

Canaux calciques et complexe SNARE en interaction pour l'exocytose des neurotransmetteurs

La libération des neurotransmetteurs est essentielle à la communication intercellulaire dans les systèmes neuronaux et neuromusculaires. Il s'agit d'une exocytose réglée qui est spécifiquement déclenchée par l'arrivée d'un potentiel d'action et l'entrée calcique. Cette exocytose réglée peut être, soit rapide, et dans ce cas elle utilise pour support des petites vésicules synaptiques (SSV, *small synaptic vesicles*), soit lente, et relayée alors par des vésicules à cœur dense (LDCV, *large dense core vesicles*). Souvent ces vésicules se distinguent par leurs contenus, les SSV contenant des neurotransmetteurs de faibles poids moléculaires (comme glutamate, acétylcholine, GABA) alors que les LDCV contiennent souvent des peptides, voire des protéines. L'objectif de cette *mini-synthèse* est de passer en revue les derniers développements sur le rôle dans les processus d'exocytose des canaux calciques dépendants du potentiel et, plus particulièrement, d'examiner le rôle des protéines liant les canaux calciques aux vésicules synaptiques. L'analyse du rôle des canaux calciques sera limitée aux différentes étapes du cycle vésiculaire concernées: (1) l'amarrage des vésicules entrant en contact physique avec la membrane de la zone active; (2) l'amorçage au cours duquel les vésicules sont préparées pour l'exocytose et (3) la fusion des vésicules à la membrane plasmique qui conduit à la libération des médiateurs chimiques dans l'espace synaptique.

La transmission synaptique de type chimique: l'hypothèse SNARE

L'hypothèse SNARE a été avancée pour expliquer la reconnaissance entre une vésicule de transport et

son compartiment cible (*m/s n° 6-7, vol. 9, p. 802*); par exemple, la membrane de la vésicule synaptique et la membrane plasmique. Les protéines appelées SNARE, pour *SNAP receptors* (SNAP étant l'acronyme de *soluble NSF attachment protein*), sont responsables de ce processus de reconnaissance [1]. Elles se divisent en deux catégories: une protéine vésiculaire (vSNARE), la synaptobrevine (encore appelée VAMP, *vesicle associated membrane protein*), et deux protéines cibles de la membrane plasmique (*target SNARE*, tSNARE), la syntaxine et la SNAP-25. L'assemblage ternaire VAMP-syntaxine-SNAP-25 forme un complexe protéique ayant une mobilité de 7 S, résistant à la dissociation par le SDS. La formation de ce complexe favorise alors la construction d'un édifice moléculaire encore plus important par la fixation des SNAP. De même, l'association SNAP-SNARE crée un site de forte affinité pour la NSF (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*), une ATPase de 76 kDa sous forme trimérique, parachevant ainsi la formation du complexe 20 S. Les résultats expérimentaux démontrent aussi que l'association de NSF aux SNAP accroît sa capacité d'hydrolyser l'ATP. En retour, l'hydrolyse d'ATP serait capable de provoquer la dissociation du complexe 20 S. L'hypothèse SNARE classique, telle qu'elle a été formulée originellement, s'articulerait de la manière suivante: (1) la reconnaissance mutuelle des vSNARE et tSNARE permet l'amarrage des vésicules de transport au niveau du compartiment cible; (2) l'amarrage des SNAP et de NSF sur les SNARE suivrait pour former un complexe 20 S nécessaire au processus de fusion; (3) la fusion des vésicules est provoquée par l'hydrolyse de l'ATP par le NSF; (4) l'activité

catalytique de la NSF permet la dissociation du complexe SNARE, provoquant ainsi les réarrangements moléculaires présidant à la fusion membranaire.

Un certain nombre de contraintes moléculaires et fonctionnelles ont nécessité une actualisation importante du modèle SNARE originel. Les fonctions des protéines SNARE sont en réalité plus étendues que prévues. Le groupe de Rothman (New York, NY, USA) [2] a récemment montré que les protéines SNARE sont nécessaires non seulement à l'appariement de deux compartiments membranaires (vésiculaire et synaptique) mais aussi à la fusion des deux bicouches lipidiques entre elles. D'autres événements-clés de la réinterprétation de l'hypothèse SNARE sont l'introduction au modèle d'un détecteur de calcium, inhibiteur du processus fusogène, et la co-localisation de ce complexe avec les canaux calcium dépendants du potentiel. Enfin, de nombreuses protéines semblent jouer des rôles régulateurs de la fonction et de l'assemblage de ce complexe. C'est le cas, par exemple, des protéines Rab qui semblent gérer l'assemblage des complexes SNARE [3].

Le calcium intracellulaire est un maillon essentiel du processus d'exocytose

• *Espaces fonctionnels*

L'analyse fonctionnelle de la neurotransmission rapide a permis de définir d'autres éléments de la chaîne d'exocytose, structurés en domaines spatiaux de fonctions différentes (espaces fonctionnels) et impliquant le calcium. On a ainsi pu définir plusieurs espaces fonctionnels contigus: un espace efficace d'augmentation de la concentration intracellulaire en

calcium autour du canal calcique dépendant du potentiel, un espace d'ancrage de la vésicule à la membrane plasmique, un espace régulateur sensible à l'élévation de calcium et, enfin, un espace gouvernant le processus d'exocytose (figure 1). C'est la compréhension de l'organisation moléculaire de ces différents espaces fonctionnels qui a considérablement évolué au cours de ces dernières années puisque des interactions moléculaires directes ont été mises en évidence entre le canal calcique et des protéines constitutives de l'espace régulateur, détecteur de calcium, et de l'espace d'ancrage. Ces interactions semblent contribuer au mécanisme de libération vésiculaire.

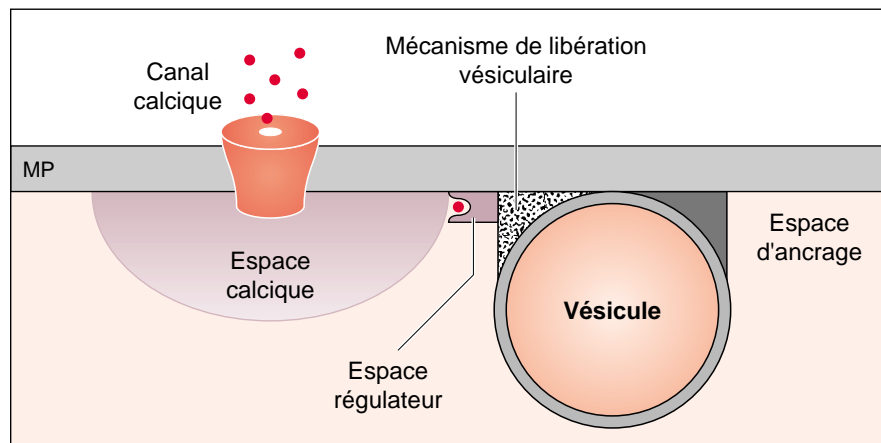


Figure 1. **Espaces fonctionnels liant la source d'entrée calcique au processus de libération vésiculaire.** L'espace calcique se présente sous la forme d'un gradient de concentration de 100 à 10 μM et s'étend dans un rayon de 20 à 50 nm autour du canal.

• Sources d'élévation du calcium cytoplasmique

La découverte de plusieurs toxines capables de bloquer l'influx calcique a permis non seulement de développer une classification pharmacologique des canaux calciques dépendants du potentiel mais surtout d'appréhender leurs fonctions cellulaires. C'est ainsi que le canal de type N, sensible à l' ω -conotoxin GVIA, une toxine isolée du venin d'un cone marin (*conus geographicus*), a été le premier canal dont l'implication dans la transmission chimique ait été reconnue [4]. En réalité, la libération rapide des neurotransmetteurs dans le système nerveux central dépend aussi largement des canaux de type P/Q, sensible à l' ω -agatoxine IVA [5]. Enfin, l'implication des canaux de type L semble reconnue dans la neurosécrétion lente des cellules neuroendocrines [6] et neuronales. Il est proposé que la libération des SSV serait prise en charge par les canaux de type N et P/Q, et celle des LDCV, plus particulièrement mais non exclusivement, par les canaux de type L.

Les voies d'élévation du calcium mobilisé semblent critiques au bon fonctionnement de la machinerie de l'exocytose. Ainsi, dans les cellules chromaffines la libération du calcium des stocks intracellulaires s'avère inefficace pour libérer des neuromédiateurs [7]. La problématique soulevée ici est loin d'être résolue et les partisans d'un rôle du calcium des stocks intracellu-

laire dans les processus d'exocytose se réjouiront des récentes observations qui suggèrent l'existence d'une libération calcique des granules de sécrétion et des vésicules synaptiques grâce à la présence de récepteurs IP₃ (inositol trisphosphate) et ryanodine (pour revue [8]). Nul doute qu'une libération de calcium vésiculaire à partir de vésicules amarrées à la membrane plasmique remplirait les conditions spatio-temporelles de concentration calcique cytoplasmique requises pour le processus de fusion.

• Concentrations calciques efficaces

Le délai entre l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium consécutive à l'arrivée d'un potentiel d'action et la réponse post-synaptique est extrêmement bref (évalué à 200 μs) [9]. La concentration du calcium nécessaire au processus d'exocytose des SSV est supérieure à 50 μM [10]. Or, l'élévation de la concentration cytoplasmique du calcium est fortement limitée dans la durée et dans l'espace, non seulement en raison du caractère transitoire de l'activation des canaux calciques après un potentiel d'action, mais surtout à cause de la diffusion et du très fort pouvoir tampon du cytoplasme. Ces caractéristiques élémentaires font que l'espace calcique effectif ne dépasse pas un rayon de 50 nm autour du canal calcique; cet espace est défini comme un espace où la concentration intracellulaire en

calcium est capable d'activer l'espace régulateur. Ces considérations ont amené de nombreux auteurs à proposer que les espaces calcique, régulateur et d'exocytose se chevauchent et/ou sont en contiguïté physique.

• Importance du détecteur de calcium dans l'hypothèse SNARE

Les synaptotagmines I et II, des protéines de 65 kDa présentes dans l'espace présynaptique, représentent de bons candidats pour jouer le rôle de détecteur de calcium (*m/s n° 8-9, vol. 9, p. 1000*). Elles contiennent, en effet, deux domaines homologues de ceux de la protéine kinase C, C2A et C2B. Leur liaison au calcium est coopérative (3 à 6 sites de liaison) et de faible affinité (10 à 150 μM), des propriétés cohérentes avec le profil de concentration calcique requis pour l'exocytose [11]. Leur rôle dans l'exocytose rapide est bien démontré puisque la libération des neurotransmetteurs dans les terminaisons présynaptiques géantes de calamar peut être inhibée par microinjection de peptides issus de la région centrale de cette molécule [12].

Enfin, la rapidité du processus empêche d'envisager la mise en place de nouvelles interactions protéiques comme étapes intermédiaires de la fusion. Elle n'autorise que des changements de conformation des protéines impliquées [13]. Ces considérations imposent des contraintes sur le complexe SNARE des vésicules

placées en condition d'amorçage. Trois données essentielles doivent être prises en compte: (1) La vitesse d'hydrolyse de l'ATP est trop lente pour expliquer la rapidité de l'exocytose; elle ne servirait qu'à séparer les vSNARE des tSNARE à la suite d'une première fusion [2]; (2) la synaptotagmine, qui joue le rôle d'un verrou inhibiteur sensible au calcium, doit être présente dans la forme finale du complexe SNARE; (3) les fixations de α -SNAP et de synaptotagmine sur le complexe SNARE sont compétitives. Ces résultats laissent à penser que la dissociation du complexe NSF-SNAP du complexe SNARE, après hydrolyse de l'ATP, favorise la fixation de la synaptotagmine qui agit comme un inhibiteur en absence de calcium (figure 2). La conformation de la synaptotagmine est modifiée par la fixation de calcium et la liaison du domaine C2A aux phospholipides dépend du calcium. Par ce biais, la synaptotagmine jouerait un rôle essentiel dans la dernière étape de la fusion membranaire en favorisant le remodelage des phospholipides.

Interactions protéiques entre canaux calcium et complexe SNARE

• Interactions protéines SNARE-canaux calciques

L'immunoprécipitation des canaux N et P/Q, marqués par des dérivés iodés de toxines, par des anticorps anti-syntaxine, anti-SNAP-25, anti-synaptobrevine et anti-synaptotagmine, est un élément de poids dans la démonstration de l'interaction entre les différents espaces fonctionnels impliqués dans l'exocytose [14-17]. Ces différentes immunoprécipitations ne sont pas additives suggérant l'existence d'un complexe SNARE ternaire lié au canal. Ces résultats ont été affinés par la mise en évidence d'interactions directes de la plupart des protéines du complexe SNARE avec des séquences cytoplasmiques des canaux calciques présynaptiques.

La première mise en évidence d'une interaction entre protéine SNARE et canal calcique concerne la syntaxine (figure 3), et a d'ailleurs permis à

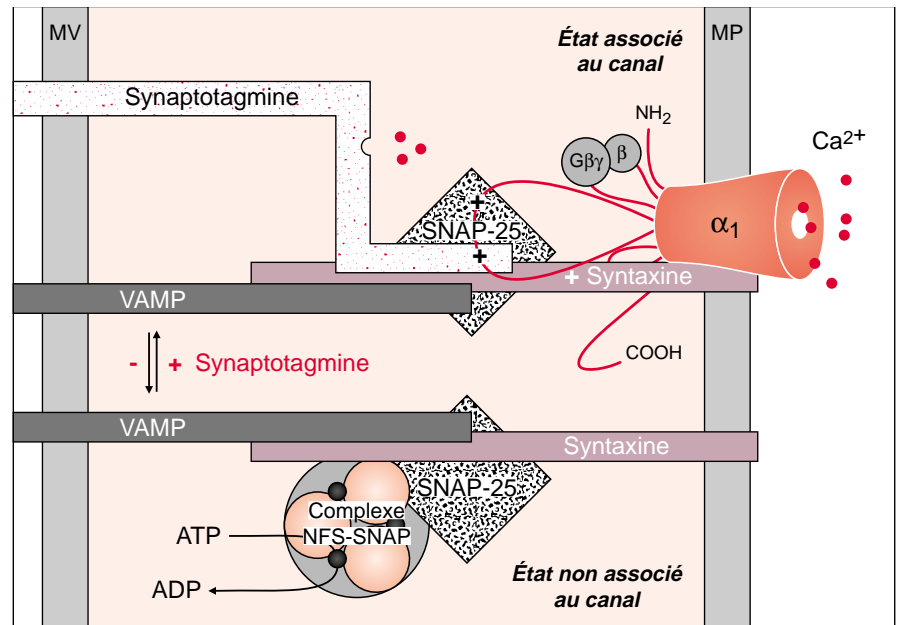


Figure 2. **État moléculaire présumé du complexe SNARE associé au canal calcique dépendant du potentiel.** L'hydrolyse de l'ATP par le NSF déstabilise l'interaction des SNAP avec les protéines SNARE (VAMP, syntaxine, SNAP-25) provoquant l'association de la synaptotagmine qui agit comme un inhibiteur de la fusion. La transition entre les deux complexes schématisés fait probablement intervenir des étapes moléculaires intermédiaires, notamment celles conduisant à l'association du complexe SNARE au canal calcique. Le complexe SNARE (syntaxine et SNAP-25), ainsi que la synaptotagmine, sont en association directe avec la boucle cytoplasmique II-III du canal (symbole +). Les interactions syntaxine/canal et synaptotagmine/canal ne semblent cependant pas pouvoir se produire simultanément. La fusion vésiculaire nécessite la levée de l'inhibition exercée par la synaptotagmine par fixation de calcium sur cette molécule. MV: membrane vésiculaire; MP: membrane plasmique.

Lévêque *et al.* (Marseille, France) de réaliser la purification du canal N [18]. Sheng *et al.* (Seattle, WA, USA) [19] démontrent que la partie carboxy-terminale de la syntaxine (acides aminés 181-288) interagit avec une séquence de 87 acides aminés dérivés de la boucle II-III de la sous-unité α_{1B} constitutive du canal N. Aucune interaction n'est détectée avec la boucle II-III de la sous-unité α_{1S} du canal L. Cette séquence de 87 acides aminés est également capable de prévenir l'interaction du canal N natif avec la syntaxine, suggérant que la boucle II-III représente le seul point d'interaction de cette protéine SNARE. Enfin, la même région de la boucle II-III de la sous-unité α_{1B} lie aussi la SNAP-25 [20] ainsi que la région C2B de la synaptotagmine I [21, 22]. La mesure des affinités de fixation révèle que c'est

la synaptotagmine qui se lie avec la plus grande affinité au canal [21, 22]. Enfin, seule l'interaction avec la syntaxine est dépendante de l'épissage alternatif auquel est soumis la boucle II-III: elle n'est présente que pour un seul variant d'épissage de la sous-unité α_{1A} (constitutive des canaux P/Q) [19, 23]. Curieusement, les interactions des protéines SNARE avec les canaux calcium semblent privilégier des domaines de fixation chevauchants de la boucle II-III de la sous-unité α_1 , ce qui interroge sur leur caractère simultané ou compétitif. Ainsi, il a été observé que les interactions syntaxine/boucle II-III [16] et syntaxine/synaptotagmine [24] impliquaient toutes deux le dernier tiers carboxy-terminal de la syntaxine. L'équipe de Seattle [21] a ainsi montré que la boucle II-III de α_{1B} et la synaptotagmine I entrent en

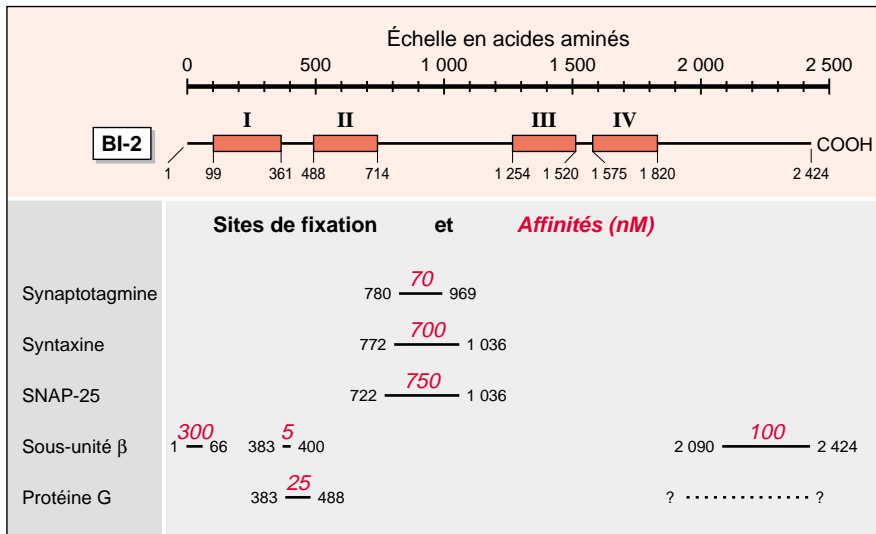


Figure 3. **Représentation schématique d'une sous-unité α_1 de canal calcium (BI-2 est un épissage alternatif de α_{1A} de lapin).** Les séquences cytoplasmiques du canal liant la synaptotagmine et les protéines SNARE (syntaxine et SNAP-25) ont été identifiées. Les résultats montrent l'existence d'un chevauchement des sites d'interactions à la base de la compétition entre la fixation de la syntaxine et celle de la synaptotagmine. À titre de comparaison, les sites de fixation de la sous-unité β du canal et du complexe $G\beta\gamma$ sont également montrés. La mesure des affinités de fixation est souvent révélatrice de l'ordre dans lequel les interactions se produisent. (D'après [34].)

compétition pour la fixation sur la syntaxine. Ce résultat indique que la syntaxine et la synaptotagmine ne peuvent pas interagir simultanément avec le canal calcium bien qu'elles fassent parties du même complexe.

• Dépendance vis-à-vis du calcium des interactions protéiques

L'exocytose dépendant du calcium, il était intéressant d'analyser la dépendance vis-à-vis du calcium des interactions protéiques décrites à ce jour. Le groupe de Catterall (Seattle, WA, USA) a montré que la liaison de syntaxine à la boucle II-III de la sous-unité α_{1B} augmente brutalement pour des concentrations de calcium comprises entre 1 et 25 μM , puis diminue pour des concentrations supérieures à 35 μM [20]. Une dépendance calcique similaire est décrite pour la fixation de SNAP-25 à la boucle II-III, ainsi que pour la fixation du complexe syntaxine/SNAP-25/VAMP au canal N natif solubilisé. L'importance de ces résultats est remise en question par l'absence de sites calcium reconnus au sein de la syntaxine, SNAP-25 et boucle II-III, et enfin par le fait que

la dépendance calcique de la fixation des protéines SNARE est fonction du variant d'épissage de la sous-unité α_1 étudiée [23]. Les résultats concernant la dépendance calcique de la fixation de synaptotagmine I à la boucle II-III, pourtant un détecteur de potentiel, sont également contrastés. La fixation de synaptotagmine ne dépend du calcium que pour un seul variant d'épissage de la sous-unité α_{1A} selon une relation bipolaire similaire à la syntaxine [21-23]. Cette dépendance calcique semble impliquer, outre la région C2B, une autre région de fixation de la synaptotagmine, la région C2A.

Le rôle central de la synaptotagmine dans la dépendance calcique de l'exocytose n'est plus à démontrer. Cependant, l'interaction de la synaptotagmine avec de nombreux autres partenaires moléculaires dépend du calcium. Il serait donc erroné de penser, au stade actuel de nos connaissances, que la dépendance calcique de l'interaction entre la synaptotagmine et la boucle II-III des sous-unités α_1 est à la base de la stimulation de l'exocytose par le calcium. A ce

titre, rappelons simplement que la synaptotagmine interagit de manière dépendante du calcium avec la syntaxine [24] et les phospholipides [25] via le domaine C2A, et avec la SNAP-25 via le domaine C2B [26]. Finalement, le domaine C2B est aussi responsable de la dimérisation de la synaptotagmine, un processus moléculaire dont le rôle fonctionnel est mal compris. L'ensemble ou partie de ces processus moléculaires peut rendre compte de la dépendance de l'exocytose vis-à-vis du calcium.

Importance fonctionnelle des interactions entre complexe SNARE et canaux calcium

L'identification de protéines SNARE en interaction avec les canaux calciques, si elle est d'un intérêt majeur, n'est pas en soi un gage de l'importance fonctionnelle des canaux calciques dans l'exocytose. De nombreux résultats expérimentaux tendent à prouver que l'interaction de protéines non constitutives du canal modifie la distribution, les réponses cellulaires et le fonctionnement biophysique des canaux ioniques.

• Effets sur le fonctionnement des canaux calciques

Les études de l'impact de l'association des protéines SNARE sur l'activité des canaux calciques sont récentes. Bezprozvanny *et al.* (Stanford, CA, USA) [27] montrent que la syntaxine inhibe l'activité des canaux N et P/Q exprimés dans l'ovocyte de xénope en stabilisant l'état inactivé des canaux. Le rôle fonctionnel de cette inhibition est hypothétique mais les auteurs proposent que la syntaxine inhibe l'entrée calcique via les canaux qui ne fixent pas de vésicules. Ce serait alors l'amarrage des vésicules qui libérerait les canaux de cette inhibition via la fixation d'autres protéines SNARE, soit à la syntaxine, soit au canal calcique lui-même. Les auteurs proposent que cette levée d'inhibition produite par l'amarrage des vésicules au complexe syntaxine-canal calcium produirait une sélectivité spatiale, limitée à la synapse, de l'entrée calcique requise pour le processus d'exocytose. Il faut

souligner l'importance privilégiée que donne cette hypothèse à la syntaxine dans les interactions protéines SNARE-canaux calcium. Tobi *et al.* (Jérusalem, Israël) [28] confirment que l'amplitude du courant N est diminuée par la syntaxine, et élargit la gamme d'action de cette molécule à des modifications cinétiques et de dépendance de l'inactivation vis-à-vis du potentiel [27, 29]. En accord avec l'hypothèse du groupe de Tsien (Stanford, CA, USA), ces auteurs démontrent surtout que la synaptotagmine a la capacité d'annihiler totalement l'action de la syntaxine alors même qu'elle est dépourvue d'action lorsqu'elle est coexprimée seule avec les canaux N. Ces informations fonctionnelles ne renseignent pas sur le mode d'action de la synaptotagmine, en particulier sur la capacité de la synaptotagmine de se lier aux canaux calciques en absence de syntaxine ou d'inhiber la fixation de cette dernière aux canaux. Cependant, il serait tentant de spéculer que la fixation de synaptotagmine, soit à la syntaxine, soit encore au canal, représente ce signal de levée d'inhibition du canal calcium complexé à la syntaxine, tel qu'il a été imaginé par le groupe de Tsien. Contrairement à la synaptotagmine, la coexpression de la SNAP-25 avec les canaux calciques modifie la régulation de l'ouverture des canaux N suggérant une interaction directe avec les canaux en absence de syntaxine. Plus intéressant encore, la SNAP-25 s'avère capable de désinhiber l'effet de la syntaxine sur l'amplitude du courant calcique, mais non de modifier les effets cinétiques et de dépendance vis-à-vis du potentiel sur l'inactivation produite par cette molécule. Ces observations sont en faveur de la formation d'un complexe ternaire canal-syntaxine-SNAP-25. Il reste à analyser les effets de la synaptotagmine sur l'action de la SNAP-25, mais il est tentant d'envisager un scénario selon lequel l'activation de la synaptotagmine aurait la capacité de dissocier le complexe SNARE du canal calcique, étape préalable à l'exocytose. Quoi qu'il en soit, ces résultats prouvent donc que : (1) les effets des protéines SNARE sur les courants calciques ne sont pas simplement addi-

tifs ; (2) des allostéries complexes peuvent se répercuter sur l'activité des canaux calciques ; et (3) les canaux calciques peuvent exister sous plusieurs états d'associations moléculaires, une protéine SNARE interagissant non seulement avec les canaux calciques mais aussi avec une autre protéine SNARE.

Bien que ces résultats sur le rôle fonctionnel des protéines SNARE soient instructifs, peu de choses semblent connues sur l'état des interactions moléculaires réelles du complexe protéines SNARE/canaux calciques impliqués dans l'exocytose, ni d'ailleurs sur l'évolution de ce complexe au cours du cycle d'exocytose. Ces données sont donc fragmentaires puisqu'elles ne rendent probablement pas compte de l'état réel du canal dans sa fonction synaptique. Des questions banales restent en suspens : (1) plusieurs complexes peuvent-ils s'associer aux canaux calciques, et (2) si oui, quels sont les répercussions fonctionnelles de ces différents complexes sur l'activité des canaux et sur l'exocytose ? Enfin, il est à parier qu'un certain nombre de ces protéines jouent également un rôle dans les processus de ciblage des canaux calciques sans rapport direct avec les processus d'exocytose. Ainsi, on a mis en évidence une interaction entre la syntaxine et les canaux CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulators*), alors que ces structures protéiques ne jouent pas de rôle précis dans l'exocytose [30]. Curieusement, comme pour les canaux N, la syntaxine diminue l'amplitude du courant chlorure produit par les canaux CFTR. Les effets de la syntaxine sont inhibés par le clivage de la toxine botulinique C1, une endoprotéase, ou par la fixation de Munc18, un ligand protéique naturel. Cette interaction semble réversible ; elle est dynamique car elle modifie activement le fonctionnement du canal CFTR. On est donc en droit de s'interroger sur le rôle fonctionnel des interactions identifiées avec les protéines SNARE ; une dualité de fonction paraît probable, une vocation à l'exocytose et une autre, impliquée dans le ciblage, par exemple.

Enfin, l'approche complémentaire de celle qui analyse les effets des

interactions protéiques SNARE sur l'activité des canaux calciques consiste à déterminer l'importance fonctionnelle en termes d'exocytose de chacune des interactions spécifiques décrites entre canaux calcium et protéines SNARE.

• Effets sur l'exocytose

La signification physiologique de l'interaction entre les canaux N et les protéines du complexe SNARE a été étudiée dans les neurones du ganglion cervical supérieur [31]. Les peptides dérivés de la boucle II-III de la sous-unité α_{1B} qui dissocient le complexe des canaux calcium inhibent aussi l'exocytose rapide déclenchée par le calcium, mais augmentent la libération asynchrone lente et la facilitation induite par des protocoles de double stimulation. Ces résultats ne sont pas sans rappeler ceux obtenus par l'injection de peptides dérivés des domaines C2 de la synaptotagmine [12] qui inhibent la libération des neurotransmetteurs dans des synapses géantes de calamar. Cette inhibition se produirait par le blocage d'une interaction avec une protéine récepteur, la syntaxine ou le canal calcium par exemple. L'inhibition de la transmission synaptique par les peptides dérivés des sites d'interaction de la boucle II-III ne passe pas par un effet fonctionnel direct sur les canaux calciques puisque l'entrée de calcium dans les cellules n'est pas modifiée. Ces résultats sont en accord avec l'idée que les vésicules synaptiques sont déplacées d'un état amorcé, prêt à fusionner rapidement, vers un état incompetent à la libération rapide et synchronisée, probablement en raison du déplacement spatial du microdomaine calcique. Ils évoquent d'une certaine manière la sécrétion réglée lente qui implique les canaux de type L, c'est-à-dire des canaux pour lesquels il n'existe pas d'interactions démontrées avec les protéines SNARE. Des conclusions similaires ont été tirées devant les résultats obtenus après l'injection d'un peptide de la boucle II-III de la sous-unité α_{1B} dans des neurones spinaux embryonnaires de Xénopes [32]. Dans l'état actuel des connaissances, ces expériences ne permettent pas de déter-

miner quelles sont les interactions qui sont affectées par l'injection d'un peptide capable de lier seulement la syntaxine, la SNAP-25 ou la synaptotagmine. Ces expériences ont cependant le mérite de montrer clairement que l'interaction du complexe SNARE avec les canaux calciques est requise pour que les neurotransmetteurs soient libérés de façon efficace par les potentiels d'action présynaptiques. Les canaux calciques sont donc à mettre sur la longue liste des protéines (synaptotagmine, syntaxine, SNAP-25, synaptobrevine) requises pour l'exocytose rapide. Dans le cas des canaux calciques, cependant, l'inhibition de la neurotransmission rapide semble être due à un blocage de l'amarrage du complexe SNARE aux canaux, et non à une perturbation directe de la machinerie d'exocytose.

Les interactions entre protéines SNARE et canal calcium ne sont pas seulement requises pour l'exocytose rapide, mais aussi dans des mécanismes physiologiques d'inhibition de l'exocytose. C'est ainsi que le traitement des neurones par la toxine botulinique C1 qui clive la syntaxine et la SNAP-25 diminue l'amplitude de la régulation inhibitrice directe du canal par les protéines G [33]. Ces résultats suggèrent l'importance du complexe SNARE, soit pour une conformation permissive du canal, soit pour sa colocalisation avec les récepteurs couplés aux protéines G. L'absence d'interactions moléculaires directes des canaux calcium avec la machinerie d'exocytose semble donc produire une plus grande latence de libération vésiculaire probablement en raison des limitations intrinsèques à la diffusion calcique dans le cytoplasme (variabilité en concentration efficace accrue avec la distance). Ces considérations sur les mécanismes d'exocytose permettent de s'interroger sur le rôle fonctionnel précis des structures du canal calcique impliqué dans les interactions avec les protéines SNARE. S'il est acquis que la boucle II-III des canaux N et P/Q est requise pour l'ancrage des vésicules synaptiques à proximité de la source d'élévation du calcium, il reste cependant à déterminer le rôle des interactions

canaux/protéines SNARE dans les mécanismes de fusion vésiculaire eux-mêmes.

Chaîne d'événements moléculaires conduisant à l'exocytose

Il serait prématuré d'interpréter les interactions moléculaires mises en évidence jusqu'à présent. Seul le groupe de Catterall s'autorise à interpréter la dépendance vis-à-vis du calcium des interactions SNARE en donnant un rôle central à la syntaxine [20]. Pour ces auteurs, les vésicules synaptiques amarrées à la membrane formeraient un complexe de faible affinité avec les canaux calcium *via* la liaison de SNAP-25 et de la syntaxine. L'affinité de ce complexe serait augmentée par le calcium qui contribuerait à une étape préliminaire à la fusion. Dans un deuxième temps, une augmentation plus forte de calcium produirait une dissociation de la syntaxine et de la SNAP-25 du canal en vertu de la dépendance biphasique de ces molécules vis-à-vis du calcium; cette modification serait responsable de la fusion membranaire. Cette théorie s'accommode cependant mal de l'absence de sites calcium décrits sur la syntaxine, la SNAP-25 et la boucle II-III des sous-unités α_1 . Enfin, ces mêmes auteurs n'observent pas de dépendance de la fixation de syntaxine et de SNAP-25 sur la boucle II-III de la sous-unité α_{1A} de lapin avec le calcium [23]. En revanche, d'autres auteurs semblent plutôt s'accorder sur le rôle principal joué par la synaptotagmine et le calcium. L'attribution d'une importance accrue à la synaptotagmine semble logique puisqu'elle se fixe à l'ensemble des isoformes α_1 impliquées dans la transmission synaptique, ce qui n'est pas le cas de la syntaxine [23]. Il semble clair que la fixation du calcium, voire aussi les modifications de conformation induites par le potentiel au sein des canaux calciques, est directement responsable des réarrangements moléculaires requis pour le processus de fusion des vésicules synaptiques. La description des interactions entre protéines constitutives du complexe d'exocytose ne suffit pas à expliquer un processus moléculaire aussi com-

plexe que l'exocytose. Il convient d'intégrer aux schémas conventionnels actuels une analyse de la dynamique moléculaire séquentielle qui préside au phénomène lui-même. Ainsi, de nombreuses questions restent en suspens, et notamment le devenir des interactions moléculaires décrites dans l'état d'amorçage après le stimulus désinhibiteur que constitue le calcium. Les questions qui restent en suspens concernent la cascade d'événements produits par la fixation du calcium à la synaptotagmine. A titre d'exemple, il a été montré que l'élévation du calcium renforce la liaison de la synaptotagmine à la syntaxine; une modification qui est à mettre en parallèle avec l'observation selon laquelle les fixations de la boucle II-III et de la synaptotagmine à la syntaxine sont compétitives [21]; cela suggère que l'augmentation de fixation de synaptotagmine à la syntaxine pourrait produire une dissociation de tout le complexe SNARE des canaux calcium ou ne maintenir que l'interaction SNAP-25/canal calcium.

Parmi les questions posées, les suivantes sont d'actualité: en présence des protéines SNARE, la synaptotagmine peut-elle se dissocier du canal calcique après la fixation du calcium? Le devenir des interactions synaptotagmine-complexe SNARE, qui fait suite à l'activation des canaux calciques, est lui-même obscur. Enfin, il n'est toujours pas clairement défini si chacune des interactions identifiées avec le canal calcium (synaptotagmine-canal, syntaxine-canal, SNAP-25-canal) est requise pour le processus d'exocytose. Parmi les pistes de recherche à explorer, il faut parfaire l'identification des sites de reconnaissance des protéines et améliorer la sélectivité des outils d'analyse du rôle de chaque protéine dans le processus d'exocytose. Enfin, on ne peut s'empêcher de mettre en parallèle les interactions protéines SNARE/boucle II-III et récepteur de la ryanodine/boucle II-III de la sous-unité α_{1S} : les changements de conformation protéique induits par les changements de potentiel membranaire joueraient un rôle direct dans les réarrangements moléculaires gouvernant l'exocytose ■

Note

Ce manuscrit a été rédigé en consultation avec les Dr Christian Lévêque et Michael Seagar de l'unité U. 464 de l'Inserm.

Mini-synthèse à l'occasion du 8^e Colloque Canaux Ioniques qui s'est tenu à La Londe-les-Maures du 21 au 24 septembre 1997, dont elle constitue le compte rendu d'un des symposiums. Ce colloque fait le point annuel sur tous les aspects moléculaires et cellulaires des recherches en cours sur les canaux ioniques. **Sa prochaine édition aura lieu du 20 au 23 septembre 1998.** Le programme prévu et tout renseignement utile sont disponibles sur le serveur de l'Association Canaux Ioniques: <http://physio.univ-lyon1.fr/canaux/canaux.htm>.

Michel De Waard

Inserm U. 464, Faculté de médecine Nord, boulevard Pierre-Dramard, 13916 Marseille Cedex 20, France.

Caroline Strube

Cnrs UMR 5578, Laboratoire de physiologie des éléments excitables, 43, Bd du 11-Novembre-1918, Bat. 401B, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

Michel Villaz

Inserm CjF 9709, DBMS/CIS-CEA Grenoble, 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

TIRÉS À PART

M. De Waard.

RÉFÉRENCES

- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993; 362: 318-24.
- Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Söllner TH, Rothman JE. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 1998; 92: 759-72.
- Søgaard M, Tani K, Ye RR, Geromanos S, Tempst P, Kirchhausen T, Rothman JE, Söllner T. A Rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell* 1994; 78: 937-48.
- Nargeot J, Charnet P. Diversité moléculaire des canaux calciques: du gène à la fonction. *Med Sci* 1994; 10: 1293-308.
- Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 1994; 264: 107-11.
- Artalejo CR, Adams ME, Fox AP. Three types of Ca²⁺ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 1994; 367: 72-6.
- Powis DA, Clark CL, O'Brien KJ. Depleted internal store-activated Ca²⁺ entry can trigger neurotransmitter release in bovine chromaffin cells. *Neurosci Lett* 1996; 204: 165-8.
- Petersen OH. Can Ca²⁺ be released from secretory granules or synaptic vesicles? *Trends Neurosci* 1996; 19: 411-3.
- Llinas R, Steinberg IZ, Walton K. Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys J* 1981; 33: 323-51.
- Adler EM, Augustine GJ, Duffy MP, Charlton MP. Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J Neurosci* 1991; 11: 1496-1507.
- Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ. Calcium action in synaptic transmitter release. *Annu Rev Neurosci* 1987; 10: 633-93.
- Bommert K, Charlton MP, DeBello WM, Chin GH, Betz H, Augustine GJ. Inhibition of neurotransmitter release by C2-domain peptides implicates synaptotagmin in exocytosis. *Nature* 1993; 363: 163-5.
- Almers W, Tse FW. Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis? *Neuron* 1990; 4: 813-8.
- Bennett MK, Calakos N, Scheller RH. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 1992; 257: 255-9.
- Yoshida A, Oho C, Omori A, Kuwahara R, Ito T, Takahashi M. HPC-1 is associated with synaptotagmin and ω-conotoxin receptor. *J Biol Chem* 1992; 267: 24925-8.
- Rettig J, Sheng Z, Kim DK, Hodson CD, Snutch TP, Catterall WA. Isoform-specific interaction of the α_{1A} subunits of brain Ca²⁺ channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7363-8.
- Martin-Moutôt N, Charvin N, Lévêque C, Sato K, Nishiki T, Kozaki S, Takahashi M, Seagar M. Interaction of SNARE complexes with P/Q-type calcium channels in rat cerebellar synaptosomes. *J Biol Chem* 1996; 271: 6567-70.
- Lévêque C, El Far O, Martin-Moutôt N, Sato K, Kato R, Takahashi M, Seagar MJ. Purification of the N-type calcium channel associated with syntaxin and synaptotagmin: a complex implicated in synaptic vesicle exocytosis. *J Biol Chem* 1994; 269: 6306-12.
- Sheng Z, Rettig J, Takahashi M, Catterall WA. Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron* 1994; 13: 1303-13.
- Sheng Z, Rettig J, Cook T, Catterall WA. Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex. *Nature* 1996; 379: 451-4.
- Sheng Z-H, Yokoyama CT, Catterall WA. Interaction of the synprint site of N-type Ca²⁺ channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5405-10.
- Charvin N, Lévêque C, Walker D, Berton F, Raymond C, Kataoka M, Shoji-Kasai Y, Takahashi M, De Waard M, Seagar M. Direct interaction of the calcium sensor protein synaptotagmin I with a cytoplasmic domain of the α_{1A} subunit of the P/Q-type calcium channel. *EMBO J* 1997; 16: 4591-6.
- Kim DK, Catterall WA. Ca²⁺-dependent and -independent interactions of the isoforms of the α_{1A} subunit of brain Ca²⁺ channels with presynaptic SNARE proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14782-6.
- Chapman ER, Hanson PI, An S, Jahn R. Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J Biol Chem* 1995; 270: 23667-71.
- Chapman ER, Jahn R. Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. *J Biol Chem* 1994; 269: 5735-41.
- Schiavo G, Stenbeck G, Rothman JE, Söllner TH. Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 997-1001.
- Bezprozvanny I, Scheller RH, Tsien RW. Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature* 1995; 378: 623-6.
- Wiser O, Tobi D, Trus M, Atlas D. Synaptotagmin restores kinetic properties of a syntaxin-associated N-type voltage-sensitive calcium channel. *FEBS Lett* 1997; 404: 203-7.
- Wiser O, Tobi D, Trus M, Atlas D. Synaptotagmin interaction with syntaxin-associated N-type calcium channel: rescue of an inhibited channel. 8^e colloque des Canaux Ioniques 1997; La Londe-les-Maures, France.
- Naren AP, Nelson DJ, Xie W, Jovov B, Pevsner J, Bennett MK, Benos DJ, Quick MW, Kirk KL. Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc18 isoforms. *Nature* 1997; 390: 302-5.
- Mochida S, Sheng Z-H, Baker C, Kobayashi H, Catterall WA. Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca²⁺ channels. *Neuron* 1996; 17: 781-8.
- Rettig J, Heinemann C, Ashery U, Sheng Z-H, Yokoyama CT, Catterall WA, Neher E. Alteration of Ca²⁺ dependence of neurotransmitter release by disruption of Ca²⁺ channel/syntaxin interaction. *J Neurosci* 1997; 17: 6647-56.
- Stanley EF, Miroznic RR. Cleavage of syntaxin prevents G-protein regulation of presynaptic calcium channels. *Nature* 1997; 385: 340-3.
- Walker D, De Waard M. Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function. *Trends Neurosci* 1998; 21: 148-54.