HAL
open science

Dynamique de récepteurs uniques du GABAA dans le cône de croissance : rôle dans la détection de signaux de guidage

Cedric Bouzigues

▶ To cite this version:

Cedric Bouzigues. Dynamique de récepteurs uniques du GABAA dans le cône de croissance : rôle dans la détection de signaux de guidage. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2006. Français. NNT : . tel-00120620v1

HAL Id: tel-00120620
https://theses.hal.science/tel-00120620v1

Submitted on 15 Dec 2006 (v1), last revised 19 Dec 2006 (v3)

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.

UNIVERSITÉ PARIS 7 - DENIS DIDEROT

UFR de Physique

DOCTORAT

Spécialité Interface Physique Biologie

Cédric BOUZIGUES

Dynamique de récepteurs uniques du $GABA_A$ dans le cône de croissance : rôle dans la détection de signaux de guidage

Thèse dirigée par ***Maxime DAHAN***

Soutenue le 3 octobre 2006 devant le jury composé de :

M. Jean-Baptiste Fournier	Président
M. Philippe Bastiaens	Rapporteur
M. Daniel Choquet	Rapporteur
M. Alain Chedotal	Examinateur
M. François Amblard	Examinateur
M. Maxime Dahan	Directeur de thèse

Signature numérique de Cedric Bouzigues
'Date : 2006.12.15 15:09:20 +01'00

À Nadia et Ines,
qui me sont plus que la vie

Remerciements

A l'heure où ma thèse s'achève, le temps est venu pour d'adresser mes remerciements à tous ceux qui firent de ces trois années de travail ce qu'elles furent. La mémoire me fera peut être défaut aujourd'hui, je m'en excuse par avance auprès des oubliés et les remercie comme ils le méritent.

Ma première pensée va naturellement pour Maxime Dahan, qui dirigea cette thèse. Je le remercie avant toute chose de m'avoir accueilli dans son équipe au Laboratoire Kastler Brossel pour travailler sur un projet neuf et passionnant. Enthousiaste, exigeant, scientifiquement remarquable, il fut un directeur de thèse particulièrement stimulant. Je pense avoir appris beaucoup à ses côtés, humainement et intellectuellement, et pour cela avant toute chose, je le remercie. Je tiens également à remercier Pierre Desbiolles, le second animateur de l'équipe Optique et Biologie, qui fut -et reste- pour moi une référence scientifique, et dont j'ai pu apprécié la bienveillance, la sympathie et la disponibilité. Le travail présenté dans cette thèse s'est de plus fait en étroite collaboration avec le Laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse Normale et Pathologique, dirigé par Antoine Triller. Son contact fut particulièrement enrichissant : l'étendue de sa culture scientifique ne lasse pas de susciter mon admiration et cette thèse serait très loin de ce qu'elle est aujourd'hui sans son implication. Mes premiers pas en neurobiologie furent guidés par Sabine Lévi que je remercie pour ses conseils judicieux et sa patience, ainsi que Béatrice Riveau, qui m'a initié à la culture de neurones. Je remercie David Holcmann, avec qui j'ai abordé la partie modélisation théorique présentée dans ce manuscrit. Outre ce qu'il a peu m'apprendre sur le plan scientifique, j'ai pu goûter son énergie et son enthousiasme hors du commun. Je remercie sincèrement les membres de mon jury de soutenance, Jean-Baptiste Fournier, François Amblard, Alain Chedotal et plus particulièrement les rapporteurs de cette thèse Daniel Choquet et Philippe Bastiaens. Je leur suis avant tout redevable de l'attention qu'ils ont portée à ce travail, qui m'a permis d'avoir une meilleure mise en perspective de mes propres résultats.

J'adresse mes plus profonds remerciements à mes camarades doctorants

avec qui j'ai partagé beaucoup durant ces trois ans. Je pense tout d'abord à Marie-Virginie Ehrensperger, qui a débuté en même tant que moi une thèse sur la dynamique du récepteur de la glycine et fut ainsi mon premier interlocuteur scientifique, dont la capacité à surmonter l'adversité a suscité mon plus grand respect et dont le naturel et l'humour ont contribué grandement à une ambiance de travail conviviale. Je pense également à Stéphane Bonneau, doctorant en mathématiques appliquées, dont l'esprit et la causticité m'ont ravi pendant trois ans. Je le remercie de plus pour son travail remarquable sur la reconstruction de trajectoires, sans lequel cette thèse aurait été bien difficile à mener, ainsi que pour les conversation stimulantes que j'ai pu avoir avec lui. J'ai aussi une pensée pour Isabelle Bonnet, qui sera au laboratoire pendant encore un an pour étudier la dynamique d'enzymes de restriction individuelles, dont j'ai pu apprécié l'entrain et la sympathie. Je tiens à leur faire part de ma plus grande amitié et leur souhaite le meilleur à tous. Je souhaite aussi bon courage à Mathieu Morel, qui commence sa thèse avec Maxime sur le cône de croissance ; j'espère pouvoir être là dans trois ans quand à, son tour, il présentera ses travaux lors de sa soutenance. Je remercie plus généralement tous ceux au côté desquels j'ai eu l'occasion de travailler au laboratoire durant ma thèse : Sébastien Courty, Emilie Mercey, Camilla Luccardini, Makrina Anastassiadou, David Sebiskveradze, Amodsen Chotia,... J'ai une pensée particulière pour Aurélen Crut qui fut le premier docteur de l'équipe et mon voisin de bureau pendant deux ans, et dont j'ai apprécié la constante bonne humeur. La place me manque pour dire un mot de chacun, et cet exercice serait bien difficile, mais je leur adresse à tous l'expression de ma plus grande sympathie.

Je remercie également tous ceux qui ont pris de leur temps pour discuter des travaux présentés dans cette thèse ou relire les articles associés et ce manuscrit : Stephane Dieudonné, qui m'a de plus guidé pour les expériences d'imagerie calcique, Jean-Louis Bessereau et Alain Prochiantz dont le regard critique a été très profitable et Nadia Feraoun qui fut une lectrice attentive et pertinente de ce manuscrit. Je souhaite remercier tous ceux grâce à qui j'ai pu travailler durant trois ans dans un environnement d'exception : Thierry Tardieu et Linda Krikorian, grâce à qui je sais presque faire un ordre de mission du premier coup sans me tromper, ainsi que Didier Courtiade, Roland Labé et Huguette Guerard.

J'ai enseigné durant ma thèse la physique à l'Unversité Paris 7 ; je remercie ceux avec qui j'ai travaillé à cette occasion, et en particulier Atef Asnacios dont j'ai pu apprécier la grande compétence, l'enthousiasme et l'extrême gentillesse. Je remercie aussi les étudiants que j'ai eu dans mes groupes de travaux dirigés, et qui m'ont donné de très grandes joies. Grâce à eux, j'ai pu découvrir l'épanouissement que peut procurer l'enseignement ; leur sympathie et le goût naissant pour la physique de certains ont embelli mes années de thèse et me pousse à vouloir continuer d'enseigner.

La fin de la thèse est aussi l'heure où une page se tourne, fournissant

l'occasion de jeter un regard plus lointain vers le passé. J'ai une pensée pour ceux qui furent mes camarades de collège il y plus de dix ans en Seine-Saint-Denis, que j'ai perdus de vue aujourd'hui. De nombreux parmi eux n'ont pas eu l'occasion de faire de longues études et je n'ose pour certains me demander ce qu'ils sont devenus. Leur pensée m'a néanmoins accompagné jusqu'à aujourd'hui, et me pousse à garder toute ma tendresse à la jeunesse oubliée et en colère. Ce manuscrit leur est dédié.

Table des matières

Introduction **11**
Introduction générale : la physique du vivant 11
Les manipulations de molécules uniques 13
Le développement du système nerveux 13

1 Le guidage axonal **17**
1.1 La croissance dirigée de l'axone 18
1.1.1 Le cône de croissance 18
1.1.2 Les voies de signalisation 20
1.1.3 La régulation 22
1.2 Le guidage par le GABA 25
1.2.1 Les récepteurs du GABA 25
1.2.2 La voie de signalisation du $GABA_AR$ 25
1.3 Le chimiotactisme 28
1.3.1 Les systèmes biologiques 29
1.3.2 Les mécanismes de détection 31
1.3.3 Modèles de chimiotactisme eukaryote 35
1.3.4 Analogies et différences 37

2 Dynamique du récepteur du $\mathbf{GABA_A}$ **41**
2.1 Aspects expérimentaux 42
2.1.1 Système biologique 42
2.1.2 La microscopie de fluorescence 43
2.1.3 Utilisation de nanocristaux 44
2.1.4 Le suivi de molécules uniques 49
2.2 Mouvements dirigés dans la membrane 51
2.2.1 Méthodes d'analyse 51
2.2.2 Résultats 55
2.3 Interactions avec le cytosquelette 59
2.3.1 Résultats expérimentaux 59

2.3.2 Méthode d'analyse locale 63
2.3.3 Résultats : interactions transitoires avec les microtubules 68
2.4 Modèle de locomotion et portée fonctionnelle 70
2.4.1 Le modèle du tapis roulant 70
2.4.2 Microtubules et organisation membranaire 70

3 L'intégration fonctionnelle 73
3.1 Régulation spatiale par les microtubules 74
3.1.1 Dispositif expérimental 74
3.1.2 Méthodes d'analyse 74
3.1.3 Existence d'une barrière axonale 75
3.1.4 Rôle des microtubules 75
3.2 Expériences de guidage 76
3.2.1 Le guidage artificiel 76
3.2.2 Réponse au GABA 79
3.2.3 Distribution des récepteurs 81
3.2.4 Spécificité de la réorganisation 85
3.2.5 Le mécanisme de redistribution 88
3.3 Dynamique des récepteurs en présence de GABA 90
3.3.1 Dynamique en bain de GABA 90
3.3.2 Dynamique sous gradient de GABA 91
3.4 La réponse calcique 92
3.4.1 L'imagerie calcique 92
3.4.2 Mesure d'amplification 94
3.5 Mécanisme d'amplification 98
3.5.1 Une rétroaction positive 98
3.5.2 Discussion 99
3.5.3 Portée biologique 102

4 Modélisation 107
4.1 Modèle numérique de la redistribution des récepteurs 108
4.1.1 Modélisation 108
4.1.2 Modélisation numérique 111
4.1.3 Résultats 114
4.2 Exploration des paramètres 117
4.2.1 La densité de récepteurs 117
4.2.2 Le coefficient de diffusion 118
4.2.3 La valeur du gradient 122
4.2.4 Le nombre de microtubules 123
4.2.5 Un ajustement optimal ? 124
4.3 Développements analytiques 124
4.3.1 Modèle analytique complet 125
4.3.2 Modèle analytique simplifié 126
4.3.3 Résolution asymptotique 132

4.4 Bilan des résultats et prédictions 141

Conclusion **143**
Les possibilités des nanocristaux 143
Mécanisme générique de chimiotactisme 144
Perspectives 145
Conclusion générale 146

Annexes **149**
Unités,abréviations et notations 149
Simulation numérique de trajectoires de particules uniques 150
Diffusion d'une particule dans un puits de potentiel 151

Bibliographie **157**

Introduction

Introduction générale : la physique du vivant

Au milieu du siècle dernier, E. Schroedinger se demandait dans son ouvrage *What is life ?* comment les propriétés remarquables des organismes vivants pouvaient s'exprimer à partir des lois fondamentales de la physique [134]. Si l'évidence force à admettre que l'état des connaissances actuelles ne répond pas à cette question, la problématique qu'elle pose a notablement transformé l'approche scientifique des système vivants. En effet, face aux extraordinaires variété et complexité du vivant, les démarches physiques sont longtemps restées insuffisantes. La conviction de la possibilité d'une réduction des complexes fonctions biologiques en phénomènes physico-chimiques élémentaires est ainsi une idée neuve.

L'avènement de la génétique moléculaire a depuis lors transformé la compréhension des systèmes biologiques en expliquant certains phénomènes fondamentaux, comme l'hérédité ou la production de protéines, en termes d'interactions biochimiques simples. La biologie moléculaire est ainsi devenue un champ nouveau des sciences de la vie ; le nom même de cette discipline contient l'essence de cette révolution épistémologique, où le vivant est devenu explicable au niveau moléculaire. Le séquençage complet du génome humain [36] en est le point d'orgue. En identifiant l'ensemble des protéines de l'organisme et des gènes qui les encodent sur l'ADN, il semblait que le vivant pouvait se réduire aux différentes combinaisons possibles entre ces gènes et protéines. Le nombre réduit de gènes identifiés dans le génome humain - de l'ordre de 20 000- pouvait laisser à penser que le jeu moléculaire serait de plus relativement simple.

Il paraît cependant clair aujourd'hui que la compréhension de nombreux phénomènes biologiques, au niveau de l'organisme ou même de la cellule, ne se réduit pas au dénombrement des protéines qu'ils mettent en jeu. Le fonctionnement du système nerveux, la mobilité dirigée des bactéries vers leurs sources de nourriture, la morphogénèse lors du développement embryonnaire

[62], ... sont des problèmes de natures très différentes mais pour lesquels la génétique échoue à proposer des explications complètes.

De façon générale, le processus menant des interactions entre molécules à l'accomplissement d'une fonction physiologique est encore bien souvent incompris. L'adaptation d'un organisme à son environnement ou la communication cellulaire, par exemple, nécessitent de pouvoir moduler la transduction de signaux extérieurs à l'aide d'un nombre limité d'acteurs moléculaires. La complexité de la physiologie d'un organisme ou d'une cellule, issue de la simplicité d'interactions biochimiques, requiert un autre niveau de régulation. Il apparaît que l'organisation dans le temps et l'espace au niveau moléculaire est ainsi cruciale dans la cellule [68, 126]. Le caractère stochastique des interactions moléculaires est également un aspect essentiel du fonctionnement cellulaire [92]. La description physique du fonctionnement cellulaire est ainsi apparue pertinente au même titre que sa biochimie.

De nouveaux thèmes de recherche en physique orientés vers la biologie ont ainsi émergé depuis une vingtaine d'année. Depuis les études structurales de la conformation des protéines jusqu'aux travaux portant sur des organismes entiers, un large spectre d'échelle spatiale est balayé par des travaux d'inspiration physique. Leur motivation commune est l'intégration de données physico-chimiques élémentaire vers la description d'une fonction biologique complexe. Des développements instrumentaux et conceptuels permettent à la biophysique d'aborder aujourd'hui une grande variété de questions. Comment une bactérie peut elle créer les forces nécessaires à sa locomotion ? Comment peut elle détecter ses aliments ? Comment une enzyme peut elle se déplacer sur l'ADN et trouver éventuellement sa cible ? Comment la communication entre neurones permet elle de générer les fonctions du cerveau ?... Les exemple sont multiples, inscrits dans des problématiques de biochimie ou de biologie cellulaire.

Face à l'ensemble de ces questions, deux approches différentes apparaissent : la description physique d'objets du vivant au niveau moléculaire ou supramoléculaire d'une part, et l'étude de systèmes biologiques réels ou modèles à l'aide de concepts et d'outils de la physique d'autre part. Les travaux du premier type se sont par exemple penchés sur les mouvement de moteurs moléculaires [176] ou sur l'organisation du cytosquelette [91]. Il s'agit essentiellement d'études complémentaires de la biochimie, permettant de préciser le comportement dynamique ou statistique des molécules du vivant. La seconde approche vise à appréhender un système biologique fonctionnel, à l'aide de systèmes simplifiés ou réels. L'utilisation de systèmes modèles permet de reconstruire à partir d'ingrédients minimaux un système de moindre complexité que le système vivant, et d'ainsi en comprendre son fonctionnement. L'analyse de système réels a pour but d'extraire d'un système complet les éléments et phénomènes simples expliquant son fonctionnement. Le travail présenté dans ce rapport s'inscrit dans cette démarche, en s'intéressant au problème du guidage axonal dans le système nerveux.

Les manipulations de molécules uniques

Les systèmes biologiques sont complexes et le nombre élevé d'acteurs moléculaires en interaction qu'ils mettent en jeu rend difficile leur analyse. Une idée simple afin de résoudre cette complexité consiste à essayer de voir directement ces acteurs au niveau élémentaire : celui de la molécule unique. Si la biochimie met en évidence des propriétés moyennes par des mesures d'ensemble, l'étude au niveau de la molécule individuelle peut révéler des phénomènes inobservés jusqu'alors. En effet, les processus mis en jeu dans la vie cellulaire se déroulent à une échelle de temps et d'espace où les effets de diffusion deviennent importants et où les fluctuations d'une molécule à une autre ne sont pas négligeables par rapport au comportement moyen d'un ensemble de molécules. Le nombre réduit de molécules identiques dans une cellule rend les effets stochastiques importants. La mesure en molécule unique est donc une approche pertinente pour comprendre le déroulement dans le temps et l'espace d'un processus biologique.

La première expérience en molécule unique est la mesure électrophysiologique d'ouverture de canaux ioniques de Neher et Sakmann [117], qui a transformé la compréhension de la transmission nerveuse et notablement élargi les possibilités d'investigation du système nerveux. Depuis lors, différents systèmes instrumentaux ont été développés afin d'observer et de manipuler des molécules uniques : pinces magnétiques [145, 152], pinces optiques [11, 13], microscopie de fluorescence [67, 101, 176], suivi de billes d'or [129] ou de latex [16],...

La plupart des études en molécules uniques se sont toutefois le plus souvent limitées jusqu'à aujourd'hui à des problèmes moléculaires *in vitro*, mais il existe un intérêt croissant pour les expériences sur des systèmes vivants et l'observation de phénomènes *in vivo*. La visualisation de molécules uniques est ainsi un outil très puissant dans nombre de problèmes comme la motilité, la transduction du signal ou le chimiotactisme [90, 166]. Ce mémoire présente dans cette perspective une étude au niveau de la molécule unique du chimiotactisme du neurone, ou guidage axonal.

Le développement du système nerveux

Les interactions des cellules nerveuses entre elles et avec leur environnement sont déterminantes dans la formation et le fonctionnement du système nerveux. La fidélité de son auto-organisation est remarquable : des axones croissant sur des distances macroscopiques sont capables d'atteindre leur cible pour créer une connexion avec un dendrite avec une précision micrométrique. Cette capacité provient la faculté du neurone de sonder son environnement à l'aide de récepteurs membranaires détectant des signaux de guidage dans le milieu qui l'entoure. La mise en jeu simultanée de multiples

signaux permet alors un adressage fin de l'axone.

Une approche possible de ce problème complexe consiste à porter son attention sur une voie de signalisation particulière, en l'occurrence celle du l'acide γ-aminobutyrique -ou GABA- dans le travail rapporté dans ce mémoire. L'organisation des récepteurs et leur comportement dynamique sont susceptibles d'être responsables de propriétés physiologique du guidage de l'axone, comme nous le détaillerons plus loin. La visualisation de récepteurs individuels est un outil naturel pour étudier ce sujet. Les récepteurs membranaires aux substances de guidage sont en nombre a priori restreint [108] et évoluent à des échelles où la diffusion brownienne est importante. L'imagerie en molécule unique est donc indiquée pour comprendre leur organisation spatiale et temporelle.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la capacité du neurone en croissance de détecter avec une extrême sensibilité les signaux de guidage de son environnement, tel que le GABA. Quels sont les mécanismes moléculaires responsables de cette propriété remarquable ? Comment l'organisation spatiale de récepteurs membranaires peut elle y contribuer ? Nous avons tenté d'y répondre en étudiant la dynamique de récepteurs du GABA individuels.

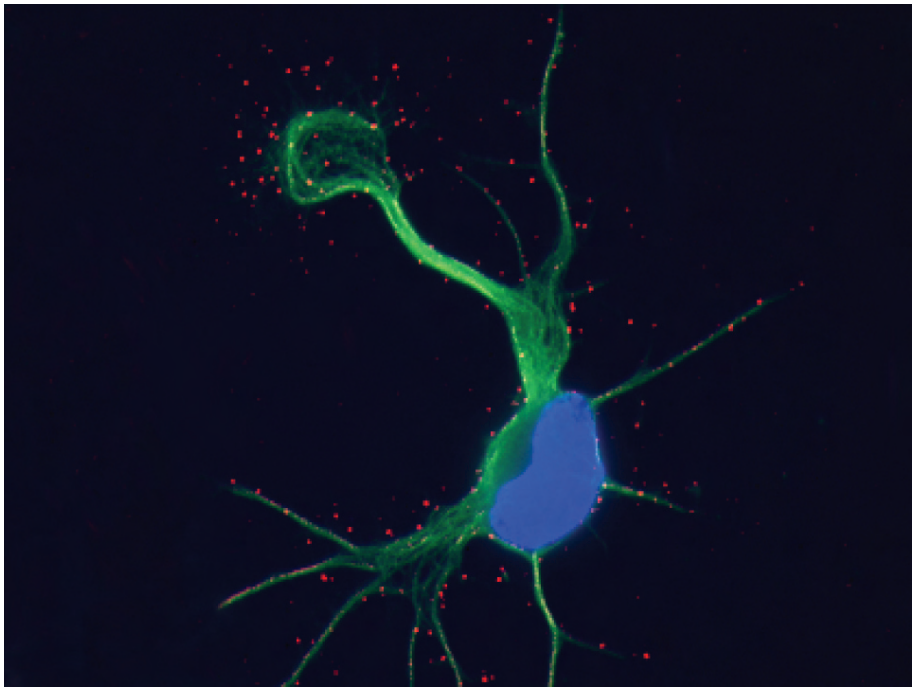
Cette thèse s'est voulue un travail à l'interface entre la physique et la biologie, en essayant d'exprimer en termes élémentaires une organisation remarquable à l'échelle de l'organisme. Ce mémoire s'organise en quatre chapitres. Tout d'abord, nous ferons un tour d'horizon des propriétés connues du guidage axonal, notamment par le GABA, afin de mieux mettre en évidence la problématique dans laquelle s'inscrit ce travail. Nous présenterons ensuite une étude du comportement dynamique des récepteurs du GABA, révélateur des interactions responsables de leur organisation. Nous montrerons ensuite l'implication de celle-ci dans le processus de détection de signaux de guidage, ce qui nous permettra d'élaborer un modèle sommaire d'auto-organisation des récepteurs menant à une amplification de ces signaux. Dans le dernier chapitre, nous montrerons comment une modélisation stochastique peut décrire cette auto-organisation des récepteurs et rendre compte de nos observations expérimentales.

Chapitre 1

Le guidage axonal

Si je désire une eau d'Europe, c'est la flache noire et froide où, vers le crépuscule embaumé, un enfant accroupi plein de tristesse lâche un bateau, frêle comme un papillon de mai.

Arthur Rimbaud



1.1 La croissance dirigée de l'axone

Le système nerveux mature d'un vertébré tel que l'être humain contient près de dix milliards de neurones. Afin de constituer un réseau fonctionnel, ceux-ci réalisent entre eux de nombreuses connexions. Durant son développement, des milliards d'axones croissent avec une sélectivité directionnelle suffisante pour atteindre le ou leurs dendrites cible. Ce processus est appelé guidage axonal. Dans ce chapitre, nous présenterons succinctement un état des connaissances en la matière tant sur le plan physiologique que moléculaire, et ce plus particulièrement dans la voie de signalisation du GABA. Nous replacerons ensuite ce phénomène dans un cadre plus général, celui de la motilité cellulaire dirigée -ou chimiotactisme- dans ses aspects expérimentaux et formels.

1.1.1 Le cône de croissance

L'établissement de connexions adéquates et précises entre neurones repose sur la capacité de l'axone de croître dans une direction contrôlée.

Ce choix directionnel est effectué par une structure spécialisée située à l'extrémité en croissance de l'axone appelée le cône de croissance, observée il y a près d'un siècle par Ramón Y Cajal [25].

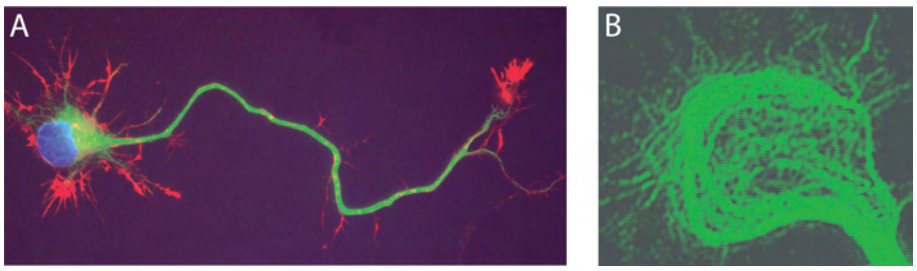


FIG. 1.1 – *Neurone de moelle épinière de rat en culture (3 jours) marqué pour les neurofilaments NEF3 (marquage spécifique de l'axone, vert), l'actine (rouge) et le noyau (bleu) (A). Le cône de croissance est situé au bout de l'axone présentant une région centrale riche en extrémités de microtubules et une région périphérique riche en actine. Cône de croissance de neurone en culture (3 jours) marqué pour les microtubules (B). En majorité, les microtubules pointent vers l'extrémité du cône de croissance, pénétrant éventuellement dans la zone périphérique et formant également des boucles.*

Au sein de cette structure, très riche en microtubules et en filaments d'actine [162] (Figure 1.1), va s'effectuer la décision d'orientation déclenchant la cascade de signalisation menant à l'élongation de l'axone vers une direction choisie.

Structure du cône de croissance

Au niveau structurel, il est possible de distinguer plusieurs régions dans un cône de croissance. La région centrale est riche en microtubules venus depuis l'axone et orientés avec leurs extrémités {+} dans le cône de croissance [84]. La région périphérique, le lamellipode et les filopodes sont riches en actine, corticale ou organisée en filaments, branchée sur les microtubules (Figure 1.2A-B). La membrane du cône de croissance contient de plus de nombreux récepteurs transmembranaires, dont le récepteur du $GABA_A$ (Figure 1.2C), dont certains sont essentiels pour la croissance et le guidage axonal.

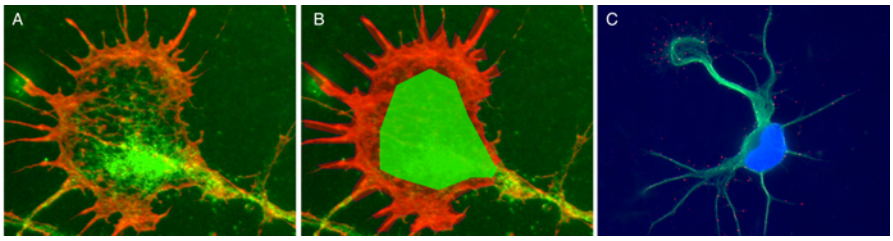


FIG. 1.2 – *Cône de croissance axonal (A)marqué pour l'actine (en rouge) et pour les microtubules (en vert). La région centrale est indiquée par la segmentation verte et la région périphérique par la rouge (B). Neurone en culture (C) marqué pour les microtubules (vert), l'ADN (bleu) et la sous-unité γ_2 (en rouge) des récepteurs du $GABA_A$ membranaires*

Fonction du cône de croissance

Un neurone en croissance est plongé dans un environnement riche en divers signaux chimiques régulant sa survie et son développement. Ceux-ci peuvent diffuser dans le milieu ou être adhérents au substrat et provenir d'autres neurones voisins ou de cellules non-neuronales.

Ces signaux sont des ligands permettant l'activation de récepteurs spécifiques dans la membrane du cône de croissance. Ceux-ci, lorsqu'ils sont activés de façon asymétrique par un gradient de ligand, sont capables de déclencher une cascade de signalisation aboutissant à la réorganisation du cytosquelette. Le réarrangement de la membrane induit alors la réorientation du cône de croissance et permet la croissance de l'axone dans la direction adaptée [44] (Figure 1.3). Ainsi, dans le cône de croissance se déroulent deux processus complémentaires : une détection des signaux chimiques extérieurs et une modification spatiale de l'activité du cytosquelette, les microtubules et les filaments d'actine. Le couplage de ces deux processus est essentiel pour l'accomplissement de la fonction biologique du cône de croissance. L'importance de la phase de détection sur l'organisation spatiale du cône de crois-

sance est évidente, et nous allons préciser au niveau moléculaire la nature des interactions menant de la détection d'un signal chimiotactique jusqu'au cytosquelette.

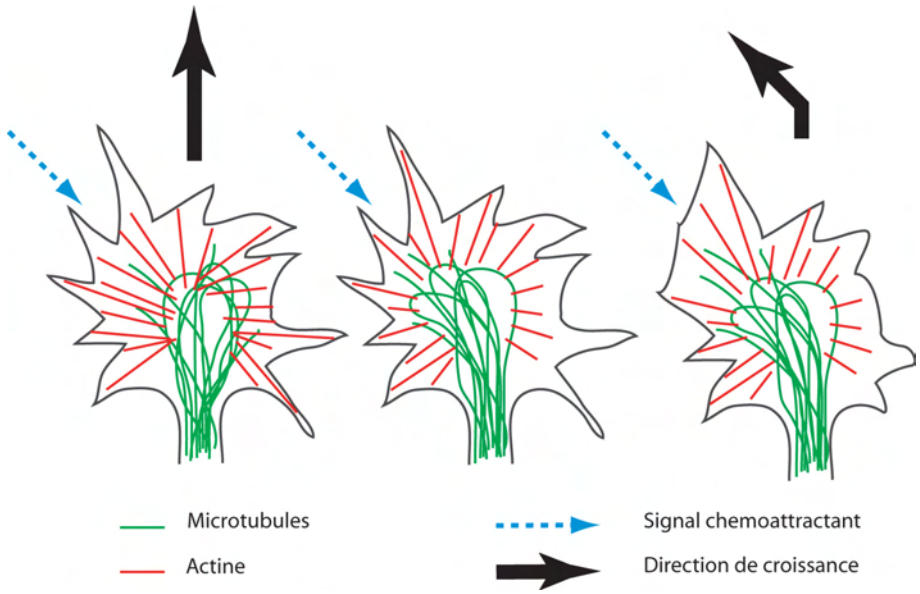


FIG. 1.3 – *Modèle de détection et de réorganisation du cône de croissance. La détection d'un gradient de ligand chimioattractif permet à la fois la réorganisation des microtubules et des filaments d'actine, qui viennent former une protrusion initiant le virage de l'axone dans la direction de la source de ligand.*

1.1.2 Les voies de signalisation

Les voies de signalisation moléculaire permettant le guidage de l'axone sont nombreuses, relativement complexes, et sont étudiées attentivement depuis une quinzaine d'années. La présentation ci-dessous n'est pas exhaustive mais se restreint à exposer les principes généraux de la détection de signaux de guidage par l'axone ainsi que les grandes familles de signalisation dans le cône de croissance [78].

Les molécules de guidage

L'axone est guidé lors de sa croissance par des chimioattractants et des chimiorépulsants, qui peuvent être liés au substrat ou diffusant dans le milieu extérieur. Le premier type inclut les ephrines [41] ou les protéines d'adhésion et le second les netrines [34], les neurotrophines [77], les sémaphorines [124], certaines homéoprotéines [23] et certains neurotransmetteurs, comme

le glutamate, l'acétylcholine ou le GABA [175, 179]. Ces voies de signalisation mettent en jeu des intermédiaires moléculaires qui leur sont propres mais également de nombreux intermédiaires communs, ce qui est vraisemblablement un élément clé pour la précision du guidage axonal.

Chaque voie de signalisation possède un ou plusieurs récepteurs membranaires de natures différentes. Les neurotrophines, comme NGF (Nerve Growth Factor) ou BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), sont ainsi détectées par les récepteurs TrKa ayant une activité kinase (c'est-à-dire catalysant des réactions de phosphorylation) [78, 148]. Les netrines activent des récepteurs de la famille DCC déclenchant leur cascade de signalisation par un changement de conformation de leur domaine intracellulaire.

Les neurotransmetteurs activent leurs récepteurs pouvant alors agir par leur activité de canal ionique, pour les récepteurs ionotropiques, ou par l'intermédiaire d'un messager secondaire, pour les récepteurs métabotropiques. Un même ligand peut produire une réponse différente à un même signal de guidage en fonction des types de récepteurs présents à la membrane. Dans le cas de la netrine par exemple, le récepteur complexé sous la forme DCC-DCC déclenche un signal attractif tandis qu'un complexe DCC-UNC5 induit une répulsion [73].

L'activation d'une cascade de signalisation active un nombre important de protéines intracellulaires, qui ne sont pas encore toutes identifiées, ayant pour effet terminal de réguler l'activité du cytosquelette, soit directement, soit en interagissant avec les GTPAses Rho, Rac et Cdc42 (Figure 1.4).

Ces GTPases sont alors capables de moduler la dynamique et l'organisation du cytosquelette, en régulant sa croissance, sa stabilisation, ses branchements,... selon des mécanismes encore imparfaitement connus. Parmi les nombreux messagers secondaires mis en évidence dans la transduction du signal, il convient de distinguer certains intermédiaires qui interviennent dans plusieurs voies de signalisation différentes et sont parfois indispensables pour un guidage fonctionnel. Les kinases PI(3)K et PKC sont ainsi essentielles dans le guidage axonal et sont par ailleurs conservées dans la voie de signalisation du chimiotactisme chez *Dictyostelium Discoideum*, comme nous l'évoquerons plus loin. Le calcium est également un élément clé de la transmission du signal : sa séquestration intracellulaire empêche le guidage par les netrines ou l'acétylcholine par exemple, et une application intracellulaire asymétrique de calcium suffit à induire une rotation du cône de croissance [112, 59, 178, 74]. La concentration de calcium intracellulaire est susceptible d'intervenir sur le niveau d'activation de kinases médiatrices du signal de guidage, comme PKC, ou directement sur la machinerie de régulation du cytosquelette.

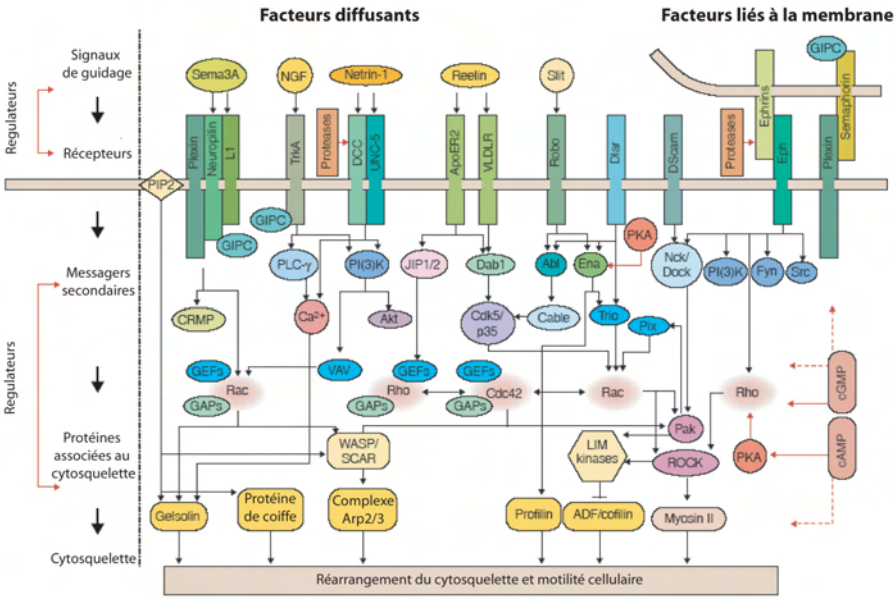


FIG. 1.4 – *Récapitulatif schématique des réseaux d'interaction dans le cône de croissance, d'après Song et Poo, Nature Cell Biology, 2001*

Principe de la réponse à un signal de guidage

Les acteurs moléculaires impliqués dans le guidage axonal sont ainsi nombreux, mais l'organisation mécanistique d'une voie de signalisation à l'autre demeure similaire (Figure 1.5). Il est possible de distinguer deux modules principaux : le premier consiste à détecter le gradient extérieur de substances de guidage et le convertir en une régulation de l'activité de protéines de contrôle du cytosquelette, comme certaines GTPases, et le second est la régulation du cytosquelette par ces GTPases, qui est commune à tous les systèmes impliquant le cytosquelette [172].

La réponse motrice de l'axone à un signal de guidage est rendue possible par l'articulation de ces deux modules reliés entre eux par des systèmes d'interactions qui peuvent être complexes, comme ceux évoqués dans la section précédente. L'efficacité du processus de guidage est remarquable : il a été montré *in vitro* que l'axone pouvait répondre à des gradients de signaux créant une différence maximale de concentration de quelques pour cents entre la partie du cône de croissance la plus proche et la plus éloignée de la source [5, 60, 110, 128].

1.1.3 La régulation

La fonction du cône de croissance est de détecter les gradients de facteurs de guidage et la modulation de sa réponse au cours du temps et en fonction

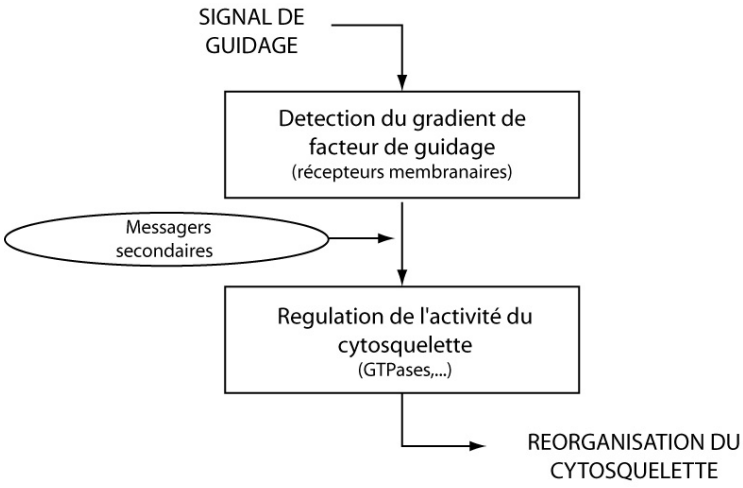


FIG. 1.5 – *Schéma général de la réponse à un signal de guidage. Le gradient extérieur est détecté par les récepteurs membranaires, converti par les messagers secondaire en un signal pour les effecteurs du cytosquelette*

de son environnement est essentielle. L'exemple du chiasme optique [171] est à ce titre caractéristique : soumis à un même signal de guidage, une expression localisée d'ephrine, l'axone croise le chiasme s'il provient de la rétine contralatérale ou l'évite s'il provient de la rétine ipsilatérale (Figure 1.6).

La régulation moléculaire

La régulation de l'activité de la cascade de transduction est fondamentale et peut se produire à différents niveaux, aussi bien à celui des récepteurs eux-mêmes que des messagers secondaires. Ainsi le guidage au niveau du chiasme optique s'explique par l'expression d'un récepteur aux ephrines spécifique (EphB1) uniquement dans les neurones ipsilatéraux qui sont repoussés par le gradient d'ephrine.

Un des régulateurs majeurs de la réponse chimiotactique du cône de croissance est l'AMP cyclique ou cAMP [100, 112, 147]. Dans le cas d'une stimulation par une netrine, une neurotrophine (BDNF) ou de l'acétylcholine, la réponse est ordinairement attractive. Cependant, lorsque l'action du cAMP est inhibée (par l'addition d'un agoniste non fonctionnel) la réponse aux mêmes stimulations devient répulsive.

La concentration de calcium est également un élément clé de la modulation de l'activité du cône de croissance, permettant d'exalter des signaux attractifs ou de convertir des signaux répulsifs en signaux attractifs

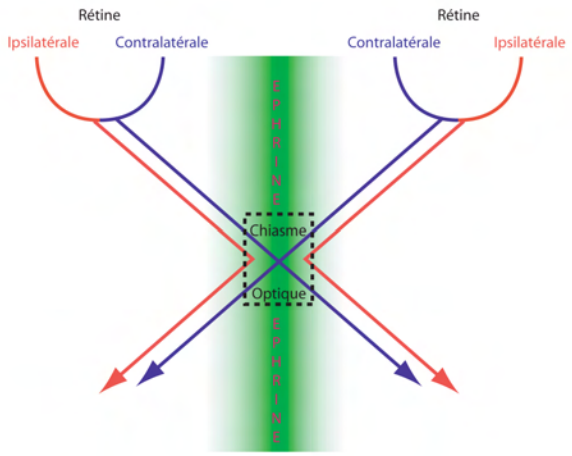


FIG. 1.6 – *Lors de la formation du système de la vision, les axones rétiniens projettent vers le cortex visuel en étant guidé par un gradient d'ephrine du à une production sur la ligne médiane.*

[74, 111, 146]. Elle régule également l'existence de phase de désensibilisation du cône de croissance, permettant son adaptation à de large plages de concentration de signal de guidage [113]. Une question cruciale pour la compréhension du fonctionnement du cône de croissance est alors l'établissement et le maintien d'un niveau de régulation adapté à la situation. Comment les concentrations de calcium et de cAMP sont elles fixées au cours du temps ? Par quel processus d'auto-organisation le cône de croissance module-t-il sa réponse pour optimiser sa fonction dans le guidage axonal ? Quelques résultats récents ont démontré l'existence de mécanismes permettant d'ajuster les concentrations de cAMP et de calcium au cours du processus de guidage. L'activation de récepteurs de la netrine est ainsi capable d'induire une augmentation intracellulaire de cAMP [37]. De façon analogue, les netrines [168] ou les neurotrophines [99] sont capables d'induire une entrée de calcium dans le milieu intracellulaire par l'intermédiaire de canaux calciques (TRPC). Ces observations laissent entrevoir la possibilité d'une organisation de la signalisation chimiotactique fondée sur une boucle de rétroaction entre les récepteurs et les régulateurs de leurs cascade de signalisation, calcium ou cAMP.

La régulation spatiale

Outre les méthodes de régulation fondées sur la biochimie des cascades d'interaction, la distribution spatiale des molécules de la voie de signalisation peut permettre un contrôle de la réponse du cône de croissance. Cette

organisation s'avère essentielle pour le chimiotactisme des cellules eukaryotes (Section suivante). La présence de radeaux lipidiques est ainsi requise pour le guidage par le BDNF et la concentration de récepteurs liés à ces radeaux est asymétrique dans un gradient de BDNF [65]. L'organisation de la transduction du signal extérieur autour de ces plates-formes membranaires permet la création de signaux secondaires locaux asymétriques. Cette forme d'organisation pourrait éventuellement permettre une amplification précoce du signal extérieur en concentrant asymétriquement certains éléments du système de détection en aval des récepteurs membranaires. De plus, une activité localisée dans l'espace au niveau du cône de croissance peut être requise pour l'accomplissement du guidage axonal [180]. L'organisation spatiale des éléments de la cascade de signalisation semble donc décisive pour la fonction du cône de croissance et constitue un niveau de régulation supplémentaire en plus de la régulation biochimique.

1.2 Le guidage par le GABA

1.2.1 Les récepteurs du GABA

Il existe trois familles différentes de récepteurs du GABA : les récepteurs $GABA_AR$, $GABA_BR$ et $GABA_CR$. Le récepteur $GABA_AR$ est un canal ionique pour les ions chlore, ayant une structure quaternaire pentamèrique [116]. Il existe au moins 17 différentes sous-unités regroupées en six classes α, β, δ, γ, ϵ et σ, chacune ayant plusieurs isoformes et une masse moléculaire de l'ordre de 50 kDa. Il se rencontre *in vivo* différents assemblages de ces sous-unités formant un récepteur fonctionnel, en proportions variables selon les tissus. Dans le système nerveux un récepteur fonctionnel se compose majoritairement de deux sous-unités α, deux sous-unités β et une sous-unité γ (Figure1.7). Il est à noter que l'isoforme γ_2 est présente de façon ubiquitaire dans les récepteurs $GABA_AR$ du système nerveux central [55]. La structure du $GABA_AR$ en fait une protéine transmembranaire présentant dans son domaine extracellulaire des sites spécifiques pour différents agonistes (GABA, baclofen,...), antagonistes (gabazine, bicuculine,..) et modulateurs (benzodiazépines, barbituriques, ethanol,...). Un assemblage de sous-unités α, β et γ est suffisant pour reproduire l'ensemble de ces propriétés pharmacologiques dans un système hétérologue [70] et constitue un récepteur du $GABA_A$ type.

1.2.2 La voie de signalisation du $GABA_AR$

Le GABA dans le système nerveux mature

Le ligand du $GABA_AR$, le GABA ou acide γ-aminobutyirique, est un acide aminé de formule chimique $C_4H_9NO_2$ (Figure 1.8).

La fixation de deux molécules de GABA au récepteur provoque l'ouverture de celui-ci suivant une dynamique coopérative entre sous-unités déjà

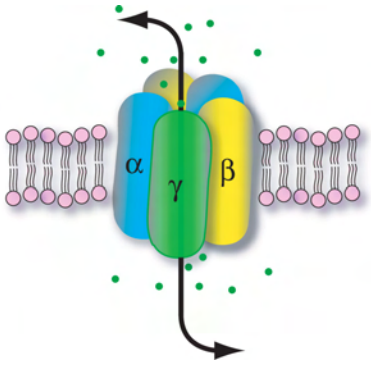


FIG. 1.7 – *Représentation schématique du récepteur du $GABA_A$ composé de cinq sous-unités, ici dans la stœchiométrie la plus fréquente : deux sous-unités α et β et une sous-unité γ*

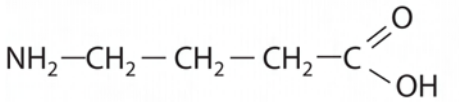


FIG. 1.8 – Formule développée de l'acide γ-aminobutyrique (GABA)

supposée par Hodgkin et Huxley [71] pour les canaux potassiques et sodiques. Dans un système mature, le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur dont la fixation sur un récepteur produit un influx d'ions chlore dans le neurone, provoquant une hyperpolarisation avec une dynamique temporelle spécifique de l'ouverture coopérative des récepteurs $GABA_AR$. Le GABA est ainsi le vecteur majoritaire de l'inhibition dans le cerveau adulte avec la glycine et fait l'objet de nombreuses études physiologiques (addiction alcoolique [156], épilepsie, processus mnésiques [135],..) ou moléculaires.

Le GABA durant le développement du système nerveux

Durant les phases initiales du développement du système nerveux le GABA est un neurotransmetteur excitateur [6, 150, 174], l'ouverture du canal chloride provoquant un efflux de chlore et donc une dépolarisation membranaire du neurone. Les récepteurs du GABA, ainsi que d'autres récepteurs aux neurotransmetteurs tels que le glutamate ou l'acétylcholine sont exprimés dans les axones de neurones en croissance. Il a ainsi pu être montré *in vitro* et *in vivo* que le GABA modulait la croissance de l'axone et pouvait être un chimioattractant [50, 175].

Le résultat net de l'action de sources de GABA sur l'axone est complexe. En effet, les récepteurs $GABA_AR$ et $GABA_B$ n'induisent pas la même ré-

ponse à la stimulation [175], les premiers provoquant une chimioattraction et les seconds une chimiorépulsion. Le comportement du cône de croissance résulte alors d'un équilibre entre les deux voies de signalisation, qui dépend notamment du type de neurones et de la région cérébrale.

Un mécanisme d'action du GABA passant par les récepteurs $GABA_AR$ a été proposé en 1996 [57]. L'activation du récepteur par le GABA provoquerait l'entrée d'ions chlore dans le milieu intracellulaire. La dépolarisation induite permettrait alors l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants. La concentration locale de calcium serait alors capable, comme détaillé plus haut, de moduler l'activité de certaines kinases comme PKCα ou PKCβ, modifiant alors l'état de phosphorylation de protéines de régulation du cytosquelette comme $MARCKS$ ou $GAP43$ (voir Figure 1.9). Ces deux dernières protéines, liées initialement à la membrane, sont en effet capables de se localiser vers le cytoplasme et de se lier aux microtubules dans leur état phosphorylé et ainsi modifier la croissance de l'axone.

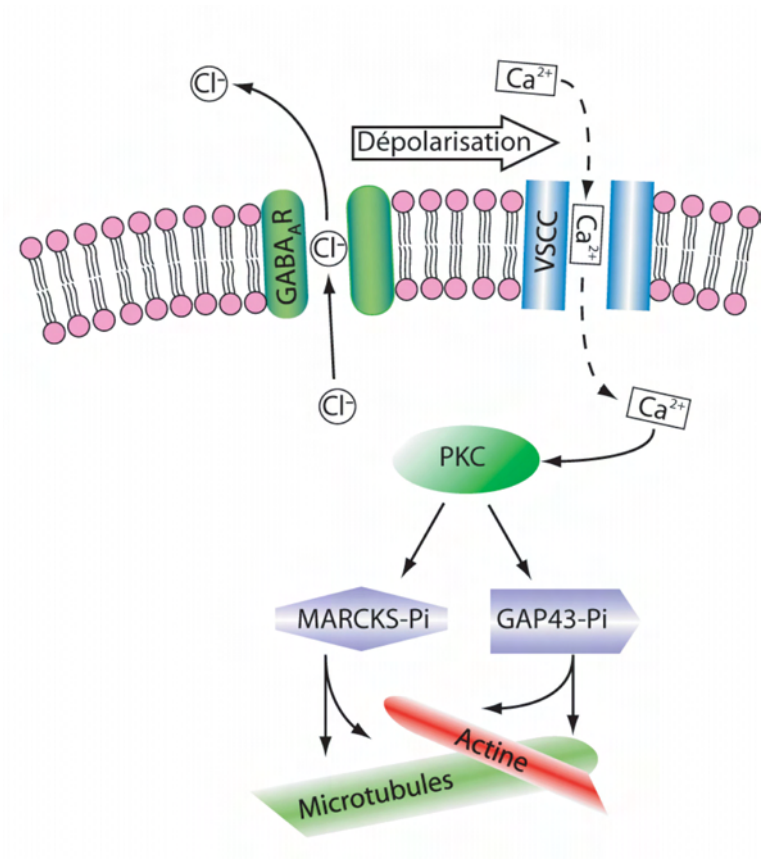


FIG. 1.9 – *Cascade de signalisation putative du $GABA_AR$ dans le cône de croissance. Ce schéma simplifié est adapté du travail de Fukura et al. [57]*

Les méthodes utilisées pour établir ce mécanisme sont cependant indirectes : ce mécanisme n'a pas été observé mais inféré à partir de données extraites de préparations biochimiques de cônes de croissance [57]. Ce modèle permet cependant de mettre en avant un élément essentiel de la signalisation par le GABA : une élévation locale de la concentration de calcium [175] due à l'activation du récepteur déclenchant une cascade de signalisation vers le cytosquelette.

Questions ouvertes

De nombreuses questions restent ouvertes quant au mode d'action du GABA dans le guidage axonal. Les mécanismes moléculaires sont encore peu caractérisés ; la régulation de la signalisation par le GABA est encore peu connue. La modulation de la réponse est essentielle, comme nous l'avons noté plus haut, pour rendre compte des propriétés remarquables des cônes de croissance. Comment expliquer en effet leur sensibilité alliée à leur robustesse de détection ? Des différences de concentration de l'ordre de quelques pour cents peuvent ainsi déclencher le virage du cône de croissance [66, 147, 175, 179] sans pour autant que la croissance du neurone soit sensible au bruit, comme le montre la précision de l'adressage axonal *in vivo*. Le mécanisme que nous venons d'évoquer pour le GABA ne saurait rendre compte de ces propriétés ; la question de la régulation de la détection de gradient de GABA est encore ouverte.

Nous allons nous intéresser maintenant aux études effectuées sur le chimiotactisme des organismes unicellulaires. Ce domaine présente une problématique analogue à celui du guidage axonal : comment une cellule est elle capable de détecter un signal extérieur avec sensibilité et précision ? Ce point est bien documenté pour le chimiotactisme ; nous nous appuierons donc sur ce système voisin afin de mettre en relief les questions clés dans la compréhension de la régulation du guidage par le GABA.

1.3 Le chimiotactisme

Afin de remplir certaines fonctions vitales, comme la recherche de nourriture ou l'organisation supracellulaire, de nombreux organismes unicellulaires et types cellulaires ont développé la capacité, appelée chimiotactisme, de se mouvoir en réponse à des stimulations chimiques externes. Nous allons présenter ici quelques éléments sur les mécanismes moléculaire conférant cette faculté et comment ils peuvent produire une réponse motile efficace à des signaux externes faibles. Nous verrons alors comment ils peuvent nous éclairer sur les mécanismes du guidage axonal. Les systèmes de chimiotactisme nous serviront de références pour nos résultats sur le cône de croissance, nous allons donc les présenter plus en détail.

1.3.1 Les systèmes biologiques

Le chimiotactisme a été étudié pour deux grandes familles de systèmes biologiques : les bactéries, essentiellement *Escherichia Coli*, et les cellules eukaryotes, essentiellement les neutrophiles ou l'amibe *Dictyostelium Discoideum*.

Les bactéries

La bactérie *Escherichia Coli*, ou *E. Coli* mesure environ 1μm et dispose en moyenne de 6 flagelles rotatifs d'environ 100 nm de longueur permettant son déplacement [7] (Figure 1.10).

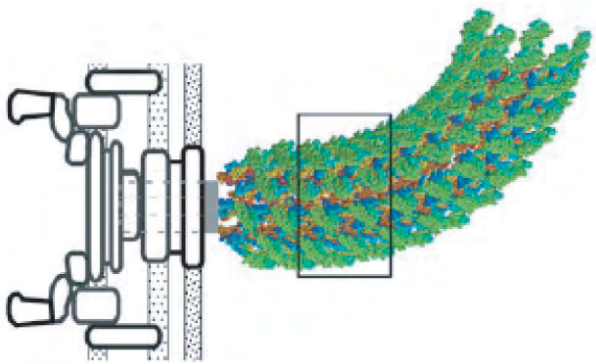


FIG. 1.10 – *Schéma du moteur et reconstruction atomique du flagelle d'une bactérie (tiré de Samatey et al, Nature, 2004 [131]).*

Le moteur mettant le flagelle en mouvement est actionné par un flux ionique et est réversible. Lorsqu'il tourne dans le sens des aiguilles d'une montre la bactérie se déplace peu et de façon chaotique. En revanche, lorsqu'il tourne dans le sens inverse, la bactérie se déplace rapidement en ligne droite (Figure 1.11). L'alternance de périodes de déplacement rapide -ou courses- et de déplacement réduit -ou culbutes- et la régulation de leurs durées permettent à *E. Coli* de se déplacer vers les sources de nutriments comme l'aspartate. Le rallongement de la durée des courses dirigés vers les fortes concentrations d'aspartate permet à la bactérie de remonter le gradient de nutriment vers sa source.

Les cellules eukaryotes : *Dictyostelium Discoideum*

Dictyostelium Discoideum est une amibe sociale se nourrissant de bactéries. Pour cela, elle est capable de détecter la présence d'AMP cyclique (cAMP) sécrété par celles-ci et de se diriger vers sa source pour finalement

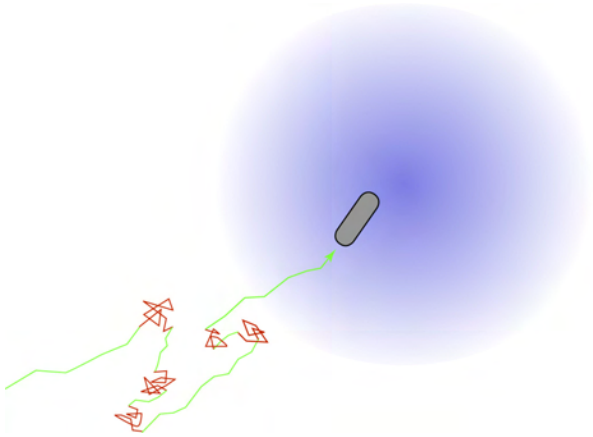


FIG. 1.11 – *Mouvement schématique d'une bactérie dans un gradient de nutriment. Son mouvement alterne entre courses (en vert) et culbutes (en rouge). Le rallongement relatif des courses dirigées vers les nutriments produit le chimiotactisme.*

phagocyter la bactérie [33]. Le génome de *Dictyostelium Discoideum* est aujourd'hui complètement séquencé et annoté, et sa manipulation génétique par mutagénèse dirigée utilisant la recombinaison homologue est possible. D'autre part, cet unicellulaire d'une taille d'environ 20 μm est assez plat, ce qui rend son imagerie aisée. Ces caractéristiques en font aujourd'hui un des systèmes modèles les plus utilisés dans l'étude du chimiotactisme des cellules eukaryotes.

Description macroscopique

Les deux systèmes modèles présentés ici semblent très similaires. Les mouvements d'*E. Coli* et de *Dictyostelium* sont tous deux correctement décrits au niveau macroscopique par l'équation phénoménologique du chimiotactisme [114] :

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D\frac{\partial^2 n}{\partial x^2} - \chi\frac{\partial}{\partial x}(n\frac{\partial a}{\partial x}) \tag{1.1}$$

où $n(x,t)$ est le nombre de cellules en x à l'instant t et $a(x,t)$ la concentration local de chimioattractant. Cette équation d'évolution de la concentration cellulaire n présente deux composantes : le premier terme décrit la diffusion des cellules et le second traduit leur mouvement dirigé par la présence d'un gradient d'activateur a. Une cellule est chimiotactique dans la mesure où son mouvement est influencé par la présence de la substance a, c'est-à-dire lorsque χ la susceptibilité chimiotactique est non nulle. Quelle est l'origine moléculaire de cette susceptibilité macroscopique ? Il s'agit de comprendre

comment une cellule peut détecter un signal chimique extérieur et le convertir en une réponse motrice.

1.3.2 Les mécanismes de détection

Le chimiotactisme a été observé dès le 19me siècle (W. Pfeffer en 1884 [122]), mais la compréhension du mécanisme permettant à un organisme unicellulaire d'intégrer certains signaux extérieurs pour aboutir à une mobilité dirigée est récente et reste encore incomplète. Si la description macroscopique des bactéries et des eukaryotes est semblable, les tailles sensiblement différentes d'une bactérie et d'une cellule eukaryote (de l'ordre de ~ 1 μm pour une bactérie et de ~ 10 μm pour une amibe) laissent supposer que les mécanismes permettant l'accomplissement de la fonction chimiotactique peuvent être différents.

La détection temporelle et la détection spatiale

Le chimiotactisme implique deux systèmes : un système de détection de gradients extérieurs appuyé sur des récepteurs membranaires (les récepteurs MCP pour *E. Coli* [104] et les récepteurs cAR1 pour *Dictyostelium*), et un système moteur (les flagelles pour une bactérie, le cytosquelette pour une cellule eukaryote). Comment le système de détection d'une cellule est il capable de mesurer un gradient de concentration de chimioattractant ? Deux méthodes génériques sont envisageables [120] : une méthode dite spatiale et une méthode dite temporelle. Dans une méthode temporelle, la cellule ressent la concentration moyenne de chimioattractant autour d'elle puis se déplace. Elle conserve la mémoire de la concentration mesurée durant un certain temps τ et mesure celle à sa nouvelle position. La comparaison des deux permet alors de choisir la direction du déplacement vers les hautes concentrations de chimioattractants. Dans une méthode spatiale, la cellule compare la concentration d'attractant entre deux différents points de sa membrane, puis se réorganise afin de remonter le gradient. De façon intuitive, un modèle spatial semble peu adéquat pour un organisme de trop petite taille comme une bactérie, mais plus adapté pour une amibe.

Le chimiotactisme bactérien

Dans le cas bactérien, il a été montré qu'*E. Coli* était capable de réaliser une comparaison temporelle de la concentration ambiante d'aspartate sur un temps $\tau = 4$ s [12, 136]. En effet, lorsque une bactérie collée sur une surface est soumise à une impulsion d'aspartate de quelques millisecondes, son flagelle augmente durant une seconde son taux de rotation anti-horaire (donc le déplacement de la bactérie) et le diminue en dessous de son taux au repos durant les trois secondes suivantes (Figure 1.12). Un signal chimioattractant est ainsi intégré sur 4 secondes, sous une forme similaire à la dérivée

temporelle du signal extérieur [136]. Ceci permet à la bactérie d'ajuster son déplacement au cours du temps : le déplacement est augmenté rapidement suite à l'augmentation brutale d'aspartate (phase montante de l'impulsion), puis diminué sous sa valeur à l'équilibre suite à la baisse d'aspartate (phase descendante de l'impulsion). Ainsi, une bactérie dans un gradient d'aspartate peut orienter son déplacement vers les hautes concentrations. Le mécanisme

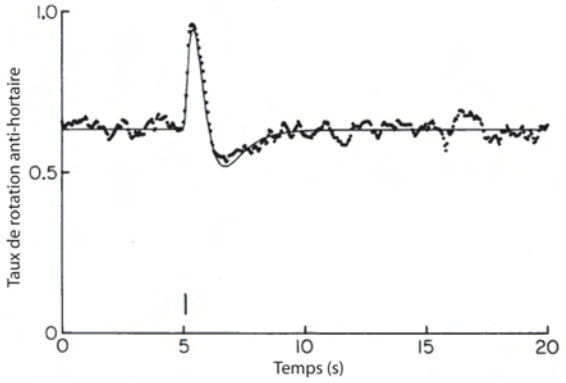


FIG. 1.12 – *Réponse motrice d'Escherichia Coli (points noirs) à une impulsion d'aspartate, indiquée par le trait (tiré de Segall et al., PNAS, 1986 [136]).*

responsable de cette propriété integrative est aujourd'hui bien connu. L'activation des récepteurs MCP induit une activation du flagelle par l'action de plusieurs protéines, dont CheA, CheY et CheW. Ceci produit l'augmentation du déplacement quand la concentration d'aspartate devient plus élevée. Cependant, l'activation de CheA permet celle de CheB, qui favorise la déméthylation et donc l'inactivation des récepteurs (Figure 1.13).

Cette boucle de rétroaction négative est plus lente que l'activation et reste encore transitoirement en action après l'extinction du signal attractant, ce qui explique la période de déplacement amoindri observée. Elle permet également à la bactérie de s'adapter à des milieux où les niveaux moyens d'aspartate sont différents : la boucle restaure le niveau de rotation anti-horaire au repos. La sensibilité remarquable de la détection peut s'expliquer par un ajustement optimisé de la densité de récepteur [8, 9] et l'existence d'interactions (essentiellement médiées par CheA et CheW) causant la formation de groupes de récepteurs membranaires. Ils forment un système de détection coopératif permettant l'amplification du gradient externe [20, 149]. Le chimiotactisme bactérien repose ainsi sur une détection "exploratoire" : la bactérie compare la concentration extérieure de chimioattractant à ses positions successives dans le temps. Ce système est adapté à un petit organisme pouvant induire son déplacement rapidement, sans profonde modification

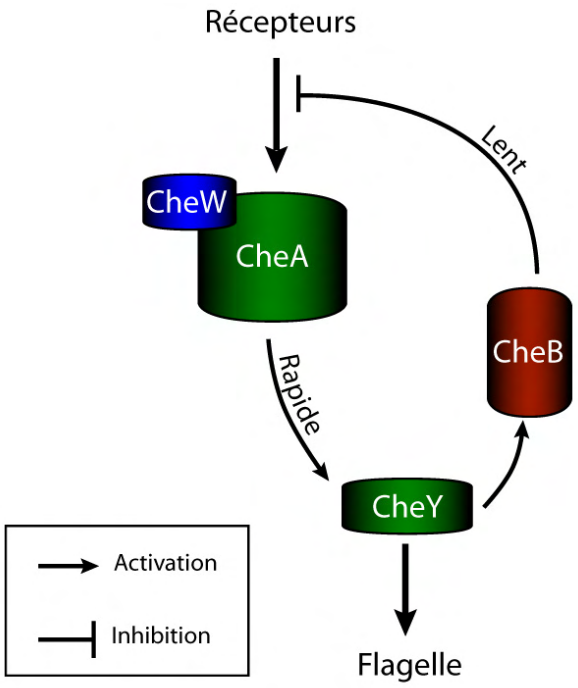


FIG. 1.13 – *Signalisation chimiotactique chez E. Coli. L'activation rapide et l'inhibition plus lente par CheB explique la forme de la réponse chimiotactique de la bactérie).*

morphologique, comme les bactéries propulsées par leurs flagelles. Les propriétés des cellules eukaryotes sont bien différentes, leur mobilité repose sur un réarrangement du cytosquelette. Le mécanisme bactérien n'est donc pas transposable directement mais fait apparaître les problèmes essentiels à résoudre dans un système chimiotactique : la lecture du gradient, le couplage au système moteur, l'adaptation et la sensibilité de la détection.

Le chimiotactisme de *Dictyostelium Discoideum*

Les cellules eukaryotes ont également la capacité de détecter de très faibles gradients (∼1%) [181]. L'amibe *Dictyostelium Discoideum* peut se déplacer ainsi de façon directionnelle vers une source de cAMP. Ce mouvement est dépendant de la réorganisation des filaments d'actine à l'intérieur de la cellule et une faible stimulation extérieure est ainsi capable de déclencher des modifications majeures de l'organisation cellulaire. Une amplification du signal par la chaîne de transduction semble donc nécessaire.

L'utilisation d'outils génétiques a permis d'identifier les acteurs moléculaires de la détection chimiotactique [106] (Figure 1.14).

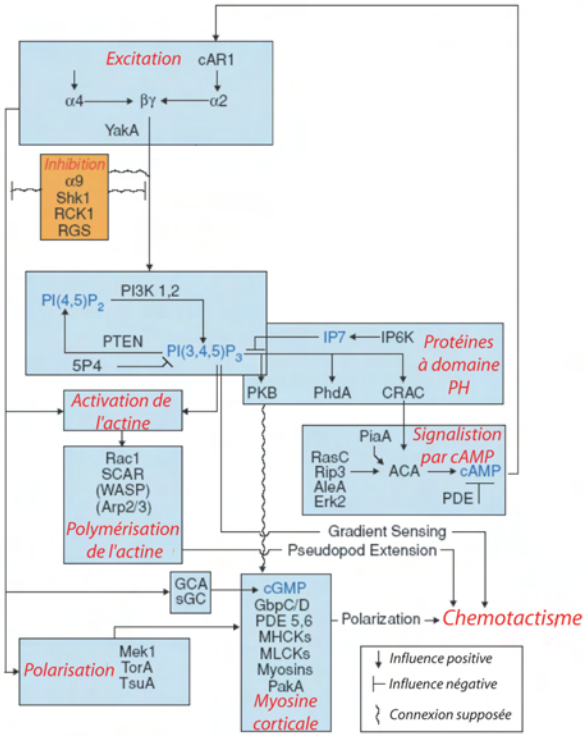


FIG. 1.14 – *Cascade de signalisation du chimiotactisme de Dictyosteliumm Discoideum (tiré de Manahan et al., Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2004 [106]).*

Sans entrer dans une description exhaustive des interactions moléculaires mises en jeu dans la détection d'un gradient de cAMP, mentionnons simplement quelques points marquants. Le cAMP est détecté par des récepteurs membranaire (cAR1) couplés à des protéines G. Ce messager secondaire favorise l'activité kinase de PI3K. La phosphorylation des phosphoinositides comme PI(4,5)P_2 étant permise par PI3K et inhibée par PTEN, ceci induit l'augmentation de la proportion de la forme phosphorylée PI(3,4,5)P_3. Celle-ci déclenche alors plusieurs cascades d'activation menant à la motilité, en régulant notamment la dynamique de l'actomyosine et en activant des protéines à domaine PH (pour Pleckstrine Homologue) comme CRAC (Cytosolic Regulator of Adenylyl Cyclase) induisant la production de cAMP par l'amibe. Cependant, la détermination de ce réseau d'interactions n'est pas suffisante pour comprendre la détection de signaux de guidage et l'amplification observée du signal extérieur. A quel niveau l'asymétrie apparaît elle dans la distribution des molécules de la cascade de signalisation ?

La visualisation directe des différents intermédiaires [53] est une méthode puissante pour apporter quelques éléments de réponse à ces questions. L'ima-

gerie en molécule unique des récepteurs cAR1 libres ou liés à du cAMP [166] ainsi que des protéines G [81, 83] révèlent que les composants les plus en amont de la cascade de signalisation restent distribués de façon homogène. En revanche, les protéines à domaines PH (CRAC ou PKB)[119, 139] et les régulateurs PTEN et PI3K de la production PIP_3 [58] sont localisés asymétriquement lorsque la cellule est soumise à un gradient de cAMP. PI3K est diffus dans le milieu intracellulaire en l'absence de stimulation extérieure, mais en présence d'un gradient de cAMP, il est recruté à la membrane plasmique faisant face à la source. Dans le même temps PTEN, qui est initialement lié à la membrane, se détache vers le cytoplasme depuis la membrane la plus proche de la source. PI3K et PTEN ont ainsi une localisation complémentaire dans la cellules (Figure 1.15).

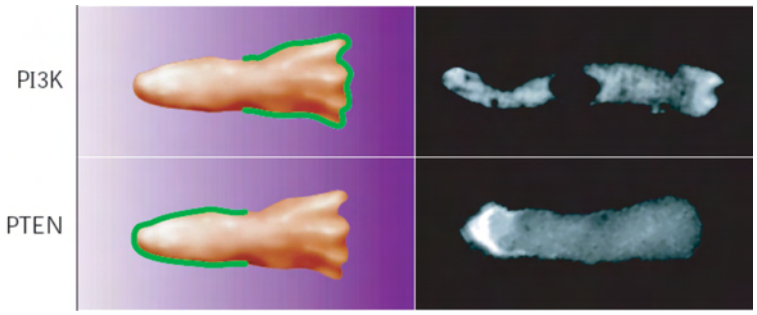


FIG. 1.15 – *Distribtution de PI3K et PTEN en présence d'un gradient de cAMP, provenant ici de la droite (tiré de Franca-Koh et Devreotes, Physiology, 2004 [53]).*

L'asymétrie de ces deux effecteurs est ainsi visiblement plus prononcée que celle du signal extérieur, dont la différence entre les deux extrémités de la cellule est de l'ordre de quelques pour cents. Ces observations permettent de constater l'amplification réalisée lors de la transduction du signal. Il peut a priori s'agir simplement de la réponse non-linéaire de la cascade de signalisation ou d'une réorganisation du système de détection. Le mécanisme à l'origine de cette asymétrie initiale est alors intéressant.

1.3.3 Modèles de chimiotactisme eukaryote

Excitation locale et inhibition globale

Un modèle d'amplification de l'asymétrie simple et étayé expérimentalement est celui dit de l'excitation locale et de l'inhibition globale [53, 110, 144]. Ce modèle est essentiellement fondé sur l'observation suivante : quand une amibe est plongée dans un bain de cAMP, une augmentation rapide ($\sim$ 10 s) du recrutement membranaire de PI3K (ou de CRAC) [120] est observée, suivie par un lent retour à la distribution initiale. L'amibe est ainsi capable

de s'adapter à une concentration moyenne plus élevée de chimioattractant. Cette expérience révèle de plus que le niveau d'asymétrie dans la cellule semble être le résultat de deux phénomènes antagonistes : un processus d'excitation rapide et un processus d'inhibition plus lent (Figure 1.16). En supposant d'autre part que l'excitation reste localisée dans l'espace et reflète la stimulation extérieure et que l'inhibition est une interaction à longue portée non compartimentée, on peut rendre compte de la création d'une asymétrie forte, et ce même dans un faible gradient. En effet, l'inhibition est identique dans toute la cellule, maintenue à un niveau plus élevé qu'au repos suite à l'application du gradient. L'excitation localisée est ainsi trop faible à l'arrière de la cellule pour surmonter cette inhibition, au contraire du côté faisant face au gradient (Figure 1.16). L'asymétrie des messagers secondaires est ainsi plus prononcée que celle dans la concentration de cAMP extérieur : le gradient est amplifié.

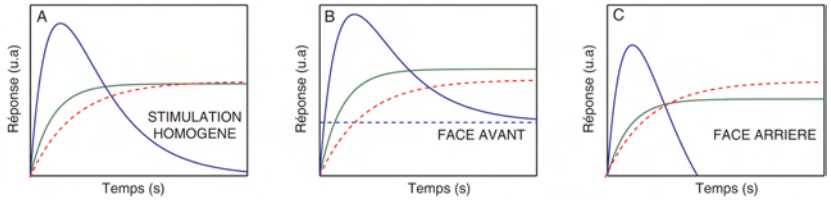


FIG. 1.16 – *Évolution temporelle de l'excitation et de l'inhibition de la réponse, d'une cellule à une stimulation homogène (A) ou par un gradient de cAMP (à l'avant en B et à l'arrière en C). L'inhibition est indiquée par en trait rouge plein, l'excitation en vert pointillé et la réponse nette en bleu.*

La voie excitatrice est bien caractérisée au niveau moléculaire : l'activation du récepteur puis celle des protéines G causent la translocation de PI3K vers la membrane et celle de PTEN vers le cytoplasme. L'inhibition est par contre moins connue. Certaines protéines régulant l'activité des protéines G [106, 153] ou celle de PI3K [144] sont néanmoins suspectées de pouvoir jouer ce rôle (Figure 1.17). Le caractère globale de l'inhibition qui en résulterait est encore spéculatif.

Pertinence du modèle

Le modèle d'excitation-inhibition permet d'expliquer une amplification du signal extérieur dans les régions les plus exposées au facteur attractant. Le gradient extérieur faible est converti en une asymétrie plus marquée au niveau des effecteurs PTEN et PI3K par la modulation de leur translocation vers la membrane. Le cytosquelette n'est pas nécessaire pour cette étape qui peut donc être très rapide. Ce modèle simple peut rendre compte de la sensibilité élevée des cellules eukaryotes aux signaux extérieurs. Il prédit de

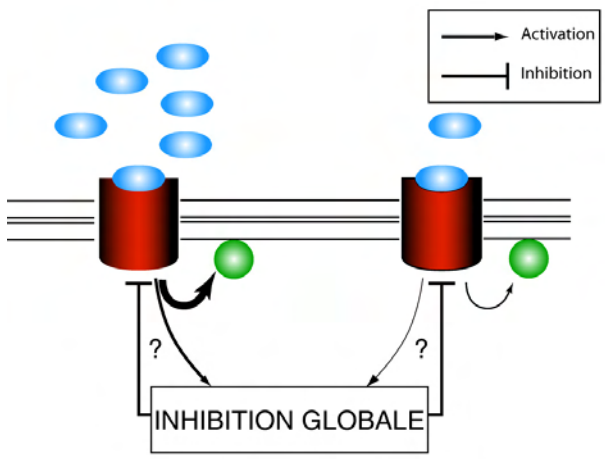


FIG. 1.17 – *Modèle d'excitation-inhibition. Les récepteurs sont les cylindres rouges, le cAMP les ovoïdes bleus et PI3K les sphères vertes. Les flèches indiquent une interaction positive et les T une inhibition. L'épaisseur des traits indique l'amplitude de l'interaction. Le mécanisme de l'inhibition globale est encore peu connu.*

plus que la polarisation de la cellule peut s'établir suite à une stimulation brève en un temps lié à la biochimie de la cascade de signalisation, c'est-à-dire quelques secondes, ce qui est conforme aux observations expérimentales [53].

Ce modèle est cependant incapable en l'état d'expliquer l'ensemble des propriétés chimiotactiques des cellules eukaryotes. Une asymétrie établie serait difficile à renverser, la cellule étant piégée dans un état de polarisation acquise dont elle ne pourrait sortir que par la dégradation de l'activateur [110]. Ce comportement résulterait en une alternance de périodes sensibles et de périodes où la détection d'un gradient extérieur serait impossible. Ceci est en contradiction avec les observations expérimentales [137], qui montrent que *Dictyostelium Discoideum* est capable de répondre à des stimulations "minute" indépendamment du moment de la stimulation. Il est possible de développer des modèles plus complets permettant de rendre compte de cette propriété en introduisant à partir du schéma général d'excitation locale et inhibition globale, un inhibiteur local d'action plus lente que les deux autres acteurs [110]. L'interprétation moléculaire de tels modèles est cependant encore largement hypothétique.

1.3.4 Analogies et différences

L'acquisition de capacités chimiotactiques repose sur l'existence d'un système de détection réalisant des comparaisons de concentration de signaux

extérieurs dans le temps, comme les bactéries, ou dans l'espace comme *Dictyostelium Discoideum*. Le problème de l'amplification du signal extérieur apparaît crucial dans les deux cas et les études menées ont permis de révéler certains mécanismes généraux permettant d'obtenir cette amplification.

Le cône de croissance est sensible à de très faibles différences de concentrations, tout comme les cellules eukaryotes. Une étape d'amplification semble également requise pour répondre aux gradients de signaux de guidage. L'amplification est cependant susceptible d'être de nature différente d'un système à l'autre, en raison de leur utilisation physiologique différente du chimiotactisme. En effet, l'amplification du signal extérieur dans *Dictyostelium Discoideum* par exemple, doit permettre de respecter la fonction "de chasse" du chimiotactisme de l'amibe. Un modèle cohérent, comme celui présenté dans la section précédente, doit être capable de rendre compte de la capacité de l'amibe de réagir en un temps très bref à un gradient extérieur, même fugace, et de s'adapter rapidement à une nouvelle direction d'attraction.

A l'inverse, le guidage axonal n'est pas un processus de chasse ou d'exploration mais un processus d'adressage. Un axone a en effet une cible unique dans sa croissance ; il n'a pas pour fonction de collecter de la nourriture, en explorant éventuellement de vastes régions de l'espace comme le fait une amibe. Le rôle du cône de croissance est de sélectionner une direction précise définie par un signal extérieur persistent, afin de réaliser un guidage axonal précis. En ce sens, il est différent des systèmes chimiotactiques eukaryotes "usuels".

Il apparaît donc crucial de déterminer la base moléculaire du processus d'amplification dans le cône de croissance et surtout comment, il peut conférer de la robustesse et de la sensibilité au choix de la direction de croissance de l'axone. Le mécanisme d'excitation locale et d'inhibition globale est il pertinent dans le chimiotactisme nerveux ou existe-t-il des mécanismes alternatifs capables de produire une asymétrie amplifiée dans le cône de croissance ?

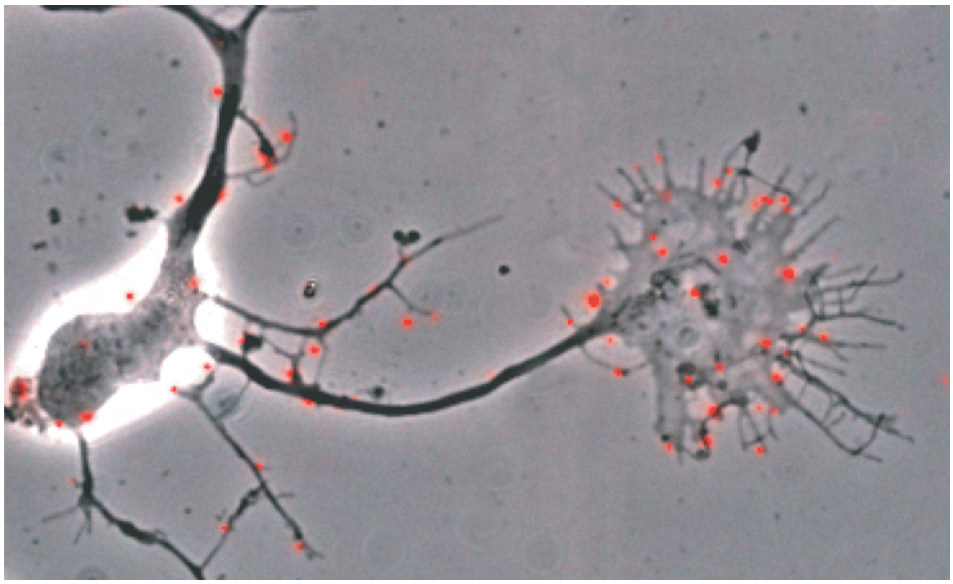
Les travaux sur *Dictyostelium Discoideum* mettent d'autre part en évidence l'importance de la visualisation des protéines de la cascade de signalisation. Leur dynamique est susceptible de révéler des informations sur les mécanismes de détection dans le cône de croissance. De plus, l'organisation spatio-temporelle des protéines intracellulaires et membranaires semble de façon générale un élément clé dans le fonctionnement cellulaire [19, 87]. Ces considérations ont motivé notre intérêt dans la visualisation des mouvements des récepteurs du GABA. Dans le chapitre suivant, nous nous intéresserons ainsi aux méthodes d'imagerie de ce récepteur et à sa dynamique dans la membrane du cône de croissance.

Chapitre 2

Dynamique du récepteur du $GABA_A$

Peut-être l'immobilité des choses autour de nous leur est-elle imposée par notre certitude que ce sont elles et non pas d'autres, par l'immobilité de notre pensée en face d'elles ?

Marcel Proust



L'organisation spatiale du système de détection de gradient de substances de guidage dans le cône de croissance apparaît essentielle pour comprendre les propriétés remarquables du guidage axonal évoquées dans le chapitre précédent [59, 148, 161]. Afin de comprendre la dynamique et l'organisation des $GABA_A$Rs dans la membrane, il est important de mettre en évidence les interactions moléculaires qui gouvernent leurs déplacements. La taille nanométrique des récepteurs implique que ceux-ci se trouvent dans un environnement où les contributions browniennes et les fluctuations stochastiques sont importantes et ne peuvent être révélées par des mesures dynamiques moyennes. Il est ainsi nécessaire d'observer la dynamique des récepteurs au GABA de réaliser au niveau de la molécule unique. Nous présenterons ici les outils mis en œuvre pour réaliser ces mesures qui permettent de proposer un modèle de locomotion des récepteurs du $GABA_A$, dont nous discuterons la pertinence biologique.

2.1 Aspects expérimentaux

2.1.1 Système biologique

Toutes les expériences présentées dans la suite de ce rapport ont été effectuées sur des cultures primaires d'interneurones de moelle épinière de rat [105]. Celles-ci sont obtenues sur des embryons de rat 14 jours après fécondation. A l'aide d'instruments de microchirurgie, les moelles sont prélevées sur les animaux et conservées dans du PBS additionné de glucose à $3.3.10^{-2}$ mol.L^{-1} avant leur dissociation. Elles sont ensuite coupées en morceaux millimétriques, traitées par la trypsine afin d'éliminer les protéines d'adhésion intercellulaires, et dissociées mécaniquement en présence de DNAse afin d'éviter l'agrégation spontanée des cellules autour de l'ADN présent dans le milieu suite à la nécrose cellulaire induite par la dissection. Les neurones sont alors précipités par centrifugation et mis en culture sur des lamelles de verre préalablement recouvertes de polyornithine (un polypeptide favorisant l'adhésion) et de sérum afin de reproduire *in vitro* les conditions les plus proches des conditions natives. Après mise en culture, les neurones ont perdu leurs prolongements pour adopter une forme sphérique et sont dispersés sur toute la surface de la lamelle. Lorsque ceux-ci sont placés en conditions de culture adéquates (milieu Neurobasal supplémenté par de la glutamine et du B27 sous atmosphère à 5% de CO_2 à 37^oC), ils vont pouvoir se développer et faire croître leur neurites, reproduisant sur lamelle le développement du système nerveux. Dans les conditions de culture choisies, seuls des interneurones sont supposés survivre en culture. En effet, la moelle épinière à ce stade de développement est composée presque exclusivement d'interneurones, et l'absence de sérum est censée prévenir la croissance d'autres types cellulaires (fibroblastes, macrophages,...). Ceux-ci peuvent néanmoins être sporadiquement présents en cas de prélèvement imparfait de

la moelle épinière avec présence d'autres tissus comme la peau ou le sang. Après 1 à 2 jours en culture les axones vont croître vers les neurones voisins et après 7 à 9 jours en culture, un réseau de neurones mature se sera formé. L'observation de cônes de croissance et du guidage axonal est donc optimale entre 3 et 6 jours en culture.

2.1.2 La microscopie de fluorescence

Depuis plus d'une décennie, s'est posée la question de savoir comment observer une molécule unique en action dans un système vivant. Un outil naturel pour atteindre cet objectif est la microscopie de fluorescence. En effet, pourvu qu'il soit possible de munir une protéine d'intérêt d'un marqueur fluorescent, il est possible de la voir directement en l'éclairant à la longueur d'onde d'excitation du marqueur et en collectant la lumière émise lors de sa désexcitation radiative (Figure 2.1).

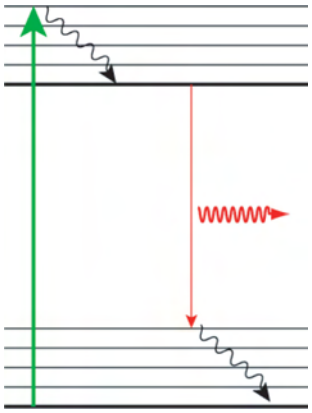


FIG. 2.1 – *Diagramme de Jablonski. Dans un système simple à deux états, la molécule est excité depuis son état fondamental vers un état excité. Les excitations vibrationnels sont perdues de façon non-radiative (flèche noire) et la molécule se désexcite vers son état fondamental (flèche droite rouge) en émettant un photon (flèche rouge courbe). Le décalage entre l'émission et l'excitation - ou décalage de Stokes - permet de les séparer spectralement.*

Si le principe d'une telle méthode est simple, la nature du marqueur et son mode de couplage à la cible sont déterminants et sont le plus souvent les facteurs limitants en microscopie de fluorescence. Aujourd'hui deux grandes méthodes de marquage fluorescent sont disponibles : le marquage endogène par la Green Fluorescent Protein (GFP) et ses homologues et le marquage exogène à l'aide de fluorophores.

La GFP est une protéine naturellement fluorescente, originellement découverte chez une méduse *Aequorea victoria* [141, 165], qui se décline aujour-

d'hui en de nombreux mutants - et autant de couleurs - produits par génie génétique. Une protéine de fusion GFP-protéine d'intérêt exprimée dans une cellule ou un organisme entier peut alors être observée par fluorescence.

Les fluorophores organiques exogènes (Cy3, A488,...) peuvent marquer une protéine par un attachement biochimique à l'aide d'anticorps, comme nous le détaillerons plus loin pour les récepteurs membranaires. L'observation en molécule unique pour ces deux types de marquage est alors possible moyennant un système d'illumination et de détection suffisamment performant.

Les champs d'application de ces méthodes sont cependant limités par le phénomène de photoblanchiment. Après un nombre fini de cycles de fluorescence, la GFP ou les fluorophores organiques (Cy3, A488,...) peuvent transiter vers un état triplet sombre de longue durée de vie ($T_T \simeq \mu$s contre $T_f \simeq$ ns pour l'état fluorescent) particulièrement réactif. Le fluorophore dans son état triplet peut être impliqué dans une réaction aboutissant à la formation d'un état noir dénaturé, provoquant l'extinction définitive de la fluorescence. Le mécanisme chimique exacte de ce processus est encore imparfaitement connu.

Un fluorophore organique ordinaire a une section efficace d'absorption est $\sigma \simeq 10^{-16}$ cm^2 et un rendement quantique proche de 1, et son nombre maximal de photons émis avant photoblanchiment est $N_{max} \simeq 10^5 - 10^6$ photons [4]. S'il est éclairé continûment avec une puissance non saturante de l'ordre de 100 W.cm^{-2} à une longueur d'onde $\lambda \simeq 1$ μm, il émet $\Gamma \simeq \sigma I \lambda / hc \simeq 10^5$ photons.s^{-1} (c est la vitesse de la lumière). La durée maximale de l'observation de la fluorescence est donc $T_{max} \simeq 1 - 10$ s. Le photoblanchiment est donc un facteur limitant pour une étude de la dynamique d'une protéine unique aux échelles de temps plus grandes que la seconde. Ce fait a motivé le développement et l'utilisation de nouvelles sondes fluorescentes stables à l'illumination : les nanocristaux semi-conducteurs.

2.1.3 Utilisation de nanocristaux

Les nanocristaux que nous avons utilisés sont des structures sphériques solides, composés d'un cœur d'un premier semiconducteur enveloppé par une coquille d'un second semi-conducteur dont les bandes interdites ne se recouvrent pas (Figure 2.2), en l'occurrence le sélénure de cadmium (CdSe) et le sulfure de zinc (ZnS). Ils peuvent être synthétisés par voie chimique depuis une dizaine d'années avec un diamètre bien contrôlé entre 5 et quelques dizaines de nanomètres.

Les propriétés optiques des nanocristaux

Sous une excitation lumineuse, un exciton est créé et confiné dans le cœur du nanocristal : un nanocristal constitue une boîte quantique. Une étude détaillée des propriétés physiques de ces objets [21] sort du cadre de cette étude,

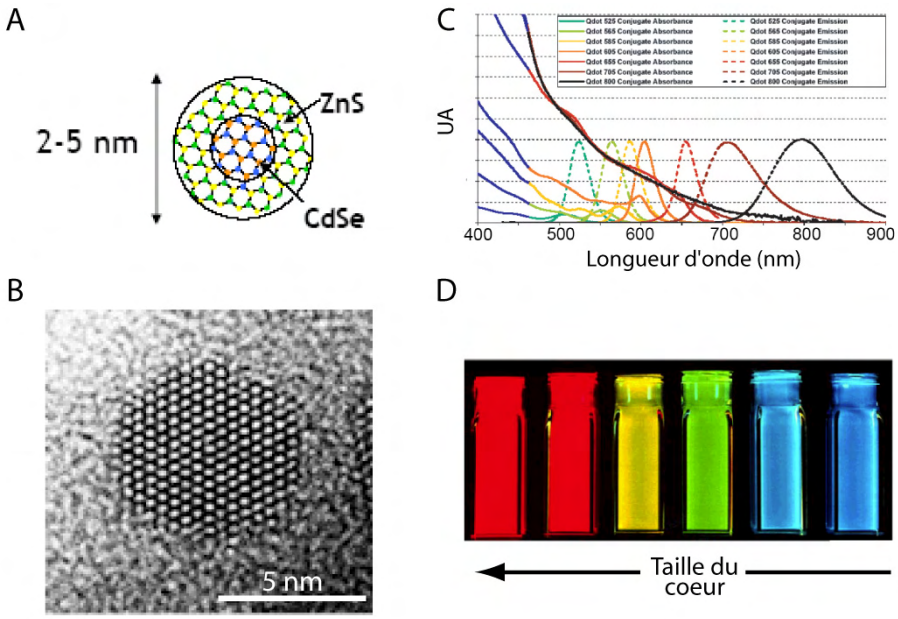


FIG. 2.2 – *Schéma d'un nanocristal de CdSe (A). Image en microscopie électronique d'un nanocristal de CdSe (B, image du groupe de P. Alivisatos, Berkeley University). Spectre d'absorption (traits pleins) et d'émission (traits pointillés) de différents nanocristaux (C). Image de fluorescence de solutions de nanocristaux de différentes tailles (D). Les images C et D ont été empruntées au site de Quantum Dot^{TM}*

mais certaines caractéristiques remarquables peuvent être détaillées. Les propriétés spectroscopiques d'un nanocristal sont celles d'une particule confinée dans une boîte dont la taille serait le diamètre du cœur. Les énergies propres sont données pour un nanocristal isotrope par $E_{n,m,p} = \frac{\hbar^2\pi^2}{8mL^2}(n^2+m^2+p^2)$, où L est le diamètre du cœur. On remarque que les niveaux d'énergie élevées sont très rapprochés et que l'énergie des transitions radiatives possibles varie comme l'inverse du carré de la taille du cœur. Les nanocristaux ont ainsi un spectre d'absorption large et une longueur d'onde d'émission de fluorescence accordable suivant leur taille (Figure 2.2).

Ces objets ont une propriété singulière de scintillement : ils alternent entre un état lumineux, avec des cycles de fluorescence, et un état sombre. La durée de vie des états sombres est distribuée suivant une loi de puissance ; il n'y a donc pas de temps caractéristique au-delà duquel il serait possible de s'affranchir de l'existence de ces alternances [22]. Le scintillement est une propriété intrinsèque d'un nanocristal unique détectable à toutes les échelles de temps. Son origine est encore mal connue mais est probablement due à l'existence d'un état ionisé [49] de longue durée de vie. Les nanocristaux

n'ayant pas la même réactivité chimique qu'un fluorophore organique, ils sont de plus stables sous illumination.

La section efficace d'absorbtion d'un nanocristal est environ dix fois plus élevée que celle d'un fluorophore organique. Ils sont donc particulièrement brillants. Si on suppose que l'efficacité de collection de photons fluorescents est de l'ordre de quelques pour cents, le taux de photons de fluorescence détectés γ_c est de l'ordre de 10^4 photons.s^{-1}. En se plaçant dans la limite du bruit de photon, le rapport signal à bruit est $S_{max} = 1/\sqrt{\tau\gamma_c}$ où τ est le temps d'acquisition. Dans nos expériences, τ est de l'ordre de 100 ms, ce qui fournit $S_{max} \gtrsim 30$. Ce rapport signal à bruit est de l'ordre de grandeur de celui observé à l'aide de notre dispositif expérimental (Figure 2.6). L'ensemble de ces propriétés optiques a motivé leur utilisation comme marqueurs biologiques.

Marquage de protéines individuelles par un nanocristal

Les nanocristaux sont des objets colloïdaux solubles dans les solvants organiques mais qui s'agrègent en solvant aqueux et donc en milieu biologique. De travaux effectués au cours de la dernière décennie ont permis de solubiliser des nanocristaux dans l'eau. Le principe des différentes formulations proposées est identique : le nanocristal est recouvert d'une enveloppe de molécules permettant la répulsion entre deux nanocristaux, par encapsulation ou effet électrostatique ou stèrique [28, 47, 103]. Il est aujourd'hui possible de faire l'acquisition commerciale de tels objets fonctionnalisés (Figure 2.3).

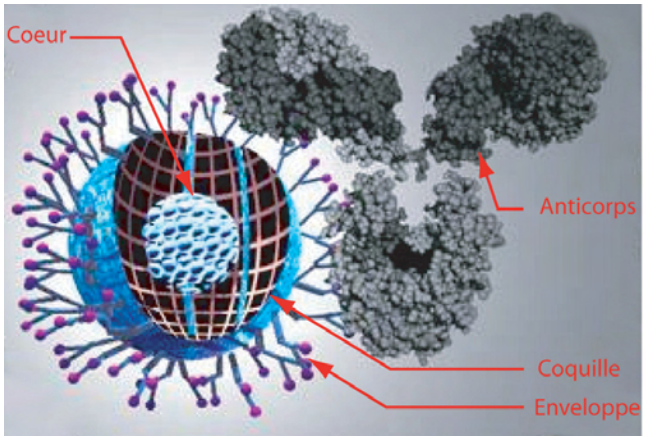


FIG. 2.3 – *Nanocristal solubilisé : le cristal est recouvert d'un assemblage moléculaire complexe (polymères, composés amphiphiles,...) et éventuellement de streptavidine permettant sa liaison à un anticorps biotinylé. Cette image est issue de la documentation fournie par Quantum Dot^{TM}*

Dans le cadre de nos expériences sur le GABA$_A$R dans la membrane de neurones vivants, nous avons utilisé une méthode de marquage standard avec des fluorophores organiques pour les protéines membranaires en se servant de nanocristaux semiconducteurs comme sondes. Les neurones en culture sont tout d'abord placés dans un milieu proche de leur milieu de culture mais tamponné (par de l'Hepes) pour avoir un pH neutre à l'air ambient. Ils sont alors incubés successivement avec un anticorps spécifique de la sous-unité γ_2 du GABA$_A$R produit chez le cochon d'Inde, puis avec un fragment Fab d'un anticorps spécifique du cochon d'Inde couplé à une biotine et enfin avec des nanocristaux émettant à 605 nm fonctionnalisés avec de la streptavidine (Figure 2.4).

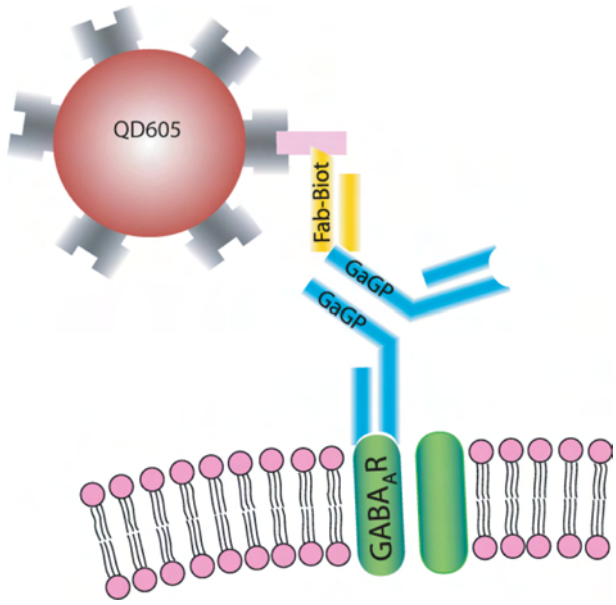


FIG. 2.4 – *Construction biochimique*

Cet assemblage biochimique réalisé par deux interactions immunologiques et une interaction spécifique permet le marquage de récepteurs membranaires uniques. L'observation de récepteurs marqués par des nanocristaux fluorescents est faite à l'aide d'un microscope de fluorescence standard (Figure 2.5).

Les lamelles couvertes de neurones en culture marqués sont illuminées par une lampe à mercure munie d'un filtre d'excitation à 525nm et sont observées à l'aide d'un objectif à immersion (grossissement x60 et ouverture numérique 1.4) à travers un filtre d'émission à 605mn sur une caméra CCD [18, 42]. Une image en transmission peut être obtenue par le même système expérimental et comparée à l'image de fluorescence (Figure 2.6). Les spots fluorescents sont des nanocristaux uniques ou des agrégats de nanocristaux. Le scintillement permet alors de détecter avec vraisemblance le signal d'un nanocristal unique.

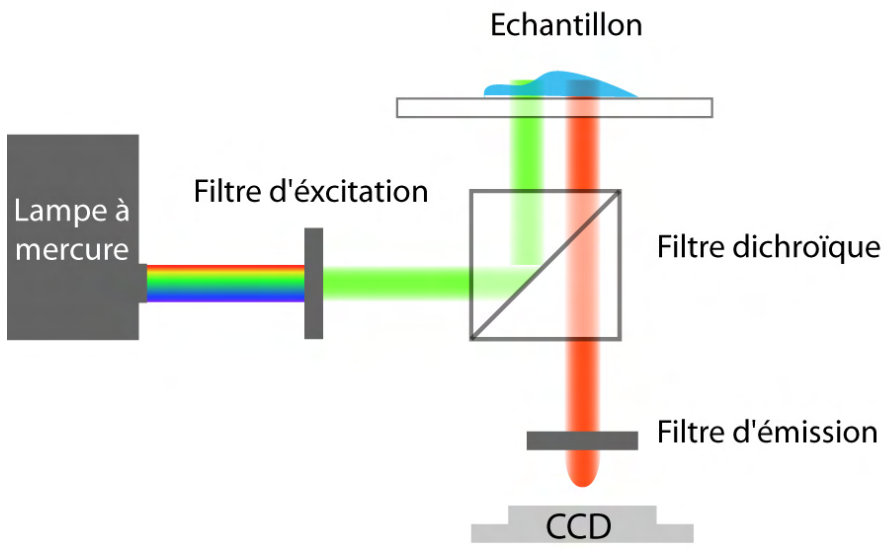


FIG. 2.5 – *Microscope de fluorescence : schéma.*

L'unicité du nanocristal n'assure pas *a priori* l'unicité du récepteur dans la construction. Cependant, l'utilisation d'un fragment Fab pour l'anticorps secondaire et l'utilisation d'anticorps et de nanocristaux très dilués permet de minimiser les possibilités de liaisons d'un nanocristal sur plusieurs récepteurs. La spécificité du marquage a été vérifiée en supprimant l'un des étages de la construction biochimique : dans tous les cas le marquage est supprimé, ce qui assure la spécificité de la construction. Les concentrations de chaque anticorps et de nanocristaux sont alors ajustées afin de pouvoir observer sur un même cône de croissance une dizaine de récepteurs.

Afin d'étudier la dynamique du récepteur du $GABA_A$, nous avons enregistré des séquences continues d'images de fluorescence avec un temps d'intégration pour chacune de 75 ms, et ce pendant des temps plus longs que la minute. Les nanocristaux restent fluorescents et scintillants pendant la durée totale de l'enregistrement, permettant la détection de phénomènes inaccessibles jusqu'alors.

La présence des récepteurs marqués par les nanocristaux durant toute la durée des expériences a été vérifiée à l'aide d'un lavage acide. Les neurones marqués sont plongés durant 2 minutes à 4^oC dans du milieu dont le pH est ajusté à 2 par ajout d'acide chlorhydrique molaire. Ce traitement permet d'éliminer toutes les constructions attachées en surface. Une heure après le marquage, un lavage acide est capable d'éliminer 90% du signal de fluorescence. Les récepteurs sont donc peu internalisés durant la durée de l'expérience et demeurent à la surface du cône de croissance. Nous allons

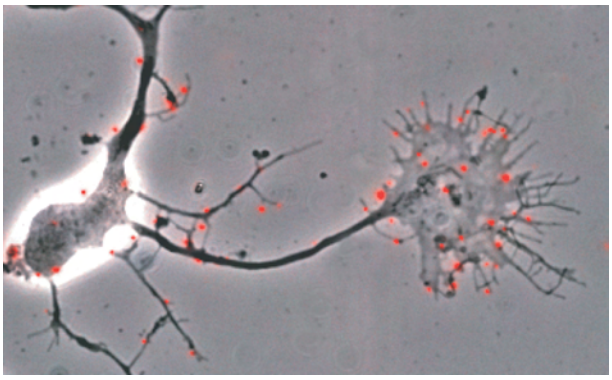


FIG. 2.6 – *Exemple de marquage sur un neurone de trois jours en culture. L'image de fluorescence est superposée sur une image de transmission en contraste de phase prise avec un objectif X60 NA=1.4*

maintenant détailler les méthodes utilisées afin d'extraire de l'information physique et biologique des données brutes enregistrées.

2.1.4 Le suivi de molécules uniques

La première étape dans l'analyse des données expérimentales consiste à reconstituer les trajectoires de récepteurs uniques observés dans la membrane du cône de croissance. Nous présentons ici le principe de la méthode employée afin de reconstruire les trajectoires, un exposé plus complet étant disponible aux références indiquées [14, 15].

Détection des nanocristaux

Les spots sont tout d'abord détectés sur chaque image de l'enregistrement à l'aide d'une méthode de corrélations. La réponse impulsionnelle de notre système optique, c'est-à-dire l'image formée sur le détecteur par un point source, a été mesurée en faisant l'image d'un nanocristal unique immobilisé sur une surface (voir Figure 2.7). En effet, à la longueur d'onde utilisée (λ = 605nm) les nanocristaux sont des objets ponctuels et leur image est celle de la diffraction d'un point source. Le calcul de la corrélation entre une image et la réponse impulsionnelle présente alors des maxima locaux aux positions des points source. Les images obtenues étant bruitées, il apparaît des maxima locaux artéfactuels ; ceux-ci sont alors exclus en ne conservant que les maxima au dessus d'un seuil de signification statistique.

La position plus précise des spots peut être obtenue en ajustant le signal de fluorescence au voisinage des points détectés par une courbe gaussienne, qui est une bonne approximation d'une fonction d'Airy, le signal théorique attendu. La qualité de l'ajustement est directement dépendant du rapport

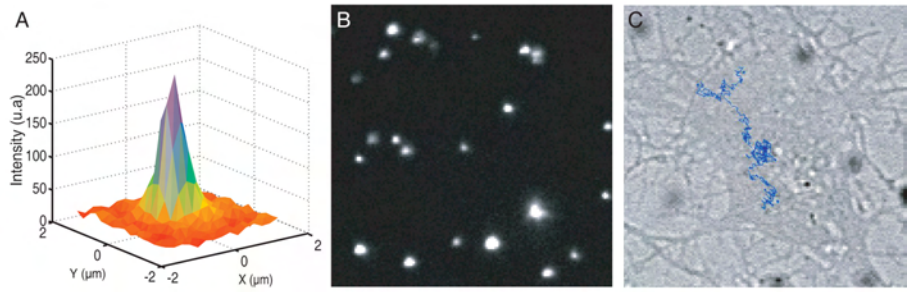


FIG. 2.7 – *Réponse impulsionnelle du système optique utilisé (A) : il s'agit en fait du profil d'intensité d'un nanocristal unique. Image typique de fluorescence (B) : les récepteurs du GABA ont été marqué comme décrit dans le texte par des nanocristaux observés en épifluorescence (excitation à 530 nm, émission à 605nm pour un temps d'acquisition de 75 ms) et en transmission (C) avec une trajectoire reconstruite d'un cône de croissance*

signal à bruit, qui est ainsi le paramètre régulant la précision de pointé. La détermination du centre de chacune de ces courbes gaussiennes fournit alors la position des nanocristaux avec une précision de l'ordre de 20 nm. La méthode utilisée permet de repérer un point source avec une précision meilleure que celle imposée par le critère de Rayleigh. Ce procédé est cependant un calcul de position de spot isolé et ne saurait permettre la résolution de deux points source plus proches que la distance de Rayleigh $R = \frac{1.22\lambda}{2NA}$ où λ est la longueur d'onde et NA l'ouverture numérique de l'objectif utilisé. Avec le dispositif utilisé, la résolution est ainsi de l'ordre de 260 nm.

Reconstruction des trajectoires

Une fois cette étape de détection accomplie, les points source détectés sur des images différentes doivent être associés afin de reconstituer les trajectoires. Pour cela, la probabilité pour chaque spot détecté sur une image donnée d'appartenir à une trajectoire reconstruite sur les images précédentes est calculée. Cette probabilité est estimée en considérant que le mouvement de toutes les particules est brownien avec un coefficient de diffusion évalué sur la partie de la trajectoire déjà reconstituée. Cette hypothèse ne préjuge pas de la dynamique réelle des particules : celle-ci peut ne pas être purement brownienne, mais entre deux images successives la diffusion est dominante sur tout autre type mouvement. Chaque spot est alors rattaché à la trajectoire à laquelle il est significativement le plus susceptible d'appartenir. Le scintillement est pris en compte dans cette approche en autorisant la reconstruction de trajectoires incomplètes et en recherchant pour chaque point-

source détecté un raccord avec des trajectoires interrompues avant l'image précédente. Les trajectoires de l'ensemble des récepteurs uniques marqués dans la membrane du cône de croissance sont alors reconstruites (Figure 2.7) et contiennent toute l'information accessible par le suivi de récepteurs individuels. Il s'agit donc à ce stade de pouvoir trouver de l'information dans ces trajectoires quant à la nature des interactions subies par les récepteurs.

2.2 Mouvements dirigés dans la membrane

La membrane plasmique peut être décrite comme un fluide visqueux ou une mosaïque fluide [93, 140]. Les récepteurs s'y déplacent avec une composante brownienne importante aux échelles de temps et d'espace observées, ce qui nécessite l'utilisation de méthodes d'analyse adaptées.

2.2.1 Méthodes d'analyse

Le déplacement quadratique moyen

Une quantité adéquate pour l'analyse de ce type de trajectoires est le Déplacement Quadratique Moyen (DQM). Considérons un ensemble de réalisations indépendantes de trajectoires $\{x_i(t)\}_{i\in\mathbb{N}}$ unidimensionnelles de particules se déplaçant sous l'effet des mêmes lois physiques. Le déplacement quadratique moyen est défini par :

$$DQM(t) =< (x(t) - x(0))^2 > \tag{2.1}$$

où $< \ldots >$ désigne la moyenne d'ensemble sur toutes les trajectoires. Le déplacement quadratique moyen permet de caractériser la nature du mouvement des trajectoires considérées. Dans le cas de la diffusion pure, la particule suit une marche au hasard : la position de la particule $x(t+\tau)$ à l'instant $t+\tau$ est donnée en fonction de sa position $x(t)$ à l'instant t par $x(t+\tau) = x(t) + \sqrt{2D\tau}\xi$ où D est le coefficient de diffusion ξ une variable aléatoire gaussienne, c'est-à-dire de moyenne $< \xi >= 0$ et de variance $< \xi^2 >= 1$. Cette formulation du mouvement brownien est la solution de l'équation de Smoluschowski en dimension 1 en l'absence de potentiel extérieur et est équivalente à la formulation de Langevin dans la limite visqueuse ($\tau > 10^{-14}$s), où les effets inertiels sont négligeables. Le déplacement quadratique moyen est alors :

$$DQM(t) =< 2Dt\xi^2 >= 2Dt \tag{2.2}$$

Dans le cas où le mouvement de la particule est la combinaison d'un mouvement brownien et d'une dérive avec une vitesse moyenne v, nous avons $x(t+\tau) = x(t) + \sqrt{2D\tau}\xi + v\tau$ et ainsi :

$$DQM(t) =< (\sqrt{2Dt}\xi + vt)^2 >= 2Dt + v^2t^2 \tag{2.3}$$

Une résolution de l'équation de Smoluschowski dans un puits unidimensionnel à bords réfléchissants de dimension L [94] (Annexe 4.4) permet de déterminer le déplacement quadratique moyen pour un mouvement confiné. Dans ce cas :

$$DQM(t) = \frac{L^2}{6} - \frac{16L^2}{\pi^4}\sum_{p=0}^{\infty}\frac{1}{(2p+1)^4}e^{-\frac{(2p+1)^2\pi^2 Dt}{L^2}} \tag{2.4}$$

dont une approximation au premier ordre en t peut être donnée par :

$$DQM(t) \simeq \frac{16L^2}{\pi^4}(1 - e^{-\frac{Dt\pi^2}{L^2}}) \tag{2.5}$$

Le terme constant a été ajusté dans cette approximation afin de vérifier qu'aux temps courts -ceux où la particule ne voit pas encore les bords- le déplacement quadratique moyen est identique à celui d'une particule en diffusion libre de même coefficient de diffusion. Le calcul du déplacement quadratique permet ainsi de caractériser la nature d'un ensemble de trajectoires comportant une composante brownienne : un mouvement diffusif produit une forme linéaire en fonction du temps tandis qu'un mouvement dirigé a une signature quadratique. De plus, il est possible d'en extraire des informations quantitatives comme le coefficient de diffusion D ou la vitesse d'entraînement v, fournis par un ajustement polynômial du déplacement quadratique moyen.

La précision de pointé

Si on considère un ensemble de trajectoires réelles, la précision obtenue par ce calcul est affectée par l'erreur expérimentale inhérente à la mesure optique. En effet, la position d'une particule à chaque instant est déterminée à une erreur près : la précision de pointé. Si la position réelle est $x(t)$, la position observée sera $x_m(t) = x(t) + \varepsilon$ où $< \varepsilon >= 0$ et $< \varepsilon^2 >= \sigma^2$ où σ est la précision de pointé. On obtient ainsi dans le cas d'un mouvement brownien un déplacement quadratique mesuré $DQM_m(t) = 2Dt + 2\sigma^2$. L'ajustement correct n'est donc plus linéaire mais affin, son ordonnée à l'origine étant une mesure de la précision du système optique. Estimons l'ordre de grandeur du décalage introduit suite à la précision de pointé finie. Dans nos mesures, que nous détaillerons plus loin, $\sigma \simeq 20$nm et $D \simeq 10^{-1}\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Le décalage devient négligeable dès que $t \gg \frac{\sigma^2}{D} \simeq 1$ms. A notre cadence d'acquisition, celui-ci est donc négligeable dès les premières positions enregistrées et nous pourrons considérer comme exactes les formes théoriques du déplacement quadratique moyen pour chaque type de mouvement.

Le temps d'acquisition

La détection expérimentale de la position d'une particule à l'instant t par un détecteur se fait en un temps d'acquisition fini T. La position de la particule mesurée par le détecteur n'est donc pas sa position réelle $x(t)$ mais sa position moyenne durant la durée de l'acquisition soit $x_{mes} = \frac{1}{T}\int_t^{t+T} x(t')dt'$. Le déplacement quadratique moyen est alors :

$$\begin{aligned}
&DQM_m(t) =< (\tfrac{1}{T}(\textstyle\int_t^{t+T} x(u)du - \int_0^T x(u)du))^2 > \\
&= (-2\textstyle\int_{w=t}^{t+T}\int_{u=0}^{T} < x(u)x(w) > dudw \\
&+ \textstyle\int_{w=t}^{t+T}\int_{u=t}^{t+T} < x(u)x(w) > dudw + \int_{w=0}^{T}\int_{u=0}^{T} < x(u)x(w) > dudw)/T^2
\end{aligned} \tag{2.6}$$

or $< x(u)x(w) >= 2D\min(u,w)$, et par conséquent

$$DQM_m(t) = \frac{1}{T^2}(-2DT^3 + 2DtT^2 + DT^3/3 + DT^3/3) \tag{2.7}$$

d'où

$$DQM_m(t) = 2D(t - \frac{T}{3}) \tag{2.8}$$

Dans le cas de la diffusion pure, l'effet dû au temps d'acquisition non nul est analogue à celui de la précision de pointé et peut être traité par la même méthode pour l'ajustement du déplacement quadratique. Dans le cas d'un mouvement confiné, par exemple, une correction supplémentaire doit cependant être introduite à cause des corrélations dans le mouvement dues aux bords du domaine de confinement [45, 125]. Cet effet n'est important que lorsque l'écart au mouvement brownien n'est pas négligeable à l'échelle du temps d'acquisition. L'existence de zones de confinement de taille comparable à celle de la région explorée par diffusion durant le temps d'acquisition impose de tenir compte de cette correction. Pour un temps d'acquisition T de 75 ms et un coefficient de diffusion de $0.25\,\mu m^2.s^{-1}$, cette taille est $d_{min} = \sqrt{4DT} \simeq 0.3\mu m$. Dans le cas d'un mouvement dirigé, la correction due au temps d'acquisition est négligeable dès lors que le déplacement dû à la vitesse d'entraînement v reste petit devant la contribution diffusive, c'est-à-dire pour $v \ll \sqrt{4D/T} \simeq 13\mu m.s^{-1}$. Les propriétés des mouvements que nous avons observés (Section 2.2.2) sont telles que ces corrections dues au temps d'acquisition du détecteur sont négligeables. Nous n'en avons donc pas tenu compte dans notre analyse.

Analyse de trajectoires individuelles

Nous venons de décrire une analyse valable pour un ensemble infini, ou du moins thermodynamique, de trajectoires indépendantes et de même loi. Nos expériences sont loin d'être dans ce cadre : il s'agit en effet d'analyser des

trajectoires uniques discrètes de durée finie $\{x(n)\}_{n=1...\frac{T}{\tau}}$ où T et τ sont respectivement la durée totale de la trajectoire et le temps d'acquisition. Il faut alors développer un estimateur du déplacement quadratique moyen pour une trajectoire unique. Considérons tout d'abord un ensemble fini de N trajectoires $\{x_i(t)\}_{i=1...N}$ indépendantes. Un estimateur naturel non biaisé du déplacement quadratique moyen est simplement la moyenne des déplacements quadratiques de chaque trajectoire $DQM_e(t) = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}(x_i(t)-x_i(0))^2$. Nous pouvons alors remarquer qu'une trajectoire unique composée de L points est en fait un ensemble de trajectoires de longueur moins grande que L (Figure 2.8).

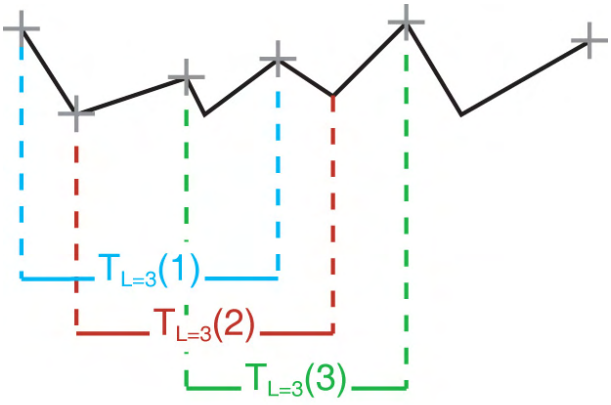


FIG. 2.8 – *Principe d'échantillonnage des trajectoires dans le calcul du déplacement quadratique moyen : quelques sous-trajectoires de longueur $L = 3$ sont représentées en couleurs différentes. Ayant des segments en commun, elles ne sont pas indépendantes.*

Un estimateur du déplacement quadratique moyen est alors [123, 132] :

$$\rho(t = (n-1)\tau) = \frac{1}{L-n}\sum_{k=1}^{L-n}(x(n+k) - x(k))^2 \tag{2.9}$$

Celui-ci se généralise pour une trajectoire en dimension quelconque $\mathbf{r}(n)$ en remplaçant $(x(n+k) - x(k))^2$ par la distance $(\mathbf{r}(n+k) - \mathbf{r}(k))^2$. La construction de cet estimateur utilise des points situés en différentes régions de la trajectoire : la mesure qu'il fournit est donc nécessairement globale et reflète les propriétés moyennes du mouvement sur l'ensemble de la trajectoire.

L'erreur statistique

Il faut de plus remarquer que, suite au nombre fini de trajectoires dans l'ensemble, il existe une erreur statistique venant se rajouter à l'erreur expérimentale. En outre, les sous-trajectoires extraites de la trajectoire unique ne sont pas indépendantes (Figure 2.8). L'erreur $\Delta\rho(t)$ n'est donc pas simplement $e_{ind}(t)$ l'erreur qui serait donnée par l'application du théorème de la limite centrale sur le même nombre de trajectoires indépendantes, pour laquelle l'erreur statistique est réduite d'un facteur $\sqrt{N}$, N étant le nombre de trajectoires indépendantes. Leur non-indépendance implique que l'erreur statistique inhérente à la méthode est nécessairement supérieure à e_{ind}. Dans le cas d'un mouvement purement brownien, il est possible de calculer l'erreur statistique en chaque point [123] :

$$\begin{cases} \Delta\rho(t)^2 = (4Dt)^2[\frac{4n^2(L-n)+2L-n-n^3}{6n(L-n)^2}] & \text{pour} \quad n \leq L/2 \\ \Delta\rho(t)^2 = (4Dt)^2[\frac{1+((L-n)^3-4n(L-n)^2+4n-L+n)}{6n^2(L-n)}] & \text{pour} \quad n \geq L/2 \end{cases} \tag{2.10}$$

L'erreur statistique commise dépend du nombre de points dans la trajectoire et du point auquel on se place. Elle croît rapidement au fur et à mesure que l'on s'intéresse à un temps plus proche de la longueur totale de la trajectoire car le nombre de sous-trajectoires extraites diminue. Il faut de plus noter que l'erreur statistique est dépendante du modèle utilisé pour le mouvement : celle-ci est *a priori* différente pour un mouvement dirigé ou confiné. Les calculs dans ces deux cas étant significativement plus complexes, il est possible de la déterminer à l'aide de simulations numériques. Pour un type de mouvement donné, 500 trajectoires de L points sont simulées (pour la méthode de simulation voir en annexe) et $\rho(n)$ est calculée pour chaque trajectoire. La mesure de la variance empirique de $\rho(n)$ donne alors l'erreur statistique $E(n, L)$ au temps n pour une trajectoire de L points. Afin de pouvoir analyser toutes les trajectoires expérimentales éventuelles, la même opération est effectuée pour L entre 10 (longueur minimale des trajectoires conservées) et 1024 (longueur totale d'un enregistrement). Cet algorithme permet donc d'obtenir la base de donnée $E(n, L)_{n=1...L;L=10...1024}$.

2.2.2 Résultats

Des enregistrements en fluorescence de récepteurs individuels on été effectués sur plusieurs cônes de croissance en culture. Plus d'une centaine de trajectoires de récepteurs du GABA_A ont ainsi pu être reconstituées. La taille de celles-ci n'est pas systématiquement celle de l'enregistrement complet (1024 images acquises à la cadence de 13 Hz), bien que les nanocristaux ne subissent pas de photoblanchiment. Il existe de nombreuses autres raisons expliquant la difficulté de reconstruction : période de scintillement trop

longue, croisement de plusieurs particules,... Pour tous les résultats présentés ici, seules les trajectoires de plus de 100 points ont été conservées. Deux populations de récepteurs peuvent être préalablement séparées sur de simple critères morphologiques : les récepteurs présent dans la région du cône de croissance riche en actine (le lamellipode et les filopodes) et ceux de la région centrale riche en microtubules. L'analyse des trajectoires permet de mesurer leurs coefficients de diffusion (Figure 2.9) par ajustement linéaire sur les cinq premiers points de leur déplacement quadratique moyen.

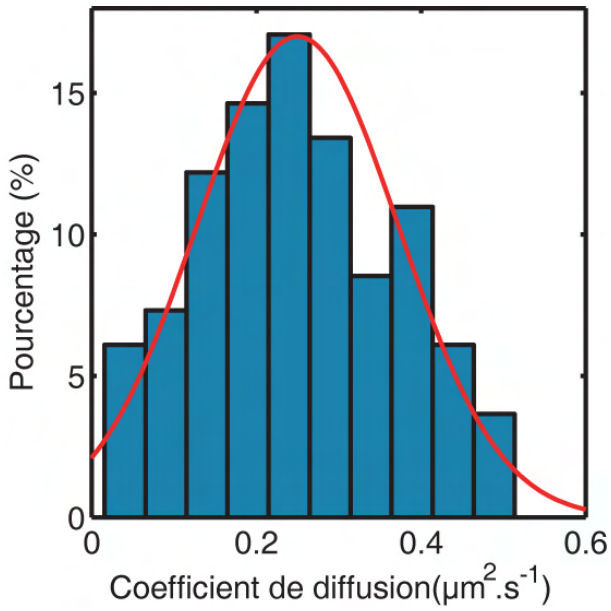


FIG. 2.9 – *Distribution des coefficients de diffusion dans la zone centrale (n=115)*

Dans la région centrale, le coefficient de diffusion moyen est $D_m = 0.25 \pm 0.01 \mu m^2.s^{-1}$ (n=115), ce qui est de l'ordre de grandeur attendu pour la diffusion libre d'une protéine dans une membrane [48] ou d'un neurorécepteur dans l'espace extra-synaptique [42]. Ceci indique que les mouvements des récepteurs du GABA ne sont pas contrôlés par des effets géométriques ou visqueux dans la membrane du cône de croissance. La faible dispersion de la distribution du coefficient de diffusion ($\sigma = 0.13 \mu m^2.s^{-1}$) et son ajustement gaussien correct dénotent que la population de récepteurs dans le cône de croissance est relativement homogène.

La longueur des trajectoires enregistrées, grâce à l'utilisation de nanocristaux, permet de caractériser plus finement les trajectoires individuelles. En conservant le premier cinquième de chaque déplacement quadratique moyen calculé -pour ne conserver qu'une région où l'erreur statistique est faible- sa courbure a été observée. Une courbure positive permet un ajustement par

une forme quadratique et révèle un mouvement dirigé [94] (Figure 2.10).

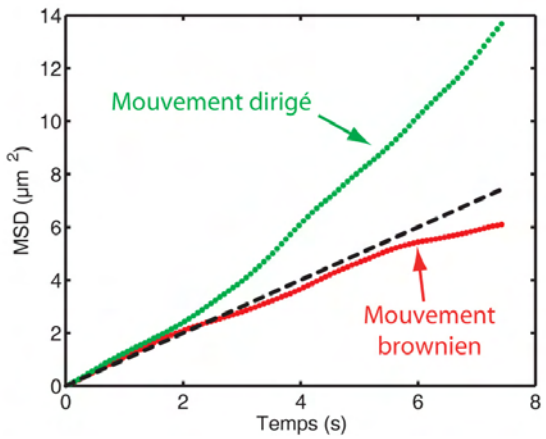


FIG. 2.10 – *Principe du critère de détection de mouvements dirigés sur des trajectoires individuels. Sur cet exemple, le premier cinquième du déplacement quadratique moyen de deux trajectoires artificielles de 500 points (D=0.25 $\mu m^2.s^{-1}$) est tracé. L'une a une vitesse d'entraînement (v=0.3 $\mu m.s^{-1}$ en vert) et l'autre non (en rouge). Leur position par rapport à la droite d'équation $MSD = 4Dt$ permet d'identifier leur type de mouvement.*

80% des trajectoires enregistrées dans la zone centrale du cône de croissance s'avèrent dirigées avec une vitesse moyenne $v_m = 0.29 \pm 0.02\mu$m.s^{-1} (n=92) (Figure 2.11). Les mouvements dirigés ne présentent pas d'orientation particulière : ils sont symétriques par rapport à l'axe de l'axone (voir le Chapitre suivant) et ne sont pas spécifiquement rétrogrades comme les mouvement dus au flot d'actine [138].

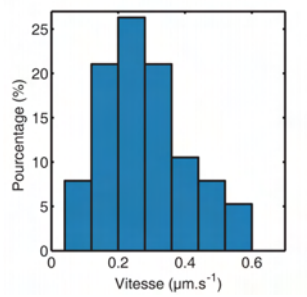


FIG. 2.11 – *Distribution des vitesses d'entraînements des mouvements dirigés dans la région centrale du cône de croissance (n=92)*

L'homogénéité des propriétés dynamiques des récepteurs dans la région

centrale indique qu'ils sont plongés dans le même environnement physique, ce qui justifie le recours à des moyennes d'ensemble sur plusieurs trajectoires. Afin de confirmer les effets non browniens détectés avec une précision statistique suffisante, nous avons effectué la moyenne des déplacements quadratiques moyens de chaque trajectoire. L'estimation de l'erreur statistique détaillée dans la section précédente permet alors d'exclure avec certitude la possibilité de mouvements des récepteurs purement diffusifs. Le mouvement moyen de ceux-ci est la combinaison d'un mouvement brownien avec coefficient de diffusion $\overline{D} = 0.25\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et d'un mouvement dirigé avec une vitesse $\overline{v} = 0.28\mu\text{m}.\text{s}^{-1}$ (Figure 2.12).

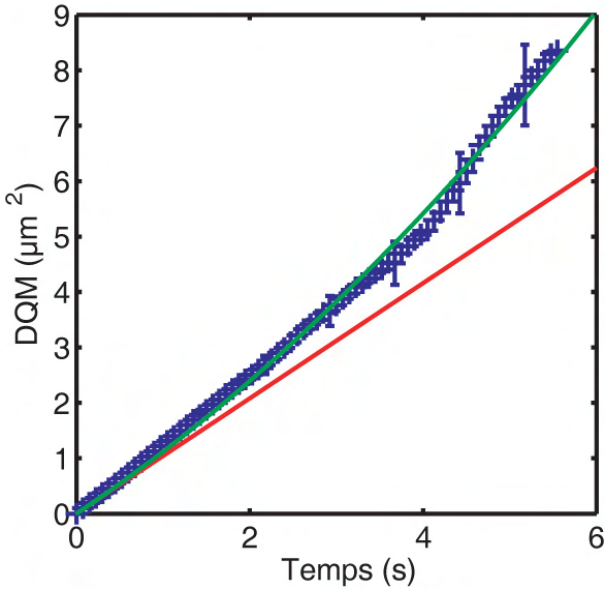


FIG. 2.12 – *Moyenne d'ensemble du déplacement quadratique moyen dans la zone centrale. Les courbes présentées avec les données sont les ajustements linéaire (mouvement brownien) et quadratique (mouvement dirigé) tenant compte de l'erreur statistique*

Les vitesses moyennes d'entraînement $\overline{v}$ etv_m sont comparables, ce qui souligne la cohérence des deux méthodes d'estimation. En moyenne, les récepteurs du GABA de la région centrale du cône de croissance ont donc avec certitude un mouvement dirigé.

Les mêmes mesures on été effectuées pour les récepteurs présents dans la région périphérique du cône de croissance. Il apparaît dans ce cas un comportement diffusif comparable ($D = 0.26 \pm 0.02\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, n=38) mais il n'existe pas de mouvement dirigé (Figure 2.13).

La présence de mouvements dirigés exclusivement dans la région centrale indique une probable implication des microtubules. En utilisant des cellules

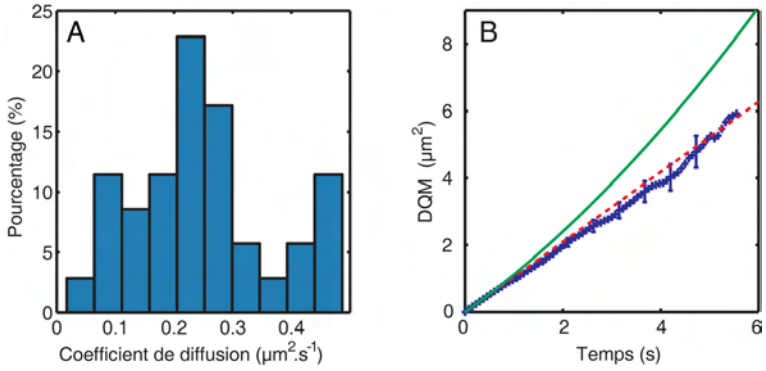


FIG. 2.13 – *Distribution des coefficients de diffusion dans la région périphérique du cône de croissance (n=38)*

transfectées à l'aide d'un plasmide codant pour une protéine de fusion EB3-GFP , il est possible de détecter et de suivre les extrémités des microtubules. Cette protéine se lie aux extrémités des microtubules dans leur phase de polymérisation. L'observation de son déplacement dans la cellule permet alors de déterminer la vitesse d'extension des microtubules *in vivo*.

Cette vitesse d'élongation mesurée dans un neurone [151] est voisine de la vitesse moyenne d'entraînement détectée dans nos expériences. Ce faisceau de suppositions nous a amené à nous intéresser plus avant au rôle de cytosquelette.

2.3 Interactions avec le cytosquelette

L'organisation cellulaire est étroitement liée à l'agencement et à la dynamique du cytosquelette dans les neurones, comme dans tout autre type de cellule. Ses deux principaux éléments, les filaments d'actine et les microtubules sont des polymères formant des filaments conférant à la cellule sa forme, déplaçant certains organelles [76] par leur dynamique propre ou à l'aide de moteurs moléculaire, et structurant la membrane plasmique [56, 30]. Outre les arguments que nous avons avancés dans la section précédente, ces éléments éveillent l'intérêt pour le rôle éventuel du cytosquelette dans les mouvements des récepteurs dans la membrane.

2.3.1 Résultats expérimentaux

Rôle des microtubules

Afin d'étudier le rôle des microtubules, ceux-ci ont été dépolymérisés par un traitement au nocodazole 1 μmol.L^{-1} pendant une heure. La méthode d'analyse des trajectoires est identique à celle déjà présentée. La diffusion

n'est pas notablement modifiée ($D = 0.23 \pm 0.01$ μm^2.s^{-1}, Figure 2.14), mais les mouvements dirigés sont abolis puisque seuls 5% des trajectoires présentant un mouvement dirigé (Figure 2.16), ce que confirme le calcul de la moyenne du déplacement quadratique moyen. (Figure 2.14).

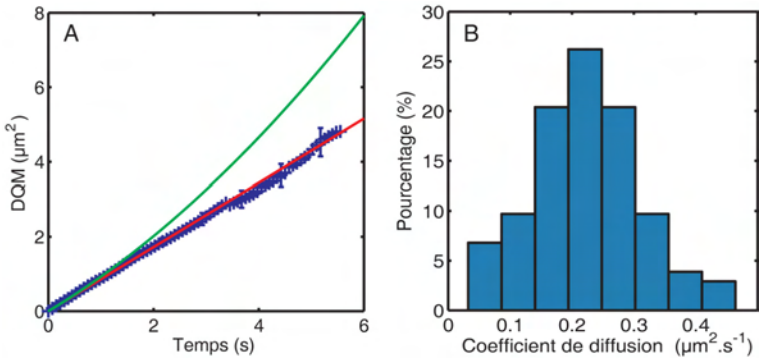


FIG. 2.14 – *Moyenne du déplacement quadratique moyen (A) comparé à un ajustement linéaire et à l' ajustement résultant des données dans le cas contrôle et distribution des coefficients de diffusion (B) en présence de nocodazole (n=103)*

L'effet du traitement par le nocodazole est réversible : lorsque les neurones précédemment traités sont rincés avec du milieu de culture frais et laissés à reposer à 37°C pendant au moins une heure, les propriétés des mouvements des récepteurs sont restaurées. 80% des trajectoires sont des mouvements dirigés (Figure 2.16) avec une vitesse moyenne $v_m^{rec} = 0.27\mu$m.s^{-1} (Figure 2.15).

La vitesse d'entraînement observée sur les mouvements des récepteurs est donc spécifiquement abolie par la dépolymérisation des microtubules.

Rôle de l'actine

Le rôle des filaments d'actine, révélé par leur dépolymérisation par un traitement de latrunculine (3μmol.L^{-1} pendant 20min), est plus ambigu. En effet, si le coefficient de diffusion n'est pas significativement modifié ($D = 0.23 \pm 0.01$ μm^2.s^{-1}, n=114), les propriétés des mouvement sont altérées mais sans pouvoir exclure l'existence d'un mouvement dirigé moyen. 30% des trajectoires sont dirigées (Figure 2.16) avec une vitesse moyenne $v_m^{lat} = 0.28 \pm 0.02\mu$m.s^{-1}($n = 38$) comparable au cas contrôle. Le rôle direct de l'actine semble donc mineur dans l'existence de mouvements dirigés.

Le couplage connu [127, 130, 155] entre la dynamique des microtubules et celle de l'actine pourrait expliquer l'influence secondaire de l'actine sur les mouvements des récepteurs dans la membrane de la région centrale du cône de croissance.

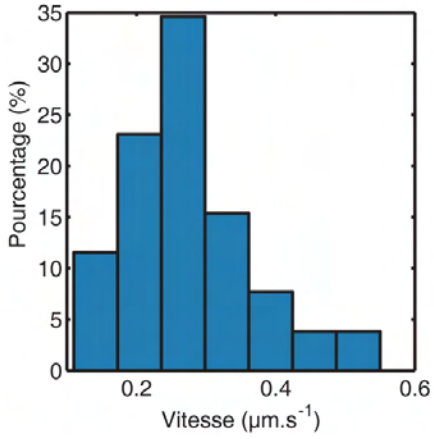


FIG. 2.15 – *Distribution des vitesses d'entraînement après traitement par le nocodazole et restauration (n=35)*

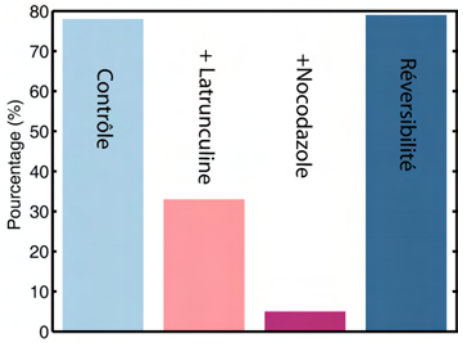


FIG. 2.16 – *Proportion de mouvements dirigés détectés par la méthode d'analyse de trajectoires uniques, dans le cas contrôle (bleu clair, 78%), après traitement par la latrunculine (rose, 33%), le nocodazole avant (violet, 5%) ou après une période de restauration (bleu, 79%)*

Modèles de locomotion

Mouvement actif et passif

L'étude pharmacologique précédente fait apparaître l'existence d'interactions de nature indéterminée des récepteurs avec les microtubules responsables des leurs mouvements dirigés. Cependant, le mode de locomotion précis du récepteur et la nature des interactions qui le crée restent inconnus. Les récepteurs se meuvent ils de façon active sur les microtubules, par exemple par l'entremise d'un moteur moléculaire, ou sont ils passivement déplacés

par la dynamique propre des microtubules ? (Figure 2.17).

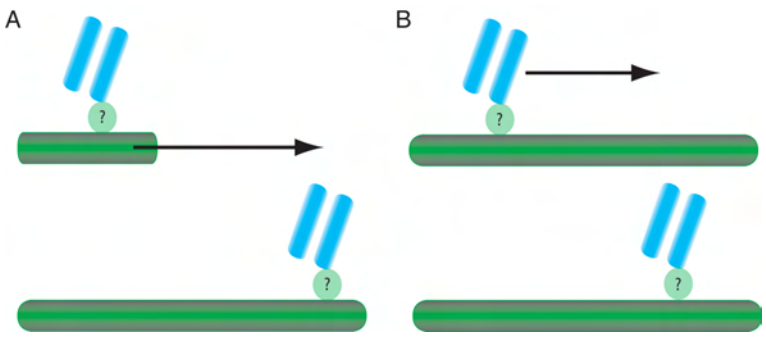


FIG. 2.17 – *Modèles de dynamique du récepteur : modèle passif (A) où un intermédiaire inconnu permet une interaction avec les extrémités du microtubules déplaçant le récepteur par sa dynamique et modèle actif (B) où un intermédiaire inconnu permet un déplacement sur le microtubule*

Traitement par le taxol

Afin de répondre à cette question, les neurones sont traités par le taxol (10 mg/mL pendant une heure). Ce traitement a pour effet de geler la dynamique des microtubules en les maintenant dans leur état polymérisé. Il permet donc de discriminer entre les deux modèles : dans le cas d'un mouvement actif le long des microtubules, la dynamique des récepteurs ne devrait pas être modifiée si ce n'est en un renforcement des mouvements dirigés. En revanche, un mouvement dépendant de la dynamique des microtubules devrait être aboli.

Le traitement par le taxol résulte en la disparition de tout mouvement dirigé. La moyenne des déplacements quadratiques moyens fait même apparaître un mouvement moyen de confinement ou de diffusion anomale (Figure 2.18), les deux modèles étant indiscernables à ce niveau. Nous pouvons cependant remarquer que les trajectoires enregistrées se situent régulièrement au niveau de la zone où les extrémités de microtubules sont ordinairement les plus abondantes. Les récepteurs pourraient ainsi être confinés au voisinage des extrémités des microtubules dans une région de taille typique $L = 1.2\ \mu$m déterminée par l'ajustement moyen du déplacement quadratique moyen par un modèle de diffusion confinée. La suppression des mouvements dirigés par le taxol exclut, quoi qu'il en soit, le modèle de dynamique active. Les récepteurs sont déplacés par la dynamique des microtubules et susceptibles d'interagir avec leurs extrémités.

Le déplacement quadratique est cependant une mesure globale sur la trajectoire et rend donc impossible la détection de périodes d'interaction entre récepteurs et microtubules. Il serait alors intéressant de mettre directement

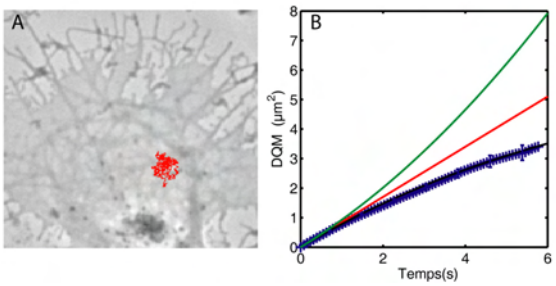


FIG. 2.18 – *Trajectoire typique d'un récepteur dans le cône de croissance en présence de taxol (A) et moyenne (n=97) du déplacement quadratique moyen en présence de taxol (B) , comparée à un modèle de mouvement confiné (quadratique), brownien (linéaire) et dirigé (saturation exponentielle).*

en évidence l'existence de ces interactions et de déterminer si les récepteurs interagissent de façon permanente avec les extrémités des microtubules. Afin de répondre à ces questions, nous nous sommes intéressés aux changements de dynamique dans la trajectoire des récepteurs.

2.3.2 Méthode d'analyse locale

Les outils de calcul pour une détection locale de mouvements dirigés n'étant pas disponibles dans la littérature existante, ils ont été développés au cours de cette thèse en s'inspirant des travaux effectués pour la détection de périodes transitoires de confinement à l'aide de l'indice de confinement [109, 142]. Cet indice repose sur l'estimation locale d'une fonction d'essai caractéristique d'une diffusion plus lente que la moyenne sur la trajectoire, à l'aide d'une moyenne glissante. Des périodes de diffusion ralentie peuvent ainsi être détectées avec certitude par cette méthode.

Principe de l'Indice de Corrélations en Vitesse

Il s'agit ici de produire une fonction qui révèle localement un mouvement dirigé. Un mouvement dirigé présente des corrélation temporelle dans sa vitesse, à l'inverse d'un mouvement brownien. Nous avons donc développé une méthode d'estimation locale des corrélations dans la vitesse : l'Indice de Corrélations en Vitesse (ICV) [17] afin de détecter les périodes de mouvement dirigé.

Mise en œuvre

Il faut obtenir une estimation des correlations dans la vitesse suffisamment locale pour détecter des événements éventuellement brefs, mais égale-

ment suffisamment moyennée dans le temps afin de pouvoir extraire un signal mesurable malgré les fluctuations dues au bruit brownien. Pour concilier ces deux besoins antagonistes, nous avons suivi l'algorithme suivant. Pour une trajectoire $\{x(i)\}_{i=1...N}$, on définit une taille de fenêtre $L < N$. Il est alors possible de regrouper les points de la trajectoire en un ensemble de segments de longueur L. Le rassemblement en segments est en fait arbitraire : suivant le choix du premier point inclus dans le premier segment, le regroupement en segments est différent (Figure 2.19). Le choix de l'origine est, pour une taille de fenêtre L, compris entre 1 et L définissant $L-1$ cadres de lecture et L ensembles de regroupements $[\{S_k(j)\}]_{k=1...L}$.

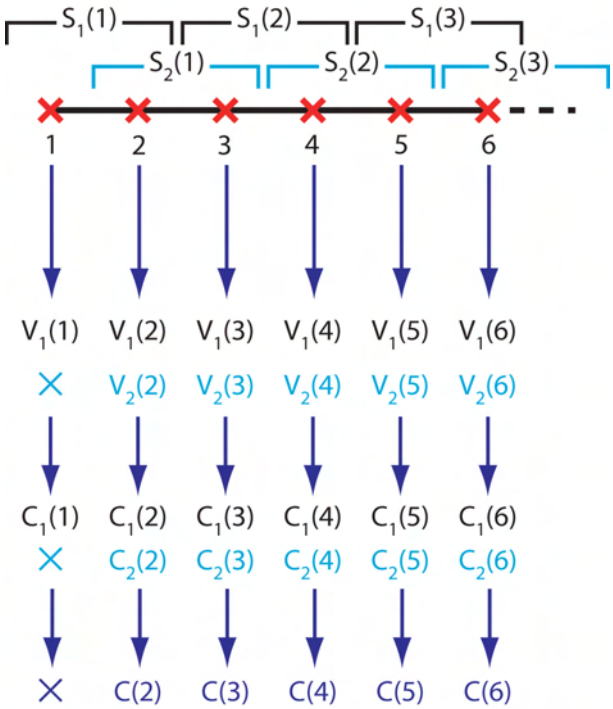


FIG. 2.19 – *Principe de calcul de l'Indice de Corrélation des Vitesses. Le schéma présente par souci de simplicité le cas L=2*

Pour chaque segment dans chaque cadre de lecture, la vitesse moyenne $\mathbf{V}_k(j)$ est calculée et attribuée à chaque point du segment. La corrélation moyennée au point i dans le cadre de lecture k est définie par :

$$C_k(i) = \frac{\mathbf{V}_k(j).\mathbf{V}_k(j+1)}{||\mathbf{V}_k(j).||.||\mathbf{V}_k(j+1).||} \tag{2.11}$$

où le point i appartient au segment j dans le cadre de lecture k. On peut remarquer que les points i de la trajectoire où $i < L$ ou $i > N - L$ ne sont pas pris en compte dans tous les cadres de lecture. Par conséquent, dans

l'étape suivante ces points ne sont pas considérés. L'indice de corrélation au point i, $C(i)$, est défini par :

$$C(i) =< C_k(i) >_k \tag{2.12}$$

où la notation $< \ldots >_k$ désigne la moyenne sur l'ensemble des cadres de lecture. $C(i)$ est compris entre -1 et 1, un mouvement dirigé pur et monodirectionnel donnant la valeur 1 et un mouvement purement diffusif la valeur 0 en moyenne. Le choix de L est important dans l'utilisation de cet algorithme : il régule le caractère local de l'indice de corrélations des vitesses. Un choix pertinent pour L est une durée pour laquelle le déplacement dû à la vitesse d'entraînement devient au moins comparable à celui dû au mouvement brownien. Une valeur minimale L_{min} est alors donnée par $vL_{min}\tau \simeq \sqrt{4DL_{min}\tau}$, soit $L_{min} \simeq 4D/v^2\tau$ où τ est le temps entre deux points consécutifs de la trajectoire, D le coefficient de diffusion et v la vitesse d'entraînement. Avec des paramètres raisonnables ($D = 0.25$ μm^2.s^{-1}, $v = 0.8$ μm.s^{-1} et $\tau = 75$ ms), L_{min} est de l'ordre de 20 images. Dans toute notre analyse, présentée plus avant, nous avons utilisé L=30 images, soit 2.25 s. Cette valeur permet de réduire suffisamment le bruit et de pouvoir s'affranchir des fluctuations browniennes, tout en conservant le caractère local de l'indice.

Détection de mouvements dirigés

La détection de périodes de mouvement dirigé se fait alors en repérant les zones de fort indice de corrélation. Il est cependant essentiel de définir un seuil de certitude permettant de discriminer entre les pics de $C(i)$ réellement dus à un mouvement dirigé et les artefacts dus aux fluctuations browniennes. Ce seuil a été déterminé en testant l'algorithme sur des trajectoires simulées numériquement. Celles-ci sont purement browniennes et ne présentent donc pas de pics "réels" dans leur indice de corrélation. Pour différentes hauteurs critiques $H_c(= [0.95\, 0.9\, 0.85\, 0.8\, 0.75\, 0.7\, 0.65\, 0.6])$ dans l'indice de corrélation, nous avons mesuré un temps critique T_c pendant lequel l'indice a une probabilité inférieure à 5% de rester continûment au-dessus de H_c suite à des fluctuations stochastiques (Figure 2.20).

Ainsi, une période continue plus longue que T_c où l'indice reste supérieur à H_c a une probabilité supérieure à 95% de correspondre réellement à une période de mouvement dirigé. Cette approche a été validée par simulations numériques : cent trajectoires browniennes ont été générées ($D = 0.25\mu$m^{2}s^{-1}) avec une unique période de mouvement dirigé ($v = 0.8\mu$m.s^{-1}) de durée donnée par une loi exponentielle de temps caractéristique $T_r = 4.1$ s et leur indice de corrélation a été calculé. Pour des valeurs de H_c décroissantes, on recherche les événements dus au mouvement dirigé à 95% de certitude (Figure 2.20). Le temps durant lequel $C(t) > H_c^{min}$ où H_c^{min} est la plus petite

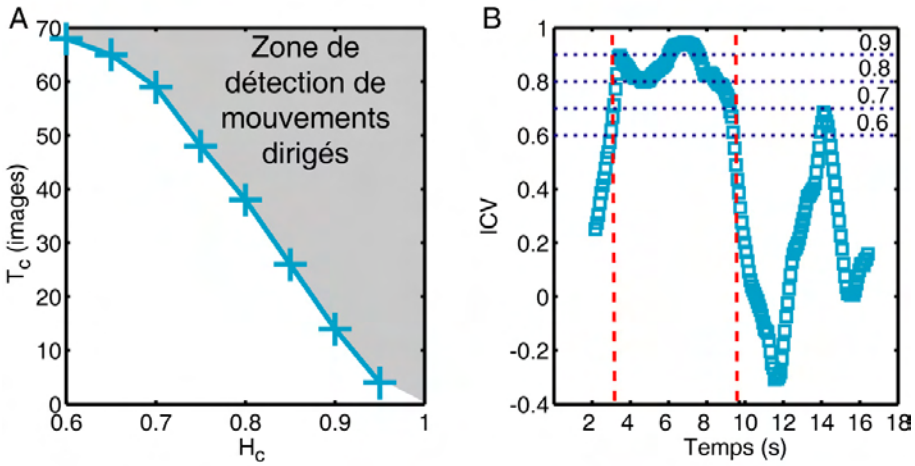


FIG. 2.20 – *Détermination du seuil de confiance dans l'Indice de Corrélation des Vitesses. Exemple de calcul de SCI sur une trajectoire simulée présentant une période de mouvement dirigé délimitée par les traits pointillés verticaux (A) et seuil de confiance (B). Un événement se produisant dans la zone grisée ne peut pas être du aux fluctuations browniennes avec 95% de certitude.*

valeur de H_c donnant un événement significatif est alors mesuré et constitue notre estimation de la durée de la période de mouvement dirigé.

Avec les paramètres utilisés, 65% de ces événements sont détectés, ce qui permet de reconstruire la distribution des temps d'entraînement (Figure 2.21). La distribution mesurée reflète la forme de la distribution réelle : elle est ajustée correctement par une distribution exponentielle de temps caractéristique $T_m = 4.5$s. La surestimation du temps caractéristique reste faible, mais est logique compte tenu de la difficulté de détecter les événements les plus courts.

Validation synthétique

Une validation plus complète de cette méthode de détection par corrélation des vitesses a été effectuée en explorant systématiquement ses paramètres critiques : les valeurs relatives du coefficient de diffusion et de la vitesse et le temps caractéristique des périodes d'interaction. Il est clair que plus la vitesse d'entraînement dans les périodes de mouvement dirigé est élevée, plus la détection est aisée. Ceci a été vérifié sur une gamme de vitesse comprise entre 0.2 et 1.5 μm.s^{-1}. La détection passe ainsi de 35% à 75% entre les deux valeurs extrêmes de cet intervalle (Figure 2.22). Ce résultat permet de fixer les limites de la méthode de l'ICV, qui ne peut pas détecter de trop faibles vitesses par rapport au coefficient de diffusion.

Le taux de détection des événements est également sensible à la durée

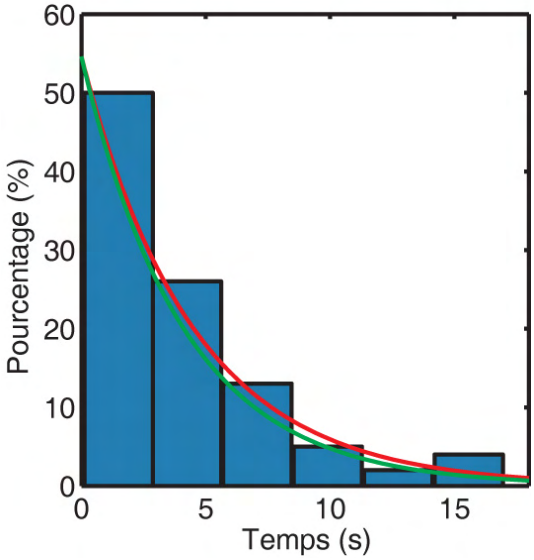


FIG. 2.21 – *Comparaison des durées du mouvement dirigé réels (courbe verte) et mesurées à l'aide de l'ICV (histogramme et courbe rouge)*

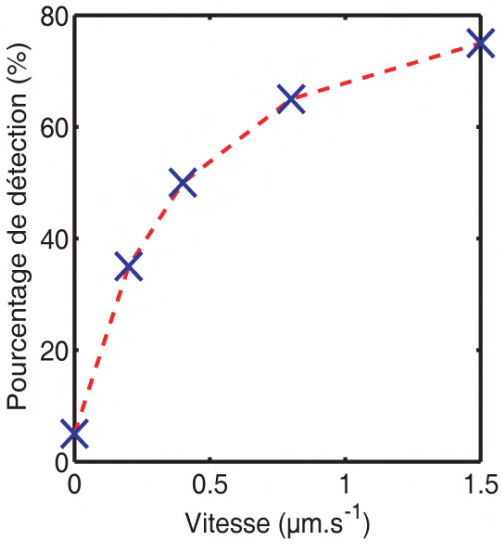


FIG. 2.22 – *Taux de détection des événements de mouvement dirigé en fonction de leur vitesse*

de ceux-ci, les plus courts ne pouvant être extraits du bruit brownien. En faisant varier le temps caractéristique des durées des phases de mouvement dirigé entre 2.25 s et 7.5 s, une augmentation du taux de détection de 53% à 75% (Figure 2.23) est observée. Ceci est du à la plus grande abondance dans une distribution à plus faible temps caractéristique d'événements trop courts pour être détectés.

Cependant, les distributions des temps d'interaction mesurées à partir du calcul de l'ICV sont peu différentes des distributions réelles (Figure 2.23) avec une surestimation du temps caractéristique τ de la distribution exponentielle limité à 20% dans le pire des cas envisagé (τ=2.25s) et de l'ordre de 0,1% pour le plus favorable (τ=7.5 s).

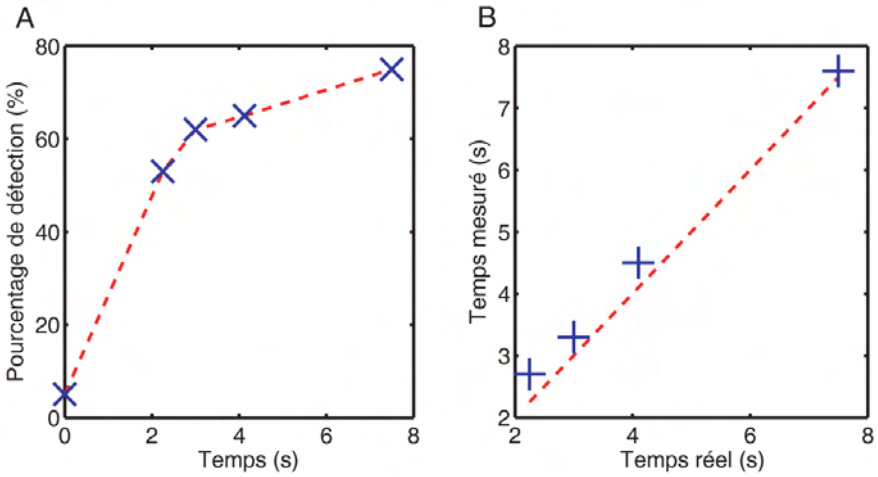


FIG. 2.23 – *Taux de détection des événements de mouvement dirigé en fonction du temps caractéristique de la distribution de leur durée (A) et taux d'identité dans la mesure de ce temps (B)*

2.3.3 Résultats : interactions transitoires avec les microtubules

La méthode de l'indice de corrélation étant ainsi validée sur des données synthétiques, nous l'avons appliquée sur les données expérimentales pour détecter d'éventuelles alternances dynamiques dans le mouvement des récepteurs du GABA. L'application de l'indice de corrélation en vitesse aux 80% de trajectoires ayant une vitesse d'entraînement permet de détecter au moins un événement transitoire de mouvement dirigé dans 60% des cas. La distribution des durées de ces périodes d'interaction avec les microtubules suit une loi exponentielle de temps caractéristique $T = 4.0$ s. (Figure 2.24).

La validité de cette approche a été vérifiée en calculant le déplacement

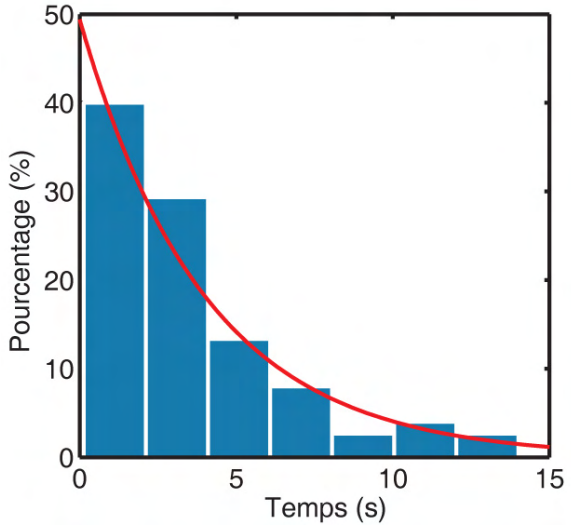


FIG. 2.24 – *Distribution des durées de mouvement dirigé (n=59)*

quadratique moyen sur les parties de trajectoires délimitées par l'utilisation de l'indice. Dans les régions de faible indice, un déplacement quadratique moyen linéaire, signature du mouvement brownien, est obtenu et, dans les régions où un mouvement dirigé est détecté, le déplacement quadratique moyen est bien quadratique (Figure 2.25).

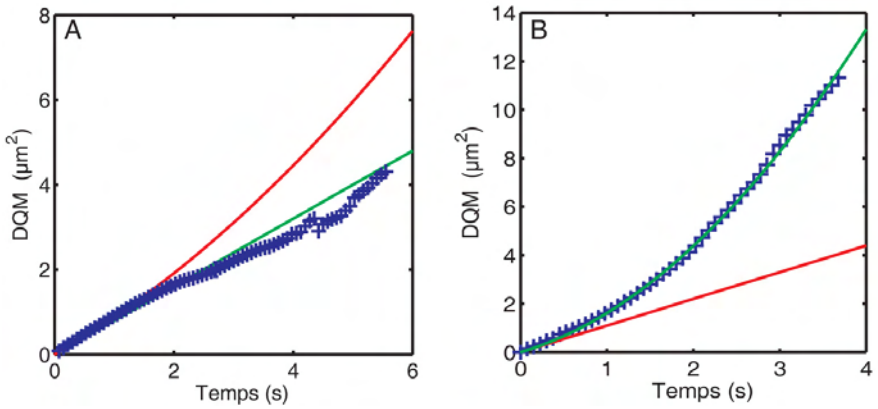


FIG. 2.25 – *Moyenne du déplacement quadratique moyen dans les périodes d'indice faible (A) et d'indice fort (B) avec leurs ajustements de mouvement brownien et dirigé respectifs*

La forme exponentielle de la distribution obtenue est caractéristique

d'une transition en une seule étape d'un mouvement dirigé vers un mouvement purement brownien. Cette mesure conforte l'interprétation en termes d'alternance entre diffusion avec interactions avec les microtubules et diffusion libre. Les coefficients de diffusion sont voisins dans ces deux périodes ; seule l'existence d'un mouvement d'entraînement les différencie. Ces deux éléments sont la signature d'interactions transitoires des récepteurs avec les microtubules et plus vraisemblablement avec leurs extrémités. La détection d'alternances entre diffusion et entraînement atteste de plus que les mouvements dirigés observés sont une transition réversible dans le mouvement contrairement à ce qui serait observé dans une endocytose.

2.4 Modèle de locomotion et portée fonctionnelle

Les données obtenues permettent de proposer un modèle complet de locomotion des récepteurs du $GABA_A$ dans la membrane du cône de croissance. Ce modèle est biologiquement intéressant pour l'organisation membranaire et le fonctionnement du système de détection de gradients de GABA.

2.4.1 Le modèle du tapis roulant

Dans ce modèle, les récepteurs du $GABA_A$ diffusent librement dans la membrane du cône de croissance avec un coefficient de diffusion $D \simeq 0.25\ \mu m^2.s^{-1}$. Ils peuvent interagir avec les extrémités des microtubules. La polymérisation du microtubule a alors pour effet de conférer aux récepteurs une vitesse instantanée $v_i \simeq 0.75\ \mu m.s^{-1}$ en plus de leur diffusion dans la membrane. Les récepteurs se détachent des microtubules avec un taux $k_{off} = 0.25\ s^{-1}$. Le processus se répète ainsi au cours du temps avec une orientation et une distribution de vitesses d'entraînement reflétant la dynamique et l'organisation spatiale des microtubules. Les récepteurs sont ainsi transportés dans la membrane selon le modèle connu dans la littérature sous le nom de "tapis roulant" [133].

2.4.2 Microtubules et organisation membranaire

L'association transitoire entre récepteurs et microtubules est potentiellement utile pour la détection d'un gradient externe de signaux de guidage. En effet, la dynamique des microtubules est capable de réguler l'exploration spatiale de la membrane par les récepteurs et éventuellement le processus de transduction de signaux extérieurs. Il existerait ainsi un couplage entre l'étape sensorielle et l'architecture cellulaire déterminée par le cytosquelette. La dynamique des microtubules aurait alors un rôle dans le chimiotactisme du neurone, non seulement au niveau de la réorganisation morphologique [159] mais aussi au niveau de l'étape de détection du gradient [24, 27]en

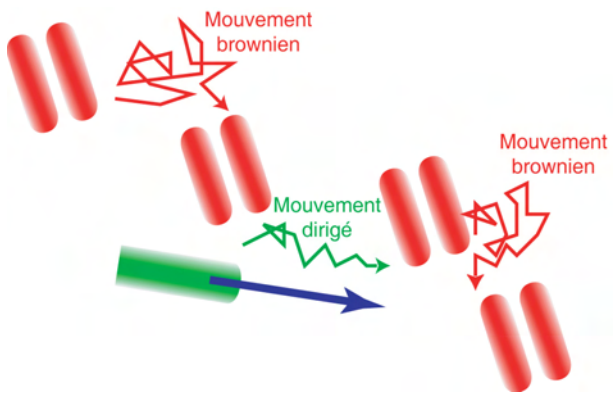


FIG. 2.26 – *Modèle de transport du récepteur du $GABA_A$ dans la membrane du cône de croissance*

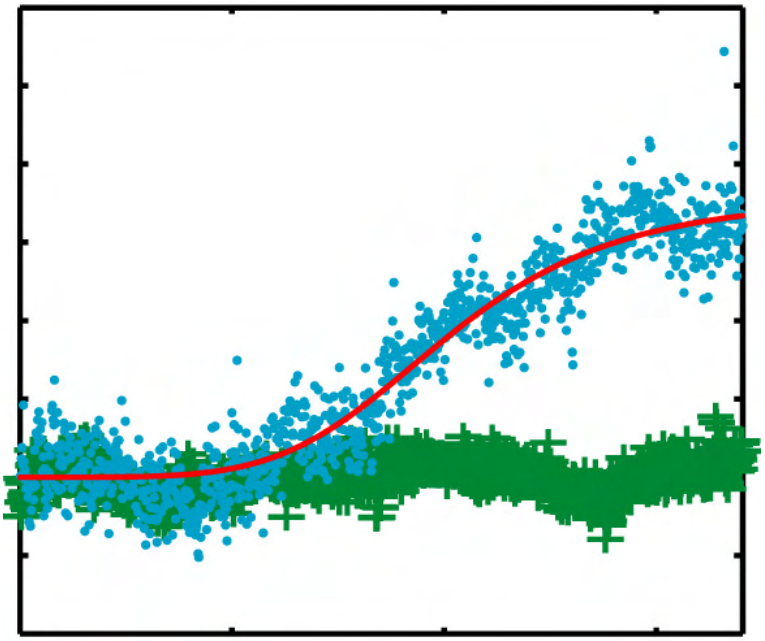
régulant les déplacements des récepteurs dans la membrane. Le rôle organisateur des microtubules est bien connu dans les phénomènes cytoplasmiques, comme le ballet chromosomique [26, 61] lors de la mitose ou le trafic intracellulaire, mais il est encore peu caractérisé dans la membrane. Il pourrait cependant s'avérer essentiel, dans les phénomènes de chimiotactisme ou de plasticité synaptique par exemple. Le couplage direct ici mis en évidence entre système senseur et système moteur laisse entrevoir la possibilité de mécanismes efficaces de détection de signaux extérieurs. Nous allons nous intéresser dans le chapitre suivant à ce dernier point, afin de de mettre en évidence les implications fonctionnelles de ce couplage dynamique entre chimiorécepteurs et cytosquelette.

Chapitre 3

L'intégration fonctionnelle

Un aveugle peut-il conduire un aveugle ? Ne tomberont-ils pas tous deux dans une fosse ?

Luc (6-39)



3.1 Régulation spatiale par les microtubules

Dans le chapitre précédent, nous avons pu mettre en évidence le rôle des microtubules dans la dynamique membranaire des récepteurs du GABA du cône de croissance. Cette observation permet de supposer leur implication dans l'organisation spatiale des récepteurs à la membrane, ce qui pourrait avoir une importance fonctionnelle en couplant le système senseur au système moteur du cône de croissance.

3.1.1 Dispositif expérimental

Le changement de direction de croissance d'un axone se produit sur des temps allant de plusieurs minutes jusqu'à l'heure. Il est par conséquent intéressant de s'intéresser à l'organisation des récepteurs dans la membrane à ces échelles. Afin d'observer les récepteurs du GABA dans un temps pertinent avec la fonction du cône de croissance, la méthode suivante a été utilisée. Les récepteurs ont été marqués par la construction décrite dans le chapitre précédent. Ils ont alors été observés durant vingt à quarante minutes en acquérant une image toutes les secondes avec un temps d'exposition de 75 ms. Ce type de mesure est rendue possible par l'utilisation de nanocristaux semiconducteurs. Aucune autre méthode ne permet à ce jour une acquisition en parallèle de molécules uniques sur des temps aussi longs.

3.1.2 Méthodes d'analyse

L'objectif de tels enregistrements n'est pas la reconstruction de trajectoires de récepteurs individuels, mais l'observation de leur organisation au cours du temps. Aussi, nous avons utilisé deux outils de visualisation de l'organisation des récepteurs : leur zone d'exploration et leur position moyenne, celle-ci étant le barycentre géométrique des positions des récepteurs.

La zone d'exploration est définie de la façon suivante. Pour une séquence de N images $\{I(k)\}_{k=1...N}$, une seconde séquence d'images de même taille $\{I_{expl}(k)\}_{k=1...N}$, appelée séquence d'exploration, est créée. Initialement tous les points des images $\{I_{expl}(k)\}$ ont une amplitude nulle. Chaque image de la séquence est alors seuillée de façon à faire apparaître la position des récepteurs. La position des points ayant une intensité supérieure au seuil est repérée, révélant les maxima locaux sur l'image. La séquence d'exploration est alors construite. Pour chaque temps k_0 , l'amplitude des points à la position des maxima locaux détectés sur toutes les images $\{I(k)\}_{k\leq k_0}$ est fixée à 1000 sur $\{I_{expl}(k_0)\}$. La séquence d'exploration décrit alors la zone d'excursion par l'ensemble des récepteurs au cours du temps (Figure 3.1), c'est-à-dire l'ensemble des points où un récepteur au moins est passé.

3.1.3 Existence d'une barrière axonale

Nous avons effectué des enregistrements de récepteurs du GABA dans des cônes de croissance dans deux situations : sans ajout extérieur ou après traitement par le nocodazole. Dans le cas contrôle (Figure 3.1), les récepteurs se déplacent dans la membrane du cône de croissance et n'en sortent pas, tandis qu'aucun nouveau récepteur n'y arrive depuis l'axone. Celui-ci est d'ailleurs pauvre en récepteurs membranaires, ceux-ci se concentrant dans le cône de croissance, le soma et les dendrites.

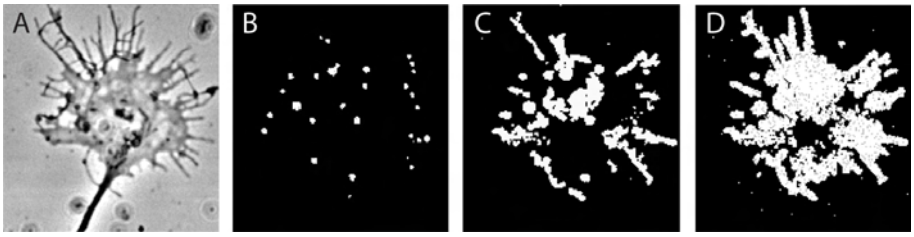


FIG. 3.1 – *Image en transmission (A) et région explorée à $t = 0min$ (B), $t = 8min$ (C) et $t = 17min$ (D)*

Il existe donc une barrière de diffusion entre le cône de croissance et le reste de l'axone ainsi qu'entre le soma et le segment initial de l'axone. Ce type de compartimentation a déjà été observé pour le segment initial de l'axone [115] et semble fondamental pour les fonctions de nombreux systèmes cellulaires polarisés. La capacité d'une cellule de compartimenter ses populations moléculaires en surmontant l'entropie tendant à les homogénéiser dans l'espace est en effet essentielle pour son fonctionnement. Le neurone en est un bon exemple : la polarisation entre axone et dendrite nécessite un triage moléculaire fort et modulé dans le temps.

3.1.4 Rôle des microtubules

Quelle est l'origine de cette barrière de diffusion ? Après traitement par le nocodazole, les récepteurs diffusent également dans le soma, l'arbre dendritique, le cône de croissance et l'axone, passant librement de l'un à l'autre (Figure 3.2). La barrière de diffusion est ainsi abolie par la dépolymérisation des microtubules. Cette expérience démontre le rôle des microtubules dans l'organisation membranaire des récepteurs du GABA, dont la localisation correcte est impossible sans le cytosquelette.

Nous avons ainsi mis en évidence le rôle du cytosquelette dans l'organisation membranaire du cône de croissance. Le rôle fonctionnel de cette propriété reste à préciser. L'organisation des récepteurs du GABA dans le cône de croissance lors de la détection d'un gradient extérieur de GABA est alors une question essentielle.

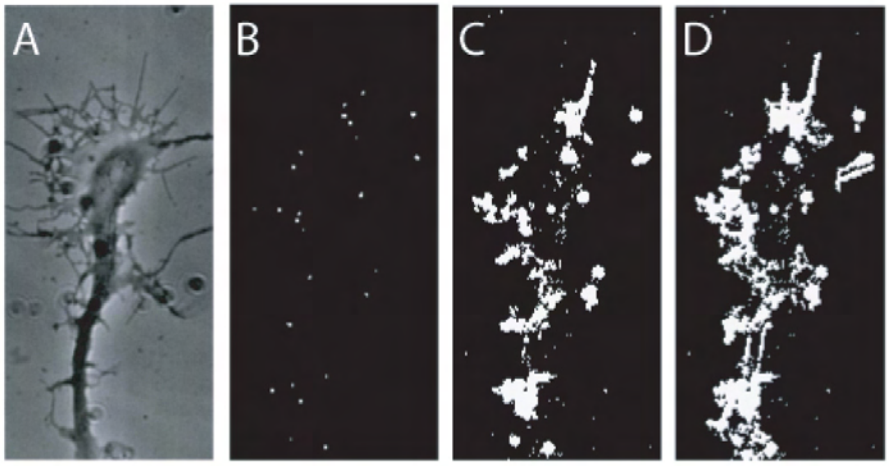


FIG. 3.2 – *Image en transmission (A) et région explorée à $t = 0min$ (B), $t = 8min$ (C) et $t = 17min$ (D) en présence de nocodazole*

3.2 Expériences de guidage

3.2.1 Le guidage artificiel

Afin de s'intéresser à une voie de signalisation précise -celle du GABA dans notre cas-, il est intéressant de disposer d'un moyen permettant de stimuler uniquement celle-ci. En effet, de nombreux signaux différents sont détectés par le cône de croissance (voir Chapitre 1), la réponse du cône de croissance étant l'intégration de ces différents signaux. Nous avons utilisé un système développé depuis une vingtaine d'années [66, 100] pour créer artificiellement des signaux de guidage *in vitro*, qui a permis la caractérisation de nombreux signaux de guidage diffusants et de leurs mécanismes d'action [121, 147, 163, 175, 179]. Le principe en est simple : une pipette étirée de diamètre d'ouverture micrométrique est remplie de substance de guidage qui est périodiquement éjectée afin d'en créer un gradient permanent au voisinage du cône de croissance (Figure 3.3).

Les pipettes sont fabriquées de la façon suivante : un tube de verre de 1 mm de diamètre intérieur est mis sous tension à ses extrémités et chauffé en son milieu par un faisceau laser, provoquant son étirement puis sa rupture. Ceci permet d'obtenir des pipettes étirées à ouverture grossière d'une taille de l'ordre du micron. Celles-ci sont alors rectifiées sur une micro-forge recouverte d'une enveloppe de verre à point de fusion plus bas que le matériau utilisé pour la pipette. À la mise en chauffe l'enveloppe fond et pénètre légèrement dans la pipette ; l'arrêt brutal du chauffage provoque sa solidification et rompt l'extrémité de la pipette, donnant une ouverture nette d'environ 2 μm (Figure 3.4).

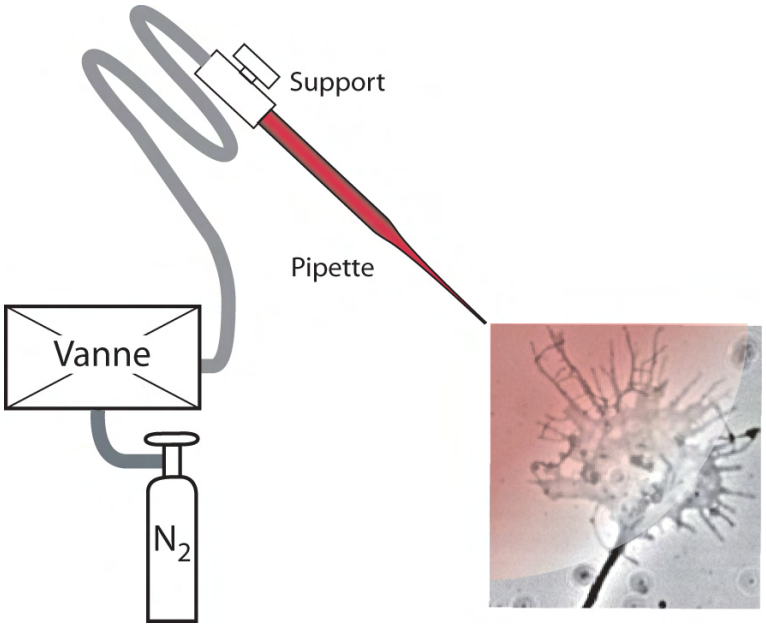


FIG. 3.3 – *Schéma du dispositif de guidage artificiel*

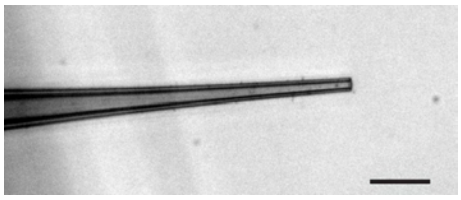


FIG. 3.4 – *Pipette étirée observée avec un grossissement de* $\times 40$. *La barre d'échelle représente 10* μm

Celle-ci est alors remplie de solution à éjecter par aspiration à partir de son extrémité. La pipette est attachée sur un support déplacé par trois vis micrométriques dans les trois directions de l'espace, et reliée à un système pneumatique commandé par une vanne électromécanique. L'éjection de liquide depuis la pipette se fait en appliquant dans le système une pression de diazote comprise entre 0 et 2 bars. La vanne électromécanique (de type Picospritzer®) a un temps d'ouverture réglable entre 2 ms et 100 s et peut être commandée par un générateur de tension délivrant un signal périodique afin de permettre une ouverture régulière. Afin de pouvoir utiliser ce dispositif correctement, il est important qu'il soit calibré afin de contrôler raisonnablement la concentration et le gradient imposés au niveau du cône de croissance. A cet effet, nous avons observé le profil d'éjection d'une solution de Cy3 par le système pneumatique (Figure 3.5) afin d'estimer le volume expulsé.

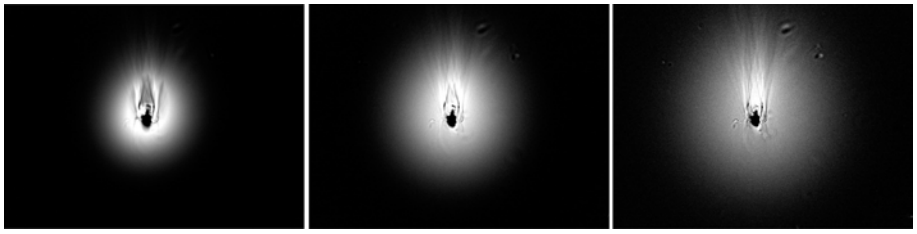


FIG. 3.5 – *Exemple d'éjection de Cy3 par le système pneumatique pour une pression de 0.4 bars de et un temps d'ouverture de 5 ms*

Modélisons le processus mis en jeu ici : un volume source de Cy3 diffuse en trois dimensions. Considérons alors que la distribution initiale de Cy3 a une forme gaussienne dont l'écart-type donne la dimension typique de la gouttelette initiale $N(\mathbf{x}, t = 0) = N_{max} e^{-\frac{x^2+y^2+z^2}{\sigma^2}}$. Dans ce cas, la résolution de l'équation de la diffusion pour la distribution de fluorophore au cours du temps donne $N(\mathbf{x}, t) = N_{max}(t) e^{-\frac{x^2+y^2+z^2}{\sigma^2+4Dt}}$. L'image observée sur la caméra est une projection sur le plan *(xy)* et par conséquent la fluorescence mesurée F a la forme suivante :

$$F(x, y, t) = F_0(t) e^{-\frac{x^2+y^2}{\sigma^2+4Dt}} \tag{3.1}$$

La mesure de l'écart-type de la gaussienne obtenue par l'ajustement du profil de fluorescence (Figure 3.6) fournit alors D le coefficient de diffusion de Cy3 dans l'eau et σ la taille typique du volume initial.

Nous avons alors pu mesurer $\sigma \simeq 10$ μm et $D \simeq 70$ $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, qui est une valeur attendue pour une molécule de taille nanométrique diffusant dans l'eau ($D = kT/6\pi\eta a \simeq 100$ $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, où k est la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité du liquide et a la taille de la

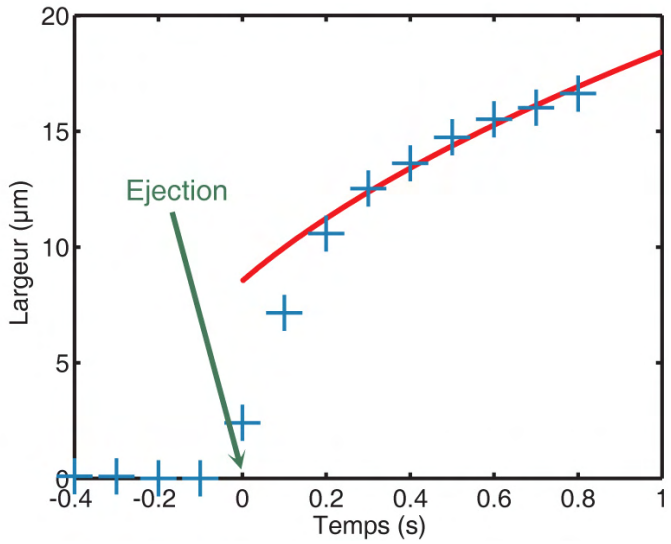


FIG. 3.6 – *Profil d'éjection par la pipette (pression de 0.4 bars et temps d'ouverture de 5 ms). Les temps initiaux ne sont pas pris en compte, le voisinage de la pipette rendant complexe l'interprétation du profil.*

molécule). Considérons alors un point M situé à l=100 μm de la source. Lorsque le gradient est maximal en ce point, c'est-à-dire lorsque le profil de diffusion a pour écart-type l la concentration y est de l'ordre de $C_0 \frac{l^3}{\sigma^3}$ où C_0 est la concentration dans la pipette. Ainsi, la concentration en M est donc approximativement 1000 fois inférieure celle présente dans la pipette. Estimons alors le gradient produit en ce point. La concentration en M s'écrit sous la forme : $C(M) = A \exp\left(-\frac{x^2}{l^2}\right)_{|x=l}$ et le gradient est alors $G(M) = |\frac{\partial C}{\partial x}|(x = l) = 2\frac{C(M)}{l}$. En remplissant, par exemple,une pipette de GABA à la concentration de 10 mmol.L^{-1} placée à environ 100 μm d'un cône de croissance, la concentration typique à son voisinage est de 10 μmol.L^{-1} et le gradient de 0.1 μmol.L^{-1}.μm^{-1}. Afin de générer ce gradient de façon quasi-permanente, il suffit alors de répéter périodiquement l'éjection avec une fréquence suffisamment élevée (2 Hz dans nos expériences). Ce dispositif est ainsi capable de créer un gradient dont la forme n'est pas précisément contrôlé ; seuls des ordres de grandeur de la concentration moyenne et la pente du profil de concentration peuvent être obtenus.

3.2.2 Réponse au GABA

Afin de réaliser un dispositif de guidage artificiel, il faut stimuler les récepteurs du cône de croissance dans une gamme de concentration en ligands voisine de leur affinité pour celui-ci. En plaçant une solution de GABA à

10 mM.L^{-1} dans la pipette résultant en une concentration de l'ordre de 10 μM.L^{-1} au niveau du cône de croissance, ces conditions sont alors remplies pour les récepteurs du GABA$_A$. Le guidage axonal artificiel de neurones spinaux a été effectué en plaçant une pipette distante de $50 - 100$ μm du cône de croissance orientée à 45° par rapport à la direction initiale de l'axone (Figure 3.7).

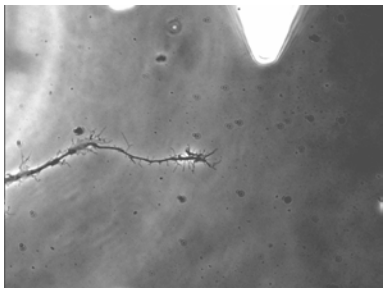


FIG. 3.7 – *Axone en croissance de neurone isolé. La pipette, placée à $\simeq$ 100 μm est remplie de GABA 10 mM.*

Pour observer une éventuelle rotation de l'axone, nous avons considéré des cônes de croissance mobiles, c'est-à-dire peu étalés sur le substrat, qui sont abondants dans des conditions d'adhésion faible. La concentration de culture est par ailleurs choisie suffisamment peu élevée (5.10^4 cellules/mL) pour observer des neurones isolés. La préparation des lamelles de culture (Chapitre 1) est ajustée afin de minimiser l'adhésion et de maximiser les mouvements rapides des cônes de croissance. Ceci peut être accompli en diminuant (d'un facteur trois) la concentration de polyornithine utilisée dans le traitement des lamelles par rapport à l'utilisation standard. L'observation des neurones s'effectue entre trois et six jours après la mise en culture de façon à ce que la polarité des neurones soit établie mais que le réseau ne soit pas encore formé. Du GABA est alors éjecté depuis la pipette à une fréquence de $2Hz$ et le cône de croissance est observé durant une heure de stimulation par le gradient produit de la façon détaillée dans la section précédente.

Il apparaît en moyenne qu'après une heure de stimulation par un gradient de GABA, l'axone modifie significativement sa direction de croissance en direction de la source (Figure 3.8) avec un angle de déviation moyen $\theta = 17.1 \pm 4.9^o$ (n=17).

Cette observation permet de vérifier dans notre système expérimental les propriétés de guidage du GABA déjà observées par ailleurs [50, 175]. Placé dans ce gradient artificiel, le cône de croissance peut effectivement accomplir sa fonction chimiotactique.

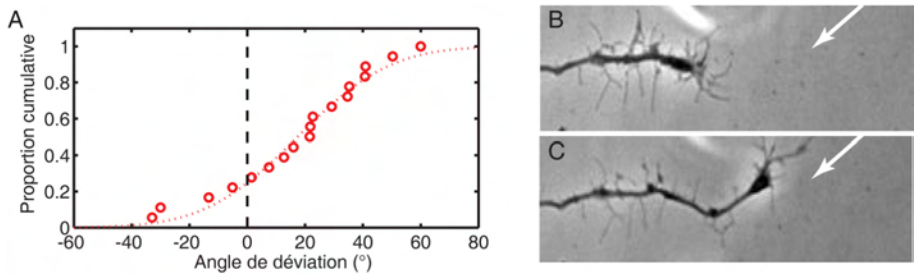


FIG. 3.8 – *Distribution cumulative des angles de déviation par un gradient de GABA (A). Axone au début de l'application du gradient (B) et après une heure (C)*

3.2.3 Distribution des récepteurs

Lorsque le cône de croissance adhère fortement au substrat, sa membrane s'étale sur quelques dizaines de microns. Il est en pause, c'est-à-dire dans une phase où son déplacement est très limité et ou son activité consiste à détecter les signaux de guidage avant son déplacement ultérieur. Nous avons observé de tels cônes de croissance, placés dans un gradient artificiel de GABA, avec leurs récepteurs membranaires du $GABA_A$ marqués par des nanocristaux fluorescents. Des enregistrements en fluorescence des récepteurs ont été réalisés pendant des temps de l'ordre de mille secondes, à raison d'une image par seconde, tandis qu'un gradient était appliqué depuis le début de l'enregistrement à la perpendiculaire de la direction du segment terminal de l'axone.

Les récepteurs sont initialement répartis de façon homogène dans la membrane et y diffusent librement. Après une dizaine de minutes, ils commencent à explorer préférentiellement la région la plus proche de la source de GABA et semblent se redistribuer en moyenne vers celle-ci (Figure 3.9).

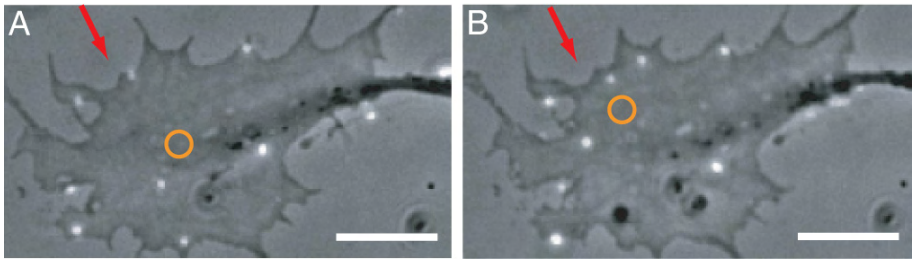


FIG. 3.9 – *Récepteurs dans la membrane d'un cône de croissance initialement (A) et après 17 minutes de stimulation (B). La flèche indique la provenance du GABA et la barre étalon représente* 5 μm

Position moyenne des récepteurs

Un indicateur caractérisant cette redistribution peut être l'évolution du barycentre de la position des récepteurs sur chaque image de l'enregistrement. Cette procédure a été répétée sur onze cônes de croissance différents. Neuf présentent un déplacement moyen de leurs récepteurs vers la source de GABA, aucun déplacement significatif n'étant remarqué pour les deux autres. La moyenne de ces déplacements est présentée sur la Figure 3.10 ; son amplitude (~ 3.5 μm soit $\sim 15 - 20\%$ de la taille d'un cône de croissance) est significative comme le montre la comparaison à une expérience contrôle sans gradient extérieur (Figure 3.10).

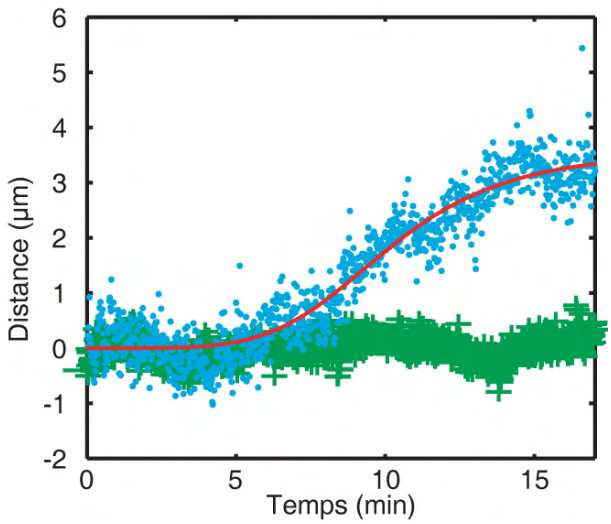


FIG. 3.10 – *Position moyenne des récepteurs dans la membrane du cône de croissance soumis à un gradient de GABA (points cyan, n=9) ou sans gradient extérieur (croix vertes, n=10)*

La redistribution des récepteurs suit un déroulement temporel particulier et reproductible d'un cône de croissance à un autre. Après une dizaine de minutes où les récepteurs restent sensiblement distribués de façon homogène, ceux-ci se déplacent vers la zone où la concentration de GABA est la plus élevée avec un temps caractéristique de 10.3 min. Il faut noter que ceux-ci ne semblent pas piégés dans une région particulière du cône de croissance mais continuent de diffuser, en explorant préférentiellement le côté proche de la pipette (Figure 3.11).

Lorsque le gradient est coupé après avoir induit l'asymétrie dans la distribution des récepteurs, celle-ci relaxe en quelques minutes vers l'équilibre, les récepteurs étant à nouveau répartis de façon homogène dans la membrane (Figure 3.12).

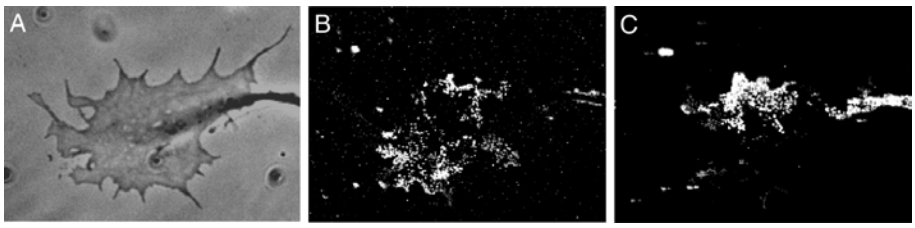


FIG. 3.11 – *Régions explorées dans la membrane du cône de croissance (A) durant les 500 premières secondes de stimulation (B) et les 500 secondes suivantes (C)*

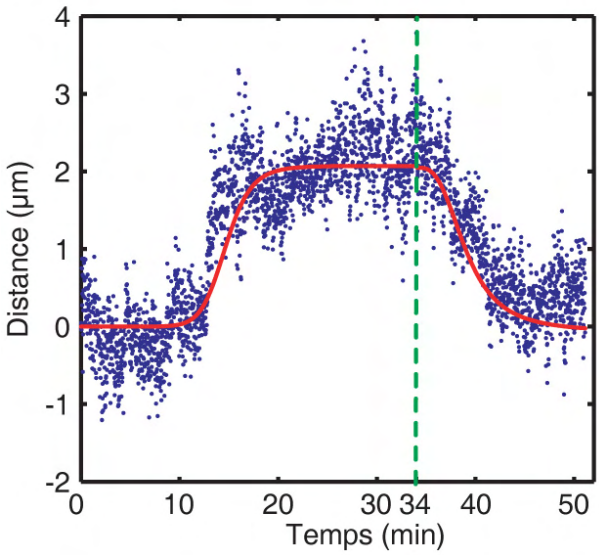


FIG. 3.12 – *Déplacement du barycentre de la position des récepteurs sur un cône de croissance. La stimulation asymétrique est activée durant les 34 premières minutes et éteintes durant les 17 suivantes. Le même type de relaxation a été observé sur 3 cône de croissance différents*

L'absence de redistribution aux premiers instants de la stimulation par le gradient extérieur révèle un système non linéaire, résultant vraisemblablement d'un processus de régulation complexe. Pour rendre compte de cette observation, la courbe de redistribution des récepteurs a été ajustée de façon heuristique par une loi de puissance avec saturation de type $At^n/(T^n + t^n)$ où A et T sont des constantes. Cette loi est inspirée de celles rencontrés pour décrire la concentration de produits de réactions enzymatiques coopératives en fonction de la concentration de substrat. Dans ce cadre, l'exposant n est une mesure du degré de coopérativité dans la réaction - c'est-à-dire du nombre de partenaires impliqués dans la réaction - appelé coefficient de Hill. Ici, n est une estimation de la non-linéarité du processus de redistribution.

Nos données sont ajustées par une loi d'exposant $n = 4.9$ (Figure 3.10). La valeur élevé de l'exposant témoigne de la non-linéarité du phénomène observé et du renforcement de la redistribution au cours du temps. Ceci suggère l'existence de mécanismes d'amplification de cette réorganisation.

Distribution des récepteurs

Initialement, les récepteurs sont répartis de façon homogène dans la membrane du cône de croissance. Ceci s'observe sur la forme de leur distribution cumulative initiale $S_0(x)$ (3.13), qui est approximativement linéaire. L'application d'un gradient de GABA provoque un déplacement significatif ($p < 5.10^{-3}$, test de Kolmogorov-Smirnov) des récepteurs de 15% de la taille totale du cône de croissance vers l'origine du GABA (Figure 3.13).

La forme de la distribution cumulative $S_G(x)$ résultant de l'application du signal de guidage est compatible avec un modèle de déplacement des récepteurs dans un potentiel linéaire $U(x) = -\lambda kTx/L$, où λ est une constante sans dimension, T la température, k la constante de Boltzmann et L la taille du cône de croissance (Figure 3.13). Dans ce cas la distribution cumulative est donnée par :

$$S_G(x) = \frac{1 - e^{-\frac{\lambda x}{L}}}{1 - e^{-\lambda}} \tag{3.2}$$

L'ajustement des données expérimentales est satisfaisant ($\lambda = 1.7$, Figure 3.13). Ceci permet de supposer que les récepteurs se réorganisent sous l'effet d'interactions reflétant le gradient extérieur linéaire qu'ils détectent. Il serait à ce titre intéressant de réaliser des expériences de redistribution en variant précisément la pente du gradient imposé au cône de croissance, ce qui est impossible avec notre dispositif expérimental. Ceci permettrait d'évaluer la dépendance de la distribution avec la force du gradient et de vérifier qu'elle est bien donnée à l'équilibre par une répartition de Boltzmann.

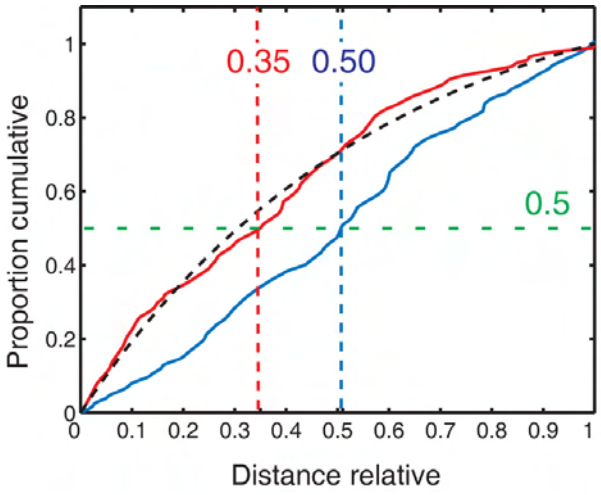


FIG. 3.13 – *Distribution cumulative de la position relative de des récepteurs sur 9 cônes de croissance en fonction de la distance normalisée par rapport à la source $x_n = x/L$ où L est la taille du cône de croissance, avant (bleu, n=109) et après (rouge, n=93) application de 1000 s d'un gradient de 10% de GABA. L'ajustement de la distribution expérimentale par une distribution sous un potentiel linéaire est la courbe noire.*

3.2.4 Spécificité de la réorganisation

Distribution des récepteurs NCAM

La distribution des récepteurs NCAM a été observée dans la membrane de cônes de croissance soumis à un gradient extérieur de GABA. NCAM est une protéine transmembranaire d'adhésion du système nerveux, sans lien connu avec la voie de signalisation du GABA et non couplée au cytosquelette [97]. Elle est visualisée dans la membrane du cône de croissance par un marquage séquentiel avec un anticorps primaire spécifique produit chez le lapin (offert par R.M. Mege), un fragment Fab d'anticorps anti-lapin biotinylé et un nanocristal (QD605) couvert de streptavidine. Contrairement au cas des récepteurs du GABA, la distribution de NCAM demeure inchangée par l'application du gradient (Figure 3.14).

La redistribution observée n'est donc pas le résultat d'un réarrangement d'ensemble de la membrane, mais bien d'une action spécifique et ciblée vers les récepteurs $GABA_A$.

Inhibition de l'activation des récepteurs

Des expériences de redistribution ont été effectuées sur des neurones soumis à un gradient de GABA plongés dans un bain de gabazine, un antagoniste

spécifique du récepteur du $GABA_A$ (voir Chapitre 1). Dans ces conditions, les récepteurs ne sont pas redistribués vers la source et leur position moyenne au cours du temps n'est pas significativement différente de celle en l'absence de stimulation (Figure 3.14).

La redistribution des récepteurs est donc spécifiquement induite par leur activation asymétrique.

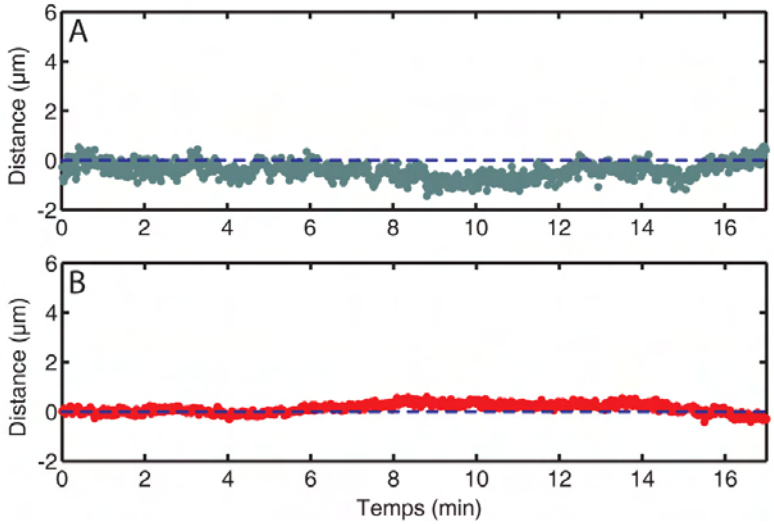


FIG. 3.14 – *Déplacement moyen des récepteurs du $GABA_A$ en bain de gabazine (A) et de NCAM (B), tous deux en présence d'un gradient de GABA*

Ce phénomène est susceptible d'être particulièrement intéressant sur le plan fonctionnel. En effet, la brisure de symétrie dans la densité des récepteurs à la membrane induite par le gradient extérieur rend *a priori* le cône de croissance plus sensible à ce gradient. L'asymétrie du signal extérieur pourrait alors être renforcée par la régulation asymétrique du nombre de récepteurs.

Stimulation par un gradient d'acétylcholine

Nous pouvons nous demander si la redistribution des récepteurs est le signe visible de la réponse du cône de croissance à un stimulus de guidage quelconque ou s'il s'agit d'une réorganisation spécifique de la cascade du GABA. Afin d'évaluer la réponse des récepteurs du GABA à une stimulation d'un autre chimioattractant, les cônes de croissance ont été soumis à un gradient d'acétylcholine (100 mmol.L^{-1} dans la pipette) [179]. Lorsque les neurones sont cultivés en condition de faible adhésion, une déviation vers la source d'acétylcholine est observée (Figure 3.15) d'un angle moyen de 15.3 ± 4.6^o

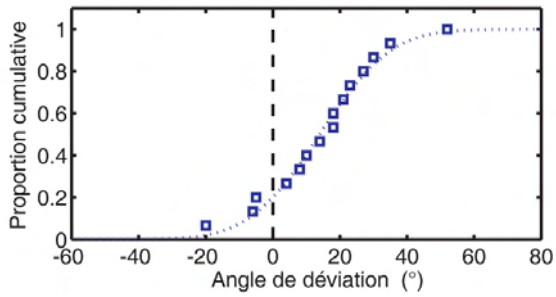


FIG. 3.15 – *Distribution cumulative des angles de déviation par un gradient de GABA.*

L'acétylcholine est ainsi un chimioattractant [179] au même titre que le GABA dans notre système.

Cependant, les récepteurs du $GABA_A$ ne se redistribuent pas dans la membrane du cône de croissance lorsqu'il soumis à un gradient d'acétylcholine (Figure 3.16). Les deux voies de signalisation sont susceptibles de partager des éléments communs, au moins au niveau du cytosquelette, qui est la cible terminale de tout signal de guidage, mais l'activation de la cascade de l'acétylcholine seule ne suffit pas à provoquer la réorganisation des récepteurs du $GABA_A$.

Toutefois, lorsque les récepteurs du $GABA_A$ sont simultanément activés *de façon homogène* par un bain de GABA (10 μM), ils se redistribuent de façon significative en direction de la source d'acétylcholine (Figure 3.16).

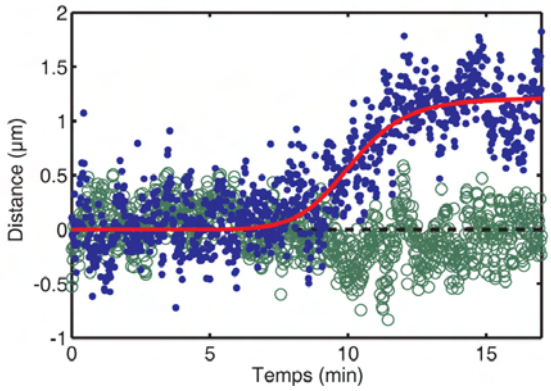


FIG. 3.16 – *Position moyenne des récepteurs $GABA_A$ dans 7 cônes ce croissance différents soumis à un gradient d'acétylcholine avec (points bleus) ou sans (cercles verts) bain GABA 10 $\mu mol.L^{-1}$. L'amplitude est de 1.2 μm pour un temps caractéristique de 10.1 minutes*

Cette observation révèle ainsi que les deux voies de signalisation, celle du GABA et celle de l'acétylcholine, partagent bien des éléments moléculaires communs, du moins en aval des récepteurs. En effet, la réorganisation spécifique des récepteurs du GABA dans la membrane peut être médiée par un signal d'acétylcholine. Cependant, l'activation des récepteurs est nécessaire à la sensibilité des récepteurs du GABA à cette stimulation croisée ; l'activation est donc un préalable spécifique à la génération d'asymétrie dans la distribution des récepteurs $GABA_A$.

3.2.5 Le mécanisme de redistribution

Rôle des microtubules

Le cytosquelette est un des éléments communs de la cascade de signalisation du GABA et de l'acétylcholine. Son rôle connu dans l'organisation membranaire et l'interaction mise en évidence (voir Chapitre 2) entre les récepteurs et les microtubules rend vraisemblable leur implication dans la redistribution des récepteurs.

Lorsque les neurones sont traités par le nocodazole afin d'éliminer les microtubules (voir Chapitre 2), la redistribution est abolie : les récepteurs restent en moyenne au voisinage de l'axe médian du cône de croissance (Figure 3.17). Les microtubules sont donc nécessaires pour la réorganisation membranaire des récepteurs.

Rôle du calcium

La concentration intracellulaire de calcium est un régulateur de la dynamique des microtubules [85, 86] et un messager secondaire central dans le guidage axonal [59, 69, 74, 178], notamment par le GABA [57] (voir Chapitre 1). Le niveau local de calcium constitue de la sorte le message généré par le système de détection (les récepteurs) vers le système moteur (le cytosquelette). L'utilisation du BAPTA-AM permet de tamponner le calcium dans le milieu intracellulaire. Le BAPTA est un composé organique capable de complexer spécifiquement les ions Ca^{2+}. La fonction AM permet au BAPTA d'entrer dans le milieu intracellulaire. Après fixation à la membrane, le BAPTA-AM, qui est un ester de BAPTA, peut passer sur la face cytoplasmique de la membrane et ensuite être clivé par une estérase du cytosol, relâchant le BAPTA dans le milieu intracellulaire. Le calcium intracellulaire est ainsi piégé par ce chélateur.

Lorsque les neurones sont traités par le BAPTA-AM (20 minutes à 30 μM) la redistribution des récepteurs est également abolie (Figure 3.17), ce qui met en évidence le rôle du calcium dans la voie de signalisation du GABA.

Ces différentes observations permettent de proposer un mécanisme d'auto-organisation spatiale des récepteurs du GABA sous un gradient. La légère

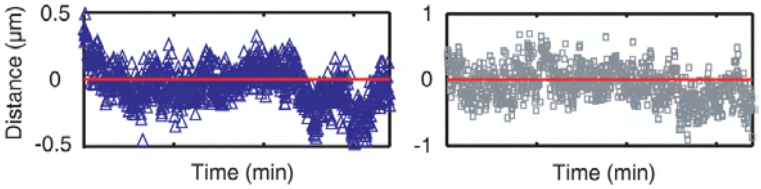


FIG. 3.17 – *Déplacement moyen des récepteurs en présence d'un gradient de GABA et de nocodazole (carrés gris)et de BAPTA (triangles bleus)*

asymétrie dans l'activation des récepteurs due au gradient extérieur induirait une anisotropie dans la concentration de calcium, initialement faible. Celle-ci modifierait à son tour l'organisation du cytosquelette, de sorte que, grâce à l'interaction entre les microtubules et les récepteurs, ces derniers seraient redistribués vers la source de GABA. L'asymétrie, notamment du signal calcique, serait alors renforcée, le tout formant une boucle de rétroaction positive (Figure 3.18), capable d'amplifier le signal extérieur et de mener finalement à la réorientation du cône de croissance.

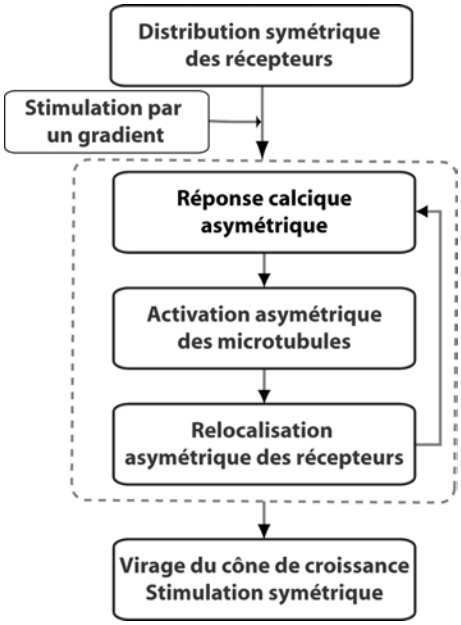


FIG. 3.18 – *Modèle de boucle amplificatrice pour la détection de gradient de GABA*

Ce modèle, cohérent avec nos observations, fournit deux prédictions. La première concerne le déplacement des récepteurs : si l'interaction avec les microtubules est responsable de la redistribution des récepteurs, le gradient

de GABA devrait modifier leur dynamique de façon anisotrope. La seconde concerne l'amplitude de la réponse. Dans notre modèle, la mesure de la concentration locale de calcium est une lecture directe de la réponse du système : si le modèle est correct, une amplification de l'asymétrie de la concentration calcique devrait être observée.

3.3 Dynamique des récepteurs en présence de GABA

Deux mesures différentes de la dynamique des récepteurs en présence de GABA ont été effectuées : une première dans un bain uniforme de GABA et une seconde lorsque le cône de croissance est soumis à un gradient de GABA capable d'induire la redistribution des récepteurs.

3.3.1 Dynamique en bain de GABA

Les mêmes mesures et analyses que dans la situation contrôle (voir Chapitre 2) ont été effectuées avec du GABA ajouté au milieu de montage des neurones pour obtenir une concentration dans le bain de 10 μmol.L^{-1}. La proportion de mouvements dirigés, leur vitesse moyenne et la distribution des durées des périodes du mouvement avec un entraînement par les microtubules ont été mesurées. Il apparaît que les caractéristiques de la dynamique des récepteurs ne sont pas sensiblement modifiées par une application homogène de GABA. En effet, le coefficient de diffusion moyen est $D_{GABA} = 0.25 \pm 0.02$ μm^2.s^{-1}, la vitesse moyenne $v_{GABA} = 0.28 \pm 0.02$ μm.s^{-1} (n=53) et le temps moyen d'interaction avec les microtubules $T_{GABA} = 3.9$ s (Figure 3.19). Ces valeurs ne sont pas significativement différentes de celles mesurées en absence de GABA.

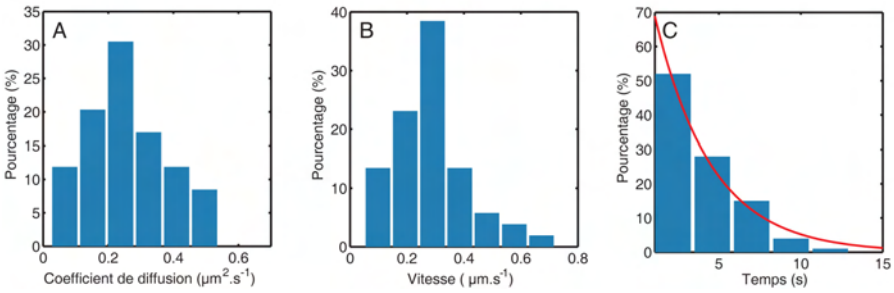


FIG. 3.19 – *Distribution du coefficient de diffusion (A), de la vitesse d'entraînement (B) et du temps d'interactions avec les microtubules (C) des récepteurs en présence d'un bain de GABA (10µM)*

L'application de GABA ne semble donc pas modifier la biochimie des interactions entre les microtubules et les récepteurs. La redistribution des

récepteurs serait due non pas à un renforcement local de leurs liaisons avec les microtubules mais à une réorganisation spatiale du cytosquelette.

3.3.2 Dynamique sous gradient de GABA

Afin de mesurer l'influence d'une stimulation asymétrique sur la dynamique membranaire des récepteurs, nous avons analysé leurs mouvements sur plusieurs cônes de croissance (n=3) soumis à un gradient de GABA, à l'instant initial d'une part, et après 10 minutes de stimulation d'autre part. Dans les deux cas, ∼80% des trajectoires ont une composante dirigée, avec une vitesse moyenne voisine : $v_{init} = 0.26 \pm 0.03$ μm.s^{-1} initialement et $v_{10} = 0.24 \pm 0.03$ μm.s^{-1} après 10 minutes de stimulation. En revanche, l'orientation des mouvements dirigés, déterminée par la direction moyenne des récepteurs sur l'ensemble de leur trajectoire, est notablement modifiée par l'application du gradient (voir Figure 3.20).

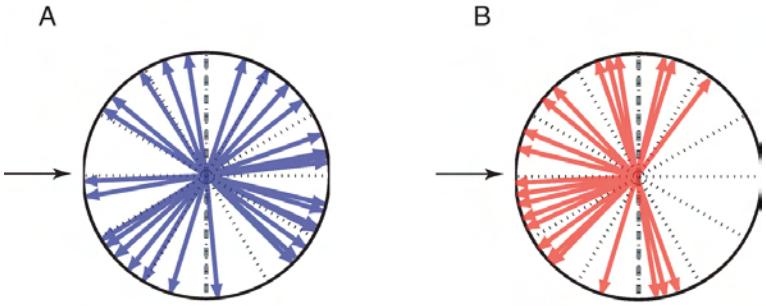


FIG. 3.20 – *Orientation des mouvements des récepteurs après 0 (A) et 10 minutes (B) de stimulation par un gradient du GABA. La flèche indique la direction du gradient*

Aux instants initiaux, aucune orientation privilégiée n'apparaît : les mouvements sont symétriques par rapport à l'axe de l'axone. Après 10 minutes, les mouvements des récepteurs sont préférentiellement dirigés vers la source de GABA.

Les distributions des angles d'orientation des mouvements des récepteurs sont significativement différentes. En choisissant l'origine des angles à l'opposé de la direction du gradient, la mesure du cosinus moyen de l'angle d'orientation des vitesses $< \cos(\theta) >$ est une quantité adaptée pour quantifier la déviation induite par le gradient. Après 10 minutes, $< \cos(\theta) >= -0.4 \pm 0.1$, attestant d'une déviation significative vers la source de GABA, tandis qu'initialement $< \cos(\theta) >= 0.1 \pm 0.1$, signe d'une absence de direction privilégiée. La mesure des orientations et des amplitudes des mouvements dirigés (Figure 3.21) permet de déterminer que le déplacement moyen des récepteurs se fait avec un angle de 166 ± 30° (soit $-14^o \pm 30^o$ par rap-

port à la direction de la source) avec une vitesse moyenne de déplacement $v_{dep} = 0.09 \pm 0.03$ μm.s^{-1} vers celle-ci.

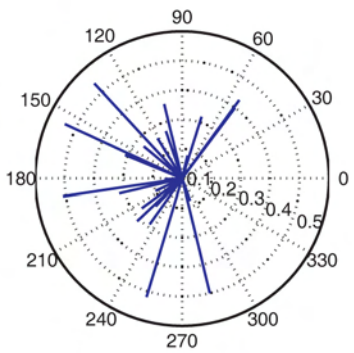


FIG. 3.21 – *Vitesses observées après 10 minutes de stimulation par un gradient de GABA*

Ces expériences permettent de relier la dynamique des récepteurs à leur organisation, vérifiant une des prédictions fournies par notre modèle. Leur interaction avec les microtubules est effectivement responsable de leur redistribution. Ce processus n'implique pas de modification de la nature des interactions entre les récepteurs et les microtubules mais reflète la réorganisation de ces derniers. Les récepteurs du GABA, lorsqu'ils sont activés, réalisent une cartographie des directions de croissance des microtubules, ce qui est cohérent avec les observations faites dans un gradient d'acétylcholine.

3.4 La réponse calcique

La quantification de la réponse du cône de croissance à une stimulation asymétrique peut être faite en mesurant la concentration locale de calcium intracellulaire lorsqu'il est plongé dans un gradient de GABA.

3.4.1 L'imagerie calcique

Principe

Le calcium régule de nombreux phénomènes biologiques et l'imagerie de sa concentration intracellulaire est devenu un enjeu important en biologie cellulaire depuis plus d'une trentaine d'années. Le développement de sondes fluorescentes sensibles au calcium [64, 164] a permis de répondre à ce besoin.

Il s'agit de chélateurs de calcium fluorescents ayant la propriété de modifier l'intensité ou la longueur d'onde de leur émission en fonction de la concentration de calcium libre dans leur environnement. On trouve aujourd'hui dans le commerce de nombreuses sondes ayant des propriétés spectrales et d'affinité pour le calcium différentes permettant de couvrir une large gamme de besoins de besoins d'imagerie biologique (activité neuronale [29], motilité cellulaire [3],...). L'affinité K_d de chaque indicateur indique la concentration typique au dessus de laquelle celui-ci peut lier le calcium. Un indicateur est donc approprié pour mesurer des niveaux calciques de l'ordre de son affinité : une concentration trop faible ne produit pas de signal et à une concentration trop élevée l'indicateur est saturé, empêchant la détection des variations de concentration de calcium. L'entrée d'indicateur calcique à l'intérieur d'une cellule peut se faire de plusieurs façons : par microinjection, l'indicateur étant directement injecté dans le cytoplasme ou en utilisant des indicateurs fonctionnalisés AM (voir Section précédente).

Mise en œuvre expérimentale

Dans notre cas, nous avons utilisé comme indicateur le Fluo4-AM. Celui-ci devient fluorescent autour de 520 nm en présence de calcium. Son affinité pour la calcium ($K_d = 345$ nM) est voisine des concentrations estimées des signaux calciques dans le cône de croissance [69, 168], ce qui le rend adapté pour notre système. La simple mesure d'augmentation de fluorescence d'un indicateur calcique n'est cependant pas suffisante pour obtenir une estimation de la concentration intracellulaire : en effet les variations de fluorescence observées peuvent provenir d'autre sources que du changement de la concentration de calcium. La fluorescence étant intégrée sur toute l'épaisseur de la cellule dans nos expériences, les éventuelles variations morphologiques du cône de croissance peuvent notablement affecter le niveau de fluorescence mesuré. Pour tenir compte de cet effet, nous avons utilisé simultanément au Fluo4, un indicateur fluorescent de morphologie cellulaire, la Calcéine Orange AM. Cette sonde fluorescente à 590 nm est insensible au calcium et permet de normaliser le signal de fluorescence obtenu pour le Fluo4. Le rapport de fluorescence $F_{Fluo4}/F_{Calceine}$ est ainsi l'estimateur de la concentration de calcium que nous avons utilisé.

La méthode employée révèle les variations relatives de la concentration de calcium en s'assurant que les fluctuations de fluorescence ne sont pas dues à des effets de morphologie ou de photoblanchiment. L'objectif n'étant pas de mesurer la concentration absolue de calcium, une mesure ratiométrique ne s'impose pas. Celle-ci nécessiterait une mesure de fluorescence en absence de calcium dans un cône de croissance, c'est-à-dire en déplétant le milieu extérieur de calcium et en perméabilisant la membrane du neurone.

Sur le plan expérimental, des neurones en culture sur lamelle de verre sont incubés durant 10 minutes en présence de Fluo4 (1 μM) et de Calcéine

Orange (4 μM). Les lamelles sont alors montées sur le microscope de fluorescence décrit au Chapitre 1 équipé d'un système de visualisation en deux couleurs (DualView^{TM}) (Figure 3.22) afin d'observer simultanément les deux indicateurs fluorescents.

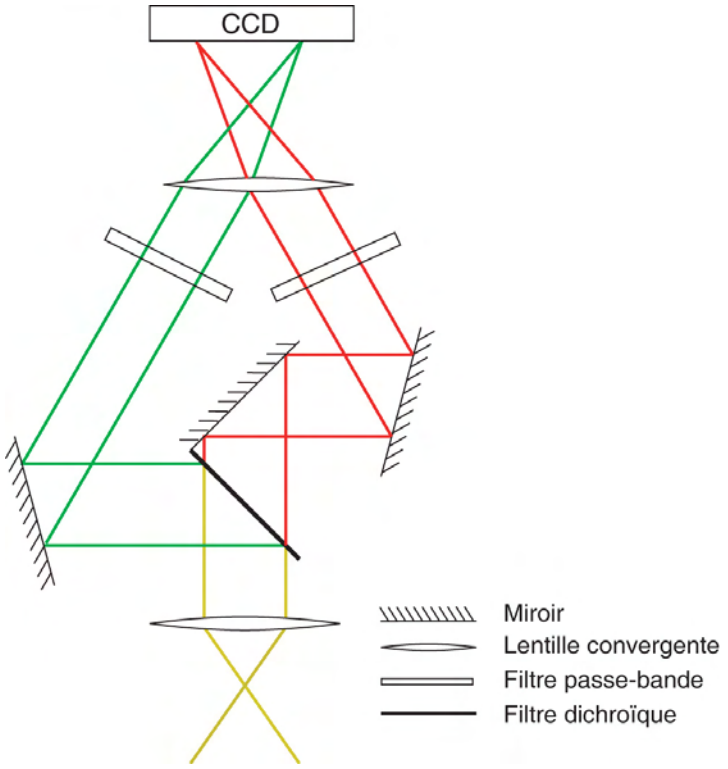


FIG. 3.22 – *Principe du dispositif DualView. Le signal de fluorescence total provenant de l'échantillon est collimaté par une lentille convergente puis séparé spectralement par un filtre dichroïque. Les longueurs d'onde d'intérêt sont sélectionnées dans chaque canal par des filtres passe-bande. La séparation spatiale est réalisé par un jeu de miroir modifiant l'inclinaison des faisceaux parallèles, qui sont alors focalisés par une seconde lentille identique en des points différents de la puce de détection.*

3.4.2 Mesure d'amplification

Dix cônes de croissance ont été observés dans ces conditions expérimentales en présence d'un gradient de GABA identique à ceux déjà évoqués. En acquérant une image toutes les 8 secondes durant 20 minutes, la concentration calcique en chaque point est estimée au cours du temps par le rapport de fluorescence entre Fluo4 et Calcéine F_F/F_C. Ce rapport effectué sur chaque

image permet d'obtenir une séquence d'images de la concentration de calcium (Figure 3.23).

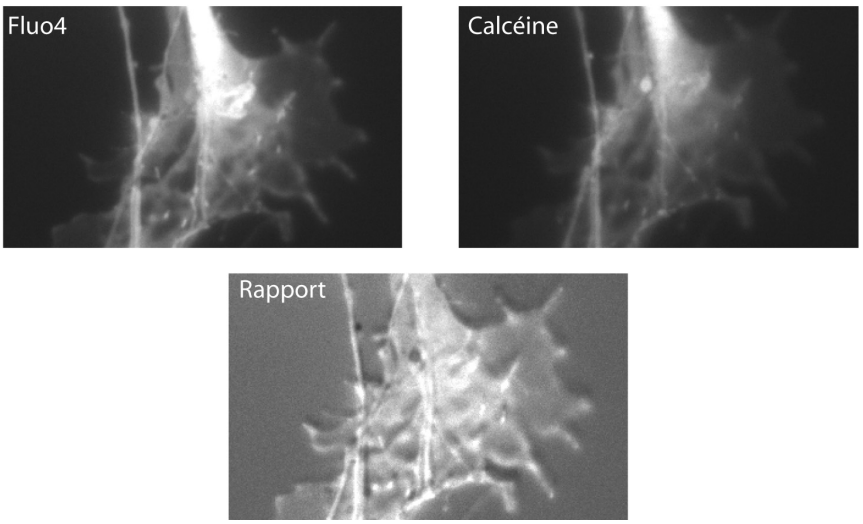


FIG. 3.23 – *Image issue du rapport de fluorescence d'un cône de croissance axonal*

Lorsque le cône de croissance est soumis au gradient de GABA, la concentration de calcium se modifie de façon asymétrique (Figure 3.24). L'observation révèle une augmentation du signal calcique moyen préférentiellement dans la région du cône de croissance la plus proche de la source de GABA (ou zone proximale) par rapport à la région la plus éloignée (zone distale). Ces deux zones sont séparés par l'axe de l'axone dans le cône de croissance.

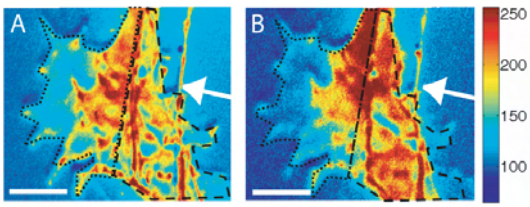


FIG. 3.24 – *Image de la concentration calcique à t=0 (A) ou après 20 minutes de stimulation (B). La flèche blanche indique la provenance du GABA. La barre d'échelle représente 10 µm. Les régions en cerclées de points et de tirets sont respectivement la zone distale et la zone proximale*

Afin de quantifier cet effet, nous avons mesuré la concentration moyenne dans le cône de croissance entier (Figure 3.25) et le rapport de concentration $R(t) = C_{proximale}/C_{distale}$ entre chacune de ces deux régions (Figure 3.26), et nous avons suivi leurs évolutions.

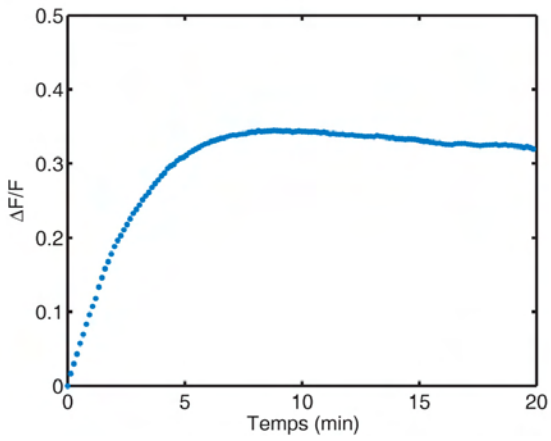


FIG. 3.25 – *Evolution de la concentration moyenne de calcium. La courbe représente l'élévation relative de niveau de calcium par rapport au niveau initiale* $\Delta F/F$

L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans le cône de croissance est de l'ordre de 30% après 20 minutes de stimulation. Ceci confirme l'implication du calcium dans le guidage axonal par le GABA. D'autre part, l'augmentation immédiate de la concentration calcique 3.25) indique que le calcium joue un rôle dans les processus initiaux de la réponse chimiotactique de l'axone, c'est-à-dire dans l'étape de détection.

Il apparaît de plus une asymétrie significative dans le signal calcique, comparée par exemple au rapport de fluorescence constant de la calcéine orange (Figure 3.26).

L'apparition de cette asymétrie semble se décomposer en deux étapes. Dans un premier temps, l'asymétrie augmente de façon linéaire avec le temps pour finalement sembler saturer vers 1.05 et est correctement approximée par un ajustement heuristique de la forme $K\frac{t}{T+t}$. Il se produit alors une seconde augmentation rapide de l'asymétrie se produisant après un temps $T = 11 \pm 2$ min de stimulation. Il est remarquable que celle-ci apparaisse ainsi en un temps comparable à celui de la redistribution des récepteurs (Figure 3.27).

Ces observations appellent deux remarques. Tout d'abord, la mesure de son asymétrie induite montre que la concentration locale calcium permet bien de lire la réponse du cône de croissance au gradient extérieur. Nous pouvons ensuite formuler une hypothèse pour décrire le signal calcique observé.

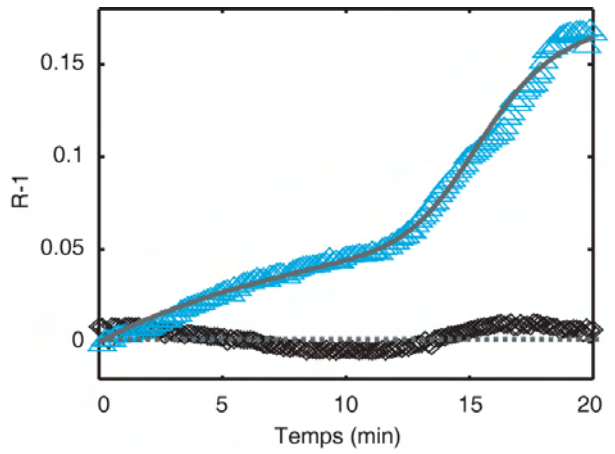


FIG. 3.26 – *Evolution du rapport des concentrations entre la zone proximale et la zone distale (triangles bleus). Les courbes présentent la moyenne du signal observé sur 10 cônes de croissance. Les carrés noirs indiquent l'évolution du rapport du signal de fluorescence ce la calcéine*

L'asymétrie initiale serait due à la lecture du gradient par une population de récepteurs répartie de façon homogène dans la membrane, tandis que l'induction de leur redistribution par cette asymétrie calcique primaire donnerait lieu à la seconde réponse non-linéaire due à une stimulation asymétrique d'une distribution anisotrope de récepteurs. Ceci permettrait d'amplifier la réponse calcique au signal extérieur (Figure 3.27).

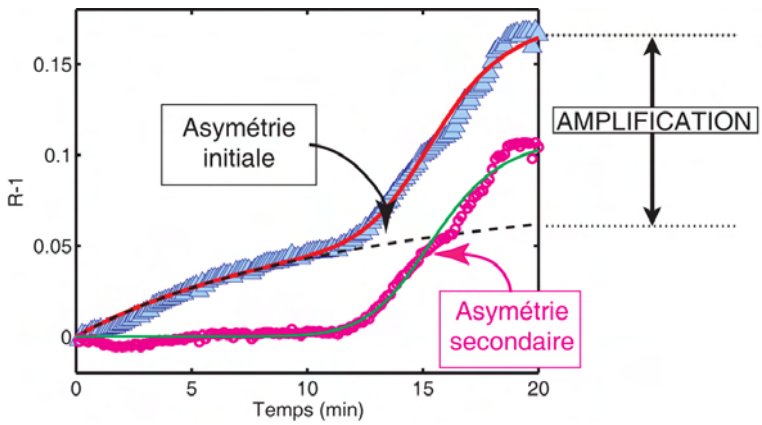


FIG. 3.27 – *La variation de l'asymétrie calcique (triangle bleus) se décompose en la somme de deux composantes : une asymétrie initiale (pointillés noirs) et une asymétrie secondaire concomitante avec la redistribution des récepteurs (cercles roses).*

Afin de vérifier cette hypothèse, la redistribution des récepteurs a été abolie par un traitement au nocodazole (voir Sections précédentes). En ce cas, l'asymétrie initiale apparaît de façon identique à la situation contrôle, mais il ne se produit pas de seconde asymétrie (Figure 3.28).

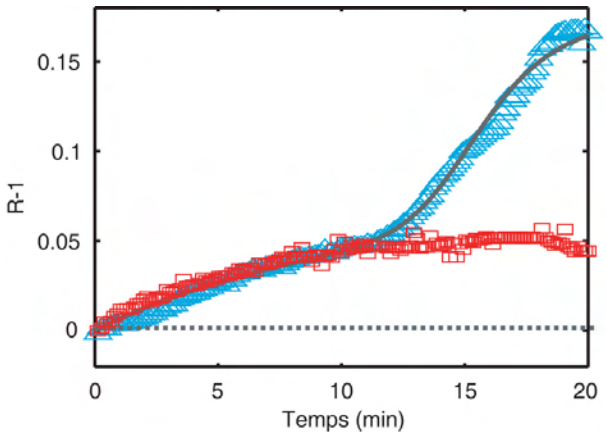


FIG. 3.28 – *Evolution du rapport des concentrations entre la zone proximale et la zone distale en présence de nocodazole (carrés rouges) comparée à la situation contrôle (triangles bleus).*

L'augmentation secondaire de l'asymétrie de la concentration de calcium est ainsi vraisemblablement due à la redistribution des récepteurs. La zone proximale s'enrichissant significativement en récepteurs à partir d'environ 10 minutes d'application du gradient, le signal calcique induit devient localement plus fort dans cette région. La seconde étape de la réponse calcique est ainsi une mesure directe de l'amplification réalisée par le cône de croissance grâce à la réorganisation des récepteurs dans la membrane (Figure 3.27).

3.5 Mécanisme d'amplification

Les observations décrites dans la section précédente permettent de proposer un modèle d'amplification des signaux de guidage axonal fondée sur la réorganisation spatiale des récepteurs membranaires, cohérent avec l'ensemble des faits expérimentaux.

3.5.1 Une rétroaction positive

Lorsque le cône de croissance est plongé dans un gradient de GABA, même faible, les récepteurs sont activés de façon asymétrique. Ceux-ci sont uniformément répartis dans la membrane et induisent un signal calcique local anisotrope, éventuellement faible, que nous avons identifié comme la réponse

primaire du cône de croissance. Les récepteurs sont à tout instant mobiles dans la membrane, alternant des périodes de diffusion libre et des périodes où ils sont entraînés par la dynamique des microtubules. Leur croissance est renforcée par l'augmentation du niveau de calcium, modifiant alors la dynamique des récepteurs.

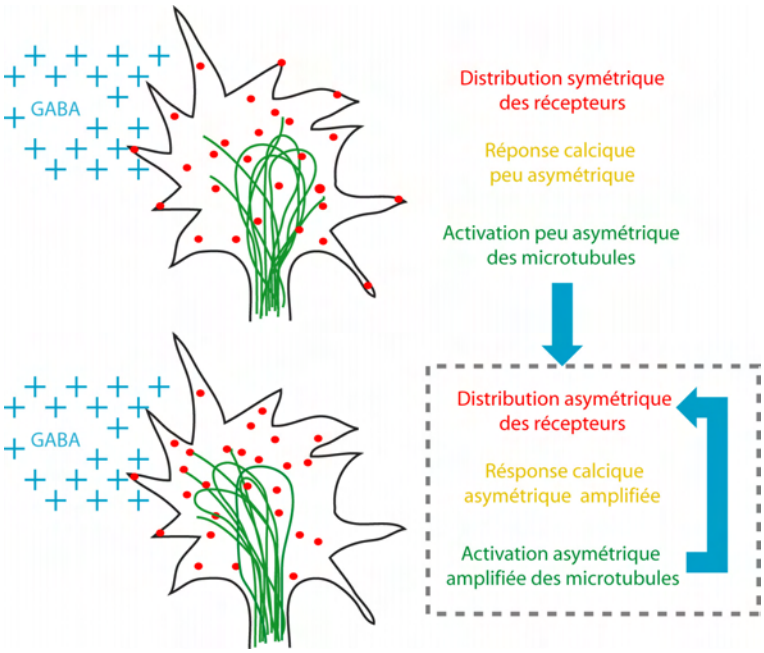


FIG. 3.29 – *Modèle de redistribution des récepteurs et d'amplification du gradient de GABA*

Les récepteurs sont ainsi capables d'induire leur déplacement préférentiel vers les zones de forte activation. Une boucle de rétroaction positive est formée (Figure 3.29), l'activation des récepteurs modifiant le cytosquelette qui réorganise en retour les récepteurs du GABA dans la membrane. Ceci permet à une asymétrie initiale éventuellement minime d'être amplifiée pour aboutir à la redistribution des récepteurs et l'apparition d'un signal calcique renforcé.

3.5.2 Discussion

Si le modèle proposé est capable de rendre compte de l'ensemble des données expérimentales, certains éléments du mécanisme demandent encore à être approfondis.

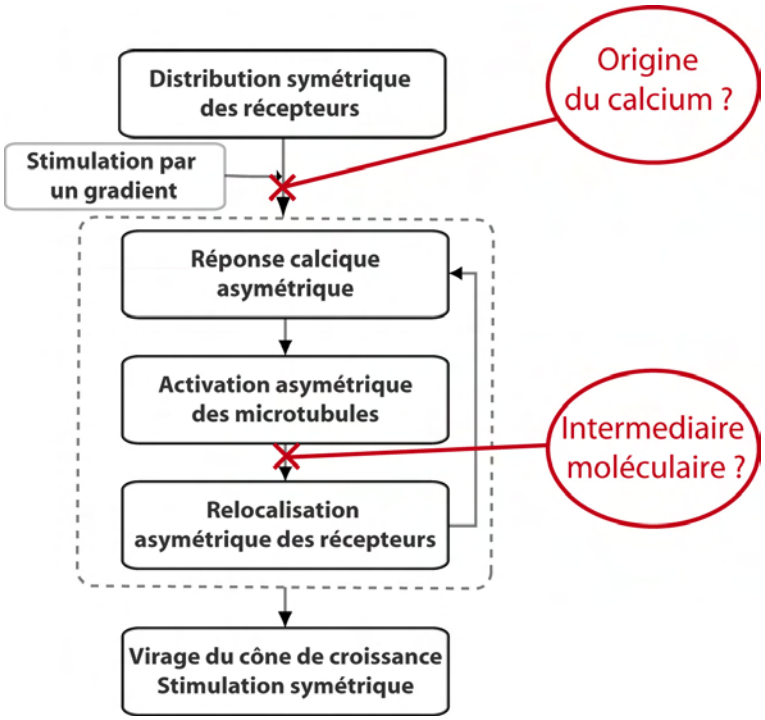


FIG. 3.30 – *Modèle de redistribution des récepteurs et d'amplification du gradient de GABA : l'origine du calcium et la nature moléculaire du couplage entre les récepteurs et le cytosquelette ne sont pas encore élucidées.*

Couplage entre les microtubules et les récepteurs

Le ou les intermédiaires moléculaires permettant l'interaction entre les récepteurs et les microtubules sont encore inconnus. Si le couplage par un moteur semble exclu par nos données (voir Chapitre 2), l'interaction directe entre le récepteur du $GABA_A$ et les microtubules est également impossible. Il existe cependant des éléments dans la littérature indiquant une interaction indirecte entre le récepteur et les microtubules. L'interaction d'une protéine appelée GABARAP (pour GABA Receptor Associated Protein) avec la boucle intracellulaire de la sous-unité γ_2 du récepteur du $GABA_A$ a été identifiée par une expérience de double-hybride [169, 170]. Cette interaction a été confirmée *in vitro* par immunocytochimie : les récepteurs du GABA colocalisent avec les GABARAPs dans des neurones corticaux. Cette protéine est également capable d'interagir avec la tubuline et les microtubules [169]. De plus, il a été démontré que GABARAP jouait un rôle fonctionnel dans différents aspects de l'organisation et le transport des récepteurs du GABA. GABARAP est ainsi impliquée dans la formation des groupes de récepteurs du GABA post-synaptiques [32] nécessaires pour une fonction normale [40].

Cette protéine intervient également dans le transport intracellulaire des récepteurs en vue d'un adressage à la membrane [89]. Ces propriétés de GABARAP en font un candidat intéressant pour jouer un rôle d'intermédiaire entre les récepteurs et les microtubules.

Une autre protéine connue pour son rôle dans l'organisation des récepteurs du GABA à la membrane est la protéine d'échafaudage appelée géphyrine [39], même si son rôle exact est encore controversé [2]. La géphyrine est une protéine de 93 kDa connue pour interagir avec les microtubules et le récepteur de la glycine [88], l'autre neurotransmetteur inhibiteur principal du système nerveux. Ses interactions avec les récepteurs du GABA sont encore incomplètement connues. Cette protéine de l'échafaudage post-synaptique régule la dynamique du récepteur du GABA aux synapses [80] et a été observée en culture dans l'axone de neurones jeunes [39], pour une fonction encore non déterminée. Ces deux protéines sont donc deux candidats potentiels, non exclusifs l'un de l'autre, pour expliquer l'existence d'une interaction effective entre les récepteurs du GABA et les microtubules dans le cône de croissance. Il serait ainsi prometteur de s'intéresser aux mêmes mesures que nous avons pu faire sur des neurones où la production de géphyrine serait limitée, par exemple par une interférence à l'ARN.

Activation des récepteurs et couplage aux microtubules

L'interaction entre les récepteurs et les microtubules révélée par nos résultats résulte vraisemblablement d'un mécanisme élaboré. En effet, il apparaît que l'activation des récepteurs ne modifie pas leurs interactions avec les microtubules mais qu'elle est néanmoins nécessaire pour permettre une interaction avec les microtubules en croissance asymétrique. Ces deux points ne sont pas contradictoires, mais il semble que l'interaction entre microtubules et récepteurs responsable de leur redistribution implique des modifications des extrémités des microtubules spécifiques de leur croissance asymétrique induite par les récepteurs.

La coiffe d'un microtubule dans une cellule au repos ou dans une cellule en mouvement avec une organisation asymétrique du cytosquelette est en effet de composition différente. Des protéines, comme APC (Adenomatous Polyposis Coli protein) [10] et CLASP (CLIP ASsociated Protein) [1] ont été identifiées à la coiffe de microtubules dans des régions motiles comme des épithéliums de cellules mobiles ou à la périphérie du cône de croissance [1, 98, 180]. Cette propriété provient de la modulation spatiale de leur affinité pour les extrémités des microtubules [173]. Les propriétés de la coiffe des microtubules sont donc susceptibles d'être modifiées par une stimulation asymétrique et de n'interagir en ce cas qu'avec les récepteurs activés.

Par ailleurs, plusieurs partenaires de CLASP, comme CLIP-115 et CLIP-170 sont connus pour leur action dans l'organisation et la polarisation du neurone [75, 177] et pourrait être impliqués dans la régulation des interactions

entre les récepteurs et les microtubules. Le mécanisme précis d'action des microtubules reste ainsi à élucider. La cohérence du modèle d'auto-organisation des récepteurs n'en est toutefois pas dépendante ; l'observation phénoménologique de la redistribution des récepteurs par les microtubules est suffisante pour rendre compte de l'amplification du gradient extérieur.

Origine du calcium

L'origine du calcium provoquant une augmentation asymétrique de la concentration intracellulaire n'a pu être précisée par les expériences présentées ici. Nous ne pouvons pour l'instant pas savoir s'il s'agit d'une entrée de calcium extracellulaire par les canaux calciques ou d'un relargage depuis les stocks internes. Les deux mécanismes sont impliqués dans la signalisation de la croissance et du guidage axonal [118, 158]. Cependant, la voie de signalisation des récepteurs $GABA_A$ semble plutôt utiliser les canaux calciques sensibles au potentiel de type L [57, 175], même si nous n'en avons pas de preuve expérimentale directe sur notre système. La modalité d'entrée éventuelle de calcium dans le milieu intracellulaire par l'intermédiaire de canaux membranaires n'est pas encore éclaircie. Des mécanismes reposant sur la dépolarisation locale [57] ou sur la génération d'une tension osmotique de la membrane cellulaire due à l'activation des récepteurs de GABA [31, 157] ont été proposés mais pas encore directement observés.

Nous pouvons nous demander également si le signal calcique asymétrique est le résultat d'une activation anisotrope d'une distribution homogène de canaux calciques ou si ces canaux sont eux-mêmes redistribués [59] par un mécanisme similaire aux récepteurs du GABA. Cette question reste ouverte et pourrait trouver sa réponse à l'avenir en visualisant les canaux calciques à la membrane du cône de croissance.

3.5.3 Portée biologique

Une boucle amplificatrice

Le mécanisme d'amplification mis en évidence par les données présentées dans ce chapitre a une importante signification fonctionnelle pour le guidage axonal. Il s'agit en effet, à notre connaissance, du premier mécanisme décrit permettant de relier des interactions moléculaires à une amplification fonctionnelle du gradient extérieur. La détection sensible de signaux de guidage, nécessaire au chimiotactisme de l'axone (voir Chapitre 1), est ainsi rendue possible par un jeu d'interactions entre le système initial de détection (les récepteurs) et le système moteur terminal (le cytosquelette) formant une boucle de rétroaction positive.

Filtrage temporel

Le déroulement temporel du processus d'amplification est également révélateur. Sur le plan fonctionnel, une simple boucle d'amplification ne semble *a priori* pas optimale pour produire une réponse précise. La détection serait sensible mais elle ne serait pas robuste car le bruit extérieur serait également amplifié. Il est alors significatif de remarquer que l'amplification démontrée dans ce travail ne se produit qu'après dix minutes de stimulation continue. Le mécanisme d'amplification par redistribution des récepteurs constitue ainsi un filtre passe-bas, éliminant la contribution des signaux de guidage de hautes fréquences (typiquement supérieure à 2 mHZ). Les signaux parasites transitoires seraient ainsi incapables de provoquer le déclenchement de la cascade de signalisation amplificatrice, signe de la robustesse du système de détection du cône de croissance.

L'équilibre entre la diffusion, tendant à homogénéiser la population des récepteurs et leur déplacement induit par leur activation produit un système très particulier de boucle de rétroaction positive intrinsèquement régulée. Ceci tient essentiellement au mode de redistribution asymétrique des récepteurs qui se renforce lui-même au cours du temps par l'intermédiaire des microtubules, ce qui résulte en une interaction effective entre récepteurs activés. Une asymétrie extérieure faible, mais continue dans le temps, peut être amplifiée en induisant une brisure de symétrie de la distribution des récepteurs.

Le cône de croissance possède ainsi la fonction remarquable, inverse de celle observée dans les systèmes de chimiotactisme bactérien [12, 43, 136], de pouvoir intégrer un signal temporel dans l'espace. Une combinaison d'excitation locale et d'inhibition globale évoquée pour le chimiotactisme eukaryotes [53, 110, 119] est ainsi réalisée. La diffusion inhibe globalement la réponse en favorisant une distribution homogène de récepteurs dans la membrane et de calcium dans le milieu intracellulaire. L'excitation locale provient alors de la stimulation localisée de la croissance des microtubules par l'élévation de la concentration de calcium suite à l'activation des récepteurs. Ceci provoque une exaltation de la réponse dans la région proche de la source de GABA, suite à l'augmentation du nombre de récepteurs et une inhibition simultanée ailleurs par la déplétion de récepteurs.

La nécessité de la redistribution pour le guidage par le GABA n'est cependant pas complètement démontrée. Faute de disposer d'un inhibiteur spécifique de la relocalisation spatiale, nous n'avons pu vérifier que ce phénomène précis était un préalable indispensable à la réponse chimiotactique du cône de croissance.

Modèle d'auto-organisation dynamique

Nos résultats, la simplicité et la généralité du modèle qui en découle, peuvent avoir une portée plus générale, au delà du problème du guidage axonal. Ils peuvent nourrir la réflexion pour des questions de mobilité cellulaire, mais aussi dans des systèmes où la modulation dynamique d'une réponse à un stimulus extérieur est utile. Nous avons ainsi apporté quelques réponses, sur un système particulier, au problème central en biologie cellulaire de l'adaptation dans le temps et l'espace de la réponse d'une cellule à un environnement complexe.

Rôle de la diffusion

Les propriétés du modèle exposé reposent sur l'organisation dynamique de récepteurs membranaires et donc sur l'existence de diffusion dans la cellule. Il apparaît aujourd'hui qu'elle est un élément important pour de nombreuses propriétés cellulaires [19, 87]. La diffusion introduit un niveau de régulation spatiale en plus du niveau de régulation biochimique, ce qui permet une modulation dynamique des voies de signalisation. Elle régule par exemple le nombre de récepteurs synaptiques et donc l'efficacité de la transmission du message nerveux [35]. En limitant la durée de vie des complexes de signalisation, la diffusion peut même jouer un rôle moteur dans la transduction du signal, comme pour la conversion en message chimique du signal lumineux par les photorécepteurs [96]. Dans le modèle proposé dans ce mémoire pour la redistribution des récepteurs du GABA, la diffusion est également essentielle. Les récepteurs sont capables d'explorer l'espace et de se lier de façon stochastique aux microtubules dans leur voisinage. L'absence de diffusion empêcherait ce processus et l'amplification qui en résulte. Le rôle précis de la diffusion sera étudié plus en détail dans les approches analytiques du modèle au chapitre suivant.

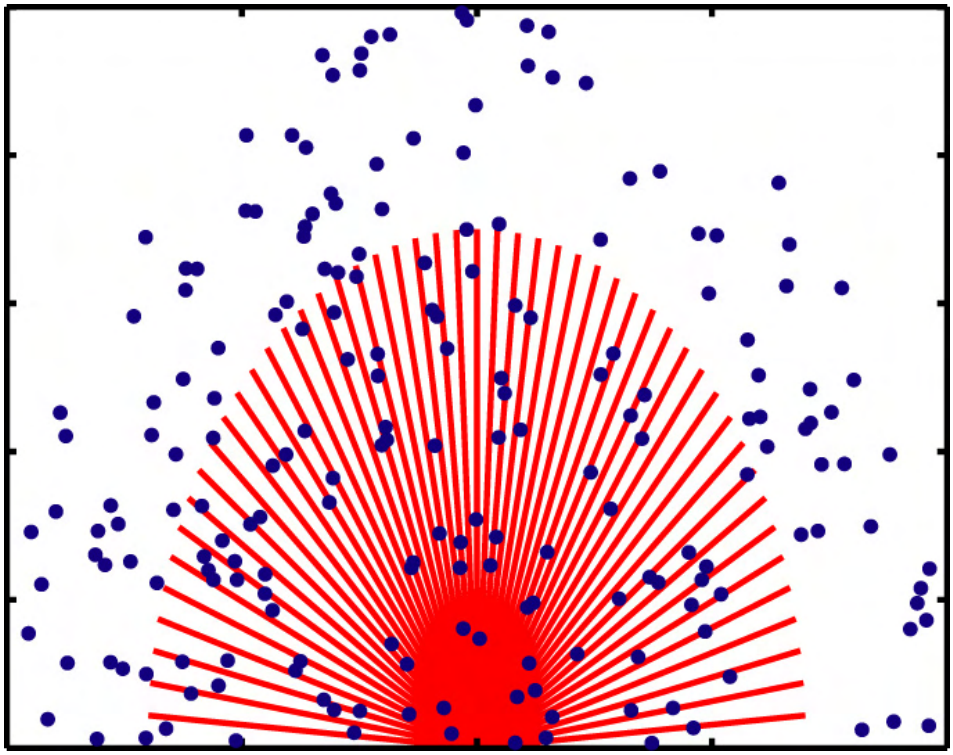
Un modèle simple (Figure 3.29) semble rendre compte, du moins qualitativement, de l'ensemble de nos données expérimentales. Il est donc intéressant de tenter de valider ce modèle en examinant plus quantitativement si les ingrédients qu'il contient sont suffisants pour expliquer la forme des résultats expérimentaux. Nous avons donc mené une série d'expériences numériques ou *"in silico"*, qui sont l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 4

Modélisation

La réalité ne pardonne pas une seule erreur à la théorie.

Léon Trotski



L'intérêt pour la modélisation mathématique en biologie est très ancien et s'est porté sur des domaines aussi variés que l'écologie des populations [102, 167], le chimiotactisme [114], ou plus récemment l'organisation du cytosquelette [63, 154], les réseaux d'interactions protéiques [54, 107] ou la signalisation cellulaire [72]. L'objectif de ces travaux est multiple. La modélisation est tout d'abord une façon de produire une explication d'un phénomène uniquement *décrit* par les résultats expérimentaux. L'analyse mathématique d'un modèle peut être à ce titre une vérification de la vraisemblance des hypothèses qui le soutiennent. Un système formalisé mathématiquement est ensuite un outil puissant pour tester l'influence éventuelle sur le système de différents paramètres physiques inaccessibles expérimentalement ; on parle alors d'expérience *in silico*. Enfin, la modélisation peut prédire certains comportements du système, ceux-ci pouvant le cas échéant être vérifiés expérimentalement. Ces trois objectifs nous ont poussés à élaborer un système formel rendant compte du modèle qualitatif que les résultats expérimentaux nous ont amenés à proposer.

Nous avons proposé un modèle, appuyé sur nos résultats expérimentaux, pour expliquer l'organisation des récepteurs du $GABA_A$ dans la membrane du cône de croissance axonal. L'évolution temporelle de la distribution des récepteurs a une forme particulière présentant un temps de latence avant la redistribution (voir Chapitre 3). Une modèle quantitatif apte à reproduire ce comportement singulier est donc requis pour confirmer qu'une mise en équation adéquate des hypothèses minimales esquissées au chapitre précédent peut être satisfaisante. De plus, l'exploration par ce modèle de paramètres inaccessibles par l'expérience, tels que le nombre de récepteurs ou de microtubules et le coefficient de diffusion, peut permettre de préciser le mécanisme de redistribution des récepteurs.

4.1 Modèle numérique de la redistribution des récepteurs

4.1.1 Modélisation

La modélisation que nous proposons décrit la dynamique des récepteurs et la dynamique des microtubules. Ces deux quantités sont couplées, ce qui constitue le cœur du modèle. Nous ne disposons cependant pas de données moléculaires précises, que ce soit sur l'interaction des microtubules avec les récepteurs ou sur l'effet exact de l'activation des récepteurs sur les microtubules. Sur le premier point, les données expérimentales suggèrent que les récepteurs interagissent avec les extrémités des microtubules en croissance, qui les poussent. Le second point est par contre une véritable boîte noire : hormis le rôle du calcium, il n'existe que peu d'informations quantitatives sur la nature de la modification de la dynamique des microtubules, dans les

données expérimentales présentées ici ou dans la littérature.

Dynamique en l'absence de couplage

Les récepteurs, en l'absence de microtubules, diffusent librement dans la membrane avec un coefficient D. Celui-ci est connu par les mesure présentées dans le deuxième chapitre : $D \sim 0.25\ \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Les microtubules ont une dynamique plus complexe, alternant stochastiquement entre des phases de polymérisation et de dépolymérisation [51]. Il est cependant possible de représenter chaque microtubule par le comportement moyen d'une assemblée de microtubule. Ainsi, l'évolution de la longueur d'un microtubule est donnée par la superposition d'une loi déterministe, régie par des taux de polymérisation k_+ et de dépolymérisation k_-, et de fluctuations régies par un coefficient de diffusion moyen D_M. En notant $\mathbf{x}$ la position d'un récepteur et L la position d'un microtubule, on obtient alors le système découplé suivant :

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{x}} = \sqrt{2D}\dot{\omega}_r \\ \dot{L} = k_+ - k_- L + \sqrt{2D_M}\dot{\omega_M} = \frac{L_{eq}-L}{\tau} + \sqrt{2D_M}\dot{\omega_M} \end{cases} \tag{4.1}$$

où $L_{eq} = \frac{k_+}{k_-}$ est la longueur d'équilibre d'un microtubule et $\tau = \frac{1}{k_-}$ son temps de relaxation vers l'équilibre. Formellement, ce système d'équation peut décrire le déplacement d'un récepteur dans le plan (cas vectoriel) ou à une dimension (cas scalaire). Dans le premier cas, les variables de la première équation sont vectorielles et dans le second scalaires ; l'équation décrivant la dynamique des microtubules est toujours scalaire, la direction d'un microtubule étant considéré comme fixe. Dans un cône de croissance, se trouvent N_r récepteurs et N_M microtubules. En considérant que tous les récepteurs d'une part et tous les microtubules d'autre part ont des propriétés identiques, la dynamique du système est donnée par :

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{x}_k} = \sqrt{2D}\dot{\omega}_{r,k} & k = 1 \dots N_r \\ \dot{L_n} = \frac{L_{eq}-L}{\tau} + \sqrt{2D_M}\dot{\omega}_{M,n} & n = 1 \dots N_M \end{cases} \tag{4.2}$$

où $\omega_r(t)$ et $\omega_M(t)$ définissent un mouvement brownien, c'est à dire sont tels que $< \omega(t+t') - \omega(t) >=0$ et $< (\omega(t+t') - \omega(t))^2 >=t'$ pour tout t'. La variable ω_r est de dimension 2 dans le cas vectoriel et de dimension 1 dans le cas scalaire, tandis que ω_M est toujours de dimension 1.

Couplage des récepteurs aux microtubules

Les récepteurs interagissent cependant avec les extrémités des microtubules ; ceci peut être modélisé en considérant qu'il existe un potentiel d'interaction attractif localisé à l'extrémité mobile de chaque microtubule, biaisant la diffusion des récepteurs. Ceci s'exprime de façon équivalente en disant que, lorsque les récepteurs sont au voisinage de l'extrémité d'un microtubule, ils

sont piégés par le potentiel et entraînés avec la vitesse du microtubule. L'ensemble des microtubules crée alors un potentiel U dans lequel les récepteurs diffusent. En utilisant la relation d'Einstein entre la friction ζ et le coefficient de diffusion D, $D\zeta = k_B T$ où k_B est la constante de Boltzmann et T la température, le mouvement des récepteurs s'exprime alors de la façon suivante :

$$\dot{\mathbf{x}_k} = -\frac{D}{k_B T}\nabla U + \sqrt{2D}\dot{\omega_{r,k}} \quad k = 1 \dots N_r \tag{4.3}$$

Cette équation a l'avantage de pouvoir rendre compte du mouvement dirigé des récepteurs, suite au déplacement des minima de potentiel, de l'alternance des phases browniennes et dirigées par les entrées et sortie des puits de potentiel et de l'invariance du coefficient de diffusion entre les phases browniennes et dirigées.

Régulation de la dynamique des microtubules par les récepteurs

La dynamique des microtubules est également affectée par les récepteurs. Une façon de modéliser ce phénomène peut être la suivante. Lorsqu'un récepteur k est à la position $\mathbf{x}_k$ où la concentration de GABA est $C(\mathbf{x}_k)$ il produit un champ d'activation $A_k(\mathbf{x}, \mathbf{x}_k)$ localisé autour de sa position. L'ensemble des récepteurs crée alors un champ résultant $A(\mathbf{x}, \{\mathbf{x}_k\}_{k=1\dots N_r})$. La croissance des microtubules est alors renforcée dans les régions de champ fort. Leur longueur d'équilibre $L_{eq} = \frac{k_+}{k_-}$ est ainsi variable au cours du temps et sa variation dépend du niveau d'activation A à l'extrémité du microtubule. Une activation forte cause une augmentation de L_{eq} et une faible activation sa décroissance. Pour un microtubule n dont l'extrémité est à la position ξ_n à l'instant t, ceci se traduit en $L_{eq}(t + dt) = L_{eq}(t) + g[A(\xi_n(t), \{\mathbf{x}_k(t)\}_{k=1\dots N_r})]dt$ où g est une fonction positive lorsque A est grand et négative sinon.

Cette loi markovienne pour L_{eq} est peu commode, car elle introduit une mémoire dans l'évolution de la longueur du microtubule, ce qui rend la formalisation délicate. Une forme plus aisée à manipuler pour L_{eq} est $L_{eq}(t) = f[A(\xi_n(t), \{\mathbf{x}_k(t)\}_{k=1\dots N_r})]$ où f est une fonction croissante. Cette approximation revient à supposer que les microtubules ont une longueur proche de leur longueur moyenne d'équilibre à tout temps. Cette loi plus simple conserve les variations souhaitables pour L_{eq}. En ce cas, la dynamique des microtubules est régie par les équations suivantes :

$$\dot{L_n} = \frac{f[A(\xi_n, \{\mathbf{x}_k\}_{k=1\dots N_r})] - L}{\tau} + \sqrt{2D_M}\dot{\omega_{M,n}} \quad n = 1 \dots N_M \tag{4.4}$$

Nous avons ainsi obtenu un système complet d'équations pour la description de l'organisation des récepteurs et des microtubules :

$$\begin{cases} \dot{\mathbf{x}_k} = -\frac{D}{k_B T}\nabla U + \sqrt{2D}\dot{\omega_{r,k}} & k = 1 \dots N_r \\ \dot{L_n} = \frac{f[A(\xi_n, \{\mathbf{x}_k\}_{k=1\dots N_r})] - L}{\tau} + \sqrt{2D_M}\dot{\omega_{M,n}} & n = 1 \dots N_M \end{cases} \tag{4.5}$$

Celui-ci est couplé, non séparable et non linéaire ; il est possible d'obtenir à partir de celui-ci l'équation de Fokker-Planck du système complet, mais sa résolution analytique ou numérique semble hors de portée. Nous avons donc réalisé des simulations numériques après avoir spécifié une géométrie simplifiée pour le système et la forme des fonctionnelles manquantes A et U.

4.1.2 Modélisation numérique

Géométrie du cône de croissance synthétique

L'organisation des microtubules est complexe dans le cône de croissance. Bien qu'ils soient tous orientés avec leur extrémité $\{+\}$ vers la partie distale de l'axone, les microtubules sont flexibles et capables de former des boucles. Dans un premier temps, il est cependant difficile de tenir compte de ces propriétés et leur considération pourrait sembler non pertinente, eu égard aux approximations drastiques effectuées par ailleurs (voir les sections précédente et suivante). Dans l'ensemble des simulations numériques présentées ici, la géométrie utilisée est ainsi la suivante. Le cône de croissance est considéré comme un demi-cercle fixe de 10 μm de rayon contenant N_r récepteurs et N_M microtubules rigides, de directions fixes, réparties uniformément dont l'origine est placée au centre du cercle, (Figure 4.1) et de longueur plus petite que le rayon du cône de croissance. Le gradient est imposé horizontalement depuis la droite.

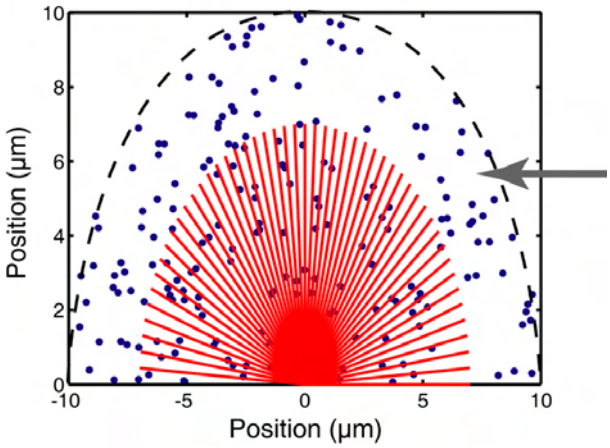


FIG. 4.1 – *Modélisation de la géométrie du cône de croissance. Les microtubules sont en rouge et les récepteurs en bleu. La flèche grise indique la provenance du gradient. Le trait pointillé noir indique les limites du cône de croissance.*

Le nombre de récepteurs est constant dans toute la simulation. Ce choix est justifié par l'absence d'endocytose significative durant la durée de l'expé-

rience et l'existence d'une barrière de diffusion entre le cône de croissance et l'axone (Chapitre 3) : il n'y a de pertes de récepteurs ni par diffusion latérale ni par internalisation. La néo-synthèse de récepteurs ne peut toutefois pas être exclue mais en l'absence de données sur ce point, nous l'avons négligée dans une première approximation.

Discrétisation du temps

La simulation numérique d'équations stochastiques telles que celles établies dans la section précédente nécessite une discrétisation du temps. A cet effet, et ce essentiellement pour des limitations de temps de calcul, la position des récepteurs et des extrémités des microtubules est calculée toutes les 10 secondes, ce qui permet à l'aide des moyens de calcul à notre disposition de mener une simulation en une dizaine de minutes.

La fonction de couplage des récepteurs

Nous disposons de peu d'éléments expérimentaux pour expliciter U ou A. Le potentiel d'interaction des récepteurs avec les microtubules est ici un potentiel *effectif* qui ne saurait être le reflet d'interactions moléculaires, mais le résultat d'un ensemble d'interactions moyennées sur une période grande par rapport au temps mis en jeu dans une interaction entre molécules.

En l'absence de données particulières, il est raisonnable de décrire une interaction locale par un potentiel parabolique coupé ou gaussien $V(\mathbf{x}) = -K \exp -\frac{(\mathbf{x}-\mathbf{x}_0)^2}{d^2}$ (Figure 4.2), qui est le choix que nous avons fait. La spécification du potentiel se réduit alors à définir sa profondeur et sa largeur caractéristique.

Sa largeur est choisie comme la taille de la région où évolue l'extrémité du microtubule à l'échelle de la résolution temporelle choisie dans les simulations. En considérant que la vitesse d'élongation d'un microtubule est de l'ordre de 0.3 μm.s^{-1}, une largeur caractéristique acceptable pour le puits de potentiel, à une échelle de quelques secondes d'intégration, est de l'ordre de 1 μm.

Les récepteurs étant capable de se défaire de leurs interactions avec les microtubules dans un temps bref ($T \sim 4$s), sa profondeur doit être choisie de l'ordre de quelques $k_B T$, où k_B est la constante de Boltzmann et T la température. Dans ce cas, où le puits est peu profond, le temps de sortie est typiquement le temps de diffusion dans la largeur du puits, qui est de l'ordre de quelques secondes pour un puits de taille micrométrique.

Dans les simulations nous avons ainsi utilisé un puits gaussien de largeur 0.5μm et de profondeur de $4k_B T$. L'ensemble des microtubules crée ainsi un potentiel $U(\mathbf{x}) = -\sum_{n=1}^{N_M} K \exp -\frac{(\mathbf{x}-\xi_n)^2}{d^2}$, où ξ_n désigne la position du microtubule n, formé d'un réseau de puits (Figure 4.2) dans lequel les récepteurs

diffusent.

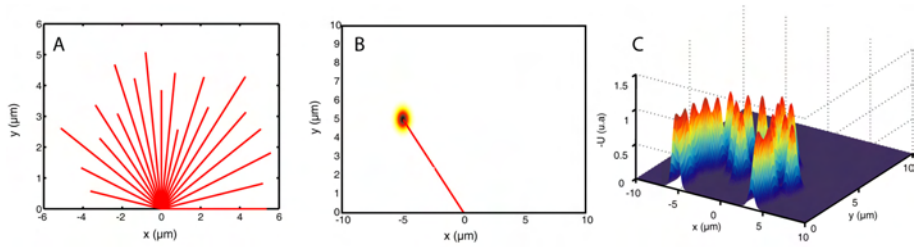


FIG. 4.2 – *Représentations des microtubules (A), du potentiel attaché à l'extrémité d'un microtubule (B)et de l'opposé $-U$ du potentiel d'interaction résultant avec les récepteurs*

La fonction de régulation de la dynamique des microtubules

L'action des récepteurs sur les microtubules peut être modélisée de façon analogue. À un instant donné, un récepteur est à une position (x_r, y_r), où la concentration de GABA est $C(x_r)$. Un champ d'activation gaussien centré en (x_r, y_r) d'amplitude proportionnelle à $C(x_r)$ et d'extension spatiale $\sigma = 2\ \mu$m est créé. Le choix de σ n'est pas complètement arbitraire : il s'agit d'une distance typique qu'un récepteur explore par diffusion au cours d'un pas de temps de la simulation.

Cette modélisation est incomplète dans la mesure où elle ne tient pas compte de la réponse réelle des récepteurs du GABA$_A$ à leur ligand, qui n'est pas linéaire, contrairement au choix effectué ici. Notre choix se justifie dans la mesure où la concentration de GABA utilisée dans nos expériences se situait dans une gamme où la réponse du récepteur est quasi-linéaire.

L'ensemble des récepteurs du cône de croissance génère ainsi une carte d'activation $A(x, y)$, somme de l'activation de tous les récepteurs individuels (Figure 4.3), qui fixe la nouvelle longueur d'équilibre du microtubule dont l'extrémité est en (x, y).

Le choix le plus simple pour la nouvelle longueur d'équilibre d'un microtubule est de choisir la fonction de couplage f comme une fonction affine : $L_{eq}(t + dt) = L_{eq}(t) + \lambda \frac{(A(x,y,t) - <A(x,y,t)>}{<A(x,y,t)>} dt$, où $< \ldots >$ désigne la moyenne sur tout le cône de croissance. Il apparaît par ailleurs dans les simulations que les résultats obtenus sont sensiblement comparables en utilisant cette loi ou la loi simplifiée pour $L_{eq}(t)$ présentée dans la section précédente où L_{eq} ne dépend que du niveau instantané de l'activation : $L_{eq}(t) = \mu \frac{(A(x,y,t) - <A(x,y,t)>}{<A(x,y,t)>}$ avec μ une constante. Le paramètre λ est *a priori* arbitraire et défini l'échelle de vitesse à laquelle un microtubule peut se déplacer, il a simplement été fixé au cours de la simulation afin que $\frac{dL_{eq}}{dt}$ reste dans une limite de quelques dixièmes de microns par seconde. En l'absence de données supplémentaires,

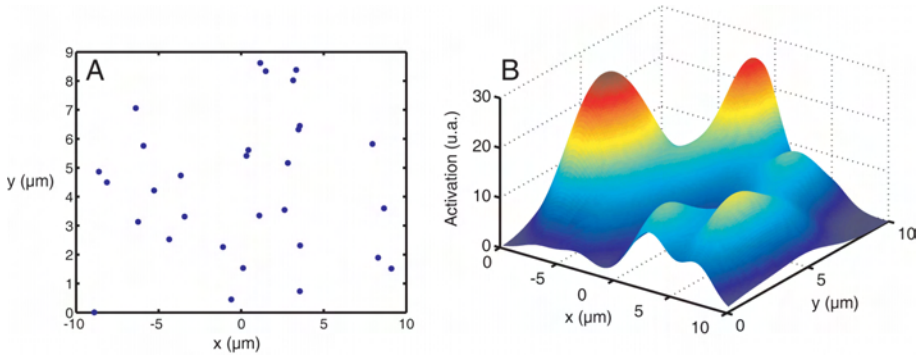


FIG. 4.3 – *Représentations des récepteurs (A) et de la carte d'activation A des microtubules correspondante (B)*

$\lambda = 0.1$ μm.s^{-1} est ainsi un choix satisfaisant et a été retenu pour les simulations.

4.1.3 Résultats

Les simulations sont menées de la façon suivante : initialement les récepteurs sont répartis de façon homogène et les microtubules ont tous une longueur initiale égale à leur longueur à l'équilibre en l'absence de toute activation L_0=7 μm. Cette valeur est typiquement l'extension de la zone occupée par les microtubules dans un cône de croissance [155]. La position des récepteurs et des microtubules est actualisée toutes les 10 secondes, la partie brownienne de leurs mouvements étant simulée comme indiqué en Annexe 4.4 . Ces positions sont ainsi générées durant en temps correspondant à 1000 s (voir Figure 4.4).

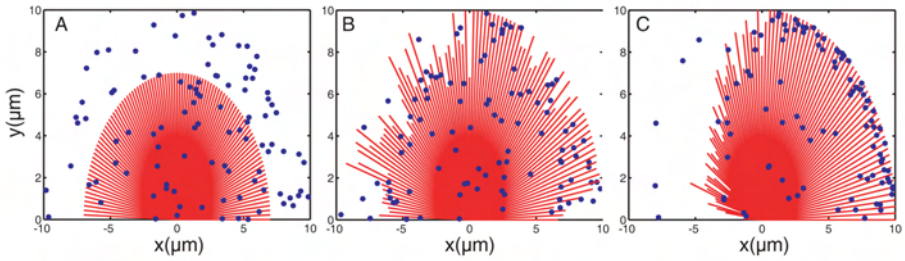


FIG. 4.4 – *Position des récepteurs et des microtubules initiale (A), après 300 secondes (B) et après 800 secondes (C)*

Redistribution moyenne des récepteurs

La position moyenne au cours du temps des récepteurs est alors calculée. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au cas de 200 récepteurs et 50 microtubules présents dans le cône de croissance soumis à un gradient de 10% de GABA, c'est-à-dire à un profil où la différence relative de concentration entre le point le plus éloigné et le plus proche de la source est de 10%. Le nombre de microtubules choisi est de l'ordre de celui mesuré expérimentalement [155]. Par ailleurs, la densité de récepteurs à l'extérieur d'une synapse est limitée à une dizaine par μm^2 [160], comme le confirme la possibilité de l'enregistrement de courant de canaux uniques dans un neurone à l'aide d'une pipette de verre d'ouverture micrométrique. L'influence de ces paramètres sera discutée plus avant.

Afin de pouvoir comparer aux données expérimentales, la simulation a été répétée 10 fois avec ces paramètres. La moyenne de la position suivant la direction x est présentée sur la Figure 4.5.

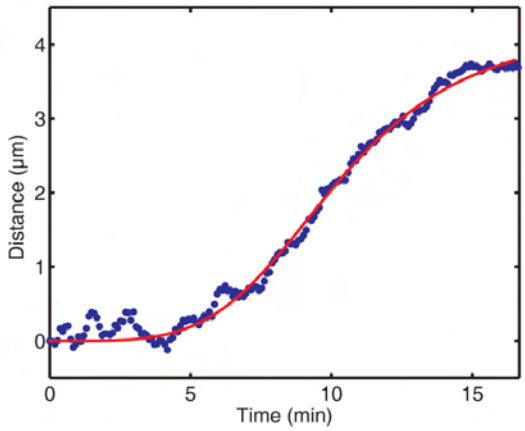


FIG. 4.5 – *Barycentre de la position des récepteurs soumis à un gradient de 10% dans la direction x (points bleus) moyenné sur dix simulations. La courbe rouge est l'ajustement heuristique du résultat par une fonction de la forme $A\frac{t^n}{t^n+T^n}$*

Comparaison aux données expérimentales

La forme de la redistribution des récepteurs dans la simulation est visuellement similaire à celle observée expérimentalement. L'ajustement par une fonction de type $A\frac{t^n}{t^n+T^n}$ est en accord avec les données expérimentales, avec un temps caractéristique T_{simul}=10.2 min et un exposant $n_{simul} = 4.3$ à comparer à T=10.3 min et $n = 4.9$ pour les données expérimentales (voir

Figure 4.6). La valeur absolue de l'amplitude n'est pas un paramètre pertinent dans notre comparaison, car elle dépend de la géométrie particulière choisie.

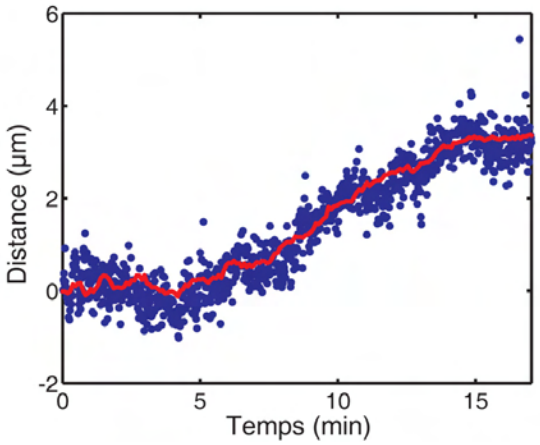


FIG. 4.6 – *Comparaison des courbes de redistribution moyenne réelle (points bleus) et obtenue par la simulation numérique (courbe rouge). L'amplitude de cette dernière a été ajustée à celle de la redistribution expérimentale.*

La simulation semble donc suffisante pour rendre compte des données expérimentales. Le modèle proposé est ainsi validé *a posteriori* par la simulation numérique : le système sommaire d'interactions entre récepteurs et microtubules, même incomplet au niveau moléculaire, est suffisant pour expliquer l'organisation des récepteurs du GABA dans la membrane du cône de croissance.

Simulation à cadence rapide

Il faut cependant remarquer que les simulations présentées ici ne sont pas rigoureusement équivalentes aux observations expérimentales. En effet, la différence de cadence d'acquisition -0.1 Hz contre 1 Hz- pourrait introduire des effets artefactuels dans la simulation. Le pas de temps retenu n'est pas neutre du point de vue de la modélisation car il impose une échelle temporelle sur laquelle la dynamique de tous les éléments du modèle est moyennée. Afin de vérifier que ceci n'était pas décisif dans notre modèle, nous avons réalisé des simulations à cadence égale à celle des acquisitions expérimentales (voir Figure 4.7).

Il apparaît que la forme de la redistribution est sensiblement équivalente à celle observée dans les simulations précédentes (T=10.3 min et n=2.9) et dans les expériences. Pour des raisons d'économie de temps de calcul, il est ainsi possible de se restreindre à des simulations numériques à une cadence

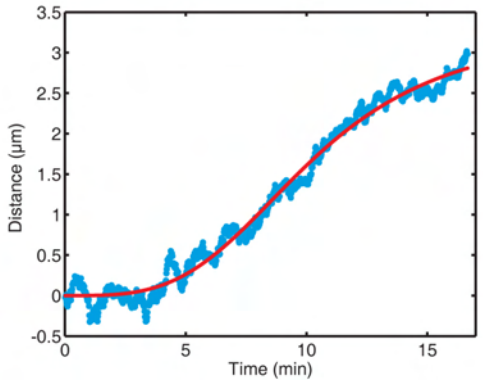


FIG. 4.7 – *Redistribution des récepteurs à la cadence utilisée expérimentalement)*

de 0.1 Hz sans perte de qualité dans la modélisation du système. Le premier objectif assigné à la modélisation au début de ce chapitre est donc atteint ; les simulations numériques confirment que le modèle élaboré est suffisant pour rendre compte des données observées.

4.2 Exploration des paramètres

L'exploration de paramètres inaccessibles expérimentalement a pour objectif de permettre d'une part d'estimer la robustesse du mécanisme par rapport à la variation de ces paramètres et d'identifier qualitativement d'autre part les différentes étapes du processus de redistribution.

4.2.1 La densité de récepteurs

La densité de récepteurs, comme signalé dans la section précédente, est un paramètre dont l'ordre de grandeur peut certes être estimé par des moyens indirects mais qui est malgré tout arbitraire dans le modèle. Des simulations avec différents nombres de récepteurs présents dans la membrane en conservant les autres paramètres inchangés (Figure 4.8) ont été réalisées.

L'amplitude de la redistribution est croissante avec le nombre de récepteurs présents dans la simulation. Il apparaît notamment que pour N_r inférieur à 20, la redistribution est impossible. L'interprétation de cette observation est simple. Le couplage réciproque entre microtubules et récepteurs équivaut de fait à une interaction attractive récepteurs-récepteurs. L'augmentation de leur nombre a ainsi pour effet naturel de renforcer la coopérativité entre récepteurs et favorise leur redistribution. Il est intéressant de remarquer que dans une large gamme de densité de récepteurs, raisonnable

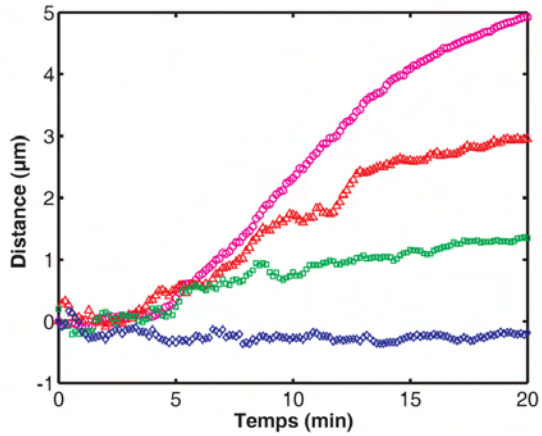


FIG. 4.8 – *Redistribution pour différents nombres N_r de récepteurs : N_r=10 (losanges bleus), N_r=50 (carrés verts), N_r=100 (triangles rouges), N_r=10000 (cercles roses)*

dans un cône de croissance réel (de l'ordre de quelques centaines de récepteurs dans la membrane), la redistribution est possible. Ceci permet de vérifier que la modélisation proposée est bien susceptible de rendre compte de phénomènes réels de réorganisation de récepteurs dans la membrane, en utilisant des paramètres physiologiquement acceptables.

4.2.2 Le coefficient de diffusion

Il paraît clair que le coefficient de diffusion est essentiel dans la régulation de l'organisation des récepteurs dans la membrane. Celui-ci est le paramètre clé de la dynamique du système. Il est également le reflet de la température dans le modèle et régit donc la répartition des récepteurs dans l'état stationnaire. L'impact du coefficient de diffusion a été évalué en simulant la redistribution de 200 récepteurs en présence de 50 microtubules dans un différentiel de concentration de 10% (voir Figure 4.9) pour différentes valeurs de D.

Dynamique de la redistribution

Le temps nécessaire à la redistribution décroît avec le coefficient de diffusion. Cette observation est attendue dans la mesure où D est lié à la viscosité du système. L'augmentation de D correspond à une diminution de la viscosité ; la dissipation dans le système est alors plus faible et la transition de la distribution des récepteurs vers une configuration favorisée énergétiquement est plus rapide. Il apparaît que le temps caractéristique de redistribution T_D

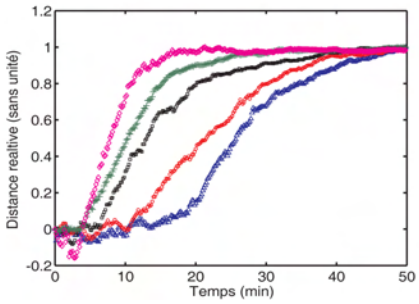


FIG. 4.9 – *Redistribution normalisée en amplitude pour différents nombres coefficients de diffusion : D=0.1 $\mu m^2.s^{-1}$ (triangles bleus), D=0.15 $\mu m^2.s^{-1}$ (cercles rouges), D=0.2 $\mu m^2.s^{-1}$ (carrés noirs), D=0.25 $\mu m^2.s^{-1}$ (croix vertes), D=0.5 $\mu m^2.s^{-1}$ (losanges roses)*

est correctement approché par une fonction linéaire de l'inverse du coefficient de diffusion : $T_D = \frac{K}{D}$ (Figure 4.10).

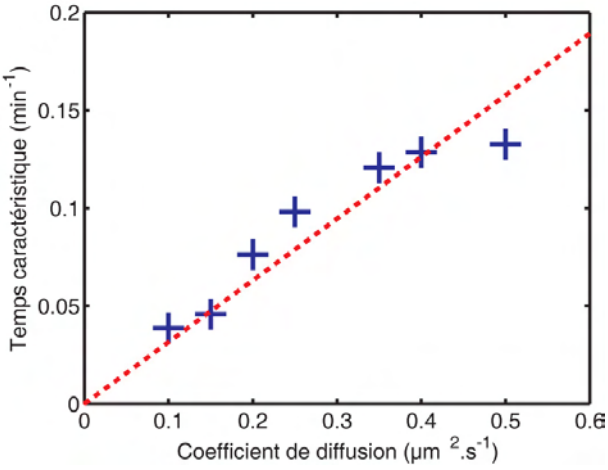


FIG. 4.10 – *Variation de l'inverse du temps caractéristique de redistribution en fonction du coefficient de diffusion (croix bleus) ajustée par une fonction linéaire)*

Cette loi pour le temps de redistribution est caractéristique du temps mis par une particule diffusant librement pour trouver une cible dans l'espace [143].

Cette information est particulièrement intéressante pour la compréhension du mécanisme de redistribution des récepteurs. Il semble qu'il existe une première étape limitante due à la diffusion des récepteurs avant leur re-

distribution. L'observation est cohérente avec un processus en deux étapes. Dans un premier temps, les récepteurs diffuseraient à la recherche de leur cible, l'extrémité d'un microtubule en croissance. Ce n'est qu'une fois cette étape accomplie que les récepteurs pourraient *en moyenne* être déplacés par les microtubules dont ils induiraient la croissance asymétrique.

Amplitude à l'équilibre

L'amplitude de la redistribution aux temps longs dépend du coefficient de diffusion. A l'équilibre, les propriétés dynamiques n'entrent plus en jeu mais le coefficient de diffusion étant proportionnel à la température, ses variations ont un effet identique à celle de cette dernière. L'amplitude de la redistribution à saturation est présentée sur la Figure 4.11.

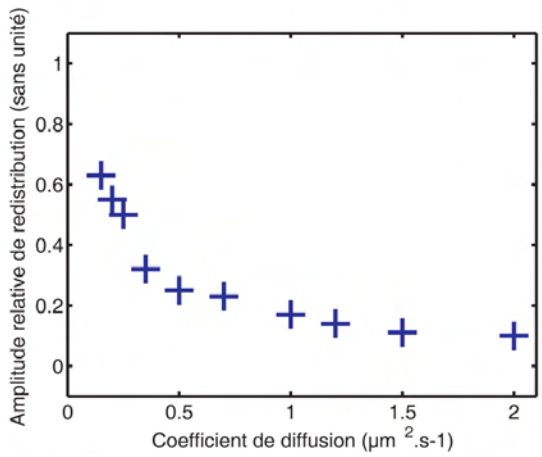


FIG. 4.11 – *Amplitude de la redistribution (croix bleues) en fonction du coefficient de diffusion*

L'asymétrie à l'équilibre est décroissante avec le coefficient de diffusion, les récepteurs étant moins sensibles au profil énergétique asymétrique aux hautes températures. Il est possible d'estimer la forme du profil énergétique d'équilibre responsable de la distribution stationnaire des récepteurs. La position d'un récepteur, normalisée par le rayon du cône de croissance, est désignée par z. Lorsque le système est soumis à un gradient venant du côté des valeurs positives, on peut supposer qu'à l'équilibre celui-ci est plongé dans un potentiel en loi de puissance $U_{eq}(z) = ak_B(1-z)^n$ où a et n sont des constantes. Ce potentiel est maximal en $z = +1$ et minimal en $z = -1$ et le système est formellement similaire à une généralisation du paramagnétisme de Langevin. Dans l'ensemble canonique à la température T, la position moyenne des récepteurs $< z >$ est donnée par :

$$< z >= \frac{\int_{-1}^{+1} z e^{-\frac{a(1-z)^n}{T}} dz}{\int_{-1}^{+1} e^{-\frac{a(1-z)^n}{T}} dz} \tag{4.6}$$

On obtient alors :

$$< z >= 1 - \frac{T^{\frac{1}{n}}}{a} \frac{\Gamma_{inc}(2^n \frac{a}{T}, \frac{2}{n})\Gamma(\frac{2}{n})}{\Gamma_{inc}(2^n \frac{a}{T}, \frac{1}{n})\Gamma(\frac{1}{n})} \tag{4.7}$$

où Γ et Γ_{inc} sont respectivement la fonction Γ et la fonction Γ incomplète définies par :

$$\begin{cases} \Gamma(p) = \int_0^\infty e^{-t} t^{p-1} dt \\ \Gamma_{inc}(x,p) = \frac{\int_0^x e^{-t} t^{p-1} dt}{\Gamma(p)} \end{cases} \tag{4.8}$$

Seul le cas $n = 1$, le paramagnétisme de Langevin, est analytique, donnant pour $< z >$ la fonction de Langevin : $< z >= \coth \frac{a}{T} - \frac{T}{a}$. L'ajustement non linéaire des données par la formule théorique de la distribution permet alors de déterminer la forme du potentiel d'équilibre U_{eq} (Figure 4.12). Nous obtenons $n = 1.3$ et $a = 0.4$ K. La profondeur du potentiel à l'équilibre est ainsi de l'ordre de $k_B T$ et semble reproduire le gradient extérieur.

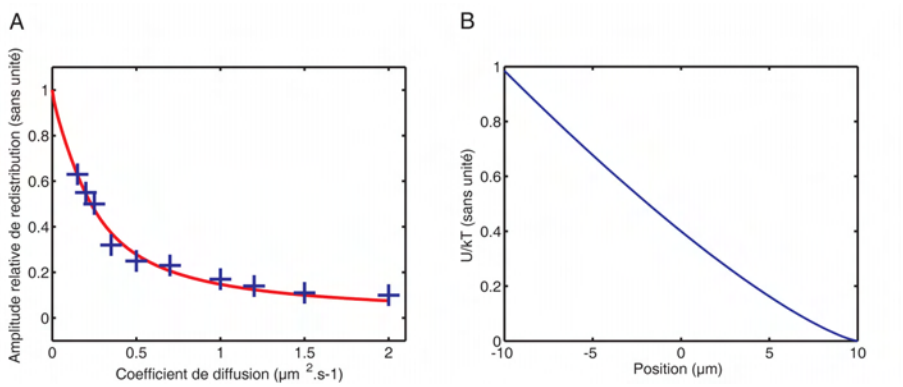


FIG. 4.12 – *Amplitude de la redistribution (croix bleues) ajustée par la formule théorique de distribution d'équilibre dans un potentiel asymétrique en loi de puissance (courbe rouge) (A) et potentiel effectif déterminé par cette méthode (B)*

Les récepteurs suivent à l'équilibre une distribution thermodynamique dans un potentiel effectif dû à la présence du gradient de GABA, ce qui a été observé dans nos expériences (Figure 3.13). Ce potentiel effectif provient de la distribution des extrémités de microtubules à l'équilibre. La vérification expérimentale de cette répartition thermodynamique apparaît essentielle et nécessitera la génération de gradients précisément calibrés.

4.2.3 La valeur du gradient

Une question centrale dans l'étude du chimiotactisme du cône de croissance est la variabilité de sa réponse en fonction du gradient extérieur. Cette question est difficilement accessible par le dispositif expérimental présenté dans ce mémoire. Aussi, l'expérience *in silico* peut fournir une prédiction utile, qui pourra être validée ou non par des expériences ultérieures où le gradient extérieur pourra être précisément maîtrisé. Des simulations ont ainsi été effectuées sous différents gradients, avec une différence de concentration entre la partie distale et la partie proximale du cône de croissance comprise entre 1% et 50% (Figure 4.13).

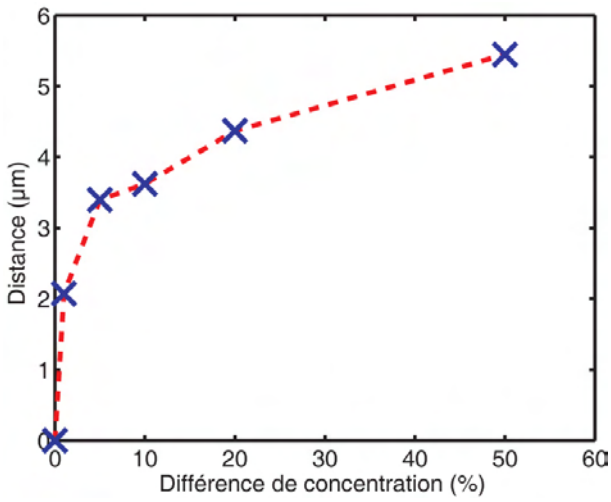


FIG. 4.13 – *Amplitude de la redistribution (croix bleues) en fonction de la différence de concentration entre les deux faces du cône de croissance*

La redistribution est significative dès la plus faible valeur de gradient utilisé (1%). Ceci met en évidence la sensibilité du modèle proposé pour la redistribution des récepteurs. L'amplitude de la redistribution est, de façon logique, augmentée par un raidissement du profil de concentration, la réponse étant cependant de plus en plus faiblement modifiée avec le renforcement du gradient (Figure 4.13).

Au contraire de son amplitude, le temps caractéristique du processus de redistribution est indépendant du gradient extérieur (Figure 4.14).

Le temps caractéristique du processus de redistribution ne dépend pas de la stimulation extérieure (Figure 4.14) mais uniquement des propriétés dynamiques intrinsèques des récepteurs (Figure 4.9) au travers de leur coefficient de diffusion. Cette observation est cohérente avec un modèle de redistribution limitée par la diffusion où le temps de latence observé serait dû à la recherche brownienne des extrémités des microtubules.

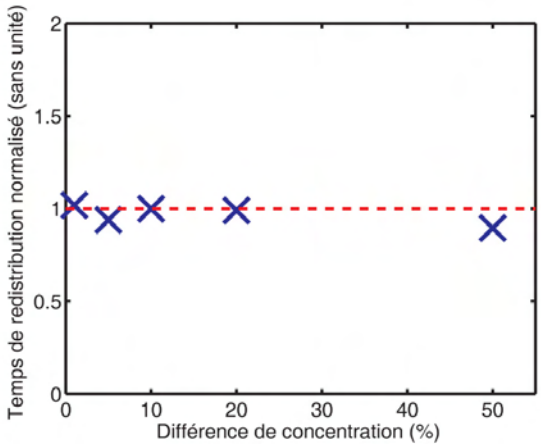


FIG. 4.14 – *Temps de redistribution normalisé (croix bleues). Le temps de redistribution pour 10% de différence de concentration est choisi comme référence et tous les temps sont rapportés à celui-ci.*

Ces résultats ouvrent la possibilité d'une validation expérimentale ultérieure du modèle : l'application d'une gamme de gradient permettrait de tester les prédictions fournies par les simulations.

4.2.4 Le nombre de microtubules

L'evolution temporelle de la distribution des récepteurs obtenue par la simulation avec un jeu de paramètres raisonnables est proche de celle observée réellement. La redistribution semble connaître une première étape limitée par la diffusion introduisant un temps de latence du à la recherche brownienne des extrémités des microtubules. La variation de leur nombre modifie la taille de la zone à rechercher et peut donc être critique pour le temps de redistribution. Nous avons donc réalisé des simulations numériques pour différents nombres de microtubules (Figure 4.15).

Il apparaît que le temps caractéristique de redistribution décroît avec l'augmentation du nombre de microtubules. Ceci n'est pas surprenant : un nombre de microtubules supérieur correspond à une surface de cible plus grande, ce qui provoque une diminution du temps de diffusion nécessaire pour l'atteindre. Les variations de ce temps de redistribution sont limitées à $\sim 10\%$ pour des nombres physiologiquement raisonnables de microtubules, compris entre 10 et 200. Notre modèle est donc robuste pour la variation du nombre de microtubules.

La cohérence des données numériques et expérimentales ne tient donc pas à un choix particulier de paramètres mais témoigne de la vraisemblance de notre modélisation de l'auto-organisation des récepteurs.

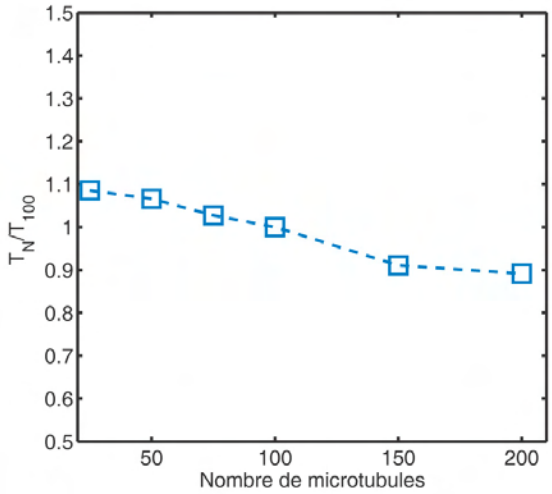


FIG. 4.15 – *Temps caractéristiques T_N de redistribution en fonction du nombre de microtubules N. Les temps sont normalisés par rapport à T_{100} le temps de redistribution pour 100 microtubules*

4.2.5 Un ajustement optimal ?

Les deux caractéristiques nécessaires à un fonctionnement correct du cône de croissance sont sa sensibilité aux signaux faibles et sa résistance au bruit. Dans le modèle exposé dans ce mémoire, cette robustesse repose sur le temps de latence inhérent au mécanisme de redistribution, la sensibilité pouvant être estimée par l'amplitude de la redistribution des récepteurs. Ces deux quantités sont régulées par la densité de récepteurs et le coefficient de diffusion. Un fonctionnement optimal du cône de croissance est ainsi obtenu pour un jeu de paramètres particulier.

Un coefficient de diffusion trop élevé accroîtrait la rapidité de la réponse du cône de croissance mais limiterait sa sensibilité en restreignant la réorganisation des récepteurs. A l'inverse, un coefficient de diffusion trop faible exalterait la redistribution mais celle-ci se produirait dans un temps trop long, éventuellement incompatible avec la croissance du système nerveux. Le système de détection du GABA dans le cône de croissance pourrait ainsi constituer un optimum tant par ses propriétés dynamiques (coefficient de diffusion des récepteurs) que par son organisation (densité de récepteurs).

4.3 Développements analytiques

La simulation numérique permet d'étudier le comportement d'un système *in silico* aussi proche que possible du système réel. Il est cependant également

intéressant de proposer une résolution analytique du modèle, quitte à recourir à des simplifications. En effet, outre l'intérêt intrinsèque de la recherche d'une telle solution, il serait pertinent de pouvoir exhiber une forme générique rendant compte des éléments essentiels du modèle et transposable à des systèmes biologiques différents.

4.3.1 Modèle analytique complet

Les équations régissant la dynamique de N_r récepteurs et de N_M microtubules établies précédemment constituent un système de $N_r + N_M$ équations stochastiques de type équation de Langevin. Il est ainsi *a priori* possible d'effectuer leur transformation canonique afin d'obtenir leur équation déterministe associée -l'équation de Fokker-Planck-, contenant toute l'information sur l'évolution du système. On note par X_i la position dans le plan du récepteur i et par L_j celle de l'extrémité du microtubule j ; ces deux variables sont donc définies dans $\mathbb{R}^2$. Définissons une variable vectorielle globale $\overline{Z(t)} = \{X_1(t), \ldots, X_{N_r}, L_1, \ldots, L_{N_M}\}$ dans une base $(\mathbb{R}^2)^{N_r+N_M}$ $(u^1, \ldots, u^{N_r+N_M})$ pour repérer la position des récepteurs et des microtubules et deux tenseurs d'évolution du système $\underline{\underline{\sigma}}$: le tenseur de diffusion et $\underline{\underline{B}}$ le tenseur de déplacement déterministe. Le premier est donné par :

$$\underline{\underline{\sigma}} = \sum_{i=1}^{N_r+N_M} \omega_i^i u^i \otimes u_i \tag{4.9}$$

où

$$\begin{cases} \omega_i = \sqrt{2D_r}\dot{\xi}_i & si \quad i \leq N_r \\ \omega_i = \sqrt{2D_M}\dot{\xi}_i & si \quad i > N_r \end{cases} \tag{4.10}$$

où les $\{\xi_i\}_{i=1\ldots N_r+N_M}$ sont des mouvements browniens. On considère un modèle où les récepteurs interagissent avec les microtubules dès lors qu'ils en sont plus proches qu'une distance ϵ. En ce cas, ils sont entraînés à la vitesse du microtubule et la longueur à l'équilibre du microtubule est modifiée en fonction de l'activation du récepteur. Le tenseur de déplacement est alors défini par :

$$\begin{cases} B_j^i = \sum_{j=N_r+1}^{N_r+N_M} \Xi(i,j) B_j^j u^i \otimes u_j & pour \quad i \leq N_r \\ B_j^i = \frac{1}{\tau} \sum_{j=1}^{N_r} \Xi(j,i) f(i) u^i \otimes u_j - u^i \otimes u_i & pour \quad i > N_r \end{cases} \tag{4.11}$$

où

$$\Xi(i,j) = V(X_i, L_{j-N_r}) \tag{4.12}$$

est une fonction de voisinage entre les récepteurs et les microtubules valant 1 lorsque le récepteur i et le microtubule j sont plus proches que ϵ et 0 sinon,

et où f est la fonction réponse de la longueur du microtubule à l'activation du récepteur.

Dans ce cas, l'équation régissant le comportement complet du système s'écrit dans le formalisme de Langevin :

$$\dot{Z} = \underline{\underline{B}}.\overline{Z} + \underline{\underline{\sigma}}.\mathbb{I} \tag{4.13}$$

où $\mathbb{I}$ est le vecteur identité. L'équation de Fokker-Planck associée pour la probabilité jointe $p(X_1, \ldots, X_{N_r}, L_1, \ldots, L_{N_M})$ de trouver les N_r récepteurs et N_M micriotubules dans $\{X_1 + dX_1, \ldots, X_{N_r} + dX_{N_r}, L_1 + dL_1, \ldots, L_{N_M} + dL_{N_M}\}$ est alors :

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \underline{\underline{\sigma}} : \underline{\underline{\sigma}}^t \Delta p - \nabla.(p\underline{\underline{B}}.\overline{Z}) \tag{4.14}$$

4.3.2 Modèle analytique simplifié

Il est ainsi possible de formuler le processus de redistribution des récepteurs en une équation analytique unique contenant toute la complexité du problème. Cependant, l'équation de Fokker-Planck obtenue ne possède pas de solution analytique ou numérique calculable. Nous proposons ici une simplification pour obtenir un système résoluble et suffisant pour rendre compte du comportement observé dans les simulations du modèle complet.

Modèle unidimensionnel

Une simplification naturelle consiste à rechercher un équivalent unidimensionnel du système complet. Le gradient extérieur introduit en effet une brisure de symétrie uniaxiale et la géométrie exacte du système est peu susceptible de jouer un rôle décisif dans la forme de la redistribution des récepteurs. D'autre part, la position moyenne des récepteurs étant la mesure la plus intéressante, il est raisonnable de considérer les mouvements d'un récepteur «moyen» reflétant ceux de l'ensemble des récepteurs. Le système complet se ramène ainsi à l'étude de la dynamique d'un récepteur repéré par sa position X et d'un microtubule unique de longueur L en une seule dimension (Figure 4.16). Le récepteur équivalent diffuse en interagissant avec un microtubule croissant ou décroissant selon son niveau d'activation. L'ensemble est plongé dans un gradient imposant une activation du récepteur différente en fonction de sa position.

Considérons un microtubule toujours orienté vers le gradient ($L>0$), de longueur maximale $2L_{max}$, avec son origine en $-L_{max}$ et un récepteur diffusant entre $-L_{max}$ et L_{max}.

De façon générale, un tel modèle unidimensionnel peut s'écrire de la façon suivante :

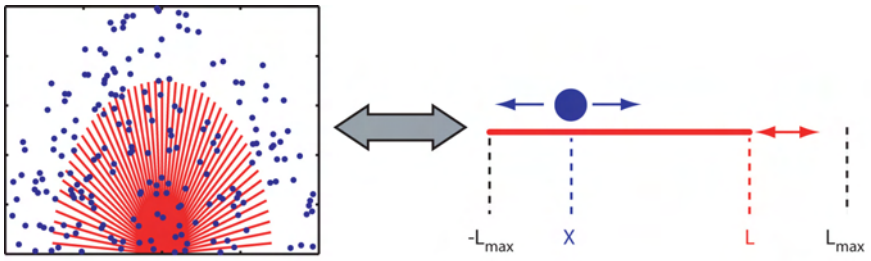


FIG. 4.16 – *Simplification du modèle complet (A) en un système à un récepteur et un microtubule (B)*

$$\begin{cases} \dot{X} = M(X, L, \dot{L}) + \sqrt{2D_{r1D}}\dot{\xi_r} \\ \dot{L} = -\frac{L - L_{eq}(L,x,t)}{\tau} + \sqrt{2D_{M1D}}\dot{\xi_M} \end{cases} \tag{4.15}$$

où M est une fonction de locomotion décrivant le couplage entre récepteurs et microtubules.

Couplage avec l'ensemble du microtubule

Considérons tout d'abord un récepteur interagissant de façon permanente avec l'ensemble du microtubule et étant entraîné par celui-ci. Dans ce cas simple, $M(X, L, \dot{L}) = \dot{L}$. Une forme envisageable pour L_{eq} est une fonction affine de X, $L_{eq} = L_0 + \alpha(X + L_{max})$, qui permet de traduire la présence du gradient créant une activation asymétrique des récepteurs. Le couplage entre récepteurs et microtubules est ainsi nul pour $X = -L_{max}$ et maximal pour $X = +L_{max}$. En ce cas le système se réduit à :

$$\begin{cases} \dot{X} = \dot{L} + \sqrt{2D_r^{1D}}\dot{\xi_r} \\ \dot{L} = -\frac{L - L_0 - \alpha(X + L_{max})}{\tau} + \sqrt{2D_M^{1D}}\dot{\xi_M} \end{cases} \tag{4.16}$$

Les équations d'évolution de X et L les valeurs moyennes de X et L sont alors :

$$\begin{cases} < \dot{X} > = < \dot{L} > \\ < \dot{L} > = -\frac{<L> - L_0 - \alpha(<X> + L_{max})}{\tau} \end{cases} \tag{4.17}$$

Ce système est résoluble. La première équation fournit $< X(t) >= X(0) + < L(t) > -L(0)$ et en reportant dans la seconde, on obtient :

$$< \dot{X} > = (\frac{\alpha - 1}{\tau}) < X > + \frac{(X(0) - L(0)) + L_0 + \alpha L_{max}}{\tau} \tag{4.18}$$

En choisissant $L(0) = L_0$, la longueur d'équilibre du microtubule en l'absence de récepteur, on obtient

$$< \dot{X} > = (\frac{\alpha - 1}{\tau}) < X > + \frac{X(0) + \alpha L_{max}}{\tau} \tag{4.19}$$

$< X >$ est alors donné par :

$$< X(t) >= \frac{X(0) + \alpha L_{max}}{1 - \alpha} - \frac{\alpha X(0) + \alpha L_{max}}{1 - \alpha} e^{\frac{\alpha - 1}{\tau} t} \tag{4.20}$$

Initialement la symétrie n'est pas brisée et la position initiale du récepteur est donc $X(0) = 0$. Par conséquent :

$$< X(t) >= \frac{\alpha L_{max}}{1 - \alpha} (1 - e^{\frac{\alpha - 1}{\tau} t}) \tag{4.21}$$

Cette équation est valable dans un milieu infini, il faut donc la modifier lorsque X est limité à L_{max} en :

$$< X(t) >= \min[L_{max}, \frac{\alpha L_{max}}{1 - \alpha} (1 - e^{\frac{\alpha - 1}{\tau} t})] \tag{4.22}$$

où $min[a, b]$ désigne le minimum de a et b. La forme de la redistribution moyenne est déterminée uniquement par la valeur de α. L'amplitude de la redistribution est ainsi $min(L_{max}, \frac{\alpha L_{max}}{1-\alpha})$ et sa forme est une exponentielle croissante coupée ($\alpha > 1$) ou une exponentielle décroissante ($\alpha < 1$) (Figure 4.17).

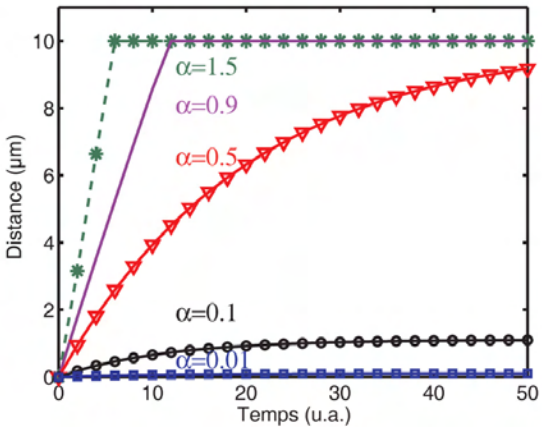


FIG. 4.17 – *Courbes de redistribution moyenne en fonction de la valeur de α (α=0.01 : carrés bleus, α=0.1 : cercles noirs, α=0.5 : triangles rouges, α =0.9 : ligne violette, α=1.5 : étoiles vertes)*

La courbe de redistribution est ainsi coupée pour les valeurs de α supérieures à $\frac{1}{2}$, pour lesquelles la position d'équilibre serait située au delà de L_{max}.

Ce modèle unidimensionnel est ainsi capable de produire une redistribution, mais ne peut rendre compte du comportement observé expérimentalement et numériquement, même à un niveau qualitatif. La redistribution suit en effet immédiatement l'application du gradient, ce qui n'est pas observé expérimentalement. Ce point semblant être essentiel dans la fonction du cône de croissance en lui conférant une certaine robustesse, le modèle développé ici n'est donc pas satisfaisant.

D'autre part, le temps de la redistribution ne dépend pas du coefficient de diffusion du récepteur : ce processus unidimensionnel n'est pas limité par la diffusion mais par la force du couplage avec les microtubules. Ceci est à nouveau contraire aux informations obtenues par simulation numérique (Figure 4.9 et 4.10).

Le comportement résultant de ce modèle est analogue à celui d'un récepteur dans un potentiel linéaire $V(x) = -\mu x$ entre deux bords réfléchissants (Annexe 4.4), Figure A. 2). Ces modèles sont adaptés pour décrire l'évolution d'un récepteur dans un potentiel fixe, ce qui néglige un point fondamental du modèle complet, où le potentiel causant le mouvement du récepteur est produit par le récepteur lui-même. Ils peuvent au mieux décrire le comportement du récepteur au voisinage de l'équilibre mais pas son évolution temporelle. Les approximations effectuées sont trop simplificatrices, notamment celle d'une interaction du récepteur avec l'ensemble du microtubule qui impose un couplage permanent avec le récepteur. Ceci confirme l'hypothèse d'une interaction localisée avec l'extrémité du microtubule.

Couplage avec l'extrémité du microtubule

Un modèle plus pertinent dérivé du précédent est celui où le couplage du récepteur et du microtubule est conditionné à la proximité du récepteur avec l'extrémité du microtubule (Figure 4.18).

Ce concept de proximité est ici équivalent aux potentiels d'interaction entre récepteurs et microtubules du système complet utilisé pour les simulations. Il convient ainsi de définir deux fonctions de voisinage *a priori* distinctes $V_{R\to MT}(X, L)$ et $V_{MT\to R}(X, L)$. Celles-ci définissent respectivement les conditions sur X et L pour que l'activation des récepteurs modifie la dynamique du microtubule et et pour que le microtubule entraîne le récepteur. Ces deux fonctions valent ainsi 1 lorsque les conditions de proximité sont satisfaites, et 0 sinon.

Dans ce cas, les équations (4.16) se modifient en :

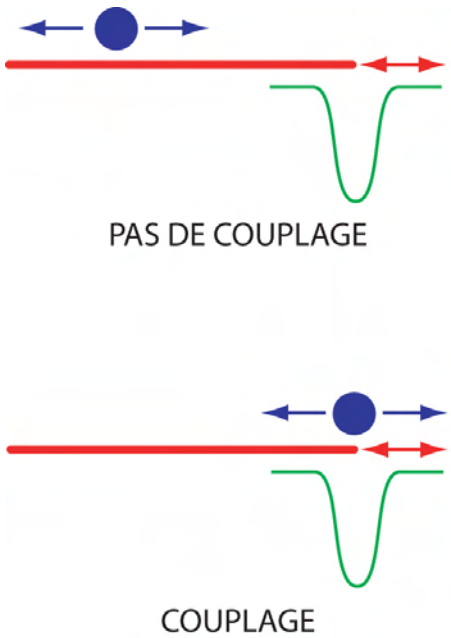


FIG. 4.18 – *Système à un récepteur et un microtubule où l'activation du microtubule par le récepteur et l'entraînement du récepteur par le microtubule ne se produisent que lorsque le récepteur est au voisinage de l'extrémité du microtubule*

$$\begin{cases} \dot{X} = \dot{L}V_{MT\to R}(X,L) + \sqrt{2D_r^{1D}}\dot{\xi_r} \\ \dot{L} = -\frac{L-L_0-(\alpha(X+L_{max})V_{R\to MT}(X,L))}{\tau} + \sqrt{2D_M^{1D}}\dot{\xi_M} \end{cases} \tag{4.23}$$

Dans un souci de simplification, les fonctions de voisinage peuvent être choisies identiques $V_{R\to MT}(X,L)$=$V_{MT\to R}(X,L) = V(X,L)$ sans notablement modifier la nature du problème. Le système unidimensionnel obtenu est alors :

$$\begin{cases} \dot{X} = \dot{L}V(X,L) + \sqrt{2D_r^{1D}}\dot{\xi_r} \\ \dot{L} = -\frac{L-L_0-(\alpha(X+L_{max})V(X,L))}{\tau} + \sqrt{2D_M^{1D}}\dot{\xi_M} \end{cases} \tag{4.24}$$

avec

$$\begin{cases} V(X,L) = 1 \quad si \quad |X-L| < d \\ V(X,L) = 0 \quad si \quad |X-L| > d \end{cases} \tag{4.25}$$

où d est la distance caractéristique du voisinage.

Analyse du modèle

Le système simplifié introduit n'est pas soluble directement à cause de la non-linéarité de la fonction de voisinage. Quelques remarques qualitatives peuvent cependant permettre de mieux analyser ce système. En l'absence de diffusion avec les conditions initiales utilisées précédemment le système aurait une solution triviale $< X(t) >= 0$ et $< L(t) >= L_0$. La diffusion est ainsi un élément moteur dans ce système, et les interactions entre le récepteur et le microtubule ne peuvent se produire que suite aux fluctuations browniennes permettant d'amener stochastiquement le récepteur au voisinage de l'extrémité du microtubule. Une fois ceci effectué, le couplage est possible et le récepteur peut activer la croissance du microtubule qui l'entraîne alors avec lui. Ce second processus est semblable au modèle déjà étudié dans cette section. Cette étape est ensuite limitée par la saturation du déplacement des récepteurs, pour raisons géométriques ou par l'établissement d'une nouvelle position d'équilibre pour le microtubule et le récepteur. Ce modèle, présentant une phase initiale de latence limitée par la diffusion est donc susceptible de rendre compte du comportement attendu. Ceci est effectivement vérifié par simulation numérique (Figure 4.19). Le coefficient de diffusion D_{r1D} du récepteur équivalent à une population de N récepteur doit être choisi tel que $D_{r1D} = D_r/N$. Dans ce cas, la redistribution du récepteur se produit après un temps de l'ordre de 10 minutes ($T = 8.5$ min), comme dans la simulation complète.

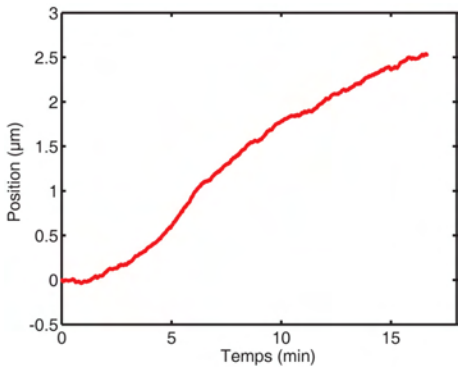


FIG. 4.19 – *Redistribution moyenne pour 10 simulations indépendantes dans le modèle unidimensionnel avec fonctions de voisinage.*

Les trois régimes différents identifiés dans la redistribution du récepteur : recherche brownienne, déplacement couplé et saturation peuvent alors être étudiés séparément. Il est ainsi possible de proposer une résolution asymptotique du système.

4.3.3 Résolution asymptotique

Régime diffusif

La première étape dans le modèle de redistribution des récepteurs est la rencontre stochastique du récepteur et de l'extrémité du microtubule. Il s'agit en fait d'un problème standard de diffusion avec échappement : la particule diffuse librement sauf en un point particulier où elle est piégée lors de son premier passage. Dans la géométrie que nous utilisons, le modèle se réduit à l'étude d'une particule libre diffusant depuis la position $X(0) = 0$ dans un domaine avec un bord réfléchissant en $X = -L_{max}$ et un bord absorbant en $X = L_0$ (Figure 4.20).

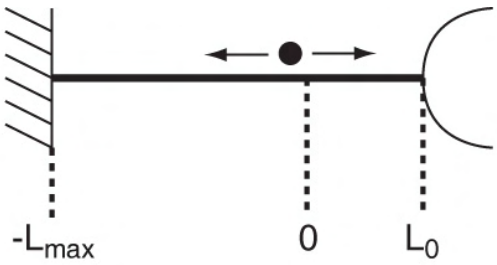


FIG. 4.20 – *Modèle de redistribution des récepteurs dans la phase d'amorçage de la redistribution*

Dans ce régime les équations régissant le mouvement des récepteurs peuvent être formulées sous la forme d'une équation de Fokker-Plank pour la densité de probabilité $P(X,t)$ du récepteur d'être à la position X à l'instant t. En l'absence de potentiel, le système se réduit à l'équation de la diffusion :

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D\frac{\partial^2 P}{\partial x^2} \tag{4.26}$$

avec les conditions aux limites suivantes :

$$\begin{cases} \frac{\partial p}{\partial x}(-L_{max}, t) = 0 \\ p(L_m ax, t) = 0 \\ p(x, 0) = \delta(x) \end{cases} \tag{4.27}$$

Le problème posé ici consiste à déterminer la fonction de Green $G(x,t,0,0)$. En effet $G(x,t,\xi,\tau)$ est la réponse à un profil de probabilité impulsionnel placé en ξ à l'instant τ. Cette fonction peut être déterminée à l'aide de la méthode des images [95]. Considérons tout d'abord une particule diffusant librement depuis sa position certaine en $x = \xi$ à $t = \tau$. Dans ce cas la fonction de Green associée est :

$$G_{libre}(x,t,\xi,\tau) = \frac{1}{2\sqrt{\pi D(t-\tau)}} e^{-\frac{(x-\xi)^2}{4D(t-\tau)}} \tag{4.28}$$

Considérons maintenant l'existence d'un bord absorbant en $x = L_0$. Dans ce cas la fonction de Green G_1 doit s'y annuler également. Ceci est possible en rajoutant un terme puits symétrique du terme source par rapport à L_0 (Figure 4.21).

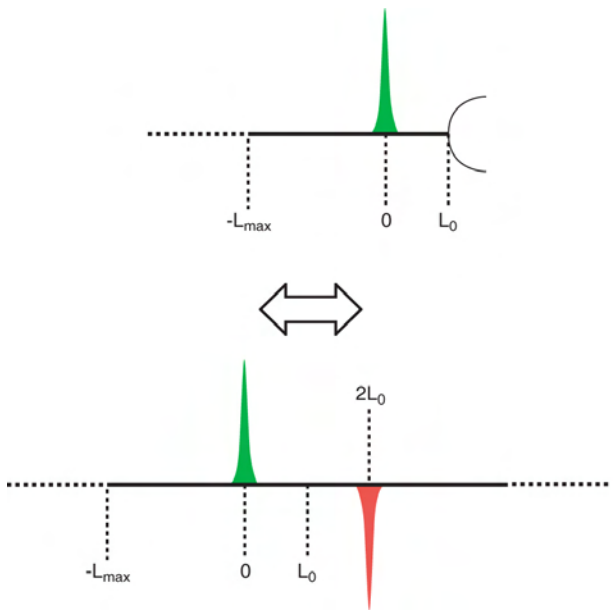


FIG. 4.21 – *Equivalence entre la diffusion d'une particule avec un bord absorbant avec une source initiale (vert) et la diffusion libre avec une source (vert) et un puits (rouge) initiaux*

La fonction de Green devient alors :

$$G_1(x,t,\xi,\tau) = \frac{1}{2\sqrt{\pi D(t-\tau)}} \left(e^{-\frac{(x-\xi)^2}{4D(t-\tau)}} - e^{-\frac{(x+\xi-2L_0)^2}{4D(t-\tau)}} \right) \tag{4.29}$$

Afin de simplifier les notations et sans perte de généralité, nous pouvons choisir L_{max} telle que $L_{max} = L_0$. La présence d'un bord réfléchissant est équivalent à la présence d'un terme source supplémentaire symétrique par rapport à $-L_0$ en $x = -2L_0 - \xi$. La présence des deux bords en L_0 et $-L_0$ génère alors une série de réflexions successives et rend le système équivalent à une diffusion libre avec une infinité de sources et de puits. (Figure 4.22). Les sources images sont situées en $x = 2(4p-1)L_0 + \xi$ et$x = 8pL_0 + \xi$ et les puits images en $x = 2(4p-3)L_0 + \xi$ et $x = 2(4p-2)L_0 + \xi$ avec $p \in \mathbb{Z}$.

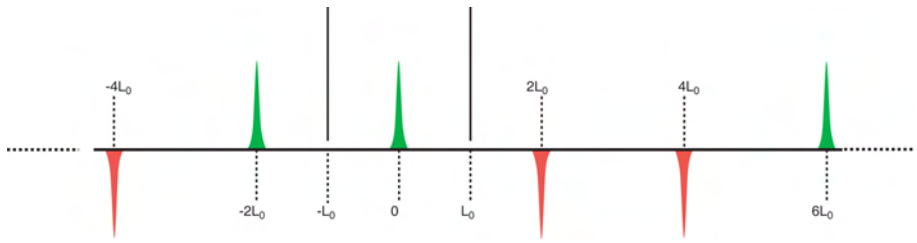


FIG. 4.22 – *Système équivalent avec un réseau infini de puits (rouge) et de sources (verts)*

Ainsi la fonction de Green de système complet est :

$$\begin{aligned} G(x,t,0,0) = \frac{1}{2\sqrt{\pi Dt}} \sum_{p=-\infty}^{\infty} e^{-\frac{(x-2(4p-1)L_0)^2}{4Dt}} + e^{-\frac{(x-8pL_0)^2}{4Dt}} \\ - \sum_{p=-\infty}^{\infty} e^{-\frac{(x-2(4p-3)L_0)^2}{4Dt}} - e^{-\frac{(x-2(4p-2)L_0)^2}{4Dt}} \end{aligned} \tag{4.30}$$

La densité de probabilité de la position de la particule est donc :

$$\begin{aligned} p(x,t) = \frac{1}{2\sqrt{\pi Dt}} \sum_{p=-\infty}^{\infty} e^{-\frac{(x-2(4p-1)L_0)^2}{4Dt}} + e^{-\frac{(x-8pL_0)^2}{4Dt}} \\ - \sum_{p=-\infty}^{\infty} e^{-\frac{(x-2(4p-3)L_0)^2}{4Dt}} - e^{-\frac{(x-2(4p-2)L_0)^2}{4Dt}} \end{aligned} \tag{4.31}$$

La probabilité de présence de la particule évolue d'une distribution symétrique vers une distribution biaisée vers le bord réfléchissant (Figure 4.23), suite à l'absorption au bord opposé.

Calculons maintenant la probabilité de survie de la particule $S(t)$, c'est-à-dire la probabilité qu'elle n'ait pas encore été absorbée à l'instant t. $S(t)$ est donnée par :

$$S(t) = \int_{-L_0}^{L_0} p(x,t)dx \tag{4.32}$$

L'expression obtenue pour la distribution de probabilité permet d'estimer $S(t)$:

$$S(t) = \frac{1}{2} \sum_{p=-\infty}^{\infty} 2\mathrm{Erf}(\frac{L_0(3-8p)}{\sqrt{4Dt}}) + \mathrm{Erf}(\frac{L_0(1+8p)}{\sqrt{4Dt}}) + \mathrm{Erf}(\frac{L_0(8p-7)}{\sqrt{4Dt}}) \tag{4.33}$$

où Erf est la fonction erreur définie par :

$$\mathrm{Erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-x^2} dx \tag{4.34}$$

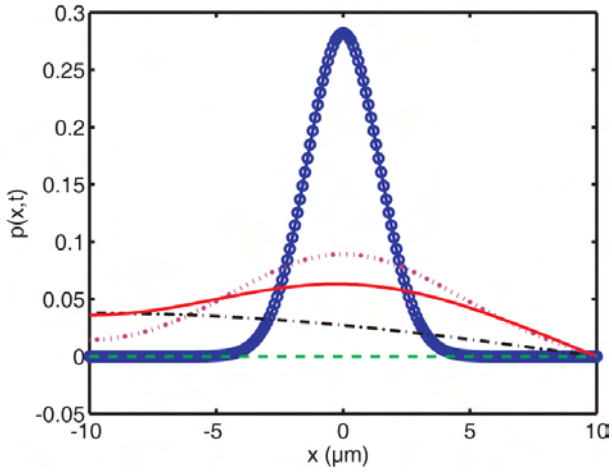


FIG. 4.23 – *Densité de probabilité pour différents temps t : en unités arbitraires $t = 0.1$ (cercles bleus), $t = 1$ (ligne pleine rouge), $t = 2$ (ligne pointillée mauve), $t = 10$ et (ligne alterné point-tiret noire) $t = 1000$ (ligne de tirets verte))*

Initialement présente avec certitude dans entre les deux bords, la particule a une probabilité décroissante avec le temps de ne pas encore avoir été absorbée en $x = L_0$ (Figure 4.24).

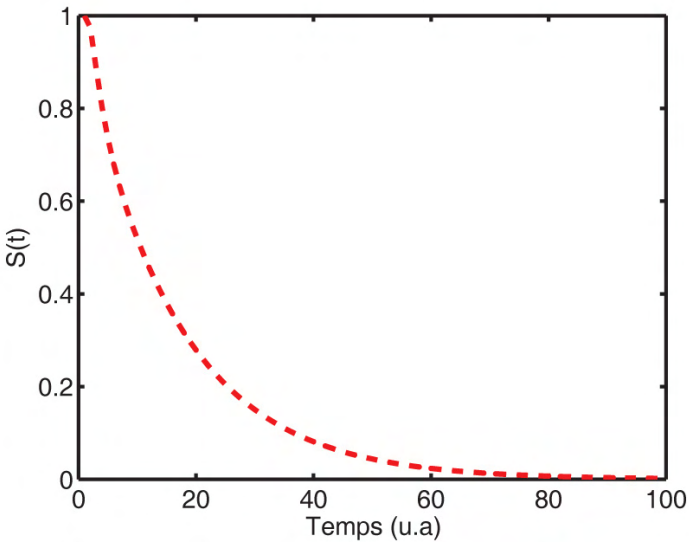


FIG. 4.24 – *Probabilité de survie de la particule entre $-L_0$ et L_0 en fonction du temps (unités arbitraires)*

La position moyenne de la particule conditionnée par son absence d'absorption au bord $< x_{NoAbs} >$, est défini par $< x >_{in} / S(t)$ où :

$$< x >_{in} = \int_{-L_0}^{L_0} x p(x,t) \tag{4.35}$$

d'où

$$< x >_{in} = \sum_{-\infty}^{\infty} F(4p-1) + F(4p) - F(4p-2) - F(4p-3) \tag{4.36}$$

avec $F(y) = \frac{1}{2\sqrt{\pi D}} \int_{-L_0}^{L_0} x e^{-\frac{(x-2L_0 y)^2}{4Dt}}$. Qualitativement, $< x >_{in}$ va décroître vers des valeurs négatives, suite à la présence du bord absorbant. La disparition des particules en $x = +L_0$ impose alors la croissance de $< x >_{in}$ qui sature en $x = 0$ après l'absorption complète (Figure (4.25).

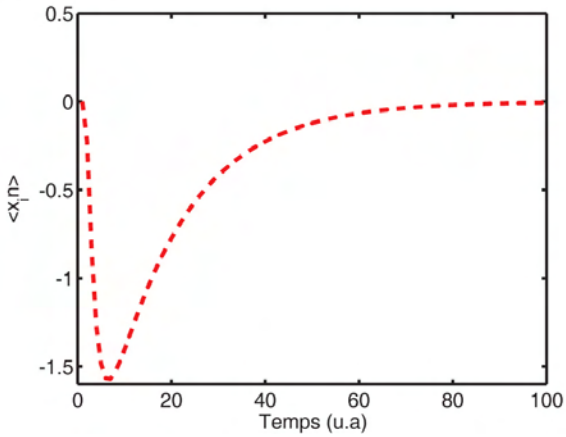


FIG. 4.25 – *Position moyenne de la particule sous condition qu'elle ne soit pas piégée par le bord absorbant*

Il est alors possible de calculer la position moyenne de la particule au cours du temps. Connaissant la moyenne conditionnée par la non-absorption au bord $< x >_{NoAbs}$ et celle conditionnée par l'absorption L_0, la position moyenne est simplement la somme de ces deux moyennes conditionnelles pondérées par la probabilité respective de chaque condition. Par conséquent :

$$< x(t) >= S(t) < x >_{NoAbs} + L_0(1 - S(t)) \tag{4.37}$$

soit :

$$< x(t) >= \{\frac{1}{2}\sum_{p=-\infty}^{\infty} 2\mathrm{Erf}(\frac{L_0(3-8p)}{\sqrt{4Dt}}) + \mathrm{Erf}(\frac{L_0(1+8p)}{\sqrt{4Dt}} + \mathrm{Erf}(\frac{L_0(8p-7)}{\sqrt{4Dt}})\}\times \{\sum_{-\infty}^{\infty} F(4p-1) + F(4p) - F(4p-2) - F(4p-3) - L_0\} + L_0 \tag{4.38}$$

Après un temps où le déplacement reste faible, le récepteur bouge en moyenne vers le bord absorbant (Figure 4.26). Le motif caractéristique observé expérimentalement et dans les simulations est ainsi conservé dans ce modèle simplifié.

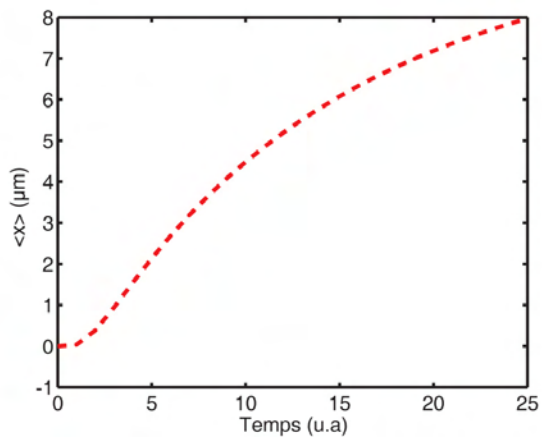


FIG. 4.26 – *Position moyenne du récepteur au cours du temps dans le régime diffusif initial*

Sortie du régime diffusif

La réponse obtenue par le modèle est donc susceptible de décrire correctement le comportement du système aux temps courts. Aux temps plus longs, l'interaction du récepteur avec le microtubule ne peut plus être négligée et on passe au régime de couplage entre la dynamique du récepteur et celle du microtubule, où ceux-ci interagissent de façon permanente. La durée de validité du régime diffusif peut être estimée en calculant le temps moyen τ_{abs} pris par la particule pour être absorbée. Pour $t \ll \tau_{abs}$ le régime diffusif est une bonne approximation et pour $t \gg \tau_{abs}$ le régime de couplage est valable. La probabilité $P(t)$ que le récepteur soit absorbé exactement à l'instant t est donnée par $P(t) = -\frac{dS}{dt}(t)$. $S(t)$ peut être approximée par une loi exponentielle $S(t) \simeq e^{-\frac{t}{T}}$ (Figure 4.27).

Le temps moyen de piégeage est alors :

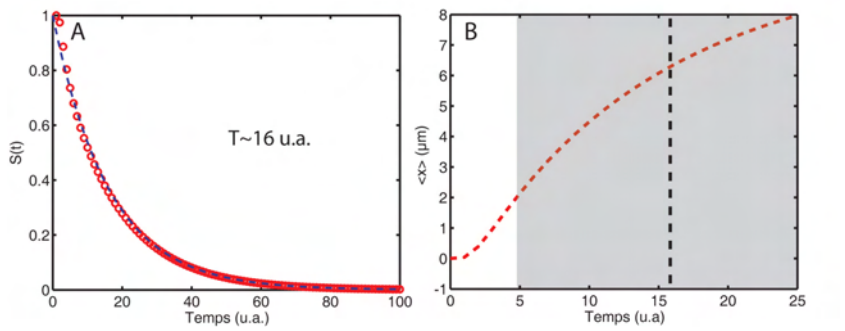


FIG. 4.27 – *Ajustement de la probabilité de survie (A) par une loi exponentielle (trait bleu pointillé) et position moyenne de la particule dans le régime diffusif (B). La ligne pointillée noire indique le temps moyen d'absorbtion et la zone non grisée est celle où le régime diffusif est pleinement valable.*

$$\tau_{abs} = \int_0^\infty tP(t)dt = T \tag{4.39}$$

Dans les unités arbitraires choisies $\tau_{abs} = T \simeq 16$ u.a. Par conséquent le régime diffusif est valable uniquement pour $t \ll T$ (Figure 4.27), donc typiquement pour $t < \frac{T}{3} \simeq 5$.

Régime de couplage

Le second régime -ou régime de couplage- est décrit par le modèle déjà exposé (voir section précédente) où le récepteur interagit avec l'ensemble du microtubule. Dans ce régime, le déplacement moyen $< \Delta x > (t)$ durant cette période est donné par :

$$< \Delta x > (t) = min[L_{max}, \frac{\alpha L_{max}}{1-\alpha}(1 - e^{\frac{\alpha-1}{\tau}t})] \tag{4.40}$$

Ce régime est valable pour les temps précédents la saturation. Initialement, la variation de la position moyenne du récepteur dans ce régime est donc linéaire .

Voisinage de l'équilibre

Lorsque la longueur d'équilibre L^*_{eq} est atteinte par le microtubule, à la nouvelle position d'équilibre, si elle existe, ou à la limite géométrique de croissance du microtubule, la dynamique du système est régie par celle de la diffusion du récepteur dans un potentiel fixe défini par la position des microtubules (Figure 4.28) dans un domaine compris entre $-L_{max}$ et $+L_{max}$.

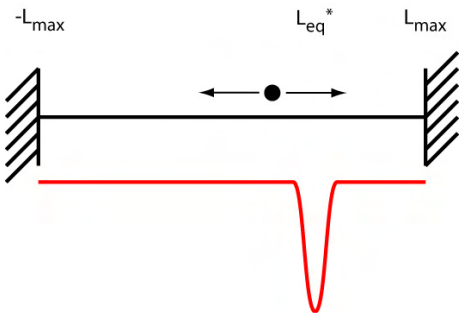


FIG. 4.28 – *Modèle de la dynamique du récepteur aux temps longs : diffusion dans un domaine fini avec un potentiel local fixe*

Le système donnant la densité de probabilité de présence du récepteur dans ce régime P_e se réduit donc à celui-ci :

$$\frac{\partial P_e}{\partial t} = D\frac{\partial^2 P_e}{\partial x^2} + \frac{\partial}{\partial x}[\frac{\partial V^*}{\partial x}(x)P_e(x,t)] \tag{4.41}$$

avec les conditions aux limites suivantes :

$$\frac{\partial P_e}{\partial x}(-L_{max},0) = \frac{\partial P_e}{\partial x}(L_{max},0) = 0 \tag{4.42}$$

Une méthode générique pour la résolution d'une telle équation de Fokker-Planck est le développement en série de Laplace de la solution. L'équation aux valeurs propres associée est :

$$D\frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + \frac{\partial}{\partial x}[\frac{\partial V^*}{\partial x}(x)P(x)] = -\lambda P(x) \tag{4.43}$$

Une fonction propre $p_{\lambda_0}(x)$ d'une valeur propre λ_0 vérifie alors $\frac{\partial p_{\lambda_0}}{\partial t}(x,t) + \lambda_0 x = 0$ d'où $p_{\lambda_0}(x,t) = p_{\lambda_0}(x)e^{-\lambda_0 t}$

Les conditions aux limites imposent que le spectre de la solution soit discret, et ainsi :

$$P_e(x,t) = \sum_k = a_k p_k(x)e^{-\lambda_k t} \tag{4.44}$$

$P_e(x,t)$ est une densité de probabilité et reste donc intégrable pour tout t. Par conséquent, $\lambda_k \geq 0$ pour tout k. Il existe donc une valeur propre minimum, en l'occurrence 0. Le vecteur propre associé est $p_0(x) = \frac{e^{-\frac{V^*(x)}{D}}}{\int_{-L_{max}}^{L_{max}} e^{-\frac{V^*(y)}{D}}dy}$ et est la densité de probabilité à l'équilibre. Le comportement aux temps longs est ainsi régi par la plus petite valeur propre non nulle et dans cette approximation, on obtient un développement de $p_3(x,t)$:

$$P_e(x,t) = a_0 p_0(x) + a_1 p_1(x) e^{-\lambda_1 t} + o(e^{-\lambda_1 t}) \tag{4.45}$$

La position moyenne du récepteur est donc :

$$< x(t) > \simeq x_{max} + K e^{-\lambda_1 (t - t_3)} \tag{4.46}$$

où x_{max} est l'amplitude de la redistribution et t_3 le temps à partir duquel le troisième régime se met en place. La saturation est donc exponentielle aux temps longs, le temps caractéristique de cette saturation dépendant de la forme du potentiel.

Reconstruction de l'évolution temporelle

Nous pouvons alors reconstruire la forme de la redistribution du récepteur au cours du temps (Figure 4.29).

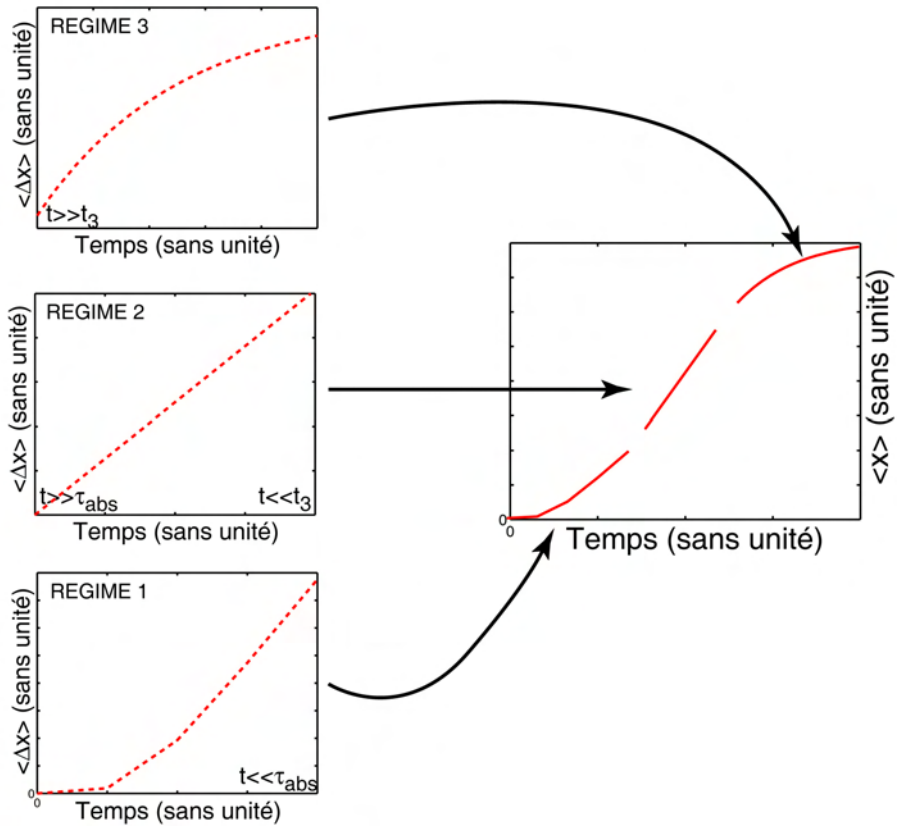


FIG. 4.29 – *Déplacement moyen du récepteur dans les trois régimes successifs et reconstruction d'un déplacement typique dans ce modèle unidimensionnelle à partir des trois résultats analytiques*

La reconstruction obtenue est compatible avec la forme attendue d'après les expériences réelles et numériques. Ce résultat confirme la possibilité d'expliquer l'auto-organisation dynamique des récepteurs à partir d'éléments minimaux. En effet, l'existence d'un système d'interaction bouclé entre le récepteur et le microtubule est suffisant pour rendre compte des effets mesurés.

4.4 Bilan des résultats et prédictions

La modélisation mésoscopique proposée ici est capable de reproduire numériquement le comportement typique des récepteurs. Ceci est vrai pour la simulation numérique à deux dimensions intégrant toutes les hypothèses sur la dynamique et les interactions des récepteurs avec le cytosquelette, mais aussi pour la résolution analytique d'une approximation unidimensionnelle. Le modèle de détection que les expériences nous avait amenés à élaborer est ainsi soutenu par l'analyse mathématique. Celle-ci permet également de mieux comprendre le mode de redistribution des récepteurs du GABA. Dans une première étape limitée par la diffusion, les récepteurs explorent l'espace pour trouver l'extrémité d'un microtubule dans une région où ils sont activés par le chimioattractant. Le couplage entre les récepteurs et les microtubules permet alors dans un second temps leur relocalisation active vers la source de substance de guidage. Ce mécanisme est atypique en comparaison des modèles proposés dans d'autres systèmes chimiotactiques. A l'aune de ces résultats, le cône de croissance semble être un système particulièrement lent et rigide, au sens où la diffusion doit être surmontée avant l'amplification du signal. Ceci peut être significatif au niveau fonctionnel, où la précision du guidage est une caractéristique vitale du chimiotactisme nerveux.

La prédiction majeure issue de notre analyse mathématique du modèle de redistribution des récepteurs est la variation de la réponse suivant le gradient de substance de guidage appliqué. L'invariabilité du temps de réponse devra ainsi être vérifiée expérimentalement. Par ailleurs, le rôle physiologique de cette propriété n'est pas établi, mais pourrait être essentiel pour la coordination de la croissance de neurones différents.

Conclusion

Les possibilités des nanocristaux

Ce travail a permis d'illustrer les possibilités de l'imagerie de fluorescence de molécules uniques sur des systèmes vivants. Les phénomènes dynamiques observés nécessitent la détection de molécules individuelles et des mesures d'ensemble ne permettraient pas de les mettre en évidence. L'observation de récepteurs membranaires à des échelles de temps variant de $\simeq$ 100 ms à plusieurs dizaines de minutes a permis d'explorer leur comportement depuis les interactions moléculaires élémentaires jusqu'à leur organisation et à sa fonction dans le cône de croissance. À ce titre, l'utilisation de nouvelles sondes fluorescentes, les nanocristaux semi-conducteurs, s'est révélée essentielle et particulièrement fructueuse. Leur propriété de photostabilité ouvre des possibilités d'investigations nouvelles, dont ce travail a présenté quelques aspects.

Le suivi de protéines membranaires uniques est une technique utilisée aujourd'hui couramment afin de révéler leurs interactions avec différents éléments membranaires ou cytoplasmiques. Les trajectoires reconstituées doivent cependant être suffisamment longues pour permettre d'en extraire cette information. Ceci a limité l'utilisation de fluorophores organiques et justifié le recours à des marqueurs non fluorescents et stables comme des billes de latex micrométriques. Ces dernières sondes ne sont toutefois pas utilisées de façon parallèle, une seule bille à la fois pouvant être suivie à la surface d'une cellule.

L'imagerie de nanocristaux permet de s'affranchir de ces difficultés en associant les avantages de l'imagerie de fluorescence et de l'utilisation de fluorophores avec la photostabilité. Un échantillon de l'ordre de quelques dizaines de protéines membranaires uniques marquées par des nanocristaux peut être suivi pour des durées arbitraires. Ceci nous a permis d'identifier les interactions responsables de l'organisation des récepteurs du GABA. De plus, la photostabilité des nanocristaux permet l'étude dynamique de l'or-

ganisation d'une population de protéines, telle que celle des récepteurs du GABA présentée dans ce mémoire. Les nanocristaux pourraient donc être un outil décisif dans l'étude de la polarité cellulaire.

Le nombre élevé de photons de fluorescence émis par les nanocristaux et leur large spectre d'absorption rendent leur imagerie aisée par des moyens optiques simples. Ces propriétés spectrales remarquables ouvrent de plus des possibilités d'imagerie multi-couleurs. Il est en effet possible d'exciter des nanocristaux émettant à des fréquences différentes simultanément. Différentes protéines, membranaires ou cytoplasmiques [38] peuvent alors être observées en même temps, en révélant leurs interactions éventuelles. La visualisation en temps réel de nombreux processus cellulaires est ainsi accessible.

Mécanisme générique de chimiotactisme

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail permet de proposer un mécanisme d'auto-organisation des récepteurs du GABA dans la membrane du cône de croissance menant à une amplification du signal de guidage. L'activation asymétrique des récepteurs membranaires du GABA par un gradient extérieur faible induit une croissance limitée des microtubules vers la source de GABA. Les interactions entre les microtubules et les récepteurs provoquent une redistribution de ces derniers reflétant l'organisation du cytosquelette. Ce système est donc auto-amplifié et permet une redistribution significative des récepteurs, responsable d'une amplification du signal extérieur, mesurée par l'asymétrie de la concentration de calcium intracellulaire.

Cette amplification repose sur la réorganisation physique du système de détection et est donc insensible à un bruit de haute fréquence dans les signaux de guidage. En effet, la boucle de rétroaction positive entre les récepteurs et les microtubules est limitée par la diffusion. Le temps précédant la redistribution est dû à une période de recherche brownienne par les récepteurs, comme les expériences numériques l'ont confirmé, et seul un signal persistent peut permettre de surmonter cette étape. Le processus mis en évidence est ainsi intéressant dans l'accomplissement du guidage axonal. Nous avons identifié un mécanisme moléculaire permettant une amplification des signaux de guidage robuste pour les bruits transitoires, dont le filtrage est permis par le temps d'intégration nécessaire dû à la diffusion. Ceci constitue un élément d'explication de la sensibilité et de la précision de la navigation de l'axone.

Ce type d'auto-organisation peut être un modèle de réponse cellulaire d'application plus vaste que la détection de gradients de signaux de guidage axonal. Le couplage entre le système de détection et le système moteur peut être un mécanisme générique de modulation de la réponse de la cellule en fonction de l'environnement. La capacité pour une cellule de réguler dans l'espace ses voies de transduction du signal est une question centrale en biologie cellulaire et le mécanisme proposé ici pourrait être une illustration

d'un mode d'organisation universel fondé sur la dynamique du cytosquelette. Il serait par exemple pertinent de s'intéresser aux mêmes types de mesure mais dans un environnement dendritique afin de déterminer si la synapse peut se former ou se renforcer à partir d'un mécanisme analogue. Nos résultats ont déjà montré que l'activation de récepteurs aux neurotransmetteurs peut déclencher une réorganisation du cytosquelette régulant en retour leur distribution membranaire dans un contexte axonal. Dans la membrane post-synaptique, ce processus pourrait permettre la localisation des récepteurs au niveau des synapses les plus actives. Ceci constituerait une forme de plasticité synaptique physico-chimique où le nombre de récepteurs à la synapse est régulé due à la réorganisation physique de la cellule par le cytosquelette.

Perspectives

Les données expérimentales et numériques mettent en évidence la nécessité d'utiliser un dispositif produisant des gradients d'amplitude précisément contrôlée. De nombreuses questions ouvertes pourraient ainsi être abordées, comme la dépendance spatiale et temporelle de la distribution des récepteurs en fonction de la forme du gradient. Afin de répondre à ces questions, un système microfluidique générant des gradients maîtrisés [46, 79, 82] peut être un outil puissant.

La visualisation simultanée du cytosquelette et des récepteurs membranaires est par ailleurs un enjeu essentiel. S'il paraît clair d'après nos données que les récepteurs se redistribuent sous l'action de la dynamique des microtubules, la façon dont leur activation modifie la dynamique du cytosquelette n'est pas entièrement connue. L'utilisation de neurones transfectés par une protéine de fusion GFP avec une protéine se liant à l'extrémité des microtubules (comme EB3-GFP) pourrait permettre de voir la réorganisation du cytosquelette au cours d'un processus de redistribution des récepteurs. L'établissement de corrélations entre la dynamique des récepteurs et celle du cytosquelette serait une validation convaincante du modèle présenté ici.

Les intermédiaires moléculaires permettant l'action des microtubules sur les récepteurs sont encore largement inconnus. La géphyrine, les GABARAPs et certaines protéines interagissant avec la coiffe des microtubules comme CLASP sont susceptibles d'être impliqués dans ce processus, mais nous n'en possédons pas encore de preuve directe. Une interférence à l'ARN d'une de ces protéines sur des neurones en culture permettrait d'identifier spécifiquement les molécules responsables du couplage entre le cytosquelette et les récepteurs. Il serait alors possible d'inhiber exclusivement la redistribution des récepteurs dans un cône de croissance et d'évaluer de façon indiscutable son rôle dans le processus de guidage.

Le guidage axonal est réalisé *in vivo* par de nombreuses substances de guidage agissant simultanément ou séquentiellement. Cette variété de signaux

semble responsable de la remarquable précision du système nerveux dans sa construction. Il serait donc intéressant de pouvoir soumettre un cône de croissance à de multiples signaux afin d'observer leur intégration pour produire la réponse finale de l'axone. L'observation au niveau moléculaire d'un cône de croissance *in vivo* est une perspective plus lointaine et nécessitera des développements instrumentaux importants au niveau de l'imagerie et du marquage fluorescent mais elle constitue un objectif essentiel pour la compréhension de la formation du système nerveux.

Conclusion générale

L'objectif général de ce travail, rappelé dans l'introduction, était de pouvoir expliquer en termes moléculaires un phénomène biologique complexe, en l'occurrence la détection de signaux de guidage par le neurone en croissance. En étudiant la dynamique des récepteurs du GABA, nous avons pu mettre en évidence les mécanismes de leur organisation spatiale dans la membrane du cône de croissance et le jeu d'interactions avec le cytosquelette qui en est responsable. Ce processus est susceptible d'être physiologiquement pertinent dans le guidage axonal et un modèle analytique mésoscopique s'avère suffisant pour rendre compte de l'ensemble de ces observations. En ce sens, nos objectifs semblent atteints dans la mesure où nous avons pu expliquer une propriété macroscopique à partir d'éléments moléculaires. Ce travail ouvre de nombreuses perspectives et soulève de multiples questions, sur le système que nous avons étudié mais aussi plus généralement sur la réponse d'une cellule ou un organisme à son environnement. L'accroissement des possibilités technologiques, notamment en imagerie biologique, laisse pressentir de nombreuses avancées dans la compréhension des phénomènes biologiques pour la construction d'une véritable physique du vivant.

Annexes

Unités, abréviations et notations

Unités

Toutes les unités employées sauf indication contraire et leurs notations sont celles du système international.

Les concentrations molaires sont notées en $M.L^{-1}$ (=$mol.L^{-1}$)

Abréviations

A488 : Fluorophore organique commercial de la famille Alexa. Le nombre indique la longueur d'onde d'absorption du fluorophore (A488 absorbe en l'occurrence à 488nm)

ADN : Acide déoxyribo-nucléique

AMP : Adénosine Mono-Phosphate

ARN : Acide ribo-nucléique

B27 : Nom d'un mélange commercial destiné à favoriser la survie de neurones en culture, dont la composition est encore confidentielle.

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor. Neurotrophine impliquée dans le guidage axonal et la survie neuronale.

^{o}C : degré Celsius

cAMP : Adénosine Mono-Phosphate cyclique

CCD : Charge Coupled Device : système de détection lumineux fonctionnant par la conversion de photons incidents en électrons

CO_2 : dioxyde de carbone

CRAC : Cytosolic Regulator of Adenylyl Cyclase.

Cy3 : fluorophore organique commercial de la famille "Cye". Le chiffre indique les propriétés spectrales du fluorophore (Cy3 émet en l'occurrence à 595nm)

DNAse : enzyme de dégradation de l'ADN.

DQM : Déplacement quadratique moyen

Fragment Fab : Fragment Antigen Binding. Partie d'un anticorps complet se liant à son antigène.

GABA : acide γ-butyrique

GABA$_A$R : récepteur du GABA de type A. Le GABA$_A$R est un récepteur ionotropique (canal chloride).

GABA$_B$R : récepteur du GABA de type B. Le GABA$_B$R est un récepteur métabotropique (il est couplé à une protéine G).

GABARAP : GABA Receptor Associated Protein. Protéine interagissant avec le récepteur du GABA$_A$

GAP43 : Growth Associated Protein

GFP : Green Fluorescent Protein.

ICV : Indice de Corrélation des Vitesses

MARCKS : Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate

NA : ouverture numérique

NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule. Protéine d'adhésion cellulaire du système nerveux.

NGF : Nerve Growth Factor. Neurotrophine impliquée dans le guidage axonal et la survie neuronale.

PBS : Phosphate Borate Solution. Le PBS est une solution de sel. de phosphore et de bore en concentrations ajustées pour avoir un pH et une osmolarité adéquate pour une cellule vivante.

PI3K : PhosphoInositide 3 Kinase

PKC : Protein Kinase C.

PTEN :Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosom TEN

TRPC : Transient Receptor Potential Channel

Notations

Les vecteurs sont notés en gras.

Le produit scalaire est noté par un point.

Les moyennes d'ensemble sont indiqués par des crochets $< \ldots >$.

Simulation numérique de trajectoires de particules uniques

L'ensemble des analyses et simulations numériques ont été réalisés à l'aide du logiciel Matlab. La méthode pour simuler une trajectoire $\{x(k), y(k)\}_{k=1\ldots N}$

brownienne à deux dimensions de N points, séparés par un pas de temps τ est la suivante. A chaque pas de temps, deux variables aléatoires δx et δy gaussiennes de moyenne nulle et de variance $2D\tau$ où D est le coefficient de diffusion sont tirées. La trajectoire est alors construite en posant $x(k+1) = x(k) + \delta x$, $y(k+1) = y(k) + \delta x$ et $x(0) = y(0) = 0$. La génération de trajectoire avec un mouvement dirigé de vitesse v est identique, en substituant $\delta x + v\tau$ à δx. Les trajectoires avec une alternance de mouvement brownien pur et de mouvement dirigé sont crées en définissant une période de mouvement dirigé. Celle-ci débute à un temps aléatoire t_0 et dure un temps T, donné par une loi exponentielle. Seules les trajectoires où $T + t_0 < N$ sont conservées. Pour $k < t_0$ et $k > t_0 + T$, la trajectoire est alors simulée suivant la méthode exposée ci-dessus pour les trajectoires browniennes, et pour $t_0 < k < t_0 + T$ suivant la méthode utilisée pour les mouvements dirigés.

Diffusion d'une particule dans un puits de potentiel

Considérons le problème suivant : une particule brownienne de coefficient de diffusion D se déplace à une dimension dans un puits de potentiel infini $V(x)$ (Figure A. 1). Les bords du puits sont en $x = 0$ et $x = L$ et, pour $0 < x < L$, $V(x) = -\mu\gamma m x$, où μ est une constante et γ est le coefficient de frottement visqueux et m la masse de la particule. La particule est initialement en $x = y$. On note $P_y(x,t)$ la probabilité pour la particule d'être à la position x à l'instant t.

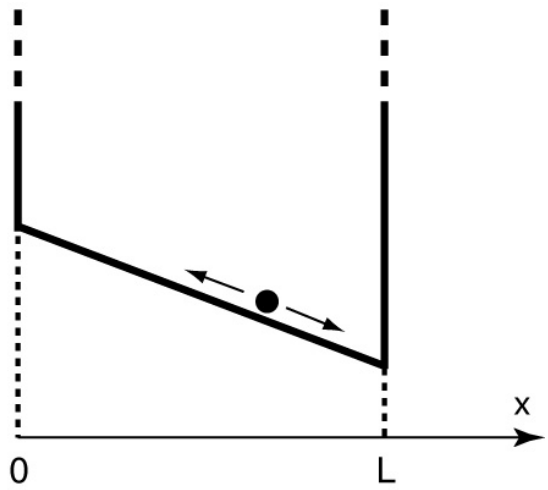


FIG. A. 1 – *Particule diffusant suivant la direction x dans un potentiel linéaire à bords infinis*

La mise en équation du problème est alors la suivante :

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D\frac{\partial^2 P}{\partial x^2} - \mu P \tag{47}$$

avec pour conditions aux limites :

$$\begin{cases} \frac{\partial P}{\partial x}(0,t) - \mu P(0,t) = \frac{\partial P}{\partial x}(L,t) - \mu P(L,t) = 0 \\ P(x,0) = \delta(y) \end{cases} \tag{48}$$

Résolvons l'équation au valeurs propres associée (ce qui revient à suivre la méthode de résolution historique introduite par Fourier [52]) :

$$D\frac{d^2 P_\lambda}{dx^2} - \mu\frac{dP_\lambda}{dx} = \lambda P_\lambda \tag{49}$$

Si $P_\lambda(x)$ en solution, alors $e^{\lambda t}P_\lambda(x)$ est solution de l'équation complète. Par conséquent, seules les valeurs de $\lambda \leq 0$ sont acceptables comme valeurs propres.

Le discriminant de l'équation aux valeurs propres est :

$$\Delta = \mu^2 + 4\lambda D \tag{50}$$

Les solutions physiquement acceptables sont telles que $\Delta \leq 0$.

Si $\lambda < 0$, les solutions de l'équation caractéristique sont :

$$r = \frac{\mu}{2D} \pm \imath\frac{\sqrt{-\lambda D - \mu^2}}{2D} \tag{51}$$

et la forme des solutions est :

$$P_\lambda(x) = e^{\frac{\mu x}{2D}}[A_\lambda \cos(\omega x) + B_\lambda \sin(\omega x)] \tag{52}$$

où $\omega^2 = \frac{-\lambda D - \mu^2}{4D^2}$

Les conditions aux limites imposent alors que :

$$\begin{bmatrix} A_\lambda(\frac{\mu}{2}\cos(\omega L) + \omega D\sin(\omega L)) + B_\lambda(\frac{\mu}{2}\sin(\omega L) - \omega D\cos(\omega L)) \\ A\frac{\mu}{2} - B_\lambda \omega D \end{bmatrix} = 0 \tag{53}$$

Il n'existe de solutions non triviales que lorsque le déterminant du système précédent est nul, soit :

$$\sin(\omega L) = 0 \tag{54}$$

d'où $\omega = \frac{k\pi}{L}$, avec $k \in \mathbb{Z}$ et

$$\lambda = -\frac{k^2\pi^2 D}{L^2} - \frac{\mu^2}{4D} \tag{55}$$

En ce cas, on a également :

$$B_\lambda = \frac{\mu}{2\omega D} A = \frac{\mu L}{2k\pi D} A \tag{56}$$

Par conséquent, le spectre des valeurs propres de l'équation complète est discret et la solution peut se développer sur la base orthogonale de ses fonctions propres.

Pour $\lambda = 0$:

$$\frac{d^2 P_0}{dx^2} = \frac{\mu}{D} \frac{dP}{dx} \tag{57}$$

d'où $\frac{dP_0}{dx} = Ke^{\frac{\mu x}{D}} + K'$ et $P_0(x) = \frac{KD}{\mu} e^{\frac{\mu x}{D}} + K'x$. Les conditions aux limites imposent alors $K' = 0$. D'autre part, $P_0(x)$ est la densité de probabilité à l'équilibre et est donc normée par $\int_0^L P_0(x)dx = 1$, d'où :

$$P_0(x) = \frac{\mu}{D} e^{\frac{\mu x}{D}} (e^{\frac{\mu L}{D}} - 1)^{-1} \tag{58}$$

et s'écrit :

$$\begin{aligned} P(x,t) &= \tfrac{\mu}{D} e^{\frac{\mu x}{D}} (e^{\frac{\mu L}{D}} - 1)^{-1} \\ &+ e^{\frac{\mu}{2D}(x - \frac{\mu t}{2})} \sum_{k=1}^{\infty} A_k [\cos(\tfrac{k\pi x}{L}) + \tfrac{\mu L}{2k\pi D} \sin(\tfrac{k\pi x}{L})] e^{-\frac{k^2\pi^2 Dt}{L^2}} \end{aligned} \tag{59}$$

Les conditions initiales imposent que $P(x,0) = \delta(y)$ soit :

$$\tfrac{\mu}{D} e^{\frac{\mu x}{D}} (e^{\frac{\mu L}{D}} - 1)^{-1} + e^{\frac{\mu}{2D}x} \sum_{k=1}^{\infty} A_k [\cos(\tfrac{k\pi x}{L}) + \tfrac{\mu L}{2k\pi D} \sin(\tfrac{k\pi x}{L})] = \delta(y) \tag{60}$$

d'où

$$\begin{aligned} & \int_0^L P(x,0) e^{-\frac{\mu x}{2D}} [\cos(\tfrac{k\pi x}{L}) + \tfrac{\mu L}{2k\pi D} \sin(\tfrac{k\pi x}{L})] dx \\ = & \int_0^L \delta(y)) e^{-\frac{\mu x}{2D}} [\cos(\tfrac{k\pi x}{L}) + \tfrac{\mu L}{2k\pi D} \sin(\tfrac{k\pi x}{L})] dx \\ = & e^{-\frac{\mu y}{2D}} [\cos(\tfrac{k\pi y}{L}) + \tfrac{\mu L}{2k\pi D} \sin(\tfrac{k\pi y}{L})] \end{aligned} \tag{61}$$

Déterminons alors les coefficients A_k. Nous avons, les termes croisés produit de deux fonctions de pulsations différentes étant nuls :

$$\begin{aligned} & \int_0^L P(x,0) e^{-\frac{\mu x}{2D}} [\cos(\tfrac{k\pi x}{L}) + \tfrac{\mu L}{2k\pi D} \sin(\tfrac{k\pi x}{L})] dx \\ = & \int_0^L A_k [\cos(\tfrac{k\pi x}{L} + \tfrac{\mu L}{2k\pi D} \sin(\tfrac{k\pi x}{L})]^2 dx \\ + & \int_0^L \tfrac{\mu}{D} e^{\frac{\mu x}{2D}} (e^{\frac{\mu L}{D}} - 1)^{-1} [\cos(\tfrac{k\pi x}{L} + \tfrac{\mu L}{2k\pi D} \sin(\tfrac{k\pi x}{L})] \end{aligned} \tag{62}$$

De plus :

$$\begin{aligned} & \int_0^L e^{\frac{\mu x}{2D}}[\cos(\tfrac{k\pi x}{L}) + \tfrac{\mu L}{2k\pi D}\sin(\tfrac{k\pi x}{L})] \\ = & \int_0^{k\pi} \tfrac{L}{k\pi}[\cos(z) + \tfrac{\mu L}{2k\pi D}\sin(z)]e^{\frac{\mu L z}{2k\pi}}dz] \\ = & \int_0^{k\pi} \tfrac{L}{k\pi}\tfrac{d}{dz}(\sin(z)e^{\frac{\mu L z}{2k\pi}})dz \\ = & 0 \end{aligned} \tag{63}$$

et

$$\int_0^L A_k[\cos(\frac{k\pi x}{L} + \frac{\mu L}{2k\pi D}\sin(\frac{k\pi x}{L})]^2 dx = \frac{A_k L}{2}(1 + (\frac{\mu L}{2k\pi D})^2) \tag{64}$$

Par conséquent :

$$A_k = \frac{2}{L}\frac{\cos(\frac{k\pi y}{L}) + \frac{\mu L}{2k\pi D}\sin(\frac{k\pi y}{L})}{1 + (\frac{\mu L}{2k\pi D})^2}e^{-\frac{\mu y}{2D}} \tag{65}$$

et en posant $\phi_k(z) = \cos(\frac{k\pi z}{L}) + \frac{\mu L}{2k\pi D}\sin(\frac{k\pi z}{L})$:

$$P(x,t) = \frac{\mu}{D}e^{\frac{\mu x}{D}}(e^{\frac{\mu L}{D}} - 1)^{-1} + \frac{2}{L}e^{\frac{\mu}{2D}(x-y-\frac{\mu t}{2})}\sum_{k=1}^{\infty}\frac{\phi_k(y)\phi_k(x)}{1 + (\frac{\mu L}{2k\pi D})^2}e^{-\frac{k^2\pi^2 Dt}{L^2}} \tag{66}$$

Zone de confinement

Le cas particulier d'une zone de confinement est celui d'un puits de potentiel carré avec $\mu = 0$. En ce cas la densité de probabilité $P_c(x,t)$ est donc donnée par :

$$P_c(x,t) = \frac{1}{L} + \frac{2}{L}\sum_{k=1}^{\infty}\cos(\frac{k\pi x}{L})\cos(\frac{k\pi y}{L})e^{-\frac{k^2\pi^2 Dt}{L^2}} \tag{67}$$

Le déplacement quadratique moyen pour une particule initialement en y est alors donné par :

$$\Delta_y x^2(t) = \int_0^L (x-y)^2(\frac{1}{L} + \frac{2}{L}\sum_{k=1}^{\infty}\cos(\frac{k\pi x}{L})\cos(\frac{k\pi y}{L})e^{-\frac{k^2\pi^2 Dt}{L^2}})dx \tag{68}$$

Si au temps initial, la densité de probabilité de présence de la particule est $P(y)$, le déplacement quadratique devient alors à l'instant t :

$$\Delta x^2 = \int_0^L \int_0^L (x-y)^2 P(y)(\frac{1}{L} + \frac{2}{L}\sum_{k=1}^{\infty} \cos(\frac{k\pi x}{L})\cos(\frac{k\pi y}{L}) e^{-\frac{k^2\pi^2 Dt}{L^2}})dxdy \quad (69)$$

soit pour une densité de probabilité initiale uniforme $P(y) = 1/L$:

$$\Delta x^2 = \int_0^L \int_0^L (x-y)^2 (\frac{1}{L^2} + \frac{2}{L^2}\sum_{k=1}^{\infty} \cos(\frac{k\pi x}{L})\cos(\frac{k\pi y}{L}) e^{-\frac{k^2\pi^2 Dt}{L^2}})dxdy \quad (70)$$

d'où :

$$\Delta x^2 = \frac{L^2}{6} - \frac{16L^2}{\pi^4}\sum_{p=1}^{\infty} \frac{1}{(2p+1)^4} e^{-\frac{(2p+1)^2\pi^2 Dt}{L^2}} \quad (71)$$

qui est la formule contenue dans le texte du mémoire.

Potentiel linéaire

Considérons maintenant l'évolution d'une particule dont la densité de probabilité initiale est uniforme mais pour μ non nul. En ce cas, sa densité de probabilité $\mathcal{P}(x,t)$ est :

$$\mathcal{P}(x,t) = \frac{\mu e^{\frac{\mu x}{D}}}{D(e^{\frac{\mu L}{D}} - 1)} + \frac{2}{L^2} e^{\frac{\mu}{2D}(x - \frac{\mu t}{2})} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\phi_k(x)}{1 + (\frac{\mu L}{2k\pi D})^2} e^{-\frac{k^2\pi^2 Dt}{L^2}} \int_0^L \phi_k(y) e^{-\frac{\mu}{2D}y} dy \quad (72)$$

d'où

$$\mathcal{P}(x,t) = \frac{\mu e^{\frac{\mu x}{D}}}{D(e^{\frac{\mu L}{D}} - 1)} + \frac{2}{L} e^{\frac{\mu}{2D}(x - \frac{\mu t}{2})} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\mu L}{k\pi D} \frac{\phi_k(x)(1 - (-1)^k e^{-\frac{\mu L}{2D}})}{k\pi(1 + (\frac{\mu L}{2k\pi D})^2)^2} e^{-\frac{k^2\pi^2 Dt}{L^2}} \quad (73)$$

et par conséquent la position moyenne de la particule $< x(t) >$ est donnée par :

$$< x(t) >= \frac{D}{\mu} \frac{e^{\frac{\mu L}{D}}(\frac{\mu L}{D} - 1) + 1}{e^{\frac{\mu L}{D}} - 1} + 4\sum_{k=1}^{\infty} \frac{\mu L^2}{k\pi D} \frac{(-1)^k \cosh(\frac{\mu L}{2D}) - 1}{(k\pi(1 + (\frac{\mu L}{2k\pi D})^2))^3} e^{-(\frac{\mu^2}{4D} + \frac{k^2\pi^2 D}{L^2})t} \quad (74)$$

Le résultat obtenu est une somme d'exponentielles de poids décroissant avec k, la forme typique obtenu est naturellement celle d'une saturation exponentielle vers la nouvelle position d'équilibre (Figure A. 2).

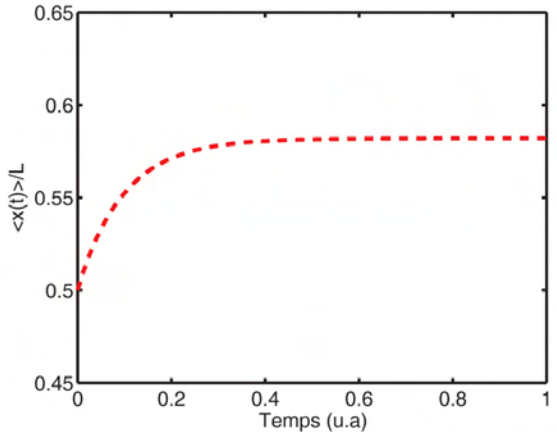


FIG. A. 2 – *Position moyenne au cours du temps pour une particule dans un puits de potentiel de pente constante tracée en conservant les 100 premiers termes de la série. Les unités de temps sont arbitraires*

Bibliographie

[1] A Akhmanova, CC Hoogenraad, K Drabek, T Stepanova, B Dortland, T Verkerk, W Vermeulen, BM Burgering, CI De Zeeuw, F Grosveld, and N Galjart. CLASPs are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell*, 104 :923–935, 2001.

[2] D.W. Allison, A.S. Chervin, V.I. Gelfand, and A.M. Craig. Postsynaptic scaffolds of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal neurons : maintenance of core components independent of actin filaments and microtubules. *Journal of Neuroscience*, 20 :4545–4554, 2000.

[3] A.M. Alteraifi and D.V. Zhelev. Transient increase of free cytosolic calcium during neutrophil motility responses. *Journal of Cell Science*, 110 :1967–1977, 1997.

[4] W.P. Ambrose, P.M. Goodwin, J.H. Jett JH, A. Van Orden, J.H. Werner, and R.A. Keller. Single molecule fluorescence spectroscopy at ambient temperature. *Chemical Reviews*, 99 :2929–2956, 1999.

[5] H. Baier and F. Bonhoeffer. Axon guidance by gradients of a target-derived component. *Science*, 255 :472–475, 1992.

[6] Y. Ben-Ari, R. Khazipov, X. Leinekugel, O. Caillard, and J.L. Gaiarsa. $GABA_A$, NMDA and AMPA receptors : a developmentally regulated "ménage à trois". *Trends in Neurosciences*, 20 :523–529, 1997.

[7] H.C. Berg. The rotary motor of bacterial flagella. *Annual Review of Biochemistry*, 72 :19–54, 2003.

[8] H.C. Berg and C.M. Purcell. Physics of chemoreception. *Biophysical Journal*, 20 :193–219, 1979.

[9] W. Bialek and S. Setayeshgar. Physical limits to biochemical signaling. *Proceeding of the National Academy of Science*, 102 :10040–10045, 2005.

[10] M. Bienz. The subcellular destinations of APC proteins. *Nature Reviews of Molecular and Cell Biology*, 3 :328–338, 2002.

[11] S.M. Block, L.S. Goldstein, and B.J. Schnapp. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature*, 348 :348–352, 1990.

[12] S.M. Block, J.E Segall, and H.C. Berg. Impulse responses in bacterial chemotaxis. *Cell*, 31 :215–226, 1982.

[13] U. Bockelmann. Single-molecule manipulation of nucleic acids. *Current Opinion in Structural Biology*, 14 :368–373, 2004.

[14] S. Bonneau. Méthode de suivi de particules individuelles scintillantes. Rapport de Diplôme d'Études Approfondies, Université Paris 9, 2003.

[15] S. Bonneau, L. Cohen, and M. Dahan. Single quantum dot tracking based on perceptual grouping using minimal paths in a spatio temporal volume. *IEEE Transactions in Image Processing*, 14 :1384–1395, 2004.

[16] A.J. Borgdorff and D. Choquet. Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature*, 417 :649–653, 2002.

[17] C. Bouzigues and M. Dahan. Transient interactions of $GABA_A$Rs with microtubules in growth cone revealed by single quantum dot tracking. 2006.

[18] C. Bouzigues, S. Lévi, A. Triller, and M. Dahan. *Methods in Molecular Biology*, chapter Single quantum dot tracking of membrane proteins. Humana Press, 2006.

[19] D. Bray. Siganling complexes : Biophysical constraints on intracellular communication. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27 :59–75, 1998.

[20] D. Bray, M.D. Levin, and C.J. Morton-Firth. Receptor clustering as a cellularmechanism to control sensitivity. *Nature*, 393 :85–88, 1998.

[21] X. Brokmann. *Propriétés de fluorescence de nanocristaux de CdSe individuels*. Thèse de Docotorat, Université Paris 6, 2004.

[22] X. Brokmann, J.P. Hermier, G. Messin, P. Desbiolles, J.P. Bouchaud, and M. Dahan. Statistical aging and non ergodicity in the fluorescence of single nanocrystals. *Physical Review Letter*, 90 :120601–120604, 2003.

[23] I. Brunet, C. Weinl, M. Piper, A. Trembleau, M. Volovitch, W. Harris, A. Prochiantz, and C. Holt. The transcription factor engrailed-2 guides retinal axons. *Nature*, 438 :94–98, 2005.

[24] K.B. Buck and J.Q. Zheng. Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *Journal of Neuroscience*, 22 :9358–9367, 2002.

[25] S. Ramòn y Cajal. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, chapter 21, page 589. Maloine, 1909.

[26] M. Caudron, G. Bunt, P. Bastiaens, and E. Karsenti. Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science*, 309 :1334–1335, 2005.

[27] J.F. Challacombe, D.M. Snow, and P.C. Letourneau. Dynamic microtubule ends are required for growth cone turning to avoid an inhibitory guidance cue. *Journal of Neuroscience*, 17 :3085–3095, 1997.

[28] W.C. Chan and S. Nie. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281 :2016–2018, 1998.

[29] S. Charpak, J. Mertz, E. Beaurepaire, L. Moreaux, and K. Delaney. Odor-evoked calcium signals in dendrites of rat mitral cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, 98 :1230–1234, 2001.

[30] C. Charrier, M.V. Ehrensperger, M. Dahan, A. Triller, and S. Levi. Cyoskeleton dependance of the GlyR diffusion in post-synaptic membranes. 2006.

[31] J. Chavas, M.E. Forero, , T. Colin, I. Llano, and A. Marty. Osmotic tension as a possible link between GABAA receptor activation and intracellular calcium elevation. *Neuron*, 44 :701–713, 2004.

[32] L. Chen, H. Wang, S. Vicini, and R.W. Olsen. The γ-aminobutyric acid type a ($GABA_A$) receptor-associated protein (GABARAP) promotes $GABA_A$ receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proceedings of the National Academy of Science*, 97 :11557–11562, 2000.

[33] M.Y. Chen, R.H. Insall, and P.N Devreotes. Signaling through chemoattractant receptors in Dictyostelium. *Trends in genetics*, 12 :52–57, 1996.

[34] A. Chisholm and M. Tessier-Lavigne. Conservation and divergence of axon guidance mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 9 :603–615, 1999.

[35] D. Choquet and A. Triller. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nature Review of Neuroscience*, 4 :251–265, 2003.

[36] International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 21 :915–916, 2004.

[37] V. Corset, K.T. Nguyen-Ba-Charvet, C. Forcet, E. Moyses, A. Chedotal, and P. Mehlen. Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b. *Nature*, 407 :747–750, 2000.

[38] S. Courty, C. Luccardini, G. Cappello, Y. Bellaiche, and M. Dahan. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum dot imaging. *Nano Letters*, in press, 2006.

[39] A.M. Craig, G. Banker, W. Chang, M.E. McGrath, and A.S. Serpinskaya. Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 16 :3166–3177.

[40] A.M. Craig, C.D. Blackstone, R.L. Huganir, and G. Banker. Selective clustering of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors opposite terminals releasing the corresponding neurotransmitters. *Proceedings of the National Academy of Science*, 91 :12373–12377, 1994.

[41] T. Cutforth and C.J. Harrison. Ephs and ephrins close ranks. *Trends in Neuroscience*, 25 :332–334, 2002.

[42] M. Dahan, S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, and A. Triller. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single quantum dot tracking. *Science*, 302 :442–445, 2003.

[43] P.G. de Gennes. Chemotaxis : the role of internal delays. *European Biophysical Journal*, 33 :691–693, 2004.

[44] E.W. Dent and F.B. Gertler. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*, 40 :209–227, 2003.

[45] N. Destainville and L. Salomé. Quantification and correction of systematic errors due to detector time-averaging in single molceule tracking experiments. *Biophysical Journal*, 90 :L17–L19, 2006.

[46] J. Diao, L. Young, S. Kim, E.A. Fogarty, S.M. Heilman, P. Zhou, M.L. Shuler, M. Wu, and M.P. DeLisa. A three-channel microfluidic device for generating static linear gradients and its application to the quantitative analysis of bacterial chemotaxis. *Lab on a Chip*, 6 :381–388, 2006.

[47] B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou, and A. Libchaber. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, (298) :1759–1762.

[48] M. Edidin, M.C. Zuniga, and M.P. Sheetz. Truncation mutants define and locate cytoplasmic barriers to lateral mobility of membrane glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Science*, 91 :1378–1382, 1994.

[49] Al.L. Efros and M. Rosen. Random telegraph signal in the photoluminescence intensity of a single quantum dot. *Physical Review Letter*, 78 :1111–1113, 1997.

[50] S.C. Ferguson and S. McFarlane. GABA and development of the xenopus optic projection. *Journal of Neurobiology*, 15 :272–284, 2002.

[51] H. Flyvbjerg, T.E. Holy, and S. Leibler. Stochastic dynamics of microtubules : A model for caps and catastrophes. *Physical Review Letter*, 73 :2372–2375, 1994.

[52] J. Fourier. *Théorie analytique de la chaleur.* Chez Firmin Didot, Père et fils, 1822.

[53] J. Franca-Koh and P.N. Devreotes. Moving forward : mechanisms of chemoattractant gradient sensing. *Physiology*, 19 :300–308, 2004.

[54] P. François and V. Hakim. Design of genetic networks with specified functions by evolution in silico. *Proceedings of the National Academy of Science*, 101 :580–585, 2003.

[55] J.M. Fritschy, D. Benke, S. Mertens, W.H. Oertel, T. Bachi, and H. Mohler. Five subtypes of type A GABA receptors identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *Proceedings of National Academy of Science*, 89 :6726–6730, 1992.

[56] T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, and A. Kusumi. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *Journal of Cell Biology*, 157 :1071–1081, 2002.

[57] H. Fukura, Y. Komiya, and M. Igarashi. Signaling pathway downstream of $GABA_A$ receptor in the growth cone. *Journal of Neurochemistry*, 67 :1426–1434, 1996.

[58] S. Funamoto, R. Meili, S. Lee, L. Parry, and R.A. Firtel. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositosides by PI3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell*, 109 :611–623, 2002.

[59] T.M. Gomez and J.Q. Zheng. The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nature Review of Neuroscience*, 7 :115–125, 2006.

[60] G.J. Goodhill and J.S. Urbach. Theoretical analysis of gradient detection by growth cones. *Journal of Neurobiology*, 41 :230–241, 1999.

[61] M.B. Gordon, L. Howard, and D.A. Compton. Chromosome movement in mitosis requires microtubule anchorage at spindle poles. *Journal of Cell Biology*, 152 :425–434, 2001.

[62] T. Gregor, W. Bialek, R.R. de Ruyter van Steveninck, D.W. Tank, and E.F. Wieschaus. Diffusion and scaling during early embryonic pattern formation. *Proceedings of the National Acaademy of Science*, 102 :18403–18407, 2005.

[63] S.W. Grill, K. Kruse, and F. Julicher. Theory of mitotic spindle oscillations. *Physical Review Letter*, 94 :108104, 2004.

[64] G. Grinkiewicz, M. Poenie, and R.Y. Tsien. A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260 :3440–3450, 1985.

[65] C. Guirland, S. Suzuki, M. Kojima, B. Lu, and J.Q. Zheng. Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron*, 42 :51–62, 2005.

[66] R.W. Gundersen and J.N. Barrett. Neuronal chemotaxis : chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. *Science*, 206 :1079–1080, 1979.

[67] Y. Harada, T. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama, and T. Yanagida. Single-molecule imaging of rna polymerase-dna interactions in real time. *Biophysical Journal*, 76 :709–715, 1999.

[68] C.M. Hempel, P. Vincent, S.R. Adams, R.Y. Tsien, and A.I. Selverston. Spatio-temporal dynamics of cyclic AMP signals in an intact neural circuit. *Nature*, 384 :113–114, 1996.

[69] J.R. Henley, K.H. Huang, D. Wang, and M.M. Poo. Calcium mediates bidirectional growth cone turning induced by myelin-associated glycoprotein. *Neuron*, 44 :909–916, 2004.

[70] W. Hervers and H. Luddens. The diversity of $GABA_A$Rs. Pharmacological and electrophysiological properties of gamma-aminobutyric acid channel subtypes. *Molecular Neurobiology*, 18 :35–86, 1998.

[71] A.L. Hodgkin and A.F. Huxley. The components of membrane conductance in the giant axon of loligo. *Journal of Physiology*, 116 :473–496, 1952.

[72] D. Holcman, A. Marchewka, and Z. Schuss. Survival probability of diffusion with trapping in cellular neurobiology. *Physical Review E*, 72 :031910, 2005.

[73] K. Hong, L. Hinck, M. Nishiyama, M.M. Poo, M. Tesier-Lavigne, and E. Stein. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell*, 97 :927–941, 1999.

[74] K. Hong, M. Nishiyama, J. Henley, M. Tessier-Lavigne, and M.M. Poo. Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature*, 403 :93–98, 2000.

[75] C.C. Hoogenraad, A. Akhmanova, F. Grosveld, C.I. De Zeeuw, and N. Galjart. Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *Journal of Cell Science*, 113 :2285–2297, 2000.

[76] J. Howard and A.A. Hymann. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, 422 :753–758, 2003.

[77] E.J. Huang and L.F. Reichardt. Neurotrophins : roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience*, 24 :677–736, 2001.

[78] A. B. Huber, A.L. Kolodkin, D.D. Ginty, and J.F. Cloutier. Signaling at the growth cone : ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annual Review of Neuroscience*, 26 :509–563, 2003.

[79] D. Irimia, S-Y. Liu, W.G. Tharp, A. Samadani, M. Toner, and M.C. Poznansky. Microfluidic system for measuring neutrophil migratory responses to dast switches of chemical gradients. *Lab on a Chip*, 6 :191–198, 2006.

[80] T.C. Jacob, Y.D. Bogdanov, C. Magnus, R.S. Saliba, J.T. Kittler, P.G Haydon, and S.J. Moss. Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABAA receptors. 25 :10469–10478.

[81] C. Janetopoulos, T. Jin, and P.N. Devreotes. Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells. *Science*, 291 :2408–2411, 2001.

[82] N. Li Jeon, H. Baskaran, S.K. Dertinger, G.M. Whitesides, L. Van de Water L, and M. Toner. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nature Biotechnology*, 20 :826–830, 2002.

[83] T. Jin, N. Zhang, Y. Ling, C.A. Parent, and P.N. Devreotes. Localization of G-protein $\beta\gamma$ complex in living celles during chemotaxis. *Science*, 287 :1034–1036, 2000.

[84] K. Kalil and E. Dent. Hot +TIPS : guidance cues signal directly to microtubules. *Neuron*, 42 :877–879, 2004.

[85] K. Kalil and E. Dent. Touch and go : guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Current Opinion in Neurobiology*, 15 :521–526, 2005.

[86] S.S. Kholmanskikh, H.B. Koeller, A. Wynshaw-Boris, T. Gomez, P.C. Letourneau, and M.E. Ross. Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nature Neuroscience*, 9 :50–57, 2006.

[87] B.N. Kholodenko. Cell-signalling dynamics in time and space. *Nature Reviews*, 7 :165–176, 2006.

[88] J. Kirsch, D. Langosch, P. Prior, U.Z. Littauer, B. Schmitt, and H. Betz. The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *Journal of Biological Chemistry*, 266 :22242–22245, 1991.

[89] J.T. Kittler, P. Rostaing, G. Schiavo, J.M. Fritschy, R. Olsen, A. Triller, and S.J. Moss. The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of $GABA_A$ receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 18 :13–25, 2001.

[90] D.F. Kucik, E.L. Elson, and M.P. Sheetz. Forward transport of glycoproteins on leading lamellipodia in locomoting cells. *Nature*, 340 :315–317, 1989.

[91] J.R. Kuhn and T. Pollard. Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 88 :1387–1402, 2005.

[92] A. Kussell and S. Leibler. Phenotypic diversity, population growth, and information in fluctuating environments. 309 :2005–2007, 2005.

[93] A. Kusumi, C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R.S. Kasai, J. Kondo, and T. Fujiwara. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid : high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 34 :351–378, 2005.

[94] A. Kusumi, Y. Sako, and M. Yamamoto. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophysical Journal*, 65 :2021–2040, 1993.

[95] P.M. Kythe. *Differential operators and applications.* Birckhaüser, 1996.

[96] T.D. Lamb. Gain and kinetics of activation in the g-protein cascade of phototransduction. *Proceedings of the National Academy of Science*, 23 :566–570, 1996.

[97] M. Lambert, D. Choquet, and R.M. Mege. Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*, 157 :469–479, 2002.

[98] H. Lee, U. Engel, J. Rusch, S. Scherrer, K. Sheard, , and D. Van Vactor. The microtubule plus end tracking protein orbit/MAST/CLASP acts downstream of the tyrosine kinase Abl in mediating axon guidance. *Neuron*, 42 :913–926, 2004.

[99] Y. Li, Y.C. Jia, K. Cui, N. Li, Z.Y. Zheng, Y.Z. Wang, and X.B. Yuan. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-dervide neurotrophic factor. *Nature*, 434 :894–898, 2005.

[100] A.M. Lohof, M. Quillan, Y. Dan, and M.M Poo. Asymmetric modulation of cytosolic camp activity induces growth cone turning. *Journal of Neuroscience*, 12 :1253–1261, 1992.

[101] P.H. Lommerse, G.A. Blab, L. Cognet, G.S. Harmsand B.E. Snaar-Jagalska, H.P. Spaink, and T. Schmidt. Single-molecule imaging of the H-ras membrane-anchor reveals domains in the cytoplasmic leaflet of the cell membrane. *Biophysical Journal*, 86 :609–616, 2004.

[102] A.J. Lotka. *Elements of Physical biology.* Williams and Wilkins Company, 1925.

[103] C. Luccardini, C. Tribet, F. Vial, V. Marchi-Artzner, and M. Dahan. Size, charge and interactions with giant lipid vesicles of quantum dots coated with an amphiphilic macromolecule. *Langmuir*, 22 :2304–2310, 2006.

[104] R. Lux and W. Shi. Chemotaxis-guided movements in bacteria. *Critical Review of Oral Biology and Medecine*, 15 :207–220, 2004.

[105] S. Lévi, C. Vannier, and A. Triller. Strychnine-sensitive stabilization of postsynaptic glycine receptor clusters. *Journal of Cell Science*, 111 :335–341, 1998.

[106] C.L. Manahan, P.A. Iglesias, Y. Long, and P.N. Devreotes. Chemoattractant signaling in *dictyostelium discoideum*. *Annual Review of Cell Devepelomental Biology*, 20 :223–253, 2004.

[107] H.H. McAdams and L. Shapiro. Circuit simulation of genetic networks. *Science*, 269 :650–656, 1995.

[108] S.O. Meakin and E.M. Shooter. The nerve growth factor family of receptor. *Trends in Neuroscience*, 15 :323–331, 1992.

[109] N. Meilhac, L. Le Guyader, L. Salome, and N. Destainville. Detetction of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Physical Review E*, 73 :0011915, 2006.

[110] H. Meinhardt. Orientation of chemotactic cells and growth cones : models and mechanisms. *Journal of Cell Science*, 112 :2867–2874, 1999.

[111] G. Ming, J. Henley, M. Tessier-Lavigne, H.J. Song, and M.M. Poo. Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron*, 29 :311–312, 2001.

[112] G.L. Ming, H.J. Song, B. Berninger, C.E. Holt, M. Tessier-Lavigne, and M.M. Poo. camp-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron*, 19 :1225–1235, 1997.

[113] G.L. Ming, S.T. Wong, J. Henley, X.B. Yuan, H.J. Song, N.C. Spitzer, and M.M. Poo. Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature*, 417 :411–418, 2002.

[114] J.D. Murray. *Mathematical Biology*, volume 1, chapter Reaction diffusion, chemotaxis, nonlocal mechannisms, pages 404–417. Springer, 1989.

[115] C. Nakada, K. Ricthie, Y. Oba, M. Nakamura, Y. Hotta, R. Iino, R.S. Kasai, K. Yamaguchi, T. Fujiwara, and A. Kusumi. Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nature Cell Biology*, 5 :626–632, 2003.

[116] N. Nayeem, T.P. Green, I.L. Martin, and E.A. Barnard. Quaternary structure of the native GABA determined by electron microscopic image analysis. *Journal of Neurochemistry*, 62 :815–818, 1994.

[117] E. Neher and B. Sakmann. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260 :799–802, 1976.

[118] M. Nishiyama, A. Hoshino, L. Tsai, J.R. Henley, Y. Goshima, M. Tessier-Lavigne, M.M. Poo, and K. Hong. Cyclic amp/gmp-dependent modulation of Ca^{2+} channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature*, 423 :990–995, 2003.

[119] C.A. Parent, B.J. Blacklock, W.M. Froehlich, D.B. Murphy, and P.N. Devreotes. G protein signaling events are activated at the leading edge of chemotactic cells. *Cell*, 95 :81–91, 1998.

[120] C.A. Parent and P.N. Devreotes. A cell's sense of direction. *Science*, 284 :765–770, 1999.

[121] R.J. Pasterkamp, J.J. Peschon, M.K. Spriggs, and A.L. Kolodkin. Semaphorin 7a promotes axon outgrowth through integrins and mapks. *Nature*, 24 :398–405, 2003.

[122] W. Pfeffer. Lokomotorisches richtungsbewegungen durch chemisches reize. *Untersuchung aus dem Botanischen Institut Tübingen*, 1 :363–482, 1884.

[123] H. Qian, M.P. Sheetz, and E.L. Elson. Single particle tracking. analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophysical Journal*, 60 :910–921, 1991.

[124] J.A. Raper. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*, 10 :88–94, 2000.

[125] K. Ritchie, X-Y. Shan, J. Kondo, K. Iwasawa, T. Fujiwara, and A. Kusumi. Detection of non-brownian diffusion in the cell membrane in single molecule tracking. *Biophysical Journal*, 88 :2266–2277, 2005.

[126] O. Rocks, A. Peyker, and P.I. Bastiaens. Spatio-temporal segregation of ras signals : one ship, three anchors, many harbors. *Current Opinion in Cell Biology*, 18 :351–357, 2006.

[127] O.C. Rodriguez, A.W Schaefer, C.A Mandato, P. Forscher, W.M. Bement, and C.M Waterman-Storer. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature Cell Biology*, 5 :599–609, 2003.

[128] W.J. Rosoff, J.S. Urbach, M.A. Esrick, R.G. McAllister, L.J. Richards, and G.J. Goodhill. A new chemotaxis assay shows the extreme sensitivity of axons to molecular gradients. *Nature Neuroscience*, 7 :678–682, 2004.

[129] Y. Sako, A. Nagafuchi, S. Tsukita, M. Takeichi, and A. Kusumi. Cytoplasmic regulation of the movement of E-cadherin on the free cell surface as studied by optical tweezers and single particle tracking : corralling and tethering by the membrane skeleton. *Journal of Cell Biology*, 140 :1227–1240, 1998.

[130] W.C. Salmon, M.C. Adams, and C.M. Waterman-Storer. Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *Journal of Cell Biology*, 158 :31–37, 2002.

[131] F.A. Samatey, K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, and K. Namba. Structure of the bacterial flagellar

protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 431 :1062–1068, 2004.

[132] M. Saxton and K. Jacobson. Single-particle tracking : applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 26 :373–399.

[133] M.J. Saxton. Single-particle tracking : models of directed transport. *Biophysical Journal*, 67 :2110–2119, 1994.

[134] E. Schroedinger. *What is life ?* Cambridge University Press, 1944.

[135] V. Schuler, C. Luscher, C. Blanchet, N. Klix, G. Sansig, K. Klebs, M. Schmutz, J. Heid, C. Gentry, L. Urban, A. Fox, W. Spooren, A.L. Jaton, J. Vigouret, M. Pozza, P.H. Kelly, J. Mosbacher, W. Froestl, E. Kaslin, K. Kaupmann H. van der Putten R. Korn, S. Bischoff, and B. Bettler. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic $GABA_B$ responses in mice lacking $GABA_B1$. *Neuron*, 31 :47–58, 2001.

[136] J.E. Segall, S.M. Block, and H.C. Berg. Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Science*, 83 :8987–8991, 1986.

[137] J.E. Segall and G. Gerisch. Genetic approaches to cytoskeleton function and the control of cell motility. *Current Opinions in Cell Biology*, 1 :44–50, 1989.

[138] A. Sergé, L. Fourgeaud, A. Hemar, and D. Choquet. Active surface transport of metabotropic glutamate receptors through binding to microtubules and actin flow. *Journal of Cell Science*, 15 :5015–5022, 2003.

[139] G. Servant, O.D. Weiner, P. Herzmark, T. Balla, J.W. Sedat, and H.R. Bourne. Polarization of chemoattractants receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science*, 287 :1037–1040, 2000.

[140] M.P. Sheetz. Glycoprotein motility and dynamic domains in fluid plasma membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22 :417–431, 1993.

[141] O. Shimomura. Structure of the chromophore of *aequorea* green fluorescent protein. *Federation of European Biochemical Societies letter*, 104 :220–222, 1979.

[142] R. Simson, E.D. Sheets, and K. Jacobson. Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophysical Journal*, 69(989-993), 1995.

[143] A. Singer, Z. Schuss, D. Holcman, and R.S. Eisenberg. Narrow escape. *Journal of Statistical Physics*, 122 :437–509, 2006.

[144] R. Skupsky, W. Losert, , and R. J. Nossal. Distinguishing modes of eukaryotic gradient sensing. *Biophysical Journal*, 89 :2806–2823, 2005.

[145] S.B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads. *Science*, 258 :1122–1126, 1992.

[146] H. Song, G. Ming, Z. He, M. Lehmann, L. McKerracher, M. Tessier-Lavigne, and M.M. Poo. Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science*, 281 :1515–1518, 1998.

[147] H.J. Song, G.L. Ming, and M.M. Poo. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature*, 388 :275–279, 1997.

[148] H.J. Song and M.M. Poo. The cell biology of neuronal navigation. *Nature Cell Biology*, 3 :81–88, 2001.

[149] V. Sourjik and H.C. Berg. Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis. *Nature*, 428 :437–441, 2004.

[150] V. Stein and R.A. Nicoll. GABA generates excitement. *Neuron*, 37 :375–378, 2003.

[151] T. Stepanova, J. Slemmer, C.C Hoogenraad, G. Lansbergen, B. Dortland, C.I. De Zeeuw, F. Grosveld, G. van Cappellen, A. Akhmanova, and N.Galjart. Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *Journal of Neuroscience*, 23 :2655–2664, 2003.

[152] T.R. Strick, J-F. Allemand, A. Bensimon, D. Bensimon, and V. Croquette. The elasticity of a single supercoiled dna molecule. *Science*, 271 :1835–1837, 1996.

[153] B. Sun and R.A. Firtel. A regulator of g protein signaling-containing kinase is important for chemotaxis and multicellular development in dictyostelium. *Molecular Biology of the Cell*, 14 :1727–1743, 2003.

[154] T. Surrey, F. Nedelec, S. Leibler, and E. Karsenti. Physical properties determining self-organization of motors and microtubules. *Science*, 292 :1167–1171, 2001.

[155] D.M. Suter, A.W. Schaeffer, and P. Forscher. Microtubule dynamics are necessary for Src family kinase-dependent growth cone steering. *Current Biology*, 14 :1194–199, 2004.

[156] B. Tabakoff and P.L. Hoffman. Alcohol addiction : an enigma among us. *Neuron*, 16 :909–912, 1996.

[157] S. Takagi, K. Obata, and H. Tsubokawa. GABAergic input contributes to activity-dependent change in cell volume in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience Research*, 44 :315–324, 2002.

[158] K. Takei, R.M. Shin, T. Inoue, K. Kato, and K. Mikoshiba. Regulation of nerve growth mediated by inositol 1,4,5-Trisphosphate receptors in growth cones. *Science*, 282 :1705–1708, 1998.

[159] E. Tanaka, T. Ho, and M.W. Kirschner. The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *Journal of cell biology*, 128 :139–155, 1995.

[160] J. Tanaka, M. Matsuzaki, E. Tarusawa, A. Momiyama, E. Molnar, H. Kasai, and R. Shigemoto. Number and density of AMPA receptors in single synapses in immature cerebellum. *Journal of Neuroscience*, 26 :799–807, 2005.

[161] T. Tani, Y. Miyamoto, K.E. Fujimori, T. Taguchi, Y.Sako, and Y. Harada. Trafficking of a ligand-receptor complex on the growth cones as an essential step for the uptake of nerve growth factor at the distal end of the axon : A single-molecule analysis. *Journal of Neuroscience*, 25 :2181–2191, 2005.

[162] V.M. Tennyson. The fine structure of the axon, and growth cone of the dorsal root, neuroblast of the rabbit embryo. *Journal of cell biology*, 44 :62–79, 1970.

[163] J.R. De la Torre, V.H. Hopker, G.L. Ming, M.M. Poo, M. Tessier-Lavigne, A. Hemmati-Brivanlou, and C.E. Holt. Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron*, 19 :1211–1224, 1997.

[164] R.Y. Tsien. Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium. *Trends in Neuroscience*, 11 :419–424, 1988.

[165] R.Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemical Chemistry*, 67 :509–544, 1998.

[166] M. Ueda, Y. Sako, T. Tanaka, P. Devreotes, and T. Yanagida. Single-molecule analysis of chemotactic signaling in dictyostelium cells. *Science*, 294 :864–867, 2001.

[167] V. Volterra. *Animal Ecology*, chapter Variations and fluctuations of a number of individuals in animal species living together, pages 409–448. McGraw-Hill, 1931.

[168] G.X. Wang and M.M. Poo. Requirement of TRPC channels in netrin-1-induced chemotropic turning of nerve growth cones. *Nature*, 434 :898–904, 2005.

[169] H. Wang, F.K. Bedford, N.J. Brandon, S.J. Moss, and R.W. Olsen. $GABA_A$-receptor-associated protein links $GABA_A$ reeptors and the cytoskeleton. *Nature*, 397 :69–71, 1999.

[170] H. Wang and R.W. Olsen. Binding of the $GABA_A$ receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAP/$GABA_A$ receptor interaction. *Journal of Neurochemistry*, 75 :644–655, 2000.

[171] S.E. Williams, F. Mann, L. Erskine, T. Sakurai, S. Wei, D.J. Rossi, N.W. Gale, C.E. Holt, C.A. Mason, and M. Henkemeyer. Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron*, 39 :919–935, 2003.

[172] T. Wittmann and C.M. Waterman-Storer. Cell motility : can Rho GTP-ases and microtubules point the way ? 114 :3795–3803.

[173] T. Wittmann and C.M. Waterman-Storer. Spatial regulation of CLASP affinity for microtubules by Rac1 and GSK3β in migrating epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 169 :929–939, 2005.

[174] W.L. Wu, L. Ziskind-Conhaim, and M.A. Sweet. Early development of glycine -and GABA- mediated synapses in rat spinal cord. *Trends in Neurosciences*, 12 :3935–3945, 1992.

[175] Y. Xiang, Y. Li, Z. Zhang, K. Cui, S. Wang, X.B. Yuan, C.P. Wu, M.M. Poo, and S. Duan. Nerve growth cone guidance mediated by G protein-coupled receptors. *Nature Neuroscience*, 5 :843–848, 2002.

[176] A. Yildiz, M. Tomishige, R.D. Vale, and P. Selvin. Kinesin walks hand-over-hand. *Science*, 303 :676–678, 2004.

[177] C.I. De Zeeuw, C.C Hoogenraad, E. Goedknegt, E. Hertzberg, A. Neubauer, F. Grosveld, and N. Galjart. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron*, 97 :1187–1199, 1997.

[178] J.Q. Zheng. Turning of nerve growth cones induced by localized increases in intracellular calcium ions. *Nature*, 403 :89–93, 2000.

[179] J.Q. Zheng, M. Felder, J.A. Connor, and M.M. Poo. Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature*, 368 :140–144, 1994.

[180] F.Q. Zhou, J. Zhou, S. Dedhar, Y.H. Wu, and W.D. Snyder. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-β and functions of the microtubule plus end binding proteins APC. *Neuron*, 42 :897–912, 2005.

[181] S.H. Zigmond. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *Journal of Cell Biology*, 75 :606–616, 1977.

Résumé

Lors du développement du système nerveux, les axones en croissance choisissent une direction d'extension avec précision. Ce processus est permis par la détection sensible de signaux de guidage par les récepteurs membranaires de la membrane du cône de croissance. Nous avons étudié la dynamique de récepteurs individuels du GABA marqués par des nanocristaux fluorescents. Les récepteurs répartis également dans la membrane d'un cône de croissance soumis à un gradient de GABA sont spécifiquement redistribués vers sa source. Cette réorganisation est due à des interactions avec les microtubules déplaçant les récepteurs vers les régions à forte concentration de GABA, mises en évidence sur les trajectoires des récepteurs. Son rôle fonctionnel a été révélé par la mesure d'une amplification de l'asymétrie de la concentration intracellulaire de calcium, qui régule l'organisation du cytosquelette. Ces observations permettent l'élaboration d'un modèle d'auto-organisation des récepteurs, permettant une amplification du signal extérieur. Une faible activation asymétrique des récepteurs induit une asymétrie de concentration de calcium et de l'organisation du cytosquelette. Ceci crée une boucle de rétroaction positive en favorisant la redistribution, qui renforce le signal induit par le gradient en amplifiant l'asymétrie de la concentration de récepteurs et de calcium. L'auto-organisation des récepteurs est décrite par un système d'équations stochastiques étudiées numériquement et analytiquement. Les travaux présentés permettent de proposer un mécanisme général d'amplification de signaux extérieurs dans l'axone en croissance et dans les systèmes chimiotactiques ou polarisés.

Mots-Clés Molécule unique - Nanocristaux - Imagerie biologique - Chimiotactisme - Cône de croissance - Guidage axonal - Récepteurs du GABA - Modélisation stochastique en biologie

Abstract

During the development of the nervous system, extending axons choose accurately their directions of growth. This step relies on the sensitive detection of guidance cues by receptors in the membrane of the growth cone. We studied the dynamics of single GABA receptors tagged by fluorescent nanocrystals. The receptors are initially homogeneously distributed in the growth cone membrane and are specifically relocalized toward the source when submitted to a GABA gradient. This reorganization is due to interactions with the microtubules that have been identified by single receptor trajectory analysis and that displace the receptors toward regions of high GABA concentration. The functional role of this phenomenon has been revealed by the measurement of a receptor redistribution induced an amplification in the asymmetry of calcium concentration. These results support a model of receptor self-organization providing an amplification of the external signal. A weak asymmetric activation of receptors causes a weak asymmetry of calcium concentration and of the cytoskeleton organization. This creates a positive feedback loop by favoring receptor redistribution that amplifies the gradient induced signal by enhancing the asymmetry in the calcium concentration. The self-organization of the receptors can be correctly described by a system of stochastic equations that has been analytically and numerically studied. This study provides a general mechanism of amplification of external signals in growing axons and also in chemotactic or polarized systems.

Keywords Single molecule - Nanocrystals - Biological imaging - Chemotaxis - Growth cone - Axonal pathfinding - Stochastic modeling in biology