-CgA cells was diluted in Buffer A (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl and Complete Inhibitors (Roche)). The sample was submitted to two freeze-thaw cycles, sonicated for 1 min in a cold water bath and centrifuged at 50,000 g for 1.5 h at 4 °C to separate soluble from insoluble material. In order to precipitate soluble proteins, the soluble fraction was diluted in 4 volumes of cold (–20 °C) acetone and incubated for 4 h at –20 °C before centrifugation at 13,000 g for protein precipitation. On the other hand, the pellet containing the insoluble material was carefully washed twice with cold buffer A and incubated in 200  $\mu\text{l}$  of Buffer A containing 1% n-dodecyl-beta-maltoside and 0.4% amidosulfobetaine-14 detergents in order to efficiently solubilize membrane proteins. After 2 h of incubation under soft agitation at 4 °C, the extract was centrifuged for 10 min at 13,000 g and the proteins contained in the supernatant were precipitated using standard chloroform/methanol method. Then, proteins were reduced, alkylated and separated by 1D- gel electrophoresis. Finally, proteins were cleaved in gel by trypsin and identified by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

**Statistical analysis.** Data were analyzed with the Prism program (GraphPad Software). All secretion experiments were repeated at least four times using the non-parametric Mann-Whitney U test. For the quantification of the number of CgA granules, statistical significance was determined by Student’s *t*-test with Welch’s correction or Mann-Whitney U test. Values are expressed as means  $\pm$  s.e.m., and the level of significance is designated in the figure legend as follows: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001.

## References

- Nyholm, T. K. M. Lipid-protein interplay and lateral organization in biomembranes. *Chem. Phys. Lipids* **189**, 48–55 (2015).
- Ha, K. D., Clarke, B. A. & Brown, W. J. Regulation of the Golgi complex by phospholipid remodeling enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 1078–1088 (2012).
- Frost, A., Unger, V. M. & De Camilli, P. The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. *Cell* **137**, 191–196 (2009).
- Rao, Y. & Haucke, V. Membrane shaping by the Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3983–3993 (2011).
- Miserey-Lenkei, S. *et al.* Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* **12**, 645–654 (2010).
- Almeida, C. G. *et al.* Myosin 1b promotes the formation of post-Golgi carriers by regulating actin assembly and membrane remodelling at the trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* **13**, 779–789 (2011).
- Gauthier, D. J., Sobota, J. A., Ferraro, E., Mains, R. E. & Lazure, C. Flow cytometry-assisted purification and proteomic analysis of the corticotropes dense-core secretory granules. *Proteomics* **8**, 3848–3861 (2008).
- Elias, S. *et al.* Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. *Endocrinology* **153**, 4444–4456 (2012).
- Bond, L. M., Peden, A. A., Kendrick-Jones, J., Sellers, J. R. & Buss, F. Myosin VI and its binding partner optineurin are involved in secretory vesicle fusion at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* **22**, 54–65 (2011).
- Komaba, S. & Coluccio, L. M. Localization of myosin 1b to actin protrusions requires phosphoinositide binding. *J. Biol. Chem.* **285**, 27686–27693 (2010).

11. Coudrier, E. & Almeida, C. G. Myosin 1 controls membrane shape by coupling F-Actin to membrane. *Bioarchitecture* **1**, 230–235 (2011).
12. Yamada, A. *et al.* Catch-bond behaviour facilitates membrane tubulation by non-processive myosin 1b. *Nat Commun* **5**, 3624 (2014).
13. Montero-Hadjadje, M. *et al.* Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides. *J. Biol. Chem.* **284**, 12420–12431 (2009).
14. Gondré-Lewis, M. C., Park, J. J. & Loh, Y. P. Cellular mechanisms for the biogenesis and transport of synaptic and dense-core vesicles. *Int Rev Cell Mol Biol* **299**, 27–115 (2012).
15. Majewski, L., Sobczak, M. & Redowicz, M. J. Myosin VI is associated with secretory granules and is present in the nucleus in adrenal medulla chromaffin cells. *Acta Biochim. Pol.* **57**, 109–114 (2010).
16. Tomatis, V. M. *et al.* Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin. *J. Cell Biol.* **200**, 301–320 (2013).
17. Sahlender, D. A. *et al.* Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J. Cell Biol.* **169**, 285–295 (2005).
18. Meunier, F. A. & Gutiérrez, L. M. Captivating New Roles of F-Actin Cortex in Exocytosis and Bulk Endocytosis in Neurosecretory Cells. *Trends Neurosci.* **39**, 605–613 (2016).
19. Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., Way, M. & Bader, M.-F. Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol. Biol. Cell* **15**, 520–531 (2004).
20. Wen, P. J. *et al.* Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate coordinates actin-mediated mobilization and translocation of secretory vesicles to the plasma membrane of chromaffin cells. *Nat Commun* **2**, 491 (2011).
21. Holst, B. *et al.* PICK1 deficiency impairs secretory vesicle biogenesis and leads to growth retardation and decreased glucose tolerance. *PLoS Biol.* **11**, e1001542 (2013).
22. Gehart, H. *et al.* The BAR domain protein Arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network. *Dev. Cell* **23**, 756–768 (2012).
23. Montero-Hadjadje, M. *et al.* Localization and characterization of evolutionarily conserved chromogranin A-derived peptides in the rat and human pituitary and adrenal glands. *Cell Tissue Res.* **310**, 223–236 (2002).
24. Boulanger, J. *et al.* Patch-based nonlocal functional for denoising fluorescence microscopy image sequences. *IEEE Trans Med Imaging* **29**, 442–454 (2010).
25. Egea, G., Lázaro-Díéguez, F. & Vilella, M. Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 168–178 (2006).
26. Heimann, K., Percival, J. M., Weinberger, R., Gunning, P. & Stow, J. L. Specific isoforms of actin-binding proteins on distinct populations of Golgi-derived vesicles. *J. Biol. Chem.* **274**, 10743–10750 (1999).
27. von Blume, J. *et al.* Actin remodeling by ADF/cofilin is required for cargo sorting at the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* **187**, 1055–1069 (2009).
28. Camera, P. *et al.* Citron-N is a neuronal Rho-associated protein involved in Golgi organization through actin cytoskeleton regulation. *Nat. Cell Biol.* **5**, 1071–1078 (2003).
29. Mota, L. J., Ramsden, A. E., Liu, M., Castle, J. D. & Holden, D. W. SCAMP3 is a component of the Salmonella-induced tubular network and reveals an interaction between bacterial effectors and post-Golgi trafficking. *Cell. Microbiol.* **11**, 1236–1253 (2009).

## Acknowledgements

Proteomic studies were performed on the Proteomics Platform PISSARO (plateau-proteomique.crihan.fr), IRIB, Faculty of Sciences, University of Rouen Normandy, 76821 Mont-Saint-Aignan, France, and in the Department of Medical Sciences of UCLM, Ciudad Real, Spain. Confocal microscopy images were obtained in PRIMACEN (<http://www.primacen.fr>), the Cell Imaging Platform of Normandy, IRIB, Faculty of Sciences, University of Rouen Normandy, 76821 Mont-Saint-Aignan. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the University of Rouen Normandy, the Conseil Régional de Normandie and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## Author Contributions

C. Delestre-Delacour and O. Carmon performed and analyzed most of the experiments. F. Laguerre helped to analyze images from live imaging experiments. C. Estay-Ahumada performed biochemical studies on PC12 cells. M. Courel helped with the optimization of siRNA experiments and secretion studies. S. Elias developed the COS7 cell line stably expressing CgA. L. Jeandel helped with the optimization of cell culture and transfection experiments. M. Villar Rayo and J.R. Peinado performed part of proteomic studies and analyzed the related MS experiments. L. Sengmanivong performed image acquisitions on spinning disc-equipped confocal microscope. E. Coudrier and S. Gasman contributed with intellectual input and discussion. Y. Anouar and M. Montero-Hadjadje conceived and designed the experiments, and wrote the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-05617-1

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

## RESULTATS : Article 2

---

### **L'interaction entre la chromogranine A et l'acide phosphatidique contribue à la biogenèse des granules de sécrétion**

*Article en préparation qui sera soumis dans Embo Journal*

Dans l'article précédent nous avons démontré l'implication du complexe actomyosine dans le bourgeonnement de GS contenant la CgA à partir du TGN. Dans le présent article, nous avons montré en utilisant des membranes de nitrocellulose sur lesquelles sont adsorbés les principaux lipides membranaires que la CgA est capable d'interagir avec l'acide phosphatidique (PA). Une analyse lipidomique par LC-MS/MS nous a permis de caractériser plus précisément deux espèces de PA majoritaires (PA 36 :1 et PA 40 :6) dans les membranes granulaire et golgienne. En utilisant des modèles de liposomes, nous avons pu montrer que la CgA est capable d'interagir spécifiquement avec ces espèces de PA et d'entraîner des déformations membranaires. La comparaison de la séquence de la CgA avec celles des protéines liant le PA a permis de prédire la présence d'un domaine de liaison au PA dans le motif hélicoïdal en C-terminal (hCgA352-381), et nous avons démontré que ce fragment présente une affinité de liaison pour le PA (36:1). En outre, nous avons démontré que l'inhibition de l'activité PLD1 en utilisant des approches pharmacologiques et d'invalidation de gène altère de manière significative le nombre de GS et la sécrétion régulée dans les cellules neuroendocrines.

Objectifs :

- ✓ La CgA est-elle capable d'interagir avec des lipides membranaires ?
- ✓ L'interaction entre la CgA et le PA permet-elle un remaniement et/ou une déformation membranaire ?
- ✓ La CgA possède-t-elle dans sa séquence une zone d'interaction spécifique avec le PA ?
- ✓ L'inhibition de l'expression du PA a-t-elle un impact sur la formation des GS et sur la sécrétion régulée ?





## Chromogranin A - phosphatidic acid interaction contributes to secretory granule biogenesis

### ABSTRACT

Chromogranin A (CgA) is a soluble glycoprotein that has been proposed to mediate the biogenesis of secretory granules at the level of the *trans*-Golgi Network (TGN). Previous studies have shown that PA controls the regulated secretory pathway. Using a lipid overlay assay, we show that CgA interacts with phosphatidic acid (PA). By LC-MS/MS, we characterize PA (36:1) and PA (40:6) as predominant PA species in the Golgi apparatus and secretory granule membranes of secretory cells, and using liposome and GUV models, we demonstrate that CgA interacts with these identified PA species and is able to induce membrane deformation of PA (36:1)- and PA (40:6)-enriched GUVs. Comparison of CgA sequence with those of PA-binding proteins predicted the presence of a PA-binding domain in the C-terminal helical motif (CgA<sub>352-381</sub>), which is indeed able to bind PA (36:1)-enriched liposomes. Furthermore, we demonstrate that depletion of PLD1 activity using pharmacological and gene silencing approaches significantly alter the number of secretory granules and regulated secretion in secretory cells. These results suggest that CgA controls secretory granule biogenesis by directly interacting with PA at the TGN to induce membrane remodeling and curvature necessary for secretory granule budding.

Key words: chromograninA/phosphatidic acid/TGN membrane/organelle biogenesis/hormone secretion

## INTRODUCTION

Secretory granules are vesicular and membrane surrounded organelles which constitute the regulated secretory pathway in secretory cells, allowing hormone release in endocrine cells as an example. Secretory granules are formed by budding from the *trans*-Golgi network (TGN) membrane. It is well established that molecular remodeling at this level is an important process for secretory granule budding (Tanguy *et al*, 2016), but the identity of molecular actors, the chronology of their intervention and their mechanisms of action are not fully elucidated. In addition to important protein players, TGN membrane is composed of a broad spectrum of lipids with specific properties that profoundly define its identity and function (Holthuis & Menon 2014). Membrane proteins influence lipid organization, and conversely protein function and clustering are under the control of lipids, leading to the formation of TGN membrane microdomains that have been predicted to regulate the function and clustering of proteins involved in the budding of secretory granules (Surma *et al*, 2012). As an example, the regulated production and organization of sphingomyelin, which assembles with cholesterol to generate microdomains in the membranes, has been demonstrated to be crucial to the biogenesis of transport carriers at the Golgi membranes (Duran *et al*, 2012). Besides the TGN membrane components, luminal and cytosolic molecular components also influence membrane organization. Among the luminal components, chromogranin A (CgA) is a soluble glycoprotein known as a key actor of the RSP involved in hormone aggregation and the biogenesis of secretory granules (Kim *et al*, 2001; Carmon *et al*, 2017). In previous studies, we have shown that CgA can induce the formation of secretory granule-like structures in a model of non-endocrine cells, confirming its important role in granulogenesis (Montero-Hadjadje *et al*, 2009; Elias *et al*, 2012). However, the mechanism of action of CgA at the level of the TGN membrane that leads to the formation of secretory granules is still unknown. The first indication for a role

of CgA at the TGN level is relative to the acidic nature of the protein that confers the ability to aggregate with neuropeptides in the TGN lumen (Chanat & Huttner 1991). Besides these soluble aggregates, a fraction of CgA was found to be tightly associated with the membrane of secretory granules via its N-terminal region (Kang & Yoo 1997), suggesting that CgA/hormone aggregates might interact with TGN membrane. *In vitro* and *in vivo* studies revealed that depletion of cholesterol altered secretory granule biogenesis (Dhanvantari & Loh 2000; Gondre-Lewis *et al*, 2006). Moreover, cholesterol has been shown to interact notably with secretogranin III (SgIII) (Hosaka *et al*, 2005). In PC12, AtT20, and pancreatic  $\beta$  cells, SgIII has been shown to interact with CgA, which therefore targets CgA aggregates to the RSP (Hosaka *et al*, 2002, 2004). However, the CgA domain of interaction with SgIII (CgA<sub>41-109</sub>) is not fully conserved through evolution and SgIII is not expressed in all cell types, indicating that various mechanisms of hormone sorting mediated by CgA remain to be elucidated. In a previous study, we showed that CgA controls the biogenesis of secretory granules and CgA sorting to the Golgi apparatus through its conserved N and/or C-terminal regions (Montero-Hadjadje *et al*, 2009). Interestingly, these regions exhibit a conserved  $\alpha$ -helix motif, suggesting a potential interaction with membranes (Elias *et al*, 2010). Supporting this hypothesis, CgA-derived peptides with such helical conformation have been demonstrated to interact with membrane lipids. Thus, the conserved N-terminal peptide vasostatin I (hCgA<sub>1-76</sub>) interacts with phosphatidylserine in monolayers of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine as analyzed by Langmuir film balance apparatus (Blois *et al*, 2006), and catestatin (hCgA<sub>352-372</sub>) binds to phosphatidylcholine in dodecylphosphocholine micelles analyzed by circular dichroism and NMR spectroscopy (Sugawara *et al*, 2010). As it is now well established that membrane lipid properties define organelle identity and function, we hypothesised that an interaction between CgA and certain lipid(s) of the TGN membrane could facilitate the formation of functional secretory granules. In the present study, we first show that recombinant

CgA can interact notably with the membrane lipids phosphatidic acid (PA) and phosphoinositides adsorbed on a nitrocellulose sheet. Since PA has been shown to control the RSP (Siddhanta & Shields 1998, Zeniou-Meyer *et al*, 2007), we focused our attention on this phospholipid. After secretory granule and Golgi membrane purification from endocrine cells, we identified several common PA species and demonstrated that CgA from cell extracts specifically interacts with these PA species when included in liposomes. Moreover, using giant unilamellar vesicles enriched with these PA species, we observed that CgA induces membrane deformation. Furthermore, as Golgi PA is predominantly generated from phosphatidylcholine hydrolysis by PLD1 (Freyberg *et al*, 2001, 2003) and that PLD1 is an important component of the regulated secretory pathway (Chen *et al*, 1997; Siddhanta *et al*, 2000; Vitale *et al*, 2001), we demonstrated that PA depletion, through pharmacological inhibition of PLD1 as well as PLD1 gene silencing, altered secretory granule formation and regulated secretion in endocrine cells.

## Results

### Chromogranin A interacts with PA and phosphoinositides

Due to the presence of two helicoidal motives in its N- and C-terminal conserved regions (Fig. 1A) (Elias *et al*, 2010), we first analyzed the capacity of CgA to interact with membrane lipids. A lipid overlay assay was performed by incubating recombinant CgA on a nitrocellulose sheet where different membrane lipids were adsorbed. Using an antibody raised against CgA, this overlay assay revealed that CgA interacts with phosphatidic acid (PA) and phosphoinositides (PIP, PIP<sub>2</sub> and PIP<sub>3</sub>) (Fig. 1B). Quantification of the CgA-lipid interaction signals from three independent experiments showed that CgA preferentially interacts with PA (Fig. 1C).

## Predominant PA species are common in Golgi and secretory granule membranes from CgA-expressing cells

As a first approach to demonstrate the implication of PA/CgA interaction in the biogenesis of secretory granules, we analyzed and compared the PA composition of Golgi and secretory granule membranes from neuroendocrine PC12 cells and from COS7-CgA cells, a simplified model consisting of COS7 cells expressing CgA which has been shown to induce CgA-containing secretory granule like structures (Delestre-Delacour *et al*, 2017; Elias *et al*, 2012; Montero-Hadjadje *et al*, 2009). Secretory granule membranes were purified using a protocol of subcellular fractionation described in a previous study (Elias *et al*, 2012) and Golgi membranes were purified by sucrose gradient centrifugation. Purified membranes were collected in 1.4 M sucrose fraction for secretory granules and 2.0 M sucrose fraction for Golgi (Fig. 2A), and their PA composition was analyzed by LC-MS/MS. This study revealed the enrichment of total PA in secretory granule membrane compared to Golgi membrane (Fig. 2B). Furthermore, detailed lipidomics analysis revealed the predominance of some specific PA species in COS7-CgA cells, *i.e.* PA (36:1), PA (38:2), PA (38:6) and PA (40:6) (Fig. 2C). Then, we compared the Golgi membrane of COS7-WT and COS7-CgA cells to examine the potential effect of CgA expression on the PA content. We observed that they exhibit the same predominant PA species, *i.e.* PA (36:1), PA (38:2) and PA (40:6) (Fig. 3A). We also compared the presence of PA species between secretory granules from COS7-CgA and neuroendocrine PC12 cells, which revealed the presence of the same PA species, *i.e.* PA (36:1), PA (38:2) and PA (40:6) (Fig. 3B). Together, these results suggest that a recruitment of PA at the Golgi membrane of CgA-expressing cells occurs for the biogenesis of secretory granules and that some predominant PA species have a key role in this process.

## **Chromogranin A interacts with predominant PA species identified in Golgi and secretory granule membranes and provokes membrane deformation of GUVs enriched with these PA species**

We used a liposome flotation assay to test the interaction between CgA from COS7-CgA cell extracts and the predominant identified PA species. We incubated COS7-CgA cell extracts with liposomes of different lipid composition and we separated the interacting protein using multi-step gradient sucrose (Fig. 4A). Following the flotation assay, the different fractions were analyzed by western blotting and for the presence of CgA using a specific antibody (Montero-Hadjadje *et al*, 2002). This analysis revealed a specific interaction between CgA and PIP<sub>2</sub>-enriched liposomes, and between CgA and liposomes enriched with some PA species identified by previous lipidomics analysis, *i.e.* PA (36:1), PA (36:2) and PA (40:6) (Fig. 4B), but not with liposomes enriched with PC, PS, or PA (36:0), in accordance with the previous results obtained using lipid strips (Fig. 1B,C). These results demonstrate that endogenous CgA interacts specifically with predominant PA species identified in Golgi and secretory granule membranes from CgA-expressing cells. To examine the membrane dynamics following the interaction between CgA and PA, we developed a model of giant unilamellar vesicles (GUVs) enriched in PA, whose formation is assisted by PVA gel. We incubated PA-enriched GUVs containing a fluorescent lipid with CgA, and we analyzed their morphology using confocal microscopy. The formed GUVs exhibited a diameter ranging between 5 and 50  $\mu\text{m}$ . After image acquisitions during 1min, we observed that the fluorescence is homogeneously distributed around GUVs and that only a few budding events occurred in control condition (Fig. 4C,D). However, in the presence of 2  $\mu\text{M}$  CgA, a marked fluorescence concentration in a limited membrane domain of several GUVs was observed just before a budding event and the resulting small vesicle formation (Fig. 4C,D). Thus, addition of CgA to PA-enriched GUVs provoked a significant increase in the number of budding events.

**CgA sequence exhibits a putative PABD within a helicoidal motif**

Analysis of the C-terminal helix residues of CgA revealed positively charged and hydrophobic amino acids that could contribute to PA binding (Fig. 5A). Bioinformatics predicted that this CgA region adopts an amphipathic helix conformation with five charged residues (arginine) sequestered in one side of the helix, whereas the other side of the helix is enriched with three hydrophobic residues (tryptophane, phenylalanine, leucine) (Fig. 5B). Interestingly, the model of CgA-PABD confirmed that this domain displays an alpha helix when its structure was examined using MacPyMol software (shown as a ribbon, Fig. 5C).

In an attempt to characterize this putative PABD of CgA, we prepared GST fusion proteins containing the C-terminal helicoidal motif of CgA: fragments 352-381, 352-372 and 373-381. To monitor PA binding of the three GST-CgA fragments in a lipid environment, we used a semi-quantitative *in vitro* assay using NBD-labeled liposomes (Kassas *et al*, 2017). The binding of fluorescent liposomes (5% PE-NBD, 85% PC, 10% PA (36:1)) to GST-CgA fragments linked to GSH-Sepharose beads was monitored by fluorimetry. When comparing PA binding to the three CgA fragments, it appeared that fragment 352-381 is by far the most potent PA sensor (Fig. 5D). The binding of the PA-containing liposomes was greatly reduced using the fragment 352-372 corresponding to catestatin peptide and was almost abolished using the fragment 373-381. These data indicate that the whole sequence corresponding to the putative PABD is involved in the CgA/PA interaction.



## **Inhibition of PLD-mediated PA synthesis alters the biogenesis of secretory granules, CgA sorting and secretion**

To demonstrate the implication of Golgi PA in the biogenesis of secretory granules, we altered PLD-mediated PA synthesis since Golgi PA is predominantly generated from phosphatidylcholine hydrolysis by PLD1 (Freyberg *et al*, 2001, 2003). When we treated WT COS7 and COS7-CgA cells with the an inhibitor of the PLD pathway called FIPI (5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide), we observed, using confocal microscopy coupled to IF, that while no effect was observed on the cell morphology (Fig. 6A,B), there is a significant reduction of the number of CgA-containing granules in COS7-CgA cells (Fig. 6B,C). When we treated PC12 cells in the same conditions, we also observed a trend toward a reduction of the number of CgA-containing granules (Fig. 7A,B) although the difference was not significant. Interestingly, in mice lacking PLD1 gene, we observed by electron microscopy a significant reduction of the number of secretory granules as well as an apparent granule deformation in chromaffin cells (Fig. 7 C,D). Since PLD1 is the predominant PLD isoform found at the Golgi level (Freyberg *et al*, 2001, 2003), these results reinforce the notion that Golgi membrane PA is involved in secretory granule biogenesis.

Given the impact of the inhibition of PLD-mediated PA synthesis on secretory granule biogenesis, we investigated the effect of this inhibition on the secretory competence of COS7-CgA (Fig. 8A) and PC12 (Fig. 8B) cells using ionomycin-stimulated CgA release as an index of the regulated secretory pathway. This analysis revealed that PLD inhibition leads to an increase in basal release of CgA in both cell models (Fig 8A,B), without affecting CgA expression in COS7-CgA (Fig. 8C) and PC12 (Fig. 8D) cells nor that of SgII and CgB in PC12 cells (Fig. 8D). These results suggest that PA is essential for CgA sorting within the regulated secretory pathway.

## DISCUSSION

Although many efforts have been deployed to identify the molecular mechanism at the origin of secretory granule formation, many aspects of this process remain to be elucidated. The biogenesis of secretory granules depends on TGN membrane dynamics that rely on interactions of cytosolic proteins with molecular components of the TGN membrane, such as microtubule-associated motor proteins and actin-based motors which are key factors in membrane deformation leading to the budding of post-Golgi carriers (Yamada *et al*, 2014). The TGN soluble protein, SgIII, has also been shown to interact with membrane cholesterol to control secretory granule biogenesis (Hosaka *et al*, 2005), but this chromogranin family member is not ubiquitously expressed in neuroendocrine cells.

Here, we report the ability of the heliocidal soluble glycoprotein CgA to bind PA and phosphoinositides first by using a lipid-overlay assay. Since PA is crucial for the biogenesis of secretory granules (Siddhanta & Shields 1998), we analyzed the PA composition of Golgi and secretory granule membranes from COS7-CgA and PC12 cells by mass spectrometry, and we observed a PA enrichment in the secretory granule membrane, further indicating that PA is involved in the biogenesis of CgA-containing secretory granules. Moreover, this analysis revealed the predominance of several common PA species, including mono- and poly-unsaturated forms, *i.e.* PA (36:1), PA (38:2) and PA (40:6). Using liposome models enriched with distinct phospholipids including these PA species, we observed that CgA preferentially interacts with PA (36:1) and PA (40:6), and that CgA is able to provoke membrane deformation of PA (36:1) or PA (40:6) enriched artificial membranes. These results confirm the binding ability of CgA to PA and support of the idea that CgA/PA (36:1) or PA (40:6) interaction play a key role in

the membrane deformation process necessary for SG budding. To characterize the PABD of CgA, we compared the CgA helicoidal motifs with those of other proteins with PABD, notably the phosphodiesterase PDE4A1 which is known to bind Golgi PA (Kassas *et al*, 2017). This analysis led to the prediction of a PABD in the C-terminal helicoidal region of CgA, CgA<sub>364-381</sub>, which includes the C-terminal sequence of catestatin (CgA<sub>352-372</sub>). Using PA-enriched liposomes, we observed that the CgA<sub>352-381</sub> sequence binds to PA (36:1), at a similar level to that of PDE4A1 in the same experimental conditions (Kassas *et al*, 2017), in contrast to CgA<sub>352-372</sub> corresponding to catestatin which exhibited a weak interaction. The CgA-PABD could allow hydrophobic residue insertion into lipid bilayers and direct ionic interaction between basic residues and several molecules of PA. These data suggest that CgA may participate to TGN remodeling by interacting with predominant PA species. This interaction could induce the formation of PA-enriched microdomains. The accumulation of PA which exhibits a conical shape enables membrane bending (Kooijman *et al*, 2003) that could be at the origin of TGN membrane curvature and consequent secretory granule budding. Since the major source of Golgi PA is the conversion of PC by the enzymatic activity of PLD, we decided to interfere with the PA synthesis pathway within neuroendocrine cells using two strategies. First, we used pharmacological inhibition of PA synthesis in COS7-CgA and PC12 cells which provoked an impairment of secretory granule biogenesis. Besides, since PLD1 isoform is predominant in the Golgi apparatus (Freyberg *et al*, 2001, 2003), we analyzed and compared the subcellular morphology of chromaffin cells from WT and PLD1-lacking mice, which also revealed a significant decrease of SG number. Interestingly, this reduction in SG could be associated to an alteration in the shape of these organelles, as also observed previously in chromaffin cells from CgA KO mice (Pasqua *et al*, 2016), suggesting that PLD1 depletion phenocopies CgA deficiency regarding the impact on secretory granule biogenesis. These observations strongly suggest that CgA and PA are two complementary molecular actors involved in the formation

of secretory granules in neuroendocrine cells. Associated to this structural alteration, we observed that the inhibition of PLD-mediated PA synthesis increases basal release of CgA in COS7-CgA and PC12 cells, indicating that PLD-derived PA is essential for CgA sorting through the regulated secretory pathway.

Altogether, our data yielded a comprehensive view of the secretory granule biogenesis in neuroendocrine cells. We propose that CgA binds to TGN PA to provoke membrane remodeling and curvature to initiate secretory granule budding, concomitantly or prior to the recruitment of other cytosolic proteins such as the acto-myosin 1b complex (Delestre-Delacour *et al*, 2017) or arfaptins (Cruz-Garcia *et al*, 2013). Future studies are needed to confirm CgA/PA interaction in relation with microdomain formation and secretory granule biogenesis using super-resolution techniques that would allow the observation and the analysis of these processes at the level of the TGN membrane in living neuroendocrine cells.

## Materials and Methods

### Cell culture

African green monkey kidney fibroblast-derived COS-7 cells (American Type Culture Collection ; CRL 1651) stably expressing CgA developed previously (Elias *et al*, 2012) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma - Aldrich), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific), and 300 µg/ml geneticin (G-418 sulfate, Life Technologies, Inc, UK) to maintain gene resistance selection, at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Rat pheochromocytoma PC12 cells (American Type Culture Collection ; CRL 1721) were routinely grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 5% sterile-filtered fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 10% sterile-filtered HyClone Donor Equine serum (GE Healthcare, Life Sciences), 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin and 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 1% L-glutamine (Gibco, Thermo Fisher Scientific), at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Most experiments with PC12 cells were performed on cells plated onto 10 µg ml<sup>-1</sup> poly-D-lysine (Sigma - Aldrich) coated 15-mm round glass coverslips in 24-well plates.

### Animals

Pld1<sup>-/-</sup> mice have been described previously and were housed and raised at Chronobiotron UMS 3415 (Ammar *et al*, 2015). All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24th November 1986 (86/609/EEC) and resulting French regulations. Accordingly, all experimental protocols were approved by the CREMEAS local ethical committee. Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

## Proteins and antibodies

Recombinant CgA (human chromogranin A 19-457aa, His tag, E.coli, ATGP0323, Atgen global) was used for lipid strip and GUVs experiments.

Primary antibodies used were goat polyclonal anti-CgA (Santa-Cruz Biotechnology inc.; sc-23556) (1:200), rabbit polyclonal anti-CgA (WE-14; Montero-Hadjadje *et al*, 2002) (1:1,000), rabbit polyclonal anti-CgA (RV31.4; Montero-Hadjadje *et al*, 2009) (1:1,000), rabbit polyclonal anti-SgII (EM66; Anouar *et al*, 1998) (1:1,000), goat polyclonal anti-CgB (Santa-Cruz Biotechnology inc.; sc-1489) (1:1,000), mouse monoclonal anti-GM130 (BDBiosciences) (1:1,000), mouse monoclonal anti-CALR (Sigma-Aldrich, clone 1G11-1A9) (1:1,000), mouse monoclonal anti-GLUD1 (Sigma-Aldrich; clone 3C2) (1:500), rabbit monoclonal anti-ZO-3 (Cell signaling; D57G7) (1:1,000), mouse monoclonal anti-PCNA (Santa-Cruz Biotechnology; sc-25280) (1:500), mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich; T5168) (1:5,000). For IF, secondary antibodies used were Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG; Alexa 594-conjugated donkey anti-mouse IgG (Invitrogen) (1:500). For Western blotting, anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Thermo Fisher Scientific) (1:5,000) were used.

## Protein-lipid binding assay

Membrane lipid strips (P-6002, Echelon Biosciences) were saturated in PBS-T buffer (0,1% v/v Tween 20 in PBS) supplemented with 3% fatty acid-free BSA for 1 h at room temperature, and then incubated with 500 ng/ml recombinant human purified CgA diluted in this buffer for an additional h at room temperature. After several washes with PBS-T, the membranes were incubated with anti-WE-14 antibody (1:1,000) 1 h at RT in the saturation buffer. After washing with PBS-T, membranes were incubated with a secondary antibody coupled to horseradish

peroxydase (Thermo Fisher Scientific) and visualized by enhanced chemiluminescence. Densitometric analysis was performed to determine the relative affinity of CgA binding to various phospholipids.

## **Liposome and giant Unilamellar vesicle formation**

### *Liposome flotation and binding assays*

Lipids solubilized in chloroform were purchased from Avanti Polar Lipids. Liposome mixtures were prepared in mass ratios composed of 90% DOPC, 5% PE-NBD, and 5% PS, PI(4,5)P<sub>2</sub>, PA mix or PA species (36 :1, 36 :2, 40 :6 or 36 :0). Lipids were dried in a stream of nitrogen and kept under vacuum for at least 2 h. Dried lipids were then suspended in liposome-binding buffer (LBB: 20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) by three freeze and thaw cycles and were extruded using a Mini-Extruder (Avanti) through polycarbonate track-etched membrane filters to produce liposomes of 200 nm in diameter. The liposomes were then diluted (1:10) and incubated with 30 µg of COS7-CgA extract during 20 min. Then samples were centrifuged at 200,000 g (1 h at 4°C) on a multi-step gradient sucrose. To determine the association of CgA with liposomes, the fractions were collected after centrifugation, and the presence of CgA was revealed using western blot analysis of the different fractions.

To quantify liposome binding to GST-CgA-PABD linked to GSH-Sepharose beads, GST and GST-PABD constructs (330 pmol) bound to GSH beads were washed once with 1 ml of LBB medium before incubation for 20 min in the dark at room temperature and under agitation with liposomes containing a 10-fold molar excess of PA relative to the quantity of GST proteins in a final volume of 200 µl of LBB. Beads were washed three times with 1 ml of ice-cold LBB and collected by centrifugation at 3000 rpm for 5 min. Liposome binding to the PABD was estimated by measuring the fluorescence at 535 nm with a Mithras fluorimeter (Berthold). Triplicate measurements were performed for each condition. Fluorescence measured with GST

linked to GSH-Sepharose beads alone was between 3 and 4 A.U. and was subtracted from sample measurements.

#### *Giant unilamellar vesicle preparation*

DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), PA (36:1) (1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphate), PA (40:6) (1-stearoyl-2-docosahexaenoyl-*sn*-glycero-3-phosphate) and PE-NBD (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) and used without further purification. Giant unilamellar vesicles (GUVs) were prepared by polyvinyl acetate (PVA, MW 145000, purchased from VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) – assisted swelling. Briefly, Teflon plate was cleaned twice with 99% ethanol. A 5% (w/w) solution of PVA was prepared by stirring PVA in water while heating at 90 °C. PVA-coated substrates were prepared by spreading 100–300 µl of PVA solution on a clean Teflon plate, and dried for 30 min at 80°C. 10–20 µl of lipid mixture (96% of DOPC, 4% of PA (36:1) or (40:6) and 1% of PE-NBD) dissolved in chloroform (1 mg/ml) was spread on the dried PVA film and placed under vacuum over-night at room temperature to evaporate the solvent. A chamber around the drops of lipids was formed with Vitrex and filled with 100 mM sucrose and 150 mM NaCl solution during 3 h at room temperature, allowing the formation of GUVs with a suitable size. Next, the buffer containing GUVs is recovered using a rib with a wide tip to not destroy the GUVs, and deposited in LabTek wells (LabTek I non-separable, on glass coverslip, 4 culture chambers, Nunc), which were previously coated with a 1 mg/ml BSA solution. To allow the sedimentation of GUVs, we added the same volume (100 µl) of a solution containing 90 mM glucose and 15 mM NaCl in LabTek wells. The sedimentation of the GUVs takes place for about 1 h at room temperature.



To test the effect of CgA on the GUV membranes, we added CgA in GUV-containing Labtek wells at a final concentration of 2  $\mu\text{M}$  just before the beginning of confocal microscopy acquisitions.

### Secretion analysis

COS7 cells stably expressing CgA and PC12 cells were cultured in 6-well plates, extensively washed with PBS and subsequently incubated in control secretion buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.4) (basal release of CgA) or in ionomycin secretion buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\mu\text{M}$  ionomycin 10 mM HEPES, pH 7.4) (stimulated release of CgA) for 15 min, at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$ . Secretion media were collected, cleared by centrifugation (5 min, 4,000 rpm, 4°C), extracted by 10% trichloroacetic acid and stored in Laemmli buffer for further analysis. Cells were lysed in NP40 cell lysis buffer (Sigma - Aldrich) containing protease inhibitor cocktail (Roche), and centrifuged (15 min, 14,000 rpm, 4°C). Then, proteins from the supernatant were denatured in Laemmli buffer. Secretion media and cell homogenates were analyzed by Western blotting.

### Immunofluorescence labelling

COS7-CgA and PC12 cells were cultured in 24-well plates (Costar® 24 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plates, Corning), onto coated glass coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma – Aldrich) in PBS at room temperature for 15 min. Cells were permeabilized and blocked for 30 min with 0.3% Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific), in PBS containing 5% normal donkey serum (Sigma – Aldrich) (1:50) and 1% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma – Aldrich)). Cells were then incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies, and, after washing with PBS, for 1 h with secondary antibodies. Nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, Molecular probes #D3571, 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$

<sup>1</sup>). To verify the specificity of the immunoreactions, the primary or secondary antibodies were substituted with PBS.

### **Protein electrophoresis and Western blotting**

Cells were harvested by scraping, homogenized, and proteins were separated by SDS-PAGE followed by Western blotting. Membranes were incubated in a blocking buffer containing 5% non-fat dry milk in phosphate-buffered saline containing 0.5% Tween 20 (Sigma - Aldrich) (PBS-T) for 1 h at room temperature, and overnight with primary antibodies at 4°C. Then, membranes were washed for 45 min with PBS-T. Blots were subsequently incubated for 1 h with appropriate HRP (Horse Radish Peroxidase)-conjugated secondary antibody (Thermo Fisher Scientific) in blocking buffer. Membranes were washed for 45 min with PBS-T. Immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence (BioRad Biotechnology). Quantification was performed using Image Lab software (5.0 build 18, 2013 version, Bio-Rad Laboratories). The mean intensity of each individual band of interest was calculated after background value subtraction. For secretion studies, values of released CgA in the medium were normalized to those of total CgA (medium + cell content).

### **Image acquisition**

For GUVs experiments, real-time videomicroscopy was carried out with an inverse confocal microscope TCS-SP5 AOBS (*Acousto-Optical Beam Splitter*), equipped with pulsed white light laser (WLL) and with a 63X oil immersion objective (Leica Microsystems). PE-NBD was excited at 463 nm and observed in a 510-550 nm window. Images were acquired at a speed of one frame per 2 s during 1 min.

For immunocytochemistry experiments, confocal microscopy was carried out with a TCS-SP8 upright confocal laser scanning microscope equipped with 63X oil immersion objective

(NA=1.4; Leica, Microsystems). Alexa 488 and GFP were excited at 488 nm and observed in a 505–540 nm window. Alexa 594 was excited at 594 nm and observed in a 600–630nm window. For dual color acquisition, images were sequentially acquired in line scan mode (average line = 2). Overlays were performed with post acquisition Leica Confocal Software functions to obtain the presented snapshots.

### **Subcellular fractionation**

Cells were collected in PBS and sedimented by centrifugation at 400 g for 5 min at 4°C. The cell pellet was disrupted by 5 pulls/pushes through a 21- and then a 25-gauge needle attached to a syringe, in ice-cold buffer (0.32 M sucrose, 20 mM Tris-HCl, pH 8; 1 ml g<sup>-1</sup> of cells). The resulting lysate was centrifuged at 800 g for 30 min at 4°C.

#### *Golgi membrane purification*

Pellets containing Golgi membranes were suspended in 1.4 M sucrose. The homogenate was deposited on a succession of 2 ml 1.6, 1.8, 2.0 and 2.2 M sucrose cushions and then covered with 2 ml 1.2 and 1 M sucrose cushions and 10 ml 0.32 M sucrose cushion, all sucrose cushions containing 10 mM Tris-Hcl at pH 7.4. The extracts were then centrifuged at 10,000 g for 18 h at 4 ° C. The different fractions were collected in hemolysis tubes and kept at -20°C. An aliquot of each fraction was used for the localization of Golgi apparatus by Western blot using specific plasma membrane, Golgi, nucleus, mitochondria and endoplasmic reticulum antibodies.

#### *Secretory granule purification*

Post-nuclear supernatants were centrifuged at 20,000 g for 20 min at 4°C. Pellets containing dense core granules were centrifuged on a multi-step gradient of 1 to 2.2 M sucrose (1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2 and 2.2 M sucrose; 5 ml steps), at 100,000 g for 12 h at 4°C. All gradient steps were

collected from the top of the tube in 5 ml fractions, and analyzed by western blotting to check the granule-containing fractions and to verify their purity. The recovered granule fractions were used for liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry analysis.

### Lipidomic analysis

Total lipids from cell samples were extracted by the method of Bligh and Dyer (1959). Extracts were mixed with chloroform/methanol (4:1), vortexed for 10 s, and left under agitation for 1 h at 4 °C. After a 5-min centrifugation at 13,000 rpm, the organic phase (150 µl) was recovered and analyzed by mass spectrometry (UPLC/MS/MS) on an Acquity UPLC system (Waters) coupled to a Quattro Premier XE triple quadrupole MS system (Waters Micromass). The sample (3 µl) was injected into an Acquity UPLC BEH HILIC Amide pre-column (2.1 × 5 mm, 1.7-µm particle size), coupled to a Waters Acquity UPLC BEH Amide column (2.1 × 100 mm, 1.7-µm particle size) and maintained at 28 °C. The column was eluted with a mixture of 99.5% acetonitrile, 0.5% ammonium hydroxide (A) and 80% acetonitrile, 19.5% water, 0.5% ammonium hydroxide (B). The flow rate was 0.4 ml·min<sup>-1</sup> using the following elution protocol: 93% A for 2 min, followed by the gradient, 93 to 60% A in 1 min, 60 to 50% A in 0.5 min, and 50 to 40% A in 1.5 min. The composition of the mobile phase was then returned to initial conditions as follows: 40–50% A in 2 min, 50–80% A in 2.5 min, 80–93% A in 0.5 min and maintained in 93% A for 2 min. UV spectra were recorded from 200 to 500 nm. The system was run by Mass-Lynx software (version 4.0). The ESI source was used in positive and negative mode with a capillary voltage of 3.4 kV; RF lens was at 0 V; resolution (LM1, HM1, LM2, and HM2) was 15; ion energy was 1 and 2:0.5. Source and desolvation temperatures were 135 and 400 °C. Flow rates of nitrogen for nebulizer and desolvation were 50 and 90 liters·h<sup>-1</sup>. Pressure of the argon collision gas was 3.0·10<sup>-3</sup> mbar. Full scan, selected ion recording, and daughter scan mode were used for qualitative analyses. Quantitative PA analyses were made based on

MS/MS multiple reaction monitoring (MRM) as described (Shui *et al*, 2010). Briefly, MRM transitions for individual PAs were determined using PA standards (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL). The PAs were identified as deprotonated parent ions  $[M - H^-]$ ; cone energy was optimized for each PA and set to 44 V. The predominant daughter fragment ions were then used for quantitative MRM analysis. After optimization, the collision energy was set to 44 V. MRM transitions and specific retention times were used to selectively monitor PA.

### Statistical analysis

Data were analyzed with the Prism program (GraphPad Software). All secretion experiments were repeated at least three times using the non-parametric Mann-Whitney U test. For the quantification of the number of CgA granules, statistical significance was determined by Student's *t*-test with Welch's correction or Mann-Whitney U test. Values are expressed as means  $\pm$  s.e.m., and the level of significance is designated in the figure legend as follows: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ . For the quantification of CgA signal in lipid strip experiments, statistical significance was determined by an Anova one-way analysis of variance test with Bonferroni's comparison test. Values are expressed as means  $\pm$  s.e.m., and the level of significance is designated in the figure legend as follows: \*\*\*  $P < 0.0001$ .

### Post-acquisition analysis

The following procedure was used to measure the number of CgA granules and Golgi area. A computer folder containing the stack of confocal sections for the two labels was generated by the Leica TCS-SP8 confocal microscope. This folder was opened with Imaris and converted into an Imaris file. A broad region of interest (ROI) was defined. Then with the tool 'spots detection' on Imaris, the number of spots in canal of interest was quantified. Spots statistics are

automatically computed for each spot object. To each spot belongs a spatial position along the x- and y-axis, as well as the intensity of the point it represents. The spot object is available to model point-like structures in the data. It provides a procedure to automatically detect point-like structures, an editor to manually correct detection errors, a viewer to visualize the point-like structures as spheres, and statistics output.

## References

- Ammar MR, Thahouly T, Hanauer A, Stegner D, Nieswandt B, Vitale N (2015) PLD1 participates in BDNF-induced signalling in cortical neurons. *Sci Rep* 5:14778
- Anouar Y, Desmoucelles C, Yon L, Leprince J, Breault L, Gallo-Payet N, Vaudry H (1998) Identification of a novel secretogranin II-derived peptide (SgII(187-252)) in adult and fetal human adrenal glands using antibodies raised against the human recombinant peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2944-2951
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917
- Blois A, Holmsen H, Martino G, Corti A, Metz-Boutigue MH, Helle KB (2006) Interactions of chromogranin A-derived vasostatins and monolayers of phosphatidylserine, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Regul Pept* 134: 30-37
- Carmon O, Laguerre F, Jeandel L, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (2017) Chromogranins at the crossroads between hormone aggregation and secretory granule biogenesis. Chromogranins: from cell biology to physiology and biomedicine. UNIPA Springer Angelone, Cerra and Tota Eds, pp 39-48
- Chanat E, Huttner WB (1991) Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 115: 1505-1519
- Chen YG, Siddhanta A, Austin CD, Hammond SM, Sung TC, Frohman MA, Morris AJ, Shields D (1997) Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 138: 495-504
- Cruz-Garcia D, Ortega-Bellido M, Scarpa M, Villeneuve J, Jovic M, Porzner M, Balla T, Seufferlein T, Malhotra V (2013) Recruitment of arfaptins to the trans-Golgi network by PI(4)P and their involvement in cargo export. *EMBO J* 32: 1717-1729
- Delestre-Delacour C, Carmon O, Laguerre F, Estay-Ahumada C, Courel M, Elias S, Jeandel L, Rayo MV, Peinado JR, Sengmanivong L, Gasman S, Coudrier E, Anouar Y, Montero-

- Hadjadje M (2017) Myosin 1b and F-actin are involved in the control of secretory granule biogenesis. *Sci Rep* 7: 5172
- Dhanvantari S1, Loh YP (2000) Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *J Biol Chem* 275: 29887-29893
- Duran JM, Campelo F, van Galen J, Sachsenheimer T, Sot J, Egorov MV, Rentero C, Enrich C, Polishchuk RS, Goni FM, Brugger B, Wieland F, Malhotra V (2012) Sphingomyelin organization is required for vesicle biogenesis at the Golgi complex. *EMBO J* 31: 4535-4546
- Elias S, Delestre C, Courel M, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (2010) Chromogranin A as a crucial factor in the sorting of peptide hormones to secretory granules. *Cell Mol Neurobiol* 30: 1189-1195
- Elias S, Delestre C, Ory S, Marais S, Courel M, Vazquez-Martinez R, Bernard S, Coquet L, Malagon MM, Driouich A, Chan P, Gasman S, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (2012) Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. *Endocrinology* 153: 4444-4456
- Freyberg Z, Sweeney D, Siddhanta A, Bourgoin S, Frohman M, Shields D (2001) Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12: 943-955
- Freyberg Z, Siddhanta A, Shields D (2003) "Slip, sliding away": phospholipase D and the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* 13: 540-546
- Gondré-Lewis MC, Petrache HI, Wassif CA, Harries D, Parsegian A, Porter FD, Loh YP (2006) Abnormal sterols in cholesterol-deficiency diseases cause secretory granule malformation and decreased membrane curvature. *J Cell Sci* 119: 1876-1885
- Holthuis JC, Menon AK (2014) Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 510: 48-57
- Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Uchiyama Y, Takeuchi T (2002) Identification of a chromogranin A domain that mediates binding to secretogranin III and targeting to secretory granules in pituitary cells and pancreatic beta-cells. *Mol Biol Cell* 13: 3388-3399
- Hosaka M, Suda M, Sakai Y, Izumi T, Watanabe T, Takeuchi T (2004) Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J Biol Chem* 279: 3627-3634
- Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Kato T, Takeuchi T (2005) Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. *J Cell Sci* 118: 4785-4795
- Kang YK, Yoo SH (1997) Identification of the secretory vesicle membrane binding region of chromogranin A. *FEBS Lett* 404: 87-90

- Kassas N, Tanguy E, Thahouly T, Fouillen L, Heintz D, Chasserot-Golaz S, Bader MF, Grant NJ, Vitale N (2017) Comparative Characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis. *J Biol Chem* 292: 4266-4279
- Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP (2001) Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* 106: 499-509
- Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KN (2003) Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic* 4: 162-174
- Montero-Hadjadje M, Vaudry H, Turquier V, Leprince J, Do Rego JL, Yon L, Gallo-Payet N, Plouin PF, Anouar Y (2002) Localization and characterization of evolutionarily conserved chromogranin A-derived peptides in the rat and human pituitary and adrenal glands. *Cell Tissue Res* 310: 223-236
- Montero-Hadjadje M, Elias S, Chevalier L, Benard M, Tanguy Y, Turquier V, Galas L, Yon L, Malagon MM, Driouich A, Gasman S, Anouar Y (2009) Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides. *J Biol Chem* 284: 12420-12431
- Pasqua T, Mahata S, Bandyopadhyay GK, Biswas A, Perkins GA, Sinha-Hikim AP, Goldstein DS, Eiden LE, Mahata SK (2016) Impact of Chromogranin A deficiency on catecholamine storage, catecholamine granule morphology and chromaffin cell energy metabolism in vivo. *Cell Tissue Res* 363: 693-712
- Siddhanta A, Shields D (1998) Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J Biol Chem* 273:17995-17998
- Siddhanta A1, Backer JM, Shields D (2000) Inhibition of phosphatidic acid synthesis alters the structure of the Golgi apparatus and inhibits secretion in endocrine cells. *J Biol Chem* 275: 12023-12031
- Shui G, Guan XL, Gopalakrishnan P, Xue Y, Goh JS, Yang H, Wenk MR (2010) Characterization of substrate preference for Slc1p and Cst26p in *Saccharomyces cerevisiae* using lipidomic approaches and an LPAAT activity assay. *PLoS One* 5(8):e11956
- Sugawara M, Resende JM, Moraes CM, Marquette A, Chich JF, Metz-Boutigue MH, Bechinger B (2010) Membrane structure and interactions of human catestatin by multidimensional solution and solid-state NMR spectroscopy. *FASEB J* 24: 1737-1746
- Surma MA, Klose C, Simons K (2012) Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Biochim Biophys Acta* 1821: 1059-1067
- Tanguy E, Carmon O, Wang Q, Jeandel L, Chasserot-Golaz S, Montero-Hadjadje M, Vitale N (2016) Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion. *J Neurochem* 137: 904-12



- 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
- Yamada A, Mamane A, Lee-Tin-Wah J, Di Cicco A, Prévost C, Lévy D, Joanny JF, Coudrier E, Bassereau P (2014) Catch-bond behaviour facilitates membrane tubulation by non-processive myosin 1b. *Nat Commun* 5: 3624
- Zeniou-Meyer M, Zabari N, Ashery U, Chasserot-Golaz S, Haeberlé 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

## Figure legends

### Figure 1. CgA preferentially binds to PA.

- A Human CgA sequence showing conserved regions corresponding to vasostatin I, WE14, catestatin and EL35 peptides, and regions that could lead to  $\alpha$ -helical conformation (between arrows), suggesting their function as membrane binding domains.
- B Protein–lipid overlay assay in the presence of recombinant CgA (500 ng/ml) using commercial membrane strips where are adsorbed 100 pmol/spot of the following lipids: triglyceride, diacylglycerol (DAG), phosphatidic acid (PA), phosphatidylserine (PS), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylglycerol (PG), cardiolipin, phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol 4-phosphate [PI(4)P], phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub>], phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>], cholesterol, sphingomyelin, or 3-sulfogalactosylceramide (sulfatide). The resulting membrane was immunostained for CgA detected by a WE14 antibody and revealed using a chemiluminescence kit.

- C Quantification of CgA from experiments described in (A). Plotted are means of binding expressed as percentage normalized to control (blank)  $\pm$  s.e.m. ( $n = 3$ ). \*\*\* $P < 0.0001$ , Anova one-way analysis of variance test with Bonferroni's comparison test.

**Figure 2. Identification of PA species in Golgi and secretory granule membranes from COS7-CgA cells.**

- A Secretory granule and Golgi membranes were purified by subcellular fractionation using centrifugation on sucrose gradient. Each fraction was collected and analyzed using SDS-PAGE and several antibodies raised against ER (anti-CALR, 70 Kda), mitochondria (anti-GLUD1, 55 Kda), nucleus (anti-PCNA, 36 Kda), plasma membrane (anti ZO-3, 140 Kda), Golgi (anti-GM130, 130 Kda) and SG (anti-RV29.4, 70 Kda).
- B Total PA level was measured in fractions of secretory granule (SG) and Golgi membranes from COS7-CgA cells by duplicate UPLC/MS/MS analysis of two samples (each containing 200  $\mu$ g of protein) from each fraction.
- C The levels of distinct PA species were measured in fractions of secretory granule (SG) and Golgi membranes from COS7-CgA cells by duplicate UPLC/MS/MS analysis of two samples (each containing 200  $\mu$ g of protein) from each fraction. The acyl chain composition of each species is shown on the x axis. The y axis shows the abundance of each species as a percentage of total PA in the sample.

**Figure 3. Same predominant PA species are found in Golgi and secretory granule membranes from COS7-WT, COS7-CgA and PC12 cells.**

- A PA levels were measured in fractions of Golgi membranes from COS7-WT or COS7-CgA cells by duplicate UPLC/MS/MS analysis of two samples (each containing 200  $\mu$ g of protein) from

each fraction. The acyl chain composition of each species is shown on the x axis. The y axis shows the abundance of each species as a percentage of total PA in the sample.

B PA levels were measured in secretory granule-containing fractions from PC12 or COS7-CgA cells by duplicate UPLC/MS/MS analysis of two samples (each containing 200 µg of protein) from each fraction. The acyl chain composition of each species is shown on the x axis. The y axis shows the abundance of each species as a percentage of total PA in the sample.

**Figure 4. CgA interacts with the identified PA species and provokes membrane deformation.**

A Schematic representation of the liposome flotation assay approach used to study the interaction of CgA from COS7-CgA cell extracts with PA species.

B Detection of CgA in the different fractions (Top (T), Medium (M), Bottom (B)) obtained from liposome assays. COS7-CgA cell extracts were incubated with liposomes containing 5% NBD-PE, 85% of DOPC, and 10% of the indicated phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine (PS), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), a commercial phosphatidic acid (PA) or distinct species of PA (PA 36:0, PA 36:1, PA 36:2, PA 40:6). Thirty µg of protein from each fraction were run on SDS-PAGE and immunoblotted with the CgA-derived WE14 antibody.

C Effect of CgA on PA-containing GUVs. Fluorescent GUVs (96 % DOPC, 4 % PA (36:1) and 1 % PE-NBD) were incubated without (control) or with CgA (2 µM CgA). GUV budding was observed by live confocal microscopy during 1 min. Representative confocal microscopy sections throughout the GUVs are shown. The scale bar represents 30 µm.

D Quantification of membrane budding of PA-containing GUVs shown in panel (C) (n=3; 50 GUVs per condition). \*\*\**P* < 0.001, Mann-Whitney test. Means ± s.e.m. are plotted.

**Figure 5. CgA interacts with PA through a putative PABD.**

- A Human CgA sequence showing a region of 18 amino acids (hCgA<sub>364-381</sub>), encompassing a positive charge cluster and hydrophobic residues that could adopt an  $\alpha$ -helical conformation, suggesting its function as PA-binding domain (PABD).
- B PA binding profile of the putative human CgA-PABD. Amphipathic  $\alpha$ -helix projection of the core 18 amino acids of the PABD of CgA obtained with Heliquest software. Arrow indicates hydrophobic moment.
- C Model of the putative human CgA-PABD. Ribbon corresponds to the  $\alpha$ -helix. Structure was examined using MacPyMOL (v1.74).
- D Characterization of the PA binding capacity of human CgA through the putative PABD. Semi-quantitative fluorescent liposome assays with PA-containing fluorescent liposomes (5% PE-NBD, 85% DOPC, 10% PA (36:1)) and GST-CgA-PABD constructs linked to GSH-Sepharose beads. The binding of liposomes with CgA-PABD constructs was monitored by fluorimetry. Results are presented as means  $\pm$  S.D. (of triplicate measurements pooled from three experiments, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; and \*\*\* $P < 0.001$ ).

**Figure 6. PLD inhibition alters the biogenesis of CgA secretory granules in COS7-CgA cells.**

- A WT COS7 cells were treated or not with 75nM FIPI for 6h, fixed and immunolabelled with anti-GM130 antibody. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 17  $\mu$ m.

- B COS7-CgA cells were treated or not with 75nM FIPI for 6h, fixed and immunolabelled with anti-GM130 and anti-CgA antibodies. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 17  $\mu\text{m}$ .
- C Quantification of the number of CgA secretory granules shown in panel (C) (n=2; 20 cells per condition). \*\*\* $P < 0.001$ , Mann-Whitney test. Means  $\pm$  s.e.m. are plotted.

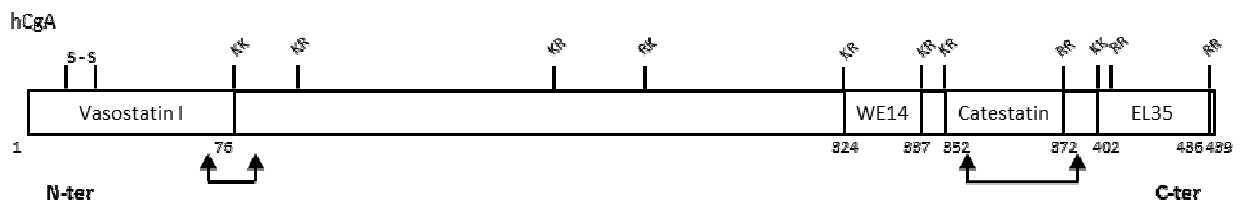
**Figure 7. PLD depletion alters the biogenesis of secretory granules in PC12 cells and in chromaffin cells.**

- A PC12 cells were treated or not with 75nM FIPI for 6h, fixed, immunolabelled with anti-CgA and anti-GM130 antibodies, and the distribution of CgA was observed by confocal microscopy. Representative confocal microscopy sections throughout the cells are shown. The scale bar represents 17  $\mu\text{m}$ .
- B Quantification of the number of CgA secretory granules shown in panel (D) (n=2; 20 cells per condition). Mann-Whitney test. Means  $\pm$  s.e.m. are plotted.
- C Electron microscopy analysis of chromaffin cells from WT (control) and PLD1<sup>-/-</sup> mice. The scale bars represent 2  $\mu\text{m}$ .
- D Quantification of the number of secretory granules (SG) shown in panel (A) (n=6 mice per condition; 50 cells per mouse adrenal medulla). \* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test). Means  $\pm$  s.e.m. are plotted.

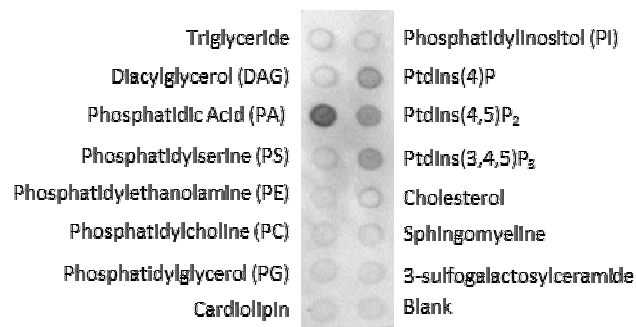
**Figure 8. PLD inhibition alters basal secretion in COS7-CgA and PC12 cells.**

- A Western blot analysis of CgA content and secretion from COS7-CgA cells, treated or not with 75nM of FIPI, in basal or 2  $\mu$ M ionomycin-stimulated conditions. Lower panel shows quantification of experiments shown in upper panel. Normalized CgA release in the medium relative to total CgA (medium + cell content) is determined. Means  $\pm$  s.e.m. from four independent experiments are plotted. \* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test).
- B Western blot analysis of CgA content and secretion from PC12 cells, treated or not with 75nM of FIPI, in basal or 2  $\mu$ M ionomycin-stimulated conditions. Lower panel shows quantification of experiments shown in upper panel. Normalized CgA release in the medium relative to total CgA (medium + cell content) is determined. Means  $\pm$  s.e.m. from four independent experiments are plotted. \* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test).
- C Western blot analysis of CgA content from COS7-CgA cells, treated or not with 75nM of FIPI. Upper panel shows a representative Western blot, where immunoreactive bands of 70 and 55 kDa corresponding to the CgA protein and tubulin respectively are detected. Lower panel shows the quantification of the relative amount of CgA protein. Tubulin was used as a loading control. Means  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments are plotted (Mann-Whitney test).
- D Western blot analysis of CgA, CgB and SgII proteins from PC12 cells, treated or not with 75nM of FIPI. Upper panel shows a representative Western blot, where immunoreactive bands of 70, 115, 85 and 55 kDa corresponding to CgA, CgB and SgII proteins and tubulin respectively are detected. Lower panel shows the quantification of the relative amounts of granin proteins. Tubulin was used as a loading control. Means  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments are plotted (Mann-Whitney test).

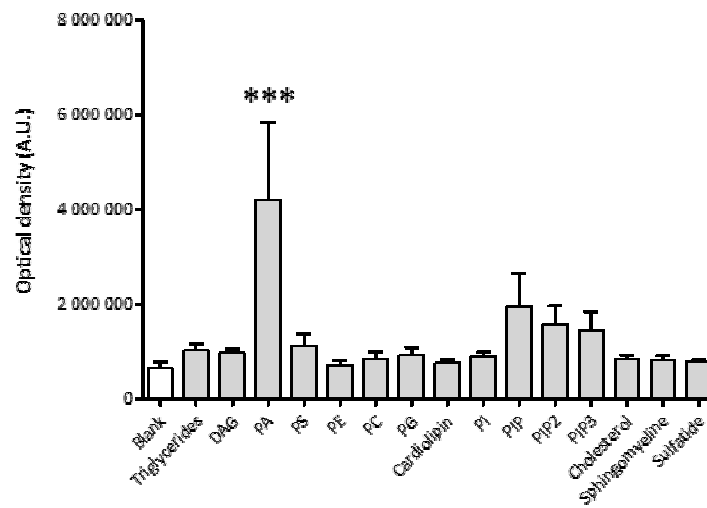
**A**



**B**



**C**



**Figure 1**

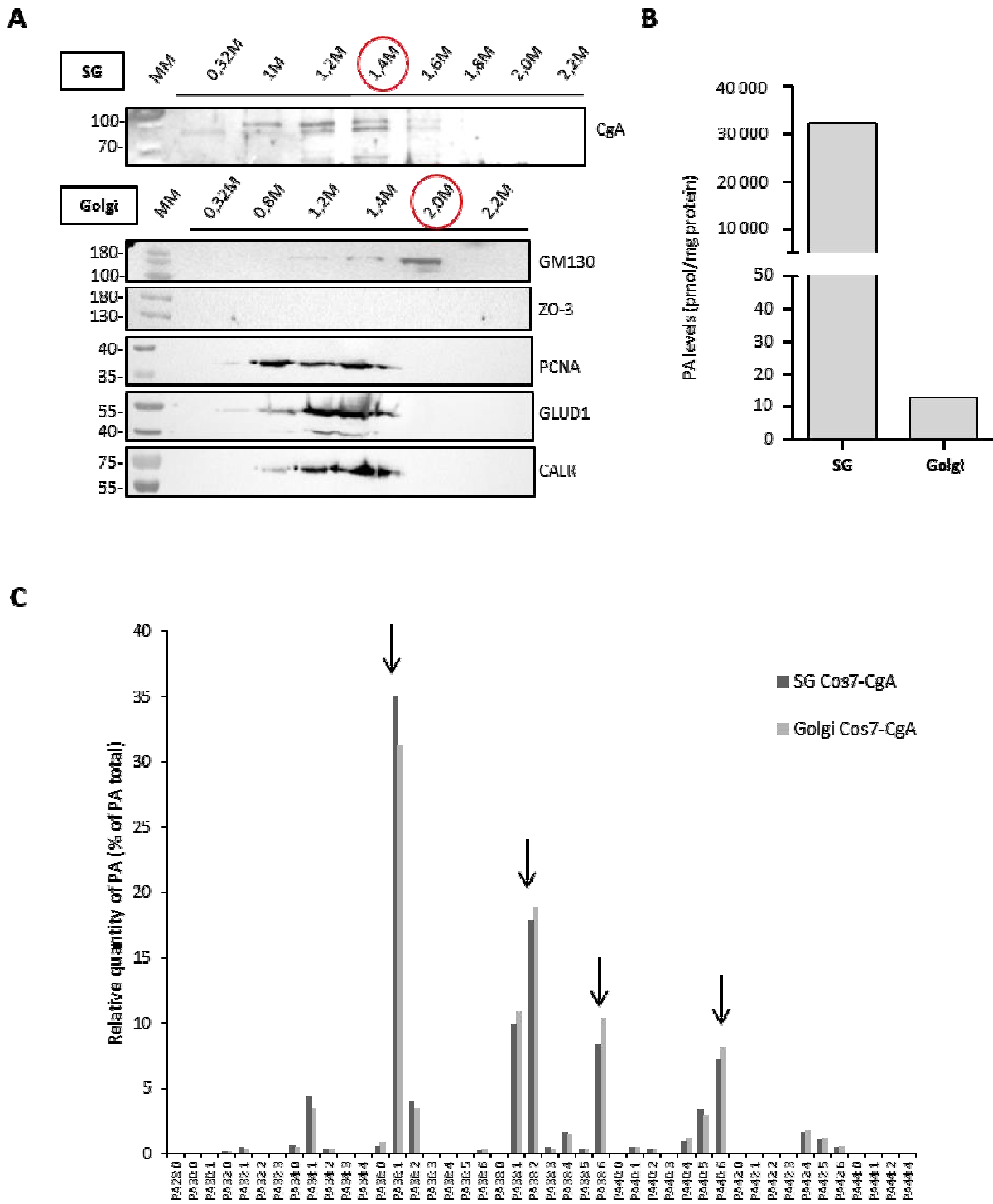
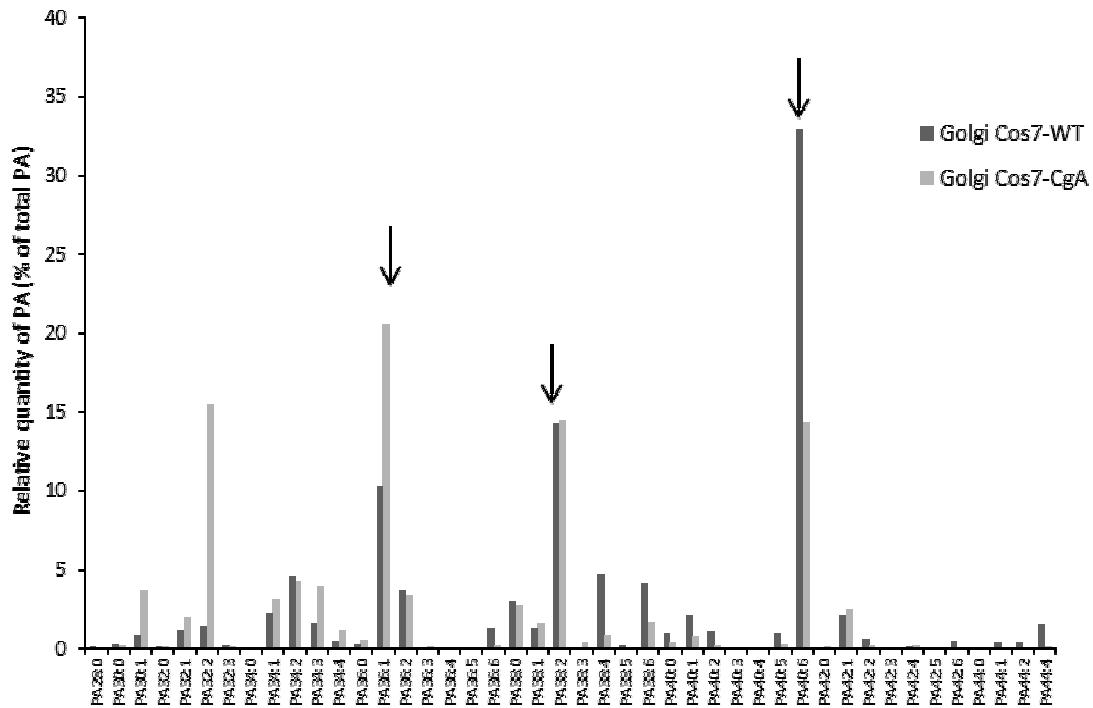


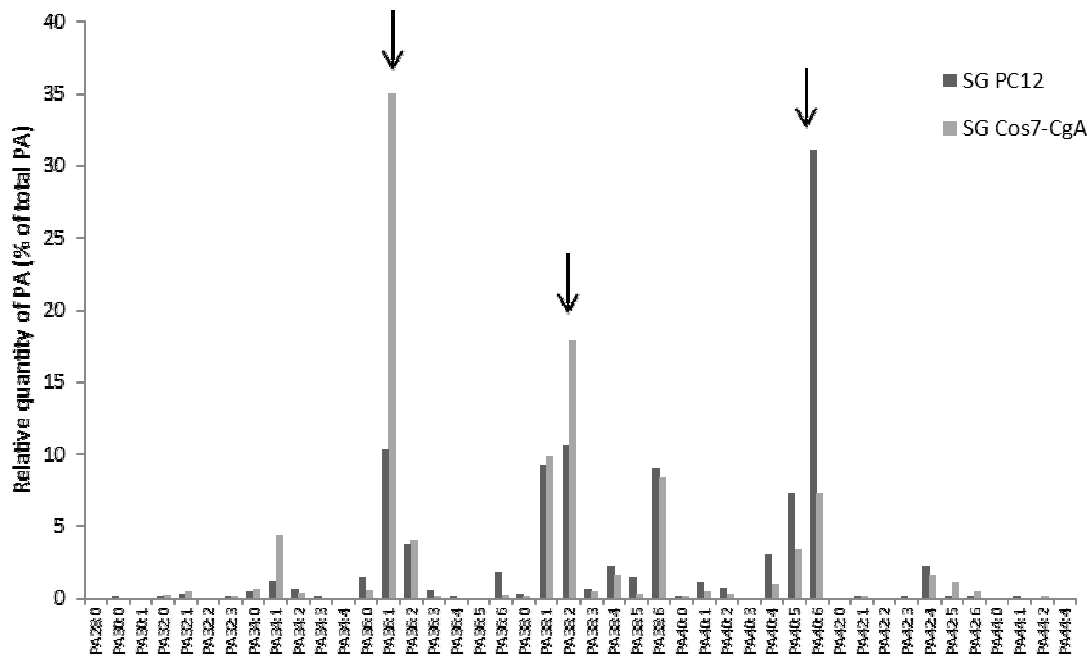
Figure 2



**A**



**B**



**Figure 3**

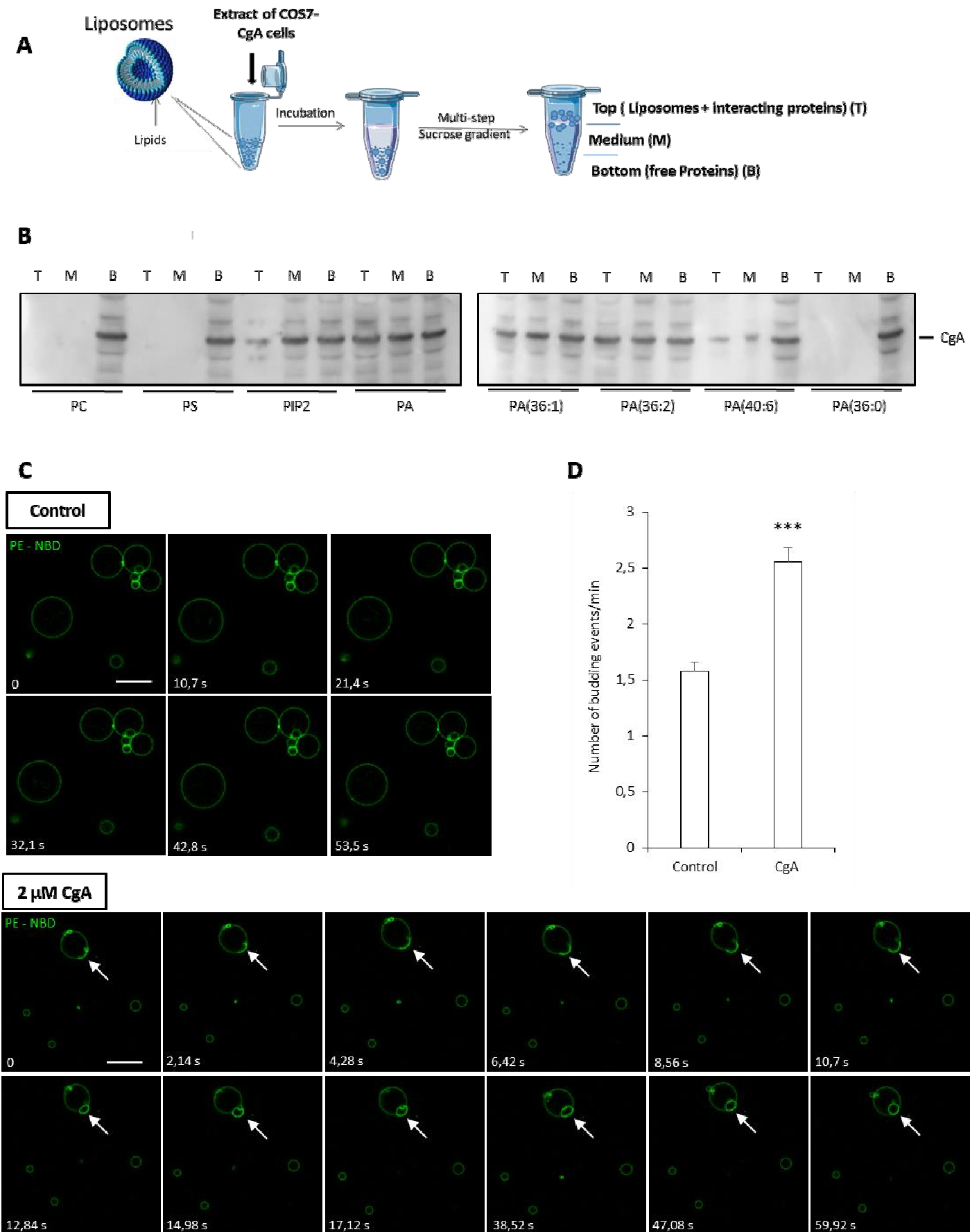
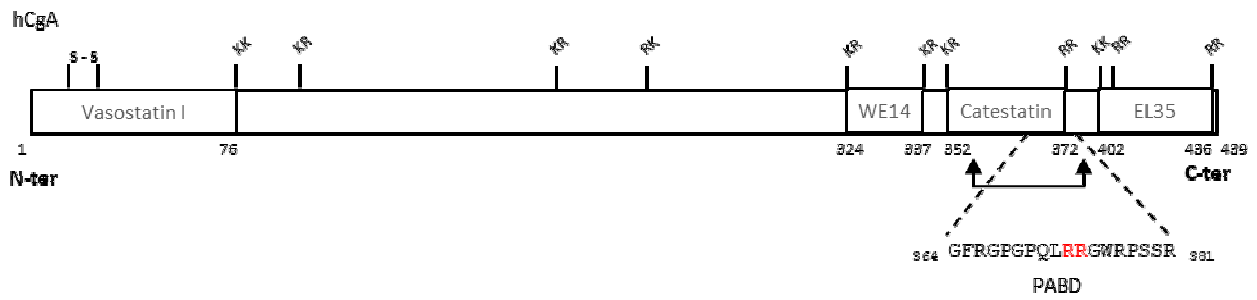


Figure 4

**A**



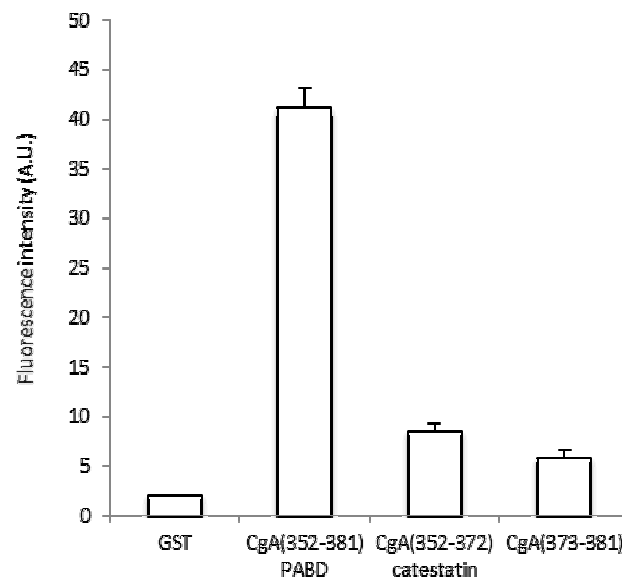
**B**

Physico-chemical properties	Polar residues + GLY	Nonpolar residues
Hydrophobicity $\langle H \rangle$	Polar residues + GLY (n / %)	Nonpolar residues (n / %)
0.142	12 / 66.67	6 / 33.33
Hydrophobic moment $\langle \mu H \rangle$	Uncharged residues + GLY	Aromatic residues
0.448	GLN 1, SER 2, GLY 4	TRP 1, PHE 1,
Net charge $z$	Charged residues	Special residues
5	ARG 5,	CYS 0, PRO 3
	Hydrophobic face : none	

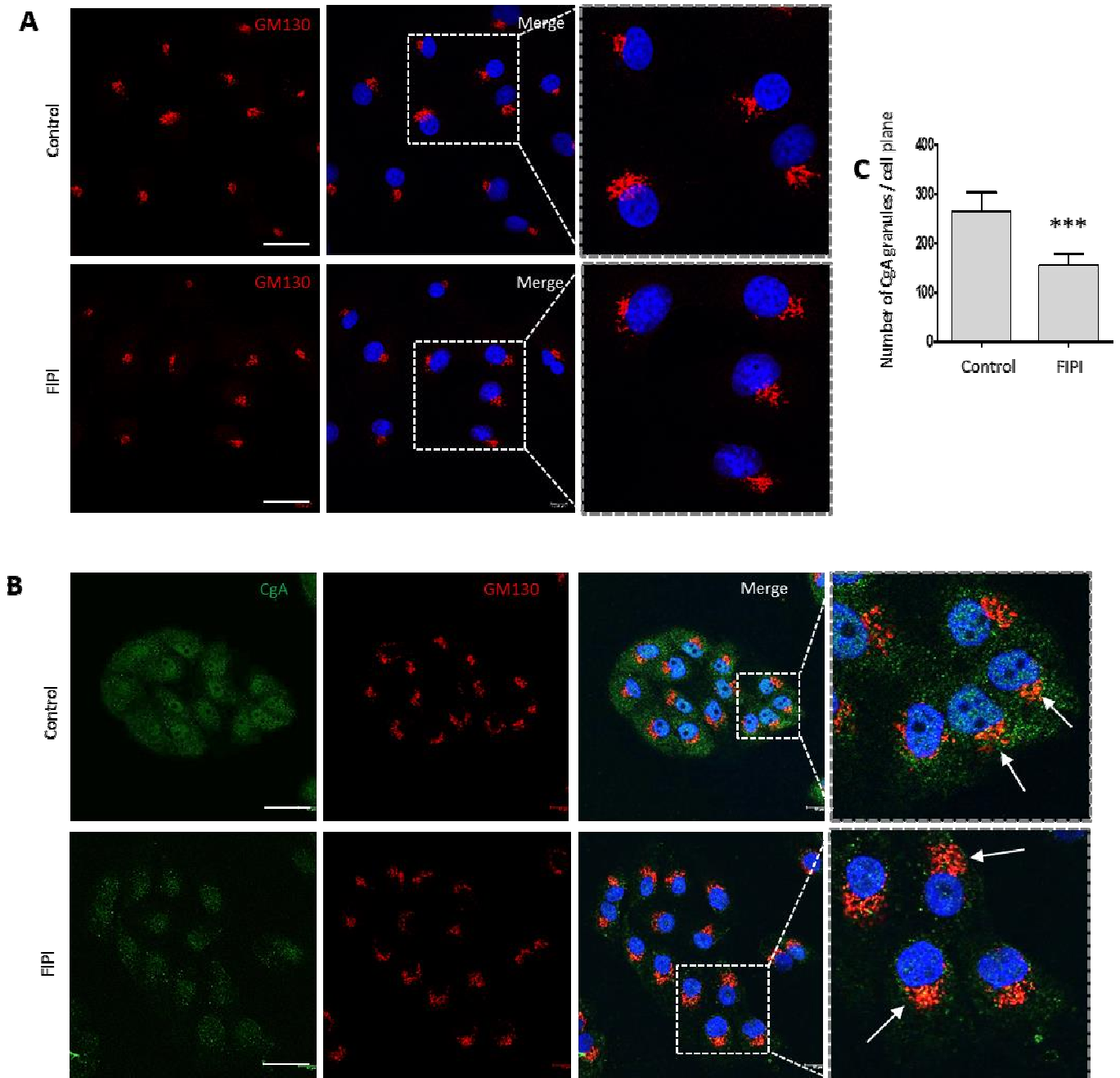
**C**



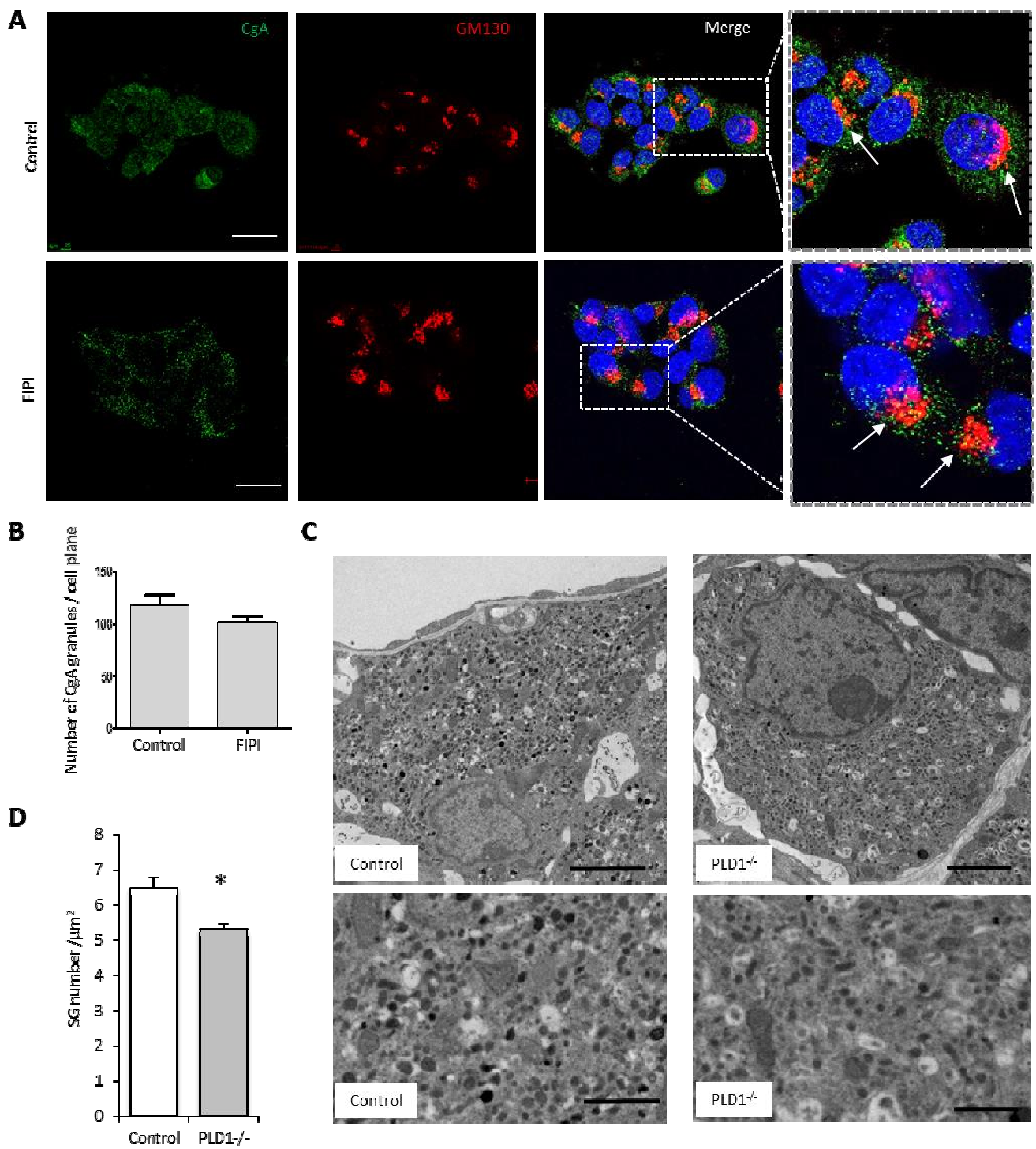
**D**



**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**

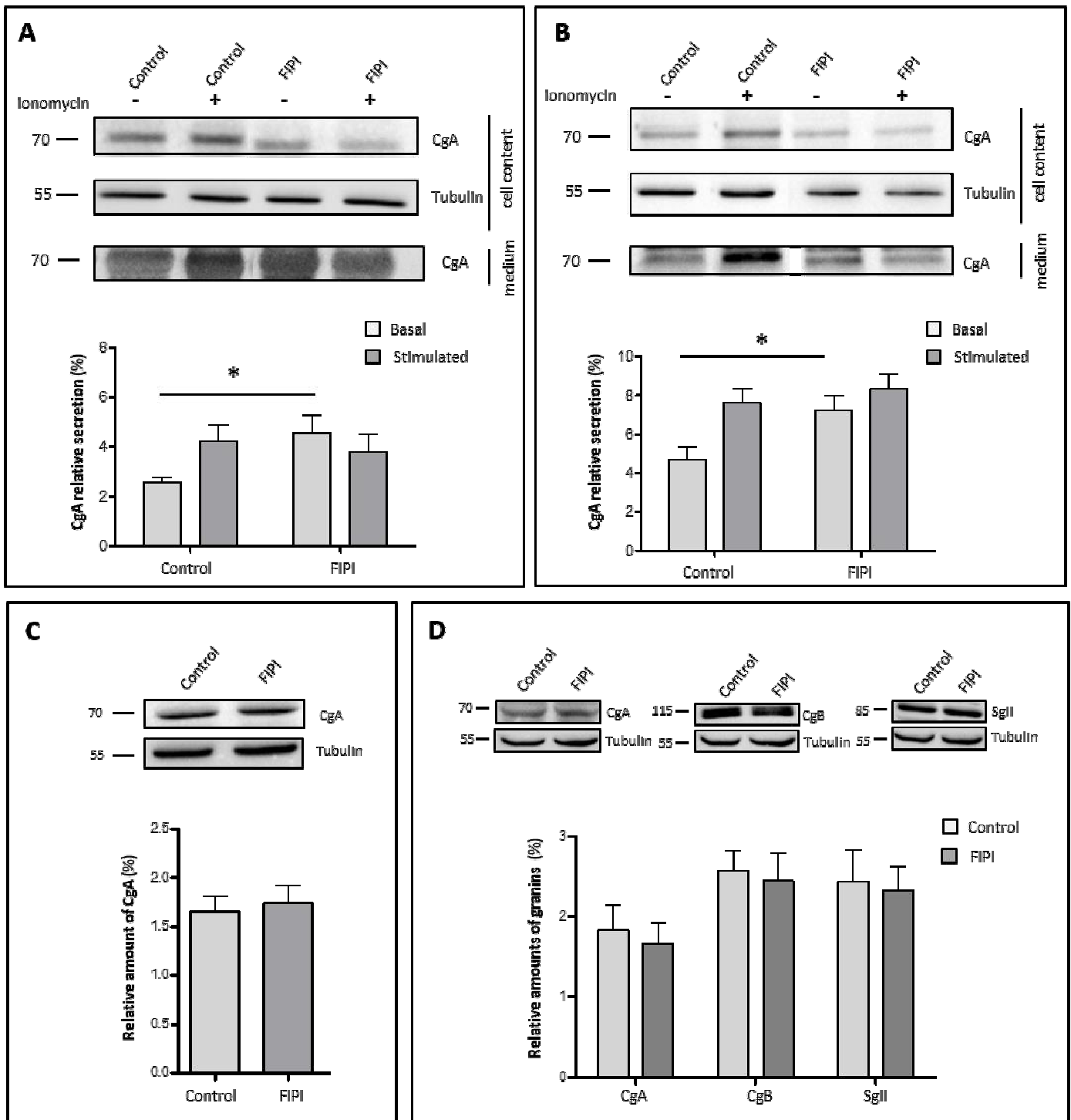


Figure 8



# Discussion





## DISCUSSION

---

L'enjeu de ces travaux de thèse vise à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués lors de la biogenèse des granules de sécrétion (GS) au sein des cellules neuroendocrines. Lors de la sécrétion neuroendocrine, le contenu destiné aux GS est trié et concentré dans des régions spécifiques du TGN de par l'action de différentes protéines telles que les granines, la CPE et les V-ATPases. Le bourgeonnement des GS à partir de la membrane du TGN est dépendant de constituants membranaires tels que le cholestérol et le PA, mais également d'un certain nombre de protéines cytosoliques telles que des kinases, des GTPases et des protéines du manteau. La maturation des GS est facilitée par l'acidification *via* des V-ATPases et la condensation du contenu par élimination d'eau *via* l'intervention d'aquaporines. Par la suite, les GS sont emmenés vers la périphérie cellulaire où aura lieu l'exocytose. Ces dernières années des efforts considérables ont été réalisés pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des GS, et notamment le bourgeonnement des GS au niveau du réseau *trans*-golgien, ces mécanismes conduisant *in fine* à la sécrétion des hormones.

Lors de mes travaux de thèse, je me suis particulièrement intéressée au rôle de la CgA et à la recherche de ses partenaires moléculaires dans la régulation de ces mécanismes, afin d'approfondir les connaissances actuelles sur les modalités de la sécrétion hormonale. Ces études sont d'autant plus importantes que de nombreuses pathologies sont en lien avec une dérégulation de la sécrétion telles que les troubles métaboliques (diabète), l'hypertension, les tumeurs d'origine neuroendocrine (phéochromocytome, paragangliomes...) ou encore les maladies neurodégénératives (sclérose latérale amyotrophique, maladie d'Alzheimer...). Les travaux que j'ai menés au cours de ma thèse s'insèrent dans un projet plus global de l'équipe de recherche de mon laboratoire d'accueil qui s'intéresse aux mécanismes de la différenciation neuroendocrine et l'impact de son altération dans le développement des pathologies sus-citées afin de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Les granines sont des glycoprotéines acides et solubles qui constituent le composant majoritaire des GS des cellules endocrines, neuroendocrines et neuronales. Les différents

membres de cette famille (CgA, CgB, SgII, SgIII...) partagent des caractéristiques et des propriétés structurales communes et sont connues pour être à l'origine de l'agrégation et du tri des pro-hormones dans les GS. Néanmoins, une telle diversité de granines suggère qu'elles possèderaient des fonctions différentes, ce qui implique une variété de populations de GS dont l'existence et la fonction restent à établir dans un type de cellule neuroendocrine donné. Par ailleurs, au sein des cellules neuroendocrines, plusieurs granines sont co-exprimées, avec potentiellement des propriétés granulogéniques communes. De plus, certaines études ont montré que la perte de certaines fonctions d'une granine dont l'expression a été altérée peut être compensée par la sur-expression d'autres granines, comme par exemple au sein des cellules chromaffines de souris dont le gène codant la CgA a été invalidé (Mahapatra *et al.*, 2005 ; Montesinos *et al.*, 2008). Durant mes travaux de thèse, nous nous sommes focalisés sur la CgA qui est la granine la plus exprimée dans les tissus endocrines et neuroendocrines et dont les fonctions dans la granulogénèse et la régulation de la sécrétion hormonale ont été rapportées (Kim *et al.*, 2001 ; Mahapatra *et al.*, 2005 ; Courel *et al.*, 2006 ; Hendy *et al.*, 2006 ; Montero-Hadjadje *et al.*, 2009).

Afin d'étudier les mécanismes d'action de la CgA en s'affranchissant du rôle compensateur des granines potentiellement co-exprimées, mon équipe d'accueil a développé un modèle cellulaire simplifié suite à certaines observations réalisées lors d'études précédentes. En effet, l'expression de la CgA dans une lignée de cellules non endocrines COS7 induit la formation de structure granulaires ayant les propriétés morphologiques et fonctionnelles d'authentiques granules de sécrétion (Montero-Hadjadje *et al.*, 2009 ; Elias *et al.*, 2012). Ainsi, à partir d'une lignée de cellules COS7 exprimant de manière stable la CgA (COS7-CgA), les GS ont été purifiés par fractionnement subcellulaire dans le but d'en analyser le protéome. Ce modèle cellulaire simplifié nous a ainsi permis l'identification d'un panel de protéines cytosoliques interagissant avec l'actine, telles que des moteurs moléculaires, mais aussi des GTPases, et des protéines liant le calcium (Elias *et al.*, 2012). De manière très intéressante, certaines protéines identifiées ont été décrites dans le protéome des GS de cellules neuroendocrines comme par exemple la myosine Ic (Gauthier *et al.*, 2008), mais également les annexines et la myosine 9 (Wegrzyn *et al.*, 2007). D'autres protéines identifiées sont impliquées dans la voie de sécrétion régulée des cellules neuroendocrines comme l'annexine A2 (Chasserot-Golaz *et al.*, 2005) et la myosine VI impliquées dans la régulation de l'exocytose des cellules neuroendocrines

(Majewski *et al.*, 2010 ; Tomatis *et al.*, 2013 ; Yano *et al.*, 2006) et dans le maintien de la morphologie golgienne (Sahlender *et al.*, 2005), ou encore les GTPases Arf5 et Arf 6 qui interagissent avec les GS pour contrôler leur trafic dans les cellules neuroendocrines (Vitale *et al.*, 2002 ; Sadakata *et al.*, 2010). Plusieurs protéines impliquées dans les interactions entre actine et membrane plasmique (telles que l'eitrine, la radixine, la moésine, l' $\alpha$ -actinine) ont également été identifiées. Or plusieurs études ont montré que ces protéines participent à l'arrimage des GS aux sites d'exocytose de la membrane plasmique des cellules endocrines suite à une stimulation (Bretscher, 1999 ; Lopez *et al.*, 2010 ; Malacombe *et al.*, 2006). Cette analyse protéomique des structures granulaires induites par l'expression de la CgA dans des cellules non-endocrines crédibilise le modèle cellulaire développé en tant que modèle neuroendocrine simplifié pour l'étude du mécanisme d'action moléculaire de la CgA.

La biogenèse des GS dépend de la dynamique de la membrane du TGN, et plus particulièrement des lipides au niveau de microdomaines particuliers (Dhanvantari et Loh, 2000), ceci pouvant être dû à l'interaction de protéines luminales ou cytosoliques avec des composants moléculaires de la membrane du TGN. Parmi les protéines cytosoliques, les moteurs moléculaires liant les microtubules ou l'actine, sont des facteurs clés de la déformation entraînant la formation de compartiments post-golgiens (Yamada *et al.*, 2014). Parmi ces protéines cytosolique, la myosine 1b a été montré comme étant capable d'interagir avec PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) (Komaba et Coluccio, 2010). Parmi les protéines luminales du TGN, un membre de la famille des granines, la SgIII, a été montré comme interagissant avec le cholestérol membranaire pour contrôler la biogenèse des GS (Hosaka *et al.*, 2005), mais cette protéine n'est pas exprimée de manière ubiquiste dans les cellules neuroendocrines. Un des objectifs de ma thèse a été de rechercher le(s) partenaire(s) moléculaire(s) membranaire(s) de la CgA afin de démontrer sa capacité d'interaction avec la membrane du TGN.

### La CgA interagit avec l'acide phosphatique

Plusieurs études ont suggéré que la CgA est susceptible d'interagir avec les membranes de par la présence d'hélices  $\alpha$  dans sa séquence. Notamment, les travaux de Dondossola et collaborateurs ont montré que la vasostatine-1 (VS-1), peptide dérivé de la région N-terminale conservée de la CgA, est capable de lier la membrane de fibroblastes *via* sa structure en hélice

$\alpha$  (Dodonssola *et al.*, 2010). Une étude *in silico* de la séquence de la CgA a permis de prédire que la région C-terminale présente également une structure en hélice  $\alpha$  (Elias *et al.*, 2010). Mon équipe d'accueil ayant démontré dans des travaux antérieurs que les régions terminales conservées de la CgA jouent un rôle majeur dans la formation des granules contenant la CgA (Montero-Hadjadje *et al.*, 2009), nous avons étudié la capacité de la CgA à lier les lipides membranaires et l'impact de cette interaction sur la biogenèse de GS.

Dans cette partie de ma thèse, nous avons commencé par démontrer le potentiel de la CgA à lier le PA en utilisant des membranes de nitrocellulose sur lesquelles sont adsorbés plusieurs lipides membranaires. Le PA étant crucial pour la biogenèse des GS (Siddhanta et Shields 1998), nous avons analysé la composition en PA des membranes golgiennes et granulaires des cellules COS7-CgA et PC12 par spectrométrie de masse LC-MS/MS équipée d'une colonne d'affinité pour le PA et nous avons observé un enrichissement du PA au niveau des membranes granulaires, confirmant ainsi l'implication du PA dans la biogenèse des GS contenant la CgA. De plus, cette analyse a révélé la prédominance des mêmes formes de PA, dont des formes mono- et poly-insaturées : PA (36:1), PA (38:2) et PA (40:6). Le développement de liposomes enrichis avec différents phospholipides incluant ces espèces de PA nous a permis d'observer une interaction spécifique de la CgA avec le PA (36:1) et le PA (40:6). De plus, le développement de liposomes géants composés de ces mêmes espèces lipidiques nous a permis de montrer que la CgA provoque une déformation de membrane enrichie en PA (36:1) ou PA (40:6). L'ensemble de ces résultats démontre la capacité de la CgA à se lier aux espèces de PA prédominantes présentes dans les membranes golgiennes et granulaires de nos modèles cellulaires et avante le rôle central de l'interaction CgA/ PA (36:1) ou PA (40:6) dans les mécanismes de déformation membranaire. Dans le but de caractériser le domaine d'interaction de la CgA au PA (PA-binding domain ou PABD), nous avons comparé la structure de la CgA avec celle de protéines ayant un PABD, notamment la phosphodiesterase PDE4A1 qui interagit avec le PA golgien (Kassas *et al.*, 2017). Cette analyse a révélé la présence d'un site potentiel d'interaction au PA dans la région C-terminale de la CgA, CgA<sub>364-381</sub>, qui inclut la séquence C-terminale de la catestatine (CgA<sub>352-372</sub>). A l'aide de liposomes enrichis en PA, nous avons observé que la CgA<sub>352-381</sub> se lie au PA (36:1), ce qui n'est pas le cas de la catestatine. De plus, le domaine CgA-PABD prédit (CgA<sub>364-381</sub>) pourrait permettre l'insertion de résidus hydrophobes dans les bicouches lipidiques et une interaction ionique directe entre les résidus

basiques et différentes molécules de PA. Ces résultats suggèrent que la CgA participe au réarrangement de la membrane du TGN en interagissant avec les espèces de PA présentes, ce qui induirait un microdomaine enrichi en PA. Cette accumulation de PA possédant une forme conique faciliterait la formation de courbures membranaires (Kooijman *et al.*, 2003) préalables au bourgeonnement des GS.

La source majeure de PA à la membrane golgienne provenant de la PC suite à l'activité de la PLD1 (Freyberg *et al.*, 2001), nous avons opté pour l'inhibition de la synthèse de PA dans nos modèles cellulaires en utilisant une stratégie pharmacologique et une stratégie par invalidation génique. L'inhibition pharmacologique de la synthèse de PA dans des cellules COS7-CgA et PC12 provoque une diminution du nombre de GS. L'isoforme PLD1 de la PLD étant prédominante au niveau de l'appareil de Golgi (Freyberg *et al.*, 2001, 2003), nous avons par ailleurs analysé et comparé la morphologie subcellulaire de cellules chromaffines provenant de souris sauvages et de souris dont le gène de la PLD1 est invalidé. Cette stratégie nous a permis d'observer une diminution significative du nombre de GS, ce qui confirme les résultats obtenus selon l'approche pharmacologique. De manière intéressante, cette diminution serait associée à une malformation de ces organites, ce qui est également observé dans les cellules chromaffines des souris dont le gène de la CgA a été invalidé (Pasqua *et al.*, 2016), suggérant que la PLD1 phénocopie la CgA en terme de régulation de la formation des GS. Ces observations indiquent que la CgA et le PA sont 2 acteurs moléculaires impliqués dans la formation des GS dans les cellules neuroendocrines.

Associées à ces altérations structurales, nous avons observé que l'inhibition de la PLD entraîne une augmentation de la sécrétion basale de CgA par les cellules COS7-CgA et PC12, indiquant que le PA formé *via* l'action de la PLD est essentiel pour l'adressage de la CgA vers la voie de sécrétion régulée.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats apporte une nouvelle vision de la mécanistique impliquée dans la biogenèse des GS. Nous proposons que la CgA en se liant au PA de la membrane du TGN provoquerait un réarrangement et une courbure membranaire pour initier le bourgeonnement des GS. A la suite ou de manière concomitante à ces événements membranaires, nous avons émis l'hypothèse que des protéines cytosoliques pouvaient être recrutées, telles que les arfaptines (Cruz-Garcia *et al.*, 2013) ou le complexe acto-myosine 1b,

identifié à la membrane des GS dans une étude précédente de mon équipe d'accueil (Elias *et al.*, 2012). L'autre partie de ma thèse a d'ailleurs porté sur le rôle du complexe acto-myosine 1b dans la formation des GS.

### La CgA provoque le recrutement du complexe acto-myosine 1b pour assurer la formation des granules de sécrétion

Parmi les protéines identifiées lors de l'analyse du protéome des structures granulaires induites par la CgA, la myosine 1b a retenu notre attention du fait de son intervention au niveau du TGN pour réguler la formation et assurer le trafic de compartiments post-golgiens vers la membrane plasmique dans des cellules Hela (Almeida *et al.*, 2011). Une étude plus spécifique du protéome de la membrane de ces GS a permis l'identification du complexe de nucléation de l'actine Arp2/3 et de l'actine cytoplasmique. Différentes études ayant montré l'implication des myosines et de l'actine filamenteuse (F-actine) dans le trafic et l'exocytose des GS (Meunier et Gutiérrez, 2016), nous avons décidé de rechercher le rôle de la myosine 1b, de la F-actine et du complexe Arp2/3 dans la formation des GS dans les cellules neuroendocrines. Nous avons ainsi démontré que la myosine 1b est associée au TGN et aux GSI dans les cellules neuroendocrines PC12, suggérant que la myosine 1b interviendrait dès les premiers stades de la biogenèse des GS en permettant le bourgeonnement des GSI à partir de la membrane du TGN. Par ailleurs, l'inhibition de l'expression de la myosine 1b provoque une diminution significative du nombre de GS, ce qui renforce l'idée d'un rôle direct de cette protéine dans la formation des GS. De plus, des expériences d'imagerie en time-lapse ont révélé que l'inhibition de l'expression de la myosine 1b dans les cellules COS7-CgA augmente la vitesse de déplacement des structures contenant la CgA, qui se rapproche ainsi de celle des vésicules constitutives dans ces cellules (Elias *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que l'absence de myosine 1b, en altérant la formation des GS, entraîne une fuite de la CgA vers les vésicules de la voie de sécrétion constitutive. Une redirection de la CgA vers les vésicules de la voie constitutive a déjà été démontrée suite à un défaut de sortie de la CgA vers les GS (Han *et al.*, 2008). Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'un nombre de vésicules constitutives contenant la CgA et d'une sécrétion basale de CgA plus élevée en absence de myosine 1b. Dans cette étude, nous avons également montré pour la première fois que la F-actine et le complexe Arp2/3 sont recrutés à la région golgienne de cellules à phénotype

neuroendocrine, et contrôleraient ainsi la biogenèse des GS, la déplétion de la myosine 1b ou du complexe Arp2/3 perturbant l'interaction entre la F-actine et la membrane du TGN ainsi que la formation des GS. Le complexe Arp2/3 exerçant un rôle actif dans l'exocytose des GS en permettant la formation de nouveaux filaments d'actine (Gasman *et al.*, 2004 ; Wen *et al.*, 2011), nous pouvons suggérer que le recrutement du complexe Arp2/3 à la membrane golgienne permet la formation de nouveaux filaments d'actine entraînant la déformation membranaire nécessaire à la formation du GS. Cette hypothèse est renforcée par l'étude d'Almeida et collaborateurs (2011) qui a montré qu'en plus de maintenir l'intégrité du complexe golgien, la F-actine avec Arp2/3 collaborent avec la myosine 1b pour contrôler la déformation de la membrane golgienne dans les cellules Hela, la myosine 1b formant et orientant activement la polymérisation de la F-actine pour générer la force mécanique requise. Ainsi, le complexe acto-myosine pourrait contribuer à la biogenèse des GS en initiant la déformation de la membrane golgienne, portion de membrane qui pourrait par la suite être stabilisée par des protéines BAR cytosoliques, telles que la protéine C kinase 1 (PICK 1) ou la protéine arfaptine (Holst *et al.*, 2013 ; Gehart *et al.*, 2012), avant le recrutement d'une protéine de scission qui permettra la formation du GS. Nos travaux constituent la première évidence d'une implication du complexe acto-myosine 1b dans la formation des GS et l'établissement de la voie de sécrétion régulée. Le complexe acto-myosine recruté à la membrane golgienne pourrait induire ou résulter d'un remodelage de la membrane, un processus nécessaire à la biogenèse des GS. De nouvelles études seront nécessaires pour établir les mécanismes moléculaires induisant le recrutement du complexe acto-myosine à la membrane du TGN puis l'initiation du bourgeonnement des GS (**Figure 23**).



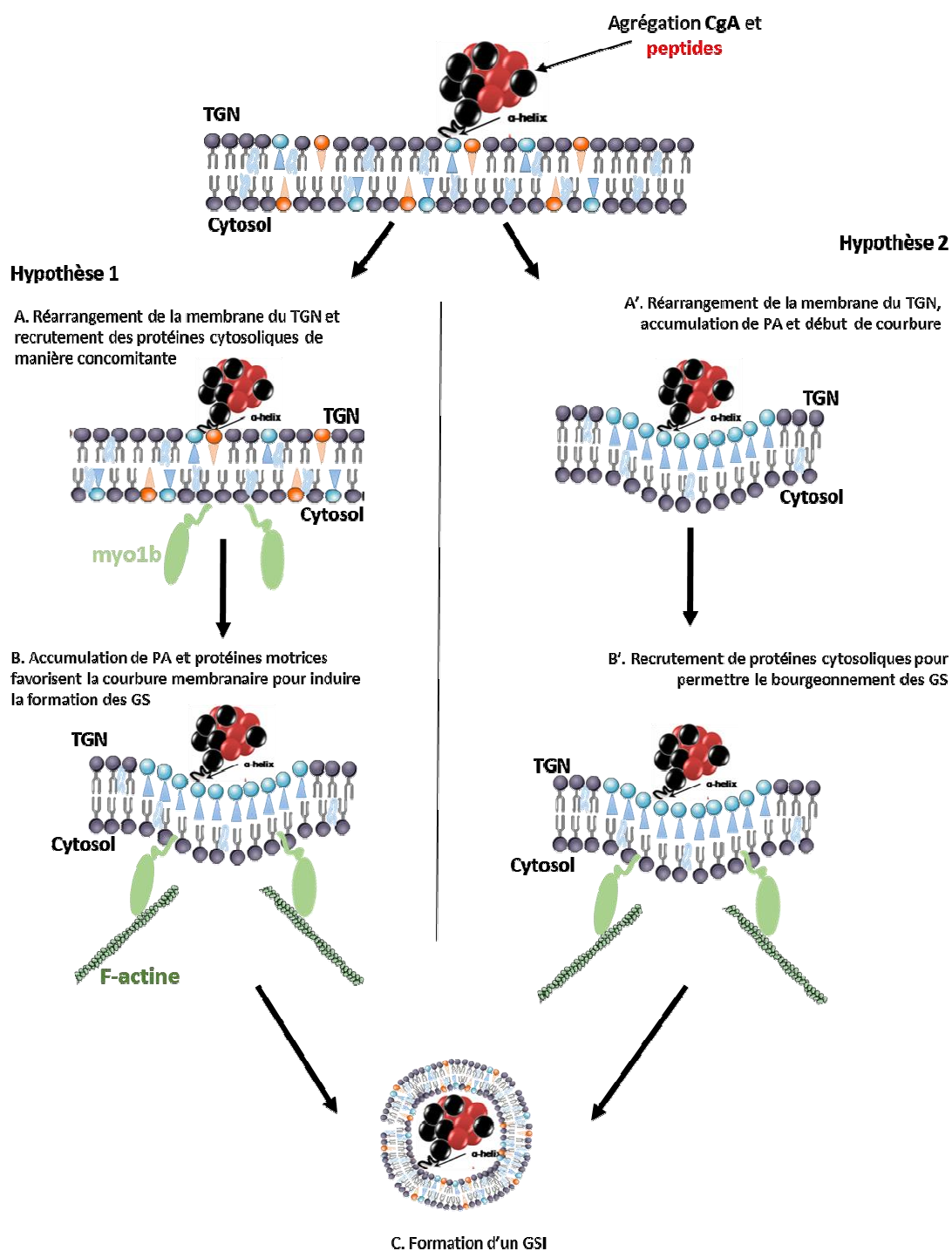


Figure 23. Schéma hypothétique du mode d'action du PA et du complexe acto-myo1b dans la formation des GS au niveau du TGN. Dans l'hypothèse 1 les deux partenaires sont recrutés de manière concomitante (A) pour permettre la déformation de la membrane du TGN (B) puis la formation d'un GSI (C). Dans l'hypothèse 2, la CgA interagirait avec le PA entraînant un réarrangement de la membrane du TGN (A'), puis le complexe acto-myo1b serait recruté pour faciliter le bourgeonnement du GS (B') et par la suite sa formation (C).

## Implication des mécanismes moléculaires de la formation des GS dans la compréhension de la physiologie et de la physiopathologie de la sécrétion hormonale

La distribution ubiquitaire des granines dans les tissus endocrines et neuroendocrines à partir desquels elles sont secrétées dans la circulation sanguine, fait des granines des marqueurs de l'activité des cellules neuroendocrines saines et tumorales. En effet, un grand nombre d'études ont documenté la valeur clinique de détecter les granines et leurs peptides dérivés dans les tissus et de mesurer leurs taux circulants (Taupenot *et al.*, 2003 ; Bartolomucci *et al.*, 2011). Cette mesure des granines et des peptides dérivés peut être utilisée pour diagnostiquer ou contrôler la progression des tumeurs neuroendocrines, la meilleure précision étant observée dans des tumeurs avec une intense activité sécrétrice (Guérin *et al.*, 2010 ; Guillemot *et al.*, 2006, 2014). Par ailleurs, des taux élevés de CgA sont présents dans le sang de patients atteints de maladies cardiovasculaires, gastro-intestinales et inflammatoires, avec des implications diagnostiques et pronostiques également chez ces patients (Corti *et al.*, 2018). Dans le cas des phéochromocytomes, qui sont des tumeurs de la médullosurrénale, les catécholamines sont hypersécrétées, ce qui conduit à plusieurs manifestations cliniques, parmi lesquelles notamment l'hypertension artérielle. La CgA circulante a également été bien documenté en tant que marqueur de l'activité sympatho-surrénalienne, les taux de sécrétion de CgA étant corrélés à la stimulation sympatho-surrénalienne (O'Connor et Bernstein, 1984 ; Takiyyuddin *et al.*, 1994). D'autre part le suivi des taux de CgA chez des patients atteints de maladies infectieuses sévères telles que le sepsis et le syndrome de réponse inflammatoire systémique serait un marqueur pronostic pour la survie des patients, des taux élevés étant en corrélation avec un faible taux de survie (Zhang *et al.*, 2008).

De plus, il a été démontré que les variants du gène de la CgA peuvent provoquer de profonds changements dans l'activité du système nerveux parasympathique et être associés au risque de développer de l'hypertension (Rao *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2008), suggérant un lien entre l'expression de CgA, la sécrétion de catécholamines et la régulation de la pression artérielle. De plus, Colombo *et al.* (2002) ont montré que l'expression de CgA dans les cellules néoplasiques affecte la croissance tumorale et la morphogénèse dans des modèles de souris nues, suggérant qu'une sécrétion anormale de CgA par des cellules néoplasiques neuroendocrines pourrait affecter les processus de tumorigénèse (Colombo *et al.*, 2002). Une

étude très intéressante basée sur la comparaison de patients normotendus et hypertendus atteints de phéochromocytome a révélé une diminution du taux de catécholamines urinaires et une diminution globale de l'expression du gène de la SgII, dans les tumeurs de patients normotensifs (Haissaguerre *et al.*, 2013). En lien potentiel entre la SgII, la sécrétion hormonale et la tumorigenèse, il a été démontré que la SgII est surexprimée dans le cancer de la prostate proportionnellement au grade de la tumeur, et que son expression déclenche une différenciation neuroendocrine des cellules tumorales, avec l'apparition de GS et d'une activité sécrétrice. La différenciation neuroendocrinne étant associée à un mauvais pronostic vital, ces données suggèrent que la sécrétion induite par la surexpression de la SgII peut jouer un rôle central dans la progression du cancer de la prostate (Courel *et al.*, 2014).

D'autres molécules de la voie de sécrétion régulée sont également impliquées dans le développement de pathologies comme par exemple les lipides. Des souris dont des gènes codant pour la synthèse de cholestérol ont été invalidés présentent des défauts au niveau de leurs GS. Pour le modèle murin du syndrome de Smith-Lemli-Opitz, caractérisé par des anomalies congénitales multiples, un déficit cognitif ainsi que des troubles comportementaux, l'invalidation du gène *Dhcr7* (*7-Dehydrocholesterol Reductase*) entraîne une augmentation du nombre de GS avec une morphologie aberrante au sein des cellules acineuses pancréatiques ainsi qu'une diminution du nombre de GS au niveau de l'hypophyse, du pancréas et des glandes surrénales. Cette diminution est également observée pour le modèle murin de l'athérosclérose dont le gène *Sc5d* (*Sterol-C5-Desaturase*) est invalidé. Ces données suggèrent que l'altération de la synthèse du cholestérol entraîne un dysfonctionnement de la voie de sécrétion régulée (Gondré-Lewis *et al.*, 2006).

Un autre exemple est le cas du syndrome de Coffin-Lowry qui est un trouble neurologique rare caractérisé par un retard psychomoteur et de croissance, une dysmorphie faciale, des anomalies digitales et des déformations squelettiques progressives chez les patients. Cette pathologie est due à une mutation au niveau du gène *RPS6KA3* (*Ribosomal Protein S6 Kinase A3*) codant pour la protéine RSK2, qui, en condition physiologique, a la capacité de phosphoryler la PLD1, qui, à son tour, hydrolyse la PtdCho en PA. Ainsi, lorsque la protéine RSK2 est mutée, la PtdCho n'est plus hydrolysée en PA, entraînant une absence de PA, qui serait à l'origine de l'absence de fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique (Zeniou-Meyer *et al.*, 2010).

Ainsi, le rôle de la voie de sécrétion régulée est montré dans de nombreuses pathologies, faisant intervenir différentes molécules à plusieurs niveaux de cette voie de sécrétion. L'implication des molécules régissant la voie de sécrétion régulée dans différentes pathologies ne cesse d'évoluer avec de nouvelles études très régulières montrant à quel point leur rôle dans les différents troubles doit être important. Il est donc essentiel de comprendre les différents mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de la voie de sécrétion régulée pour pouvoir comprendre au mieux le rôle de ces différentes molécules et leurs liens en conditions physiologiques et physiopathologiques pour permettre à terme une meilleure prise en charge des patients.



# Conclusion et Perspectives



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

La compréhension des mécanismes permettant la mise en place de la voie de sécrétion régulée au sein des cellules neuroendocrines est essentielle pour appréhender l'origine des dérégulations rencontrées dans un certain nombre de pathologies en lien avec un défaut de la sécrétion hormonale. Dans ce contexte, mes travaux de thèse s'inscrivent dans un projet visant à comprendre le rôle de la CgA et à identifier ses partenaires moléculaires dans le contrôle de la sécrétion hormonale. En effet, mes travaux ont donc porté sur 2 axes de recherche, le premier étant l'étude du rôle du complexe acto-myosine 1b et le deuxième l'étude de l'interaction de la CgA avec les lipides de la membrane du TGN dans la formation des GS, organites clés permettant la libération hormonale.

Dans mon équipe d'accueil, une étude a montré que l'expression de la CgA dans les cellules non-endocrines COS7 est suffisante pour induire la formation de structures vésiculaires ayant les caractéristiques de GS (Montéro-Hadjadje *et al.*, 2009 ; Elias *et al.*, 2012). L'analyse par spectrométrie de masse du protéome des granules formés suite à l'expression de la CgA a permis d'identifier plusieurs protéines cytosoliques ayant ou non un rôle déjà établi dans la voie de sécrétion régulée des cellules neuroendocrines. Parmi les protéines au rôle encore inconnu, nous nous sommes intéressés à la myosine 1b et à l'actine au regard de leur implication dans la formation de compartiments à partir de la membrane golgienne dans les cellules non-endocrines HeLa (Almeida *et al.*, 2011). Nos travaux sur des cellules neuroendocrines PC12 nous ont permis de mettre en évidence que le complexe acto-myosine 1b est impliqué dans les stades précoces de la granulogénèse en participant au bourgeonnement des GS. Des études complémentaires sont nécessaires pour établir les mécanismes moléculaires permettant le recrutement du complexe acto-myo1b à la membrane du TGN pour initier le bourgeonnement et la formation des GS.

Le bourgeonnement des GS étant dépendant des réarrangements au niveau de la membrane du TGN, le deuxième axe de ma thèse a porté sur l'étude de la capacité de la CgA à interagir avec les lipides membranaires. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une liaison privilégiée de la CgA avec l'acide phosphatidique, qui s'est avérée essentielle au bourgeonnement des GS contenant la CgA. De manière intéressante, l'analyse par spectrométrie de masse du lipidome des membranes granulaire et golgienne a révélé un enrichissement de la membrane des GS



en acide phosphatidique. Bien qu'il existe de nombreuses espèces d'acide phosphatidique au sein d'une cellule, la comparaison du lipidome des GS de cellules PC12 avec celui des GS des cellules COS7-CgA a révélé une composition semblable. Ces résultats placent donc encore une fois la CgA au cœur de l'acquisition de la compétence endocrine. Nous avons également montré que l'inhibition de la production de PA entraîne une diminution du nombre de GS ainsi qu'une augmentation de la sécrétion basale de CgA, probablement liée à une fuite vers la voie de sécrétion constitutive. Ainsi, ces résultats révèlent que le PA est un lipide crucial dans l'initiation du bourgeonnement des GS contenant la CgA et, par conséquent, dans la mise en place de la voie de sécrétion régulée. La suite du projet, se concentre actuellement sur la recherche du domaine d'interaction de la CgA avec le PA.

D'autre part, en collaboration avec l'équipe du Pr P.Y. Renard (CNRS UMR 6014, Mont-Saint-Aignan), la CgA a été couplée à l'Alexa 488, afin de visualiser l'interaction entre la CgA et le PA sur des modèles de liposomes géants (giant unilamellar vesicles ou GUVs). Ces modèles nous permettront également de mesurer l'interaction entre le PA et la CgA–Alexa 488 par spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS), technique détectant les variations d'intensité de fluorescence consécutives à l'interaction entre la CgA fluorescente et le PA au niveau de la membrane des GUVs.

Afin d'étudier cette interaction à l'échelle de la membrane golgienne au sein de cellules neurosécrétrices vivantes, il nous faut développer un PA qui s'insère à la membrane golgienne et qui permette d'y mesurer l'interaction CgA-PA. Dans le cadre de la collaboration établie avec les organo-chimistes de l'UMR 6014 CNRS COBRA (Mont-Saint-Aignan), des sondes PA biocompatibles sont en cours de synthèse. Les analogues des différentes espèces de PA synthétisés seront caractérisés *in vitro* sur des GUVs à l'aide de protéines recombinantes interagissant avec ces PA afin de tester l'efficacité et la biocompatibilité de ces sondes suite à leur incorporation dans la cellule vivante. Ces sondes possèdent une fonction azoture qui permettra de greffer différents groupements. Le greffage de groupements fluorescents permettra de vérifier la perméabilité cellulaire et la biodistribution de ces analogues de PA. Le greffage de groupements photoactivables permettra, suite à une illumination ciblée, d'induire des interactions covalentes entre les analogues de PA situés à la membrane golgienne et les protéines avoisinantes. Ainsi nous pourrons déterminer par spectrométrie de masse si la CgA fait partie des protéines interagissant avec le PA.

En parallèle, des analyses à l'aide d'un microscope à force atomique (AFM) de la formation de microdomaines suite à l'interaction de la CgA avec le PA sont en cours. En effet, les GUVs enrichis en PA permettront la formation de bicouches supportées sur lesquelles seront analysés les effets de l'addition de CgA. La composition de la membrane des GUVs pourra s'approcher de la composition de la membrane golgienne afin de renforcer la caractérisation de l'interaction entre la CgA et le PA dans des conditions physiologiques.

Pour la suite du projet, en collaboration avec l'équipe du Dr Nicolas Vitale (UPR 3212 CNRS, Strasbourg), il est envisagé par mon équipe d'accueil d'acquérir des souris possédant une inactivation du gène *PLD1* (*knock-out*). L'analyse des cellules de la médullosurrénale de ces souris est envisagée afin de déterminer si l'absence de PLD1, et par conséquent l'absence de PA généré par cette voie, ont des répercussions sur la localisation de la CgA dans ces cellules. Les cellules chromaffines pourront être mises en culture, afin d'étudier leur morphologie subcellulaire ou encore de mesurer leur capacité sécrétoire. Il est également envisagé de réaliser des xénogreffes de cellules PC12, cellules chromaffines tumorales, sur ces souris KO PLD1, différentes études ayant montré que l'inactivation de PLD1 ainsi que le traitement avec un inhibiteur pharmacologique de la PLD entraînent une diminution de la néovascularisation, de la croissance des tumeurs ainsi que du développement métastatique suite à la xénogreffe de cellules tumorales chez la souris (Chen *et al.*, 2012 ; Kang *et al.*, 2015). Le phénotype des cellules tumorales pourra être comparé avant et après traitement afin de déterminer si l'effet de la PLD1 est médié par la régulation de la sécrétion neuroendocrine.

Cette thèse a contribué à la compréhension des mécanismes d'action de la CgA dans le contrôle de la formation des granules de sécrétion. L'élucidation des mécanismes moléculaires ainsi que de la chronologie des événements impliqués dans la mise en place de la voie de sécrétion régulée dans un contexte physiologique et pathologique est un enjeu important pour le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prise en charge des patients atteints de troubles liés à la sécrétion hormonale, tels que les tumeurs neuroendocrines, l'hypertension artérielle et des maladies métaboliques comme le diabète, qui constituent des problèmes de santé publique majeurs.



# Références bibliographiques



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

### A

- Aardal S, Helle KB, Elsayed S, Reed RK, Serck-Hanssen G (1993) Vasostatins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *J Neuroendocrinol* 5:405–412
- Ahras M, Otto GP, Tooze SA (2006) Synaptotagmin IV is necessary for the maturation of secretory granules in PC12 cells. *J Cell Biol* 173:241–251
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Transport from the Trans Golgi Network to the Cell Exterior: Exocytosis.
- Almeida CG, Yamada A, Tenza D, Louvard D, Raposo G, Coudrier E (2011) Myosin 1b promotes the formation of post-Golgi carriers by regulating actin assembly and membrane remodelling at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* 13:779–789
- Anouar Y, Benie T, De Monti M, Counis R, Duval J (1991) Estradiol negatively regulates secretogranin II and chromogranin A messenger ribonucleic acid levels in the female rat pituitary but not in the adrenal. *Endocrinology* 129:2393–2399
- Arnaoutova I, Cawley NX, Patel N, Kim T, Rathod T, Loh YP (2008) Aquaporin 1 is important for maintaining secretory granule biogenesis in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 22:1924–1934
- Arnaoutova I, Smith AM, Coates LC, Sharpe JC, Dhanvantari S, Snell CR, Birch NP, Loh YP (2003) The prohormone processing enzyme PC3 is a lipid raft-associated transmembrane protein. *Biochemistry* 42:10445–10455
- Asensio CS, Sirkis DW, Edwards RH (2010) RNAi screen identifies a role for adaptor protein AP-3 in sorting to the regulated secretory pathway. *The Journal of Cell Biology* 191:1173–1187
- Asensio CS, Sirkis DW, Maas JW, Egami K, To T-L, Brodsky FM, Shu X, Cheng Y, Edwards RH (2013) Self-Assembly of VPS41 Promotes Sorting Required for Biogenesis of the Regulated Secretory Pathway. *Developmental Cell* 27:425–437
- Assadi M, Sharpe JC, Snell C, Loh YP (2004) The C-terminus of prohormone convertase 2 is sufficient and necessary for Raft association and sorting to the regulated secretory pathway. *Biochemistry* 43:7798–7807
- Aunis D, García AG (1981) Correlation between catecholamine secretion from bovine isolated chromaffin cells and [3H]-ouabain binding to plasma membranes. *Br J Pharmacol* 72:31–40

### B

- Bacia K, Schwille P, Kurzchalia T (2005) Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3272–3277

- Bader M-F, 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
- Baker RW, Hughson FM (2016) Chaperoning SNARE assembly and disassembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:465–479
- Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK, Fischer-Colbrie R, Loh YP, Salton SRJ (2011) The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev* 32:755–797
- Beck R, Sun Z, Adolf F, Rutz C, Bassler J, Wild K, Sinning I, Hurt E, Brügger B, Béthune J, Wieland F (2008) Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11731–11736
- Blashko G (1967) Structure and function of chromaffin cells. *Farmakol Toksikol* 30:3–7
- Blois A, Holmsen H, Martino G, Corti A, Metz-Boutigue M-H, Helle KB (2006) Interactions of chromogranin A-derived vasostatsins and monolayers of phosphatidylserine, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Regul Pept* 134:30–37
- Boulatnikov I, Lisle RCD (2004) Binding of the Golgi Sorting Receptor Muclin to Pancreatic Zymogens through Sulfated O-linked Oligosaccharides. *J Biol Chem* 279:40918–40926
- Brechler V, Chu WN, Baxter JD, Thibault G, Reudelhuber TL (1996) A protease processing site is essential for prorenin sorting to the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* 271:20636–20640
- Bretscher A (1999) Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr Opin Cell Biol* 11:109–116
- Brunger AT, Cipriano DJ, Diao J (2015) Towards reconstitution of membrane fusion mediated by SNAREs and other synaptic proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 50:231–241
- Bundgaard JR, Birkedal H, Rehfeld JF (2004) Progastrin Is Directed to the Regulated Secretory Pathway by Synergistically Acting Basic and Acidic Motifs. *J Biol Chem* 279:5488–5493
- Burgess J, Jauregui M, Tan J, Rollins J, Lallet S, Leventis PA, Boulianne GL, Chang HC, Borgne RL, Krämer H, Brill JA (2011) AP-1 and clathrin are essential for secretory granule biogenesis in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* 22:2094–2105
- Burgoyne RD, Morgan A (2003) Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83:581–632

## C

- Cao M, Mao Z, Kam C, Xiao N, Cao X, Shen C, Cheng KKY, Xu A, Lee K-M, Jiang L, Xia J (2013) PICK1 and ICA69 Control Insulin Granule Trafficking and Their Deficiencies Lead to Impaired Glucose Tolerance. *PLOS Biology* 11:e1001541
- Carmon O, Laguerre F, Jeandel L, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (2017) Chromogranins as Molecular Coordinators at the Crossroads between Hormone Aggregation and Secretory

Granule Biogenesis. Chromogranins: from Cell Biology to Physiology and Biomedicine. Springer, Cham, pp 39–48

Caro LG, Palade GE (1964) Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell. *J Cell Biol* 20:473–495

Cawley NX, Normant E, Chen A, Loh YP (2000) Oligomerization of pro-opiomelanocortin is independent of pH, calcium and the sorting signal for the regulated secretory pathway. *FEBS Letters* 481:37–41

Cawley NX, Zhou J, Hill JM, Abebe D, Romboz S, Yanik T, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Loh YP (2004) The Carboxypeptidase E Knockout Mouse Exhibits Endocrinological and Behavioral Deficits. *Endocrinology* 145:5807–5819

Chanat E (1993) [Mechanism of sorting of secretory proteins and formation of secretory granules in neuroendocrine cells]. *C R Seances Soc Biol Fil* 187:697–725

Chapman ER (2008) How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu Rev Biochem* 77:615–641

Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, Knight D, Gerke V, Bader M-F (2005) Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 16:1108–1119

Chen Q, Hongu T, Sato T, Zhang Y, Ali W, Cavallo J-A, van der Velden A, Tian H, Di Paolo G, Nieswandt B, Kanaho Y, Frohman MA (2012) Key roles for the lipid signaling enzyme phospholipase d1 in the tumor microenvironment during tumor angiogenesis and metastasis. *Sci Signal* 5:ra79

Chen Y, Rao F, Rodriguez-Flores JL, Mahata M, Fung MM, Stridsberg M, Vaingankar SM, Wen G, Salem RM, Das M, Cockburn MG, Schork NJ, Ziegler MG, Hamilton BA, Mahata SK, Taupenot L, O'Connor DT (2008) Naturally occurring human genetic variation in the 3'-untranslated region of the secretory protein chromogranin A is associated with autonomic blood pressure regulation and hypertension in a sex-dependent fashion. *J Am Coll Cardiol* 52:1468–1481

Chen YG, Siddhanta A, Austin CD, Hammond SM, Sung TC, Frohman MA, Morris AJ, Shields D (1997) Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 138:495–504

Cho G-W, Kim M-H, Chai Y-G, Gilmor ML, Levey AI, Hersch LB (2000) Phosphorylation of the Rat Vesicular Acetylcholine Transporter. *J Biol Chem* 275:19942–19948

Chu WN, Baxter JD, Reudelhuber TL (1990) A Targeting Sequence for Dense Secretory Granules Resides in the Active Renin Protein Moiety of Human Preprorenin. *Mol Endocrinol* 4:1905–1913

Colombo B, Curnis F, Foglieni C, Monno A, Arrigoni G, Corti A (2002) Chromogranin A expression in neoplastic cells affects tumor growth and morphogenesis in mouse models. *Cancer Res* 62:941–946



- Cook SJ, Wakelam MJ (1992) Epidermal growth factor increases sn-1,2-diacylglycerol levels and activates phospholipase D-catalysed phosphatidylcholine breakdown in Swiss 3T3 cells in the absence of inositol-lipid hydrolysis. *Biochem J* 285 (Pt 1):247–253
- Cool DR, Fenger M, Snell CR, Loh YP (1995) Identification of the Sorting Signal Motif within Pro-opiomelanocortin for the Regulated Secretory Pathway. *J Biol Chem* 270:8723–8729
- Cool DR, Normant E, Shen F, Chen H-C, Pannell L, Zhang Y, Loh YP (1997) Carboxypeptidase E Is a Regulated Secretory Pathway Sorting Receptor: Genetic Obliteration Leads to Endocrine Disorders in Cpefat Mice. *Cell* 88:73–83
- Corti A, Marcucci F, Bachetti T (2018) Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. *Pflugers Arch* 470:199–210
- Coupland RE (1954) Observations on the chromaffin reaction. *J Anat* 88:142–151
- Courel M, El Yamani F-Z, Alexandre D, El Fatemi H, Delestre C, Montero-Hadjadje M, Tazi F, Amarti A, Magoul R, Chartrel N, Anouar Y (2014) Secretogranin II is overexpressed in advanced prostate cancer and promotes the neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Eur J Cancer* 50:3039–3049
- Courel M, Rodemer C, Nguyen ST, Pance A, Jackson AP, O'connor DT, Taupenot L (2006) Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells: identification of a granulogenic determinant in the secretory prohormone chromogranin A. *J Biol Chem* 281:38038–38051
- Cowley DJ, Moore YR, Darling DS, Joyce PB, Gorr SU (2000) N- and C-terminal domains direct cell type-specific sorting of chromogranin A to secretory granules. *J Biol Chem* 275:7743–7748
- Crump CM, Xiang Y, Thomas L, Gu F, Austin C, Tooze SA, Thomas G (2001) PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic. *EMBO J* 20:2191–2201
- Cruz-Garcia D, Ortega-Bellido M, Scarpa M, Villeneuve J, Jovic M, Porzner M, Balla T, Seufferlein T, Malhotra V (2013) Recruitment of arfaptins to the trans-Golgi network by PI(4)P and their involvement in cargo export. *EMBO J* 32:1717–1729

## D

- D'amico MA, Ghinassi B, Izzicupo P, Manzoli L, Di Baldassarre A (2014) Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. *Endocr Connect* 3:R45-54
- Dannies PS (2012) Prolactin and Growth Hormone Aggregates in Secretory Granules: The Need to Understand the Structure of the Aggregate. *Endocr Rev* 33:254–270
- Darchen F, Senyshyn J, Brondyk WH, Taatjes DJ, Holz RW, Henry JP, Denizot JP, Macara IG (1995) The GTPase Rab3a is associated with large dense core vesicles in bovine chromaffin cells and rat PC12 cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 4):1639–1649
- De Matteis MA, Luini A (2008) Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:273–284

- Delestre-Delacour C, Carmon O, Laguerre F, Estay-Ahumada C, Courel M, Elias S, Jeandel L, Rayo MV, Peinado JR, Sengmanivong L, Gasman S, Coudrier E, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (2017) Myosin 1b and F-actin are involved in the control of secretory granule biogenesis. *Sci Rep* 7:5172
- Demaurex N, Furuya W, D'Souza S, Bonifacino JS, Grinstein S (1998) Mechanism of Acidification of the trans-Golgi Network (TGN) in situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J Biol Chem* 273:2044–2051
- Desnos C, Schonn J-S, Huet S, Tran VS, El-Amraoui A, Raposo G, Fanget I, Chapuis C, Ménasché G, de Saint Basile G, Petit C, Cribier S, Henry J-P, Darchen F (2003) Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J Cell Biol* 163:559–570
- Dhanvantari S, Arnaoutova I, Snell CR, Steinbach PJ, Hammond K, Caputo GA, London E, Loh YP (2002) Carboxypeptidase E, a Prohormone Sorting Receptor, Is Anchored to Secretory Granules *via* a C-Terminal Transmembrane Insertion. *Biochemistry* 41:52–60
- Dhanvantari S, Loh YP (2000) Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *J Biol Chem* 275:29887–29893
- Dhanvantari S, Shen F-S, Adams T, Snell CR, Zhang C, Mackin RB, Morris SJ, Loh YP (2003) Disruption of a Receptor-Mediated Mechanism for Intracellular Sorting of Proinsulin in Familial Hyperproinsulinemia. *Mol Endocrinol* 17:1856–1867
- Diao J, Grob P, Cipriano DJ, Kyoung M, Zhang Y, Shah S, Nguyen A, Padolina M, Srivastava A, Vrljic M, Shah A, Nogales E, Chu S, Brunger AT (2012) Synaptic proteins promote calcium-triggered fast transition from point contact to full fusion. *Elife* 1:e00109
- Dikeakos JD, Di Lello P, Lacombe M-J, Ghirlando R, Legault P, Reudelhuber TL, Omichinski JG (2009) Functional and structural characterization of a dense core secretory granule sorting domain from the PC1/3 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7408–7413
- Dikeakos JD, Reudelhuber TL (2007) Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out. *J Cell Biol* 177:191–196
- Dittie AS, Hajibagheri N, Tooze SA (1996) The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor. *J Cell Biol* 132:523–536
- Dittie AS, Thomas L, Thomas G, Tooze SA (1997) Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* 16:4859–4870
- Dondossola E, Gasparri A, Bachi A, Longhi R, Metz-Boutigue M-H, Tota B, Helle KB, Curnis F, Corti A (2010) Role of vasostatin-1 C-terminal region in fibroblast cell adhesion. *Cell Mol Life Sci* 67:2107–2118
- Dubois T, Paléotti O, Mironov AA, Fraisier V, Stradal TEB, De Matteis MA, Franco M, Chavrier P (2005) Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics. *Nat Cell Biol* 7:353–364

## E

- Edwards SL, Charlie NK, Richmond JE, Hegermann J, Eimer S, Miller KG (2009) Impaired dense core vesicle maturation in *Caenorhabditis elegans* mutants lacking Rab2. *J Cell Biol* 186:881–895
- Elias S, Delestre C, Courel M, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (2010) Chromogranin A as a crucial factor in the sorting of peptide hormones to secretory granules. *Cell Mol Neurobiol* 30:1189–1195
- Elias S, Delestre C, Ory S, Marais S, Courel M, Vazquez-Martinez R, Bernard S, Coquet L, Malagon MM, Driouich A, Chan P, Gasman S, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (2012) Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. *Endocrinology* 153:4444–4456
- Emr S, Glick BS, Linstedt AD, Lippincott-Schwartz J, Luini A, Malhotra V, Marsh BJ, Nakano A, Pfeffer SR, Rabouille C, Rothman JE, Warren G, Wieland FT (2009) Journeys through the Golgi—taking stock in a new era. *J Cell Biol* 187:449–453
- Eskeland NL, Zhou A, Dinh TQ, Wu H, Parmer RJ, Mains RE, O'Connor DT (1996) Chromogranin A processing and secretion: specific role of endogenous and exogenous prohormone convertases in the regulated secretory pathway. *J Clin Invest* 98:148–156

## F

- Fei H, Grygoruk A, Brooks ES, Chen A, Krantz DE (2008) Trafficking of Vesicular Neurotransmitter Transporters. *Traffic* 9:1425–1436
- Feliciangeli S, Kitabgi P, Bidard J-N (2001) The Role of Dibasic Residues in Prohormone Sorting to the Regulated Secretory Pathway a study with proneurotensin. *J Biol Chem* 276:6140–6150
- Fischer-Colbrie R, Laslop A, Kirchmair R (1995) Secretogranin II: molecular properties, regulation of biosynthesis and processing to the neuropeptide secretoneurin. *Prog Neurobiol* 46:49–70
- Fisher P, Ungar D (2016) Bridging the Gap between Glycosylation and Vesicle Traffic. *Front Cell Dev Biol* 4:15
- Freyberg Z, Sweeney D, Siddhanta A, Bourgoïn S, Frohman M, Shields D (2001) Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12:943–955
- Fucini RV, Navarrete A, Vadakkan C, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Stamnes M (2000) Activated ADP-ribosylation factor assembles distinct pools of actin on golgi membranes. *J Biol Chem* 275:18824–18829
- Futerman AH, Riezman H (2005) The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* 15:312–318

## G

- Garwicz D, Lindmark A, Gullberg U (1995) Human Cathepsin G Lacking Functional Glycosylation Site Is Proteolytically Processed and Targeted for Storage in Granules after Transfection to the Rat Basophilic/Mast Cell Line RBL or the Murine Myeloid Cell Line 32D. *J Biol Chem* 270:28413–28418
- Gasman S, Chasserot-Golaz S, Hubert P, Aunis D, Bader MF (1998) Identification of a potential effector pathway for the trimeric Go protein associated with secretory granules. Go stimulates a granule-bound phosphatidylinositol 4-kinase by activating RhoA in chromaffin cells. *J Biol Chem* 273:16913–16920
- Gasman S, Chasserot-Golaz S, Malacombe M, Way M, Bader M-F (2004) Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol Biol Cell* 15:520–531
- Gauthier DJ, Sobota JA, Ferraro F, Mains RE, Lazure C (2008) Flow cytometry-assisted purification and proteomic analysis of the corticotropes dense-core secretory granules. *Proteomics* 8:3848–3861
- Gehart H, Goginashvili A, Beck R, Morvan J, Erbs E, Formentini I, De Matteis MA, Schwab Y, Wieland FT, Ricci R (2012) The BAR Domain Protein Arfaptin-1 Controls Secretory Granule Biogenesis at the trans-Golgi Network. *Developmental Cell* 23:756–768
- Godi A, Santone I, Pertile P, Devarajan P, Stabach PR, Morrow JS, Di Tullio G, Polishchuk R, Petrucci TC, Luini A, De Matteis MA (1998) ADP ribosylation factor regulates spectrin binding to the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8607–8612
- Gondré-Lewis MC, Park JJ, Loh YP (2012) Chapter Two - Cellular Mechanisms for the Biogenesis and Transport of Synaptic and Dense-Core Vesicles. In: Jeon K.W. (eds) *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp 27–115
- Gondré-Lewis MC, Petrache HI, Wassif CA, Harries D, Parsegian A, Porter FD, Loh YP (2006) Abnormal sterols in cholesterol-deficiency diseases cause secretory granule malformation and decreased membrane curvature. *J Cell Sci* 119:1876–1885
- Guérin M, Guillemot J, Thouënnon E, Pierre A, El-Yamani F-Z, Montero-Hadjadje M, Dubessy C, Magoul R, Lihrmann I, Anouar Y, Yon L (2010) Granins and their derived peptides in normal and tumoral chromaffin tissue: Implications for the diagnosis and prognosis of pheochromocytoma. *Regul Pept* 165:21–29
- Guillemot J, Anouar Y, Montero-Hadjadje M, Grouzmann E, Grumolato L, Roshmaninho-Salgado J, Turquier V, Duparc C, Lefebvre H, Plouin P-F, Klein M, Muresan M, Chow BKC, Vaudry H, Yon L (2006) Circulating EM66 is a highly sensitive marker for the diagnosis and follow-up of pheochromocytoma. *Int J Cancer* 118:2003–2012
- Guillemot J, Guérin M, Thouënnon E, Montéro-Hadjadje M, Leprince J, Lefebvre H, Klein M, Muresan M, Anouar Y, Yon L (2014) Characterization and plasma measurement of the WE-14 peptide in patients with pheochromocytoma. *PLoS ONE* 9:e88698

## H

- Han L, Suda M, Tsuzuki K, Wang R, Ohe Y, Hirai H, Watanabe T, Takeuchi T, Hosaka M (2008) A large form of secretogranin III functions as a sorting receptor for chromogranin A aggregates in PC12 cells. *Mol Endocrinol* 22:1935–1949
- Hatsuzawa K, Lang T, Fasshauer D, Bruns D, Jahn R (2003) The R-SNARE Motif of Tomosyn Forms SNARE Core Complexes with Syntaxin 1 and SNAP-25 and Down-regulates Exocytosis. *J Biol Chem* 278:31159–31166
- Hendy GN, Li T, Girard M, Feldstein RC, Mulay S, Desjardins R, Day R, Karaplis AC, Tremblay ML, Canaff L (2006) Targeted ablation of the chromogranin a (Chga) gene: normal neuroendocrine dense-core secretory granules and increased expression of other granins. *Mol Endocrinol* 20:1935–1947
- Henneberry AL, Wright MM, McMaster CR (2002) The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of Fatty Acid and lipid head group specificity. *Mol Biol Cell* 13:3148–3161
- Holst B, Madsen KL, Jansen AM, Jin C, Rickhag M, Lund VK, Jensen M, Bhatia V, Sørensen G, Madsen AN, Xue Z, Møller SK, Woldbye D, Qvortrup K, Haganir R, Stamou D, Kjærulff O, Gether U (2013) PICK1 Deficiency Impairs Secretory Vesicle Biogenesis and Leads to Growth Retardation and Decreased Glucose Tolerance. *PLOS Biology* 11:e1001542
- Hong W, Lev S (2014) Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends Cell Biol* 24:35–43
- Hosaka M, Suda M, Sakai Y, Izumi T, Watanabe T, Takeuchi T (2004) Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J Biol Chem* 279:3627–3634
- Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Kato T, Takeuchi T (2005) Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. *J Cell Sci* 118:4785–4795
- Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Uchiyama Y, Takeuchi T (2002) Identification of a Chromogranin A Domain That Mediates Binding to Secretogranin III and Targeting to Secretory Granules in Pituitary Cells and Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Mol Biol Cell* 13:3388–3399
- Hui E, Johnson CP, Yao J, Dunning FM, Chapman ER (2009) Synaptotagmin-mediated bending of the target membrane is a critical step in  $\text{Ca}^{(2+)}$ -regulated fusion. *Cell* 138:709–721
- Hummer BH, Leeuw NF de, Burns C, Chen L, Joens MS, Hosford B, Fitzpatrick JAJ, Asensio CS (2017) HID-1 controls formation of large dense core vesicles by influencing cargo sorting and trans-Golgi network acidification. *Mol Biol Cell* 28:3870–3880
- Hutton JC (1982) The internal pH and membrane potential of the insulin-secretory granule. *Biochem J* 204:171–178

## I

- Iacangelo AL, Grimes M, Eiden LE (1991) The bovine chromogranin A gene: structural basis for hormone regulation and generation of biologically active peptides. *Mol Endocrinol* 5:1651–1660
- Irminger J-C, Verchere CB, Meyer K, Halban PA (1997) Proinsulin Targeting to the Regulated Pathway Is Not Impaired in Carboxypeptidase E-deficient Cpe fat /Cpe fat Mice. *J Biol Chem* 272:27532–27534

## J

- Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs — engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:631
- Ji L, Wu H-T, Qin X-Y, Lan R (2017) Dissecting carboxypeptidase E: properties, functions and pathophysiological roles in disease. *Endocr Connect* 6:R18–R38
- Johannes L, Perez F, Laran-Chich MP, Henry JP, Darchen F (1996) Characterization of the interaction of the monomeric GTP-binding protein Rab3a with geranylgeranyl transferase II. *Eur J Biochem* 239:362–368
- Jutras I, Seidah NG, Reudelhuber TL (2000) A Predicted  $\alpha$ -Helix Mediates Targeting of the Proprotein Convertase PC1 to the Regulated Secretory Pathway. *J Biol Chem* 275:40337–40343

## K

- Kakhlon O, Sakya P, Larijani B, Watson R, Tooze SA (2006) GGA function is required for maturation of neuroendocrine secretory granules. *EMBO J* 25:1590–1602
- Kang DW, Choi CY, Cho Y-H, Tian H, Di Paolo G, Choi K-Y, Min DS (2015) Targeting phospholipase D1 attenuates intestinal tumorigenesis by controlling  $\beta$ -catenin signaling in cancer-initiating cells. *J Exp Med* 212:1219–1237
- Kang YK, Yoo SH (1997) Identification of the secretory vesicle membrane binding region of chromogranin A. *FEBS Lett* 404:87–90
- Kassas N, Tanguy E, Thahouly T, Fouillen L, Heintz D, Chasserot-Golaz S, Bader M-F, Grant NJ, Vitale N (2017) Comparative Characterization of Phosphatidic Acid Sensors and Their Localization during Frustrated Phagocytosis. *J Biol Chem* 292:4266–4279
- Kelly RB (1985) Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230:25–32
- Kim T, Gondré-Lewis MC, Arnaoutova I, Loh YP (2006) Dense-Core Secretory Granule Biogenesis. *Physiology* 21:124–133
- Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP (2001) Chromogranin A, an “on/off” switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* 106:499–509

- Komaba S, Coluccio LM (2010) Localization of myosin 1b to actin protrusions requires phosphoinositide binding. *J Biol Chem* 285:27686–27693
- Konecki DS, Benedum UM, Gerdes HH, Huttner WB (1987) The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin. *J Biol Chem* 262:17026–17030
- Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KNJ (2003) Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic* 4:162–174
- Koshimizu H, Kim T, Cawley NX, Loh YP (2010) Reprint of: Chromogranin A: a new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis. *Regul Pept* 165:95–101
- Krantz DE, Peter D, Liu Y, Edwards RH (1997) Phosphorylation of a Vesicular Monoamine Transporter by Casein Kinase II. *J Biol Chem* 272:6752–6759
- Krantz DE, Waites C, Oorschot V, Liu Y, Wilson RI, Tan PK, Klumperman J, Edwards RH (2000) A Phosphorylation Site Regulates Sorting of the Vesicular Acetylcholine Transporter to Dense Core Vesicles. *J Cell Biol* 149:379–396
- Kuliawat R, Arvan P (1994) Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic beta-cells. *J Cell Biol* 126:77–86
- Kyoung M, Srivastava A, Zhang Y, Diao J, Vrljic M, Grob P, Nogales E, Chu S, Brunger AT (2011) In vitro system capable of differentiating fast Ca<sup>2+</sup>-triggered content mixing from lipid exchange for mechanistic studies of neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:E304-313
- L**
- Lai Y, Choi UB, Zhang Y, Zhao M, Pfuetzner RA, Wang AL, Diao J, Brunger AT (2016) N-terminal domain of complexin independently activates calcium-triggered fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:E4698-4707
- Lankat-Buttgereit B, Müller S, Schmidt H, Parhofer KG, Gress TM, Göke R (2008) Knockdown of Pcd4 results in induction of proprotein convertase 1/3 and potent secretion of chromogranin A and secretogranin II in a neuroendocrine cell line. *Biol Cell* 100:703–715
- Le Douarin NM (1990) Cell Lineage Segregation during Neural Crest Ontogeny. *Annals of the New York Academy of Sciences* 599:131–140
- Loh YP, Maldonado A, Zhang C, Tam WH, Cawley N (2002) Mechanism of sorting proopiomelanocortin and proenkephalin to the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells. *Ann N Y Acad Sci* 971:416–425
- Lopez JP, Turner JR, Philipson LH (2010) Glucose-induced ERM protein activation and translocation regulates insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E772-785
- Lou H, Kim S-K, Zaitsev E, Snell CR, Lu B, Loh YP (2005) Sorting and Activity-Dependent Secretion of BDNF Require Interaction of a Specific Motif with the Sorting Receptor Carboxypeptidase E. *Neuron* 45:245–255

- Lou H, Park JJ, Cawley NX, Sarcon A, Sun L, Adams T, Loh YP (2010) Carboxypeptidase E cytoplasmic tail mediates localization of synaptic vesicles to the pre-active zone in hypothalamic pre-synaptic terminals. *J Neurochem* 114:886–896
- Lou H, Park JJ, Phillips A, Loh YP (2013)  $\gamma$ -Adducin promotes process outgrowth and secretory protein exit from the Golgi apparatus. *J Mol Neurosci* 49:1–10
- Lou H, Smith AM, Coates LC, Cawley NX, Peng Loh Y, Birch NP (2007) The transmembrane domain of the prohormone convertase PC3: A key motif for targeting to the regulated secretory pathway. *Mol Cell Endocrinol* 267:17–25
- Lui-Roberts WWY, Collinson LM, Hewlett LJ, Michaux G, Cutler DF (2005) An AP-1/clathrin coat plays a novel and essential role in forming the Weibel-Palade bodies of endothelial cells. *The Journal of Cell Biology* 170:627–636
- Lundmark R, Doherty GJ, Vallis Y, Peter BJ, McMahon HT (2008) Arf family GTP loading is activated by, and generates, positive membrane curvature. *Biochem J* 414:189–194

## M

- Machen TE, Leigh MJ, Taylor C, Kimura T, Asano S, Moore H-PH (2003) pH of TGN and recycling endosomes of H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-transfected HEK-293 cells: implications for pH regulation in the secretory pathway. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285:C205–C214
- Mahapatra NR, Mahata M, O'Connor DT, Mahata SK (2003) Secretin activation of chromogranin A gene transcription. Identification of the signaling pathways in cis and in trans. *J Biol Chem* 278:19986–19994
- Mahapatra NR, O'Connor DT, Vaingankar SM, Hikim APS, Mahata M, Ray S, Staite E, Wu H, Gu Y, Dalton N, Kennedy BP, Ziegler MG, Ross J, Mahata SK (2005) Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J Clin Invest* 115:1942–1952
- Mahata SK, Mahapatra NR, Mahata M, O'Connor DT (2002) Neuroendocrine cell type-specific and inducible expression of chromogranin/secretogranin genes: crucial promoter motifs. *Ann N Y Acad Sci* 971:27–38
- Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, Yoo SH, Taupenot L, Wu H, Gill BM, Parmer RJ (1997) Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest* 100:1623–1633
- Majewski Ł, Sobczak M, Redowicz MJ (2010) Myosin VI is associated with secretory granules and is present in the nucleus in adrenal medulla chromaffin cells. *Acta Biochim Pol* 57:109–114
- Makowski SL, Tran TT, Field SJ (2017) Emerging themes of regulation at the Golgi. *Curr Opin Cell Biol* 45:17–23
- Malacombe M, Bader M-F, Gasman S (2006) Exocytosis in neuroendocrine cells: New tasks for actin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763:1175–1183



- Malosio ML, Giordano T, Laslop A, Meldolesi J (2004) Dense-core granules: a specific hallmark of the neuronal/neurosecretory cell phenotype. *J Cell Sci* 117:743–749
- Marquèze B, Berton F, Seagar M (2000) Synaptotagmins in membrane traffic: Which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie* 82:409–420
- Martens S, Kozlov MM, McMahon HT (2007) How synaptotagmin promotes membrane fusion. *Science* 316:1205–1208
- Meldolesi J, Chieriegatti E, Luisa Malosio M (2004) Requirements for the identification of dense-core granules. *Trends in Cell Biology* 14:13–19
- Meunier FA, Gutiérrez LM (2016) Captivating New Roles of F-Actin Cortex in Exocytosis and Bulk Endocytosis in Neurosecretory Cells. *Trends Neurosci* 39:605–613
- Mills IG, Praefcke GJK, Vallis Y, Peter BJ, Olesen LE, Gallop JL, Butler PJG, Evans PR, McMahon HT (2003) EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. *J Cell Biol* 160:213–222
- Miserey-Lenkei S, Chalancon G, Bardin S, Formstecher E, Goud B, Echard A (2010) Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 12:645–654
- Montero-Hadjadje M, Elias S, Chevalier L, Benard M, Tanguy Y, Turquier V, Galas L, Yon L, Malagon MM, Driouich A, Gasman S, Anouar Y (2009) Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides. *J Biol Chem* 284:12420–12431
- Montero-Hadjadje M, Vaingankar S, Elias S, Tostivint H, Mahata SK, Anouar Y (2008) Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf)* 192:309–324
- Montesinos MS, Machado JD, Camacho M, Diaz J, Morales YG, Alvarez de la Rosa D, Carmona E, Castañeyra A, Viveros OH, O'Connor DT, Mahata SK, Borges R (2008) The crucial role of chromogranins in storage and exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse. *J Neurosci* 28:3350–3358
- Montuenga LM, Gumbre L, Burrell MA, Bodegas ME, Calvo A, Sola JJ, Sesma P, Villaro AC (2003) The diffuse endocrine system: from embryogenesis to carcinogenesis. *Prog Histochem Cytochem* 38:155–272
- Moore H-PH (1987) Factors Controlling Packaging of Peptide Hormones into Secretory Granules. *Annals of the New York Academy of Sciences* 493:50–61
- Mosley CA, Taupenot L, Biswas N, Taulane JP, Olson NH, Vaingankar SM, Wen G, Schork NJ, Ziegler MG, Mahata SK, O'Connor DT (2007) Biogenesis of the secretory granule: chromogranin A coiled-coil structure results in unusual physical properties and suggests a mechanism for granule core condensation. *Biochemistry* 46:10999–11012

Mouland AJ, Bevan S, White JH, Hendy GN (1994) Human chromogranin A gene. Molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell-specific expression. *J Biol Chem* 269:6918–6926

Mulcahy LR, Barker AJ, Nillni EA (2006) Disruption of disulfide bond formation alters the trafficking of prothyrotropin releasing hormone (proTRH)-derived peptides. *Regulatory Peptides* 133:123–133

## N

Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH (1995) Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nature Genetics* 10:135

## O

O'Connor DT, Bernstein KN (1984) Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *N Engl J Med* 311:764–770

Orci L (1986) The insulin cell: Its cellular environment and how it processes (Pro)insulin. *Diabetes Metab Rev* 2:71–106

Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Perrelet A, Powell SK, Quinn DL, Moore HP (1987) The trans-most cisternae of the Golgi complex: a compartment for sorting of secretory and plasma membrane proteins. *Cell* 51:1039–1051

## P

Park JJ, Loh YP (2008) Minireview: How Peptide Hormone Vesicles Are Transported to the Secretion Site for Exocytosis. *Mol Endocrinol* 22:2583–2595

Pasqua T, Mahata S, Bandyopadhyay GK, Biswas A, Perkins GA, Sinha-Hikim AP, Goldstein DS, Eiden LE, Mahata SK (2016) Impact of Chromogranin A deficiency on catecholamine storage, catecholamine granule morphology and chromaffin cell energy metabolism in vivo. *Cell Tissue Res* 363:693–712

Patel S, Muallem S (2011) Acidic Ca<sup>2+</sup> stores come to the fore. *Cell Calcium* 50:109–112

Pearse AG (1969) The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem* 17:303–313

Pérez-Alvarez A, Hernández-Vivanco A, Albillos A (2010) Past, present and future of human chromaffin cells: role in physiology and therapeutics. *Cell Mol Neurobiol* 30:1407–1415

Pettitt TR, McDermott M, Saqib KM, Shimwell N, Wakelam MJ (2001) Phospholipase D1b and D2a generate structurally identical phosphatidic acid species in mammalian cells. *Biochem J* 360:707–715

Polak JM, Bloom SR (1979) The diffuse neuroendocrine system. Studies of this newly discovered controlling system in health and disease. *J Histochem Cytochem* 27:1398–1400

## R

Rao F, Wen G, Gayen JR, Das M, Vaingankar SM, Rana BK, Mahata M, Kennedy BP, Salem RM, Stridsberg M, Abel K, Smith DW, Eskin E, Schork NJ, Hamilton BA, Ziegler MG, Mahata SK, O'Connor DT (2007) Catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A (352-372) ) : naturally occurring amino acid variant Gly364Ser causes profound changes in human autonomic activity and alters risk for hypertension. *Circulation* 115:2271–2281

Rindler MJ (1998) Carboxypeptidase E, a Peripheral Membrane Protein Implicated in the Targeting of Hormones to Secretory Granules, Co-aggregates with Granule Content Proteins at Acidic pH. *J Biol Chem* 273:31180–31185

Rizo J, Xu J (2015) The Synaptic Vesicle Release Machinery. *Annu Rev Biophys* 44:339–367

Róg T, Vattulainen I (2014) Cholesterol, sphingolipids, and glycolipids: what do we know about their role in raft-like membranes? *Chem Phys Lipids* 184:82–104

Rosado JA (2011) Acidic Ca<sup>(2+)</sup> stores in platelets. *Cell Calcium* 50:168–174

Rudolf R, Salm T, Rustom A, Gerdes H-H (2001) Dynamics of Immature Secretory Granules: Role of Cytoskeletal Elements during Transport, Cortical Restriction, and F-Actin-dependent Tethering. *Mol Biol Cell* 12:1353–1365

## S

Sadakata T, Shinoda Y, Sekine Y, Saruta C, Itakura M, Takahashi M, Furuichi T (2010) Interaction of calcium-dependent activator protein for secretion 1 (CAPS1) with the class II ADP-ribosylation factor small GTPases is required for dense-core vesicle trafficking in the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 285:38710–38719

Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, Kendrick-Jones J, Buss F (2005) Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol* 169:285–295

Sahu BS, Manna PT, Edgar JR, Antrobus R, Mahata SK, Bartolomucci A, Borner GHH, Robinson MS (2017) Role of clathrin in dense core vesicle biogenesis. *Mol Biol Cell* 28:2676–2685

Santiago-Tirado FH, Bretscher A (2011) Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol* 21:515–525

Schubert T, Römer W (2015) How synthetic membrane systems contribute to the understanding of lipid-driven endocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853:2992–3005

- Shennan KI, Taylor NA, Docherty K (1994) Calcium- and pH-dependent aggregation and membrane association of the precursor of the prohormone convertase PC2. *J Biol Chem* 269:18646–18650
- Siddhanta A, Backer JM, Shields D (2000) Inhibition of phosphatidic acid synthesis alters the structure of the Golgi apparatus and inhibits secretion in endocrine cells. *J Biol Chem* 275:12023–12031
- Siddhanta A, Shields D (1998) Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J Biol Chem* 273:17995–17998
- Sirkis DW, Edwards RH, Asensio CS (2013) Widespread dysregulation of peptide hormone release in mice lacking adaptor protein AP-3. *PLoS Genet* 9:e1003812
- Sobota JA, Bäck N, Eipper BA, Mains RE (2009) Inhibitors of the V0 subunit of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase prevent segregation of lysosomal- and secretory-pathway proteins. *Journal of Cell Science* 122:3542–3553
- Stadinski BD, DeLong T, Reisdorph N, Reisdorph R, Powell RL, Armstrong M, Piganelli JD, Barbour G, Bradley B, Crawford F, Marrack P, Mahata SK, Kappler JW, Haskins K (2010) Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nat Immunol* 11:225–231
- Strub JM, Sorokine O, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH (1997) Phosphorylation and O-glycosylation sites of bovine chromogranin A from adrenal medullary chromaffin granules and their relationship with biological activities. *J Biol Chem* 272:11928–11936
- Südhof TC (2013) A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat Med* 19:1227–1231
- Südhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323:474–477
- Sugawara M, Resende JM, Moraes CM, Marquette A, Chich J-F, Metz-Boutigue M-H, Bechinger B (2010) Membrane structure and interactions of human catestatin by multidimensional solution and solid-state NMR spectroscopy. *FASEB J* 24:1737–1746
- Sumakovic M, Hegermann J, Luo L, Husson SJ, Schwarze K, Olendrowitz C, Schoofs L, Richmond J, Eimer S (2009) UNC-108/RAB-2 and its effector RIC-19 are involved in dense core vesicle maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 186:897–914
- Sun Z-P, Gong L, Huang S-H, Geng Z, Cheng L, Chen Z-Y (2011) Intracellular trafficking and secretion of cerebral dopamine neurotrophic factor in neurosecretory cells. *Journal of Neurochemistry* 117:121–132

## T

- Takiyuddin MA, Brown MR, Dinh TQ, Cervenka JH, Braun SD, Parmer RJ, Kennedy B, O'Connor DT (1994) Sympatho-adrenal secretion in humans: factors governing catecholamine and storage vesicle peptide co-release. *J Auton Pharmacol* 14:187–200

- Tang K, Wu H, Mahata SK, O'Connor DT (1998) A crucial role for the mitogen-activated protein kinase pathway in nicotinic cholinergic signaling to secretory protein transcription in pheochromocytoma cells. *Mol Pharmacol* 54:59–69
- Tartakoff A, Vassalli P, Détraz M (1978) Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. *J Cell Biol* 79:694–707
- Tatemoto K, Efendić S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, Barchas JD (1986) Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature* 324:476–478
- Taupenot L, Harper KL, Mahapatra NR, Parmer RJ, Mahata SK, O'Connor DT (2002) Identification of a novel sorting determinant for the regulated pathway in the secretory protein chromogranin A. *J Cell Sci* 115:4827–4841
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003) The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 348:1134–1149
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2005) Role of H<sup>+</sup>-ATPase-mediated Acidification in Sorting and Release of the Regulated Secretory Protein Chromogranin a evidence for a vesiculogenic function. *J Biol Chem* 280:3885–3897
- Taupenot L, Mahata SK, Wu H, O'Connor DT (1998) Peptidergic activation of transcription and secretion in chromaffin cells. Cis and trans signaling determinants of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP). *J Clin Invest* 101:863–876
- Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol* 2:42–49
- Tomatis VM, Papadopulos A, Malintan NT, Martin S, Wallis T, Gormal RS, Kendrick-Jones J, Buss F, Meunier FA (2013) Myosin VI small insert isoform maintains exocytosis by tethering secretory granules to the cortical actin. *J Cell Biol* 200:301–320
- Tooze J, Tooze SA (1986) Clathrin-coated vesicular transport of secretory proteins during the formation of ACTH-containing secretory granules in AtT20 cells. *J Cell Biol* 103:839–850
- Tooze SA (1998) Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1404:231–244
- Tooze SA, Martens GJ, Huttner WB (2001) Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol* 11:116–122
- Topalidou I, Cattin-Ortolá J, Pappas AL, Cooper K, Merrihew GE, MacCoss MJ, Ailion M (2016) The EARP Complex and Its Interactor EIPR-1 Are Required for Cargo Sorting to Dense-Core Vesicles. *PLOS Genetics* 12:e1006074
- Torii S, Saito N, Kawano A, Zhao S, Izumi T, Takeuchi T (2005) Cytoplasmic Transport Signal is Involved in Phogrin Targeting and Localization to Secretory Granules. *Traffic* 6:1213–1224

Trifaró JM, Rosé SD, Marcu MG (2000) Scinderin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent actin filament severing protein that controls cortical actin network dynamics during secretion. *Neurochem Res* 25:133–144

Turquier V, Vaudry H, Jégou S, Anouar Y (1999) Frog chromogranin A messenger ribonucleic acid encodes three highly conserved peptides. Coordinate regulation of proopiomelanocortin and chromogranin A gene expression in the pars intermedia of the pituitary during background color adaptation. *Endocrinology* 140:4104–4112

## U

Urbé S, Page LJ, Tooze SA (1998) Homotypic Fusion of Immature Secretory Granules during Maturation in a Cell-free Assay. *J Cell Biol* 143:1831–1844

## V

Valenzuela R RV, Valenzuela A AV (2013) Overview About Lipid Structure.

Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112–124

Vitale N, Chasserot-Golaz S, Bailly Y, Morinaga N, Frohman MA, 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

## W

Wang T, Li L, Hong W (2017) SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic* 18:767–775

Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388:593–598

Wang Y, Thiele C, Huttner WB (2000) Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* 1:952–962

Wegrzyn J, Lee J, Neveu JM, Lane WS, Hook V (2007) Proteomics of neuroendocrine secretory vesicles reveal distinct functional systems for biosynthesis and exocytosis of peptide hormones and neurotransmitters. *J Proteome Res* 6:1652–1665

Wen PJ, Osborne SL, Zanin M, Low PC, Wang H-TA, Schoenwaelder SM, Jackson SP, Wedlich-Söldner R, Vanhaesebroeck B, Keating DJ, Meunier FA (2011) Phosphatidylinositol(4,5) biphosphate coordinates actin-mediated mobilization and translocation of secretory vesicles to the plasma membrane of chromaffin cells. *Nat Commun* 2:491

Wendler F, Tooze S (2001) Syntaxin 6: The Promiscuous Behaviour of a SNARE Protein. *Traffic* 2:606–611

Winkler H, Fischer-Colbrie R (1992) The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 49:497–528

Wu HJ, Rozansky DJ, Parmer RJ, Gill BM, O'Connor DT (1991) Structure and function of the chromogranin A gene. Clues to evolution and tissue-specific expression. *J Biol Chem* 266:13130–13134

Wu MM, Grabe M, Adams S, Tsien RY, Moore H-PH, Machen TE (2001) Mechanisms of pH Regulation in the Regulated Secretory Pathway. *J Biol Chem* 276:33027–33035

## X

Xie S, Naslavsky N, Caplan S (2015) Diacylglycerol kinases in membrane trafficking. *Cell Logist* 5:e1078431

## Y

Yamada A, Mamane A, Lee-Tin-Wah J, Di Cicco A, Prévost C, Lévy D, Joanny J-F, Coudrier E, Bassereau P (2014) Catch-bond behaviour facilitates membrane tubulation by non-processive myosin 1b. *Nat Commun* 5:3624

Yano H, Ninan I, Zhang H, Milner TA, Arancio O, Chao MV (2006) BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex. *Nat Neurosci* 9:1009–1018

Yao J, Erickson JD, Hersh LB (2004) Protein Kinase A Affects Trafficking of the Vesicular Monoamine Transporters in PC12 Cells. *Traffic* 5:1006–1016

Yao J, Hersh LB (2007) The vesicular monoamine transporter 2 contains trafficking signals in both its N-glycosylation and C-terminal domains. *Journal of Neurochemistry* 100:1387–1396

Yeaman C, Ayala MI, Wright JR, Bard F, Bossard C, Ang A, Maeda Y, Seufferlein T, Mellman I, Nelson WJ, Malhotra V (2004) Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* 6:106–112

Yoo SH (2000) Coupling of the IP3 receptor/Ca<sup>2+</sup> channel with Ca<sup>2+</sup> storage proteins chromogranins A and B in secretory granules. *Trends Neurosci* 23:424–428

Yoo SH (2011) Role of secretory granules in inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling: From phytoplankton to mammals. *Cell Calcium* 50:175–183

Yoo SH, Hur YS (2012) Enrichment of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca<sup>2+</sup> channels in secretory granules and essential roles of chromogranins. *Cell Calcium* 51:342–350

Yoo SH, Lewis MS (1993) Dimerization and tetramerization properties of the C-terminal region of chromogranin A: a thermodynamic analysis. *Biochemistry* 32:8816–8822

Yu I-M, Hughson FM (2010) Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:137–156

## Z

- Zeniou-Meyer M, Zabari N, Ashery U, Chasserot-Golaz S, Haeberlé A-M, Demais V, Bailly Y, Gottfried I, Nakanishi H, Neiman AM, Du G, Frohman MA, Bader M-F, 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, Gambino F, Ammar M-R, Humeau Y, Vitale N (2010) The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 and neurosecretion. *Cell Mol Neurobiol* 30:1401–1406
- Zhang C-F, Dhanvantari S, Lou H, Loh YP (2003) Sorting of carboxypeptidase E to the regulated secretory pathway requires interaction of its transmembrane domain with lipid rafts. *Biochem J* 369:453–460
- Zhang D, Lavaux T, Voegeli A-C, Lavigne T, Castelain V, Meyer N, Sapin R, Aunis D, Metz-Boutigue M-H, Schneider F (2008) Prognostic value of chromogranin A at admission in critically ill patients: a cohort study in a medical intensive care unit. *Clin Chem* 54:1497–1503
- Zhou K, Blom T (2015) Trafficking and Functions of Bioactive Sphingolipids: Lessons from Cells and Model Membranes. *Lipid Insights* 8:11–20