

La V-ATPase : un senseur de pH contrôlant la fusion membranaire

Nicolas Morel¹, Sandrine Poëa-Guyon¹, Mohamed-Raafet Ammar², Nicolas Vitale²

ATPases à protons vacuolaires et exocytose régulée des vésicules synaptiques

Les ATPases à protons vacuolaires (V-ATPases) accumulent des protons dans de nombreux compartiments intracellulaires tels que le réseau trans-Golgi (*trans-Golgi network*), les endosomes, les lysosomes et les vésicules de sécrétion ou les vésicules synaptiques. L'acidification de ces organites est nécessaire à une multitude de processus biologiques (maturation, adressage ou recyclage de nombreuses protéines membranaires notamment) ainsi qu'au remplissage en médiateurs des vésicules de sécrétion et des vésicules synaptiques. La V-ATPase est constituée d'une quinzaine de sous-unités différentes organisées en un domaine membranaire V0 qui transporte les protons, et un domaine cytosolique V1 portant l'activité ATPasique. Ces deux domaines peuvent se dissocier de façon réversible, inactivant l'enzyme et démasquant V0. Le processus qui conduit à la libération des médiateurs contenus dans les vésicules de sécrétion ou les vésicules synaptiques, appelé exocytose régulée, se déroule en plusieurs étapes. Les vésicules sont d'abord amarrées à la membrane plasmique (*tethering et docking*), puis activées (*priming*). Après activation par un influx de calcium, l'ouverture et l'expansion d'un canal traversant les deux membranes accolées (pore de fusion) aboutissent enfin à la fusion des membranes vésiculaire et plasmique, libérant le contenu vésiculaire dans l'espace synaptique [1]. Malgré

l'identification depuis plus de deux décennies du rôle crucial des protéines SNARE (*SNAP [soluble NSF attachment protein] receptor*) dans les étapes de *docking* des vésicules synaptiques [1, 2], la compréhension du processus de fusion membranaire en lui-même reste très parcellaire. En particulier, la nature lipidique, protéique ou protéolipidique du pore de fusion reste sujette à débat. Des données anciennes, obtenues par des approches de reconstitution fonctionnelle [3, 4], avaient suggéré que la sous-unité c de V0, ou V0 lui-même, pouvait participer à la constitution d'un tel pore de fusion membranaire. Un rôle de V0 dans la fusion membranaire et l'exocytose, indépendant du transport des protons, a aussi été suggéré par des approches génétiques chez la levure [5], la drosophile [6], et *C. elegans* [7]. Cependant, comme de nombreuses fonctions cellulaires dépendent des gradients de protons générés par les V-ATPases, il est difficile de distinguer par des approches classiques un éventuel effet direct de l'inactivation de V0 sur l'exocytose d'effets indirects résultant de l'inactivation prolongée du transport des protons. Et cette double fonction potentielle de la V-ATPase reste encore largement ignorée.

Double rôle des domaines V0 et V1 de la V-ATPase dans le cycle des vésicules synaptiques

Pour évaluer plus spécifiquement l'importance du domaine V0 dans le processus de fusion membranaire, nous avons procédé à la photo-inactivation

¹ Centre de neurosciences Paris-Sud, CNRS, UMR 8195 et Université Paris-Sud, F-91405 Orsay, France ;

² Institut des neurosciences cellulaires et intégratives ; CNRS - UPR 3212 et Université de Strasbourg, 5, rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France.

vitalen@inci-cnrs.unistra.fr

aiguë de V0 (*via* la sous-unité a1), ou de V1 (*via* la sous-unité A portant le site ATPasique) par la technique dite du CALI (*chromophore-assisted light inactivation*) [8]. Cette approche permet de distinguer les effets rapides de l'inactivation de la sous-unité ciblée, d'effets à plus long terme sur l'acidification et le remplissage en neurotransmetteurs des vésicules. Ainsi la photo-inactivation de la sous-unité a1 de V0 conduit à une altération rapide (en 2 à 3 min) de la neurotransmission de neurones en culture et de la libération des catécholamines par les cellules chromaffines [9]. Cette altération est associée à une modification des paramètres cinétiques des événements de fusion unitaire, sans changement du contenu vésiculaire en catécholamines. Au contraire, la photo-inactivation de la sous-unité catalytique A n'entraîne pas d'effets rapides sur la neurotransmission, mais uniquement des effets retardés (après 30 min) sur la quantité de catécholamines libérée, sans affecter les paramètres cinétiques des événements d'exocytose [9]. Ces effets retardés sont probablement la conséquence d'une altération progressive du contenu granulaire en catécholamines, à la suite de l'inactivation de la sous-unité A et donc de la perte de l'activité de transport de proton. La technique du CALI nous a donc permis de distinguer très clairement les effets de la photo-inactivation aiguë de V0, qui surviennent bien avant l'apparition des effets de l'inactivation de la sous-unité catalytique A et du transport de protons [9]. Ces résultats montrent que V0



contrôle la fusion de manière indépendante de son action dans le transport de protons, et suggèrent que V0 pourrait stabiliser le pore de fusion et favoriser le mélange des lipides membranaires lors de l'étape ultime de l'exocytose [4].

La V-ATPase : un senseur du remplissage des vésicules

Bien que le rôle de V0 dans la fusion membranaire soit indépendant de la fonction de transport de protons, le trafic de nombreux organites intracellulaires semble contrôlé par leur pH interne. En manipulant le pH intra-vésiculaire par différents ionophores, bases faibles ou inhibiteurs spécifiques de la V-ATPase, nous avons pu montrer que le pH intravésiculaire régule l'exocytose des granules chromaffines, probablement en changeant la conformation de V0 [9]. Ainsi, à pH intravésiculaire acide (voisin de 5,5), V0 adopte une conformation entraînant la dissociation du domaine V1, et permissive pour l'exocytose (Figure 1B). En revanche, à pH neutre, V0 et V1 sont associés, la V-ATPase pompe les protons, permettant de restaurer le gradient de protons, et V0 est incompetent pour l'exocytose (Figure 1A). Ainsi, il est tentant de proposer que, le remplissage des vésicules synaptiques en neurotransmetteurs consommant le gradient de protons, celui-ci ne devient optimum pour l'exocytose que lorsque les vésicules sont pleines de neurotransmetteurs et de protons. La V-ATPase serait alors un senseur du pH intravésiculaire qui, par la conformation permissive de V0 et la dissociation de V1, renseignerait le mécanisme d'exocytose sur le contenu en neurotransmetteurs de la vésicule, évitant l'exocytose de vésicules en cours de remplissage. V0 interagit avec les protéines SNARE [1] et pourrait donc jouer un rôle régulateur lors de l'étape de *docking* des vésicules synaptiques (Figure 1C), avant de réintervenir lors de la fusion membranaire (Figure 1D). De manière intéressante, la dissociation de V1 rend aussi V0 disponible pour une

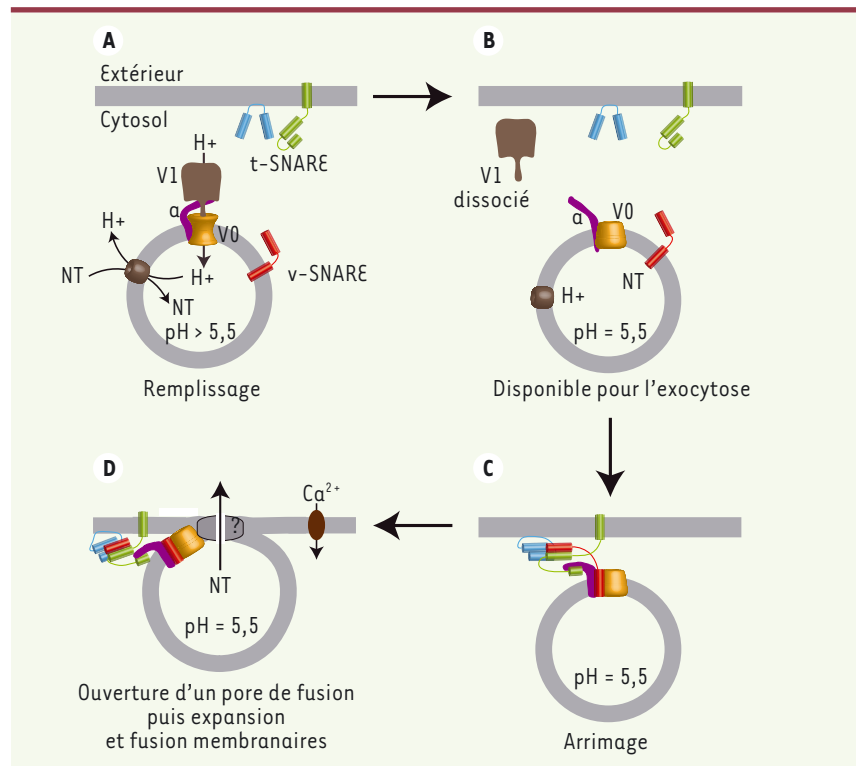


Figure 1. Modèle du mécanisme permettant à la V-ATPase de réguler la neurosécrétion. À pH > 5,5, le complexe V1-V0 permet le remplissage en neurotransmetteurs (NT) de la vésicule en générant un gradient de protons (A). La dissociation du complexe V1-V0 à pH acide (B) rend disponible V0 pour une interaction avec la v-SNARE VAMP-2 (rouge) et la t-SNARE syntaxine-1 (vert), qui favorise ainsi la formation de complexes entre VAMP-2, la syntaxine-1 et la SNAP-25 (bleue), et permet l'arrimage de la vésicule synaptique à la membrane plasmique (C). Lors de la stimulation, V0 régule la formation et/ou l'ouverture d'un pore de fusion (D) dont l'expansion va conduire à la fusion membranaire.

interaction avec d'autres régulateurs potentiels de l'exocytose. Parmi ces derniers, on peut citer la triade ARNO-ARF6 (ADP-ribosylation factor)-PLD (phospholipase D) qui module la production de lipides fusogéniques au niveau du site de fusion membranaire [10], ce qui pourrait contribuer à réguler la formation et la vitesse d'expansion du pore de fusion.

Conclusion

Nos travaux ont permis de révéler un lien entre le remplissage des vésicules synaptiques en neurotransmetteurs et leur disponibilité à l'exocytose. De manière remarquable, il n'existe qu'une ou deux copies de V-ATPase par vésicule synaptique ; ce qui les place à une

position stratégique pour recruter des éléments essentiels à la formation d'un site d'exocytose fonctionnel. L'approche de photo-inactivation rapide par CALI devrait maintenant permettre d'étudier plus en détail par quels mécanismes la V-ATPase joue successivement un rôle de senseur du contenu vésiculaire renseignant la machinerie d'exocytose, puis de régulateur de la stabilité du pore de fusion et du mélange des lipides membranaires lors de la phase terminale de l'exocytose. ♦

V-ATPase is a pH sensor controlling vesicular membrane fusion

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.



RÉFÉRENCES

1. El Far O, Seagar M. SNARE, V-ATPase and neurotransmission. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 28-31.
2. Galli T, Kuster A, Taresté D. Nobel Prize in Physiology and Medicine 2013 – an award for the discovery of the actors and fundamental molecular mechanisms of intracellular vesicle trafficking. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 1055-8.
3. Israel M, Morel N, Lesbats B, Birman S, Manaranche R. Purification of a presynaptic membrane protein that mediates a calcium-dependent translocation of acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 9226-30.
4. Peters C, Bayer MJ, Buhler S, et al. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* 2001 ; 409 : 581-8.
5. Strasser B, Iwaszkiewicz J, Michielin O, Mayer A. The V-ATPase proteolipid cylinder promotes the lipid-mixing stage of SNARE-dependent fusion of yeast vacuoles. *EMBO J* 2011 ; 30 : 4126-41.
6. Hiesinger PR, Fayyazuddin A, Mehta SQ, et al. The v-ATPase V(0) subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. *Cell* 2005 ; 121 : 607-20.
7. Liegeois S, Benedetto A, Garnier JM, et al. The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 2006 ; 173 : 949-61.
8. Tour O, Meijer RM, Zacharias DA, Adams SR, Tsien RY. Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation. *Nat Biotechnol* 2003 ; 21 : 1505-8.
9. Poëa-Guyon S, Ammar MR, Erard M, et al. The V-ATPase membrane domain is a sensor of granular pH that controls the exocytotic machinery. *J Cell Biol* 2013 ; 203 : 283-98.
10. Ammar MR, Kassas N, Chasserot-Golaz S, et al. Lipids in regulated exocytosis: what are they doing? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013 ; 4 : 125.

NOUVELLE

Instabilité des jonctions endothéliales : biomarqueurs du remodelage vasculaire

Laurence Bouillet^{1,2,3,4}, Adama Sidibé⁶, Helena Polena^{1,2,3}, Tiphaine Mannic¹, Alban Deroux⁴, Barry Stidder^{1,2,3}, Olivier Vittecoq⁵, Isabelle Vilgrain^{1,2,3}

Le système vasculaire chez les adultes est majoritairement quiescent mis à part dans le système reproducteur femelle et au cours des processus de cicatrisation et d'angiogenèse tumorale, où apparaissent des remodelages vasculaires. L'intérieur des vaisseaux sanguins est tapissé d'une monocouche de cellules endothéliales – ou endothélium vasculaire – dont l'intégrité est assurée par une forte cohésion entre les cellules via des structures adhésives situées au niveau des contacts intercellulaires : les jonctions endothéliales. L'organisation de ces dernières est essentielle à l'homéostasie vasculaire. La protéine majeure des jonctions interendothéliales est la VE-cadhérine (VE pour *vascular endothelial*), protéine transmembranaire qui comporte un large domaine extracellulaire, dont les propriétés adhésives permettent des interactions homophiliques entre molécules de VE-cadhérine, et un domaine intracellulaire qui se lie aux composants du cytosquelette et solidifie la cohésion du tapis cellulaire. Le rôle de la VE-cadhérine dans l'angiogenèse a été démontré dans les années 1995-99, et les recherches sur ses modifications post-traductionnelles en physiopathologie

vasculaire se poursuivent actuellement [1].

Phosphorylation/déphosphorylation

Les processus de phosphorylation/déphosphorylation des protéines sont des réactions enzymatiques majeures impliquées dans la prolifération, la migration, et la différenciation cellulaires. Ainsi, dans les cellules endothéliales, la modification covalente des protéines des jonctions adhésives participe à la déstabilisation de l'endothélium vasculaire au cours de processus inflammatoires et/ou angiogéniques. En situation physiologique, ces processus sont régulés par un équilibre entre protéine kinases et phosphatases. Nous avons montré qu'un domaine spécifique de la VE-cadhérine (LY⁶⁸⁵AQV) est un substrat privilégié pour la tyrosine kinase Src ; l'environnement de séquence de ce domaine correspond à un site consensus pour les kinases de cette famille (YxxV/I/L). De façon intéressante, ce motif est unique à la VE-cadhérine humaine. En réponse au VEGF (*vascular endothelial growth factor*), puissant agent angiogénique et inducteur de perméabilité, c'est ce site qui est phosphorylé *in vitro* [2].

In vivo, ce processus existe également dans des organes soumis à une angiogenèse physiologique tels que l'utérus et l'ovaire, dont l'évolution cyclique est soumise à une régulation hormonale et dépendante de la production locale de VEGF [3]. Le rôle de ce domaine spécifique est étudié actuellement par analyse d'une souris *knock-in* pour la VE-cadhérine Y685F [4]. Depuis quelques années, nous avons observé que, au plan cinétique, cette modification covalente de la VE-cadhérine par phosphorylation précède le clivage de son domaine extracellulaire, appelé VE-cadhérine soluble (sVE). Actuellement en cours d'étude, le lien mécanistique entre les deux processus pourrait être un changement de conformation de la protéine VE-cadhérine après l'incorporation des charges phosphate qui rend la protéine plus susceptible à la protéolyse. Ces données ont abouti au développement, par le laboratoire, d'un dosage par ELISA de sVE présent dans le sang des patients ; la méthode et son application ont été brevetées par l'Inserm et l'université de Grenoble [5].

¹ Inserm, Unité 1036, biologie du cancer et de l'infection, 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France ;

² UJF-Grenoble 1, biologie du cancer et de l'infection, Grenoble, F-38041, France ;

³ CEA, DSV/iRTSV, biologie du cancer et de l'infection, Grenoble, F-38054, France ;

⁴ centre hospitalier universitaire de Grenoble, département de médecine interne, centre national de référence des angiœdèmes (CREAK), Grenoble, F-38043, France ;

⁵ centre hospitalier universitaire de Rouen, département de rhumatologie, Inserm U905 et CIC1404, Institut de recherche et d'innovation en biomédecine, université de Rouen, F-76031 Rouen Cedex, France ;

⁶ adresse actuelle : université de Genève, CH-1211, Genève, Suisse.

ivilgrain@cea.fr