HAL
open science

Suivi de molécules uniques à l'aide de nanocristaux semiconducteurs :méthodes et application à l'étude de la dynamique du récepteur de la glycine

Marie-Virginie Ehrensperger

To cite this version:

Marie-Virginie Ehrensperger. Suivi de molécules uniques à l'aide de nanocristaux semiconducteurs :méthodes et application à l'étude de la dynamique du récepteur de la glycine. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : . tel-00141586

HAL Id: tel-00141586

https://theses.hal.science/tel-00141586v1

Submitted on 13 Apr 2007

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.

Laboratoire Kastler Brossel

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité : Biophysique

présentée par

Marie-Virginie EHRENSPERGER

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 6.

Suivi de molécules uniques à l'aide de nanocristaux semiconducteurs : méthodes et application à l'étude de la dynamique du récepteur de la glycine

---

soutenue publiquement le 25 janvier 2007 devant le jury composé de

Président : **Miglena ANGELOVA**
Professeur, Université Paris VI

Examinateur : **Pascal LEGENDRE**
Directeur de Recherche INSERM, Université Paris VI

Rapporteurs : **Pierre-François LENNE**
Chargé de Recherche CNRS, Institut Fresnel, Marseille

Bernard VANDENBUNDER
Directeur de Recherche CNRS, Institut de Biologie de Lille

Directeur de thèse : **Maxime DAHAN**
Chargé de Recherche CNRS, École Normale Supérieure

Remerciements

Je remercie Franck Laloë et Paul Indelicato, directeurs successifs du laboratoire Kastler Brossel, de m'avoir accueillie dans cet environnement scientifique exceptionnel.

Je remercie Pierre-François Lenne, Bernard Vandenbunder, Miglena Angelova et Pascal Legendre de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

J'ai effectué ce travail de thèse dans l'équipe Optique et Biologie du Laboratoire Kastler Brossel, au département de Physique de l'Ecole Normale Supérieure. Je tiens tout d'abord à marquer toute ma gratitude à Maxime Dahan pour m'avoir accueillie dans son équipe et avoir encadré cette thèse avec une énergie et un enthousiasme exemplaires. A ses côtés, je pense avoir appris comment conjuguer la passion avec la patience devant une réalité qui résiste parfois à la compréhension. Je le remercie ainsi de m'avoir guidée sur le chemin qui mène au plaisir de la découverte. Je remercie également Pierre Desbiolles, co-créateur de l'équipe, pour toutes les discussions scientifiques et autres que nous avons pu avoir.

Je remercie naturellement toutes les personnes qui sont ou ont été des membres actifs de l'équipe : Sébastien Courty qui forme désormais, avec Maxime et Pierre, le noyau dur de l'équipe ; Camilla Luccardini, Emilie Mercey, Makrina Anastassiadou, Aurélien Crut, Mathieu Morel, Pierre-Louis Porté, Assa Sittner, Rami El Dardiry, Raphaël Escure, Andreas Biebricher, David Sebiskveradze, Amodsen Chotia, Alexander Podzorov,...

Je remercie la bonne fortune d'avoir placé dans l'équipe Optique et Biologie, au même moment que moi, Isabelle Bonnet et Stéphane Bonneau et d'avoir permis à notre amitié profonde de voir le jour. Je salue également chaleureusement Cédric Bouzigues, qui a débuté sa thèse en même temps que moi et fut ainsi mon premier compagnon de galère. Je les remercie sincèrement tous les trois de m'avoir accompagnée tout au long de ces années et je tiens à marquer ici tout le respect que je leur porte. Je leur souhaite pour l'avenir toute la réussite et le bonheur qu'ils méritent.

Je remercie les membres de l'équipe Optique Quantique, en particulier Jean-Pierre Hermier et Xavier Brokmann, ainsi que toutes les personnes du département de Physique que j'ai été appelée à côtoyer de près ou de loin pour tous les services qu'ils m'ont rendus.

Mon travail de thèse n'aurait bien entendu pas été possible sans l'étroite collaboration avec le laboratoire de Biologie cellulaire de la Synapse, dans le département de Biologie de l'ENS. Je suis particulièrement reconnaissante à Antoine Triller, directeur du laboratoire, pour son éclairage scientifique permanent et pour tout le temps qu'il a bien voulu me consacrer. Je le remercie également vivement d'avoir trouvé les mots justes lorsque mon moral n'était pas au beau fixe.

Je remercie toutes les personnes du laboratoire de biologie de m'avoir accueillie dans leur cadre de travail, d'avoir partager leur paillasse avec moi et de m'avoir permis de me sentir biologiste à mon tour. Je remercie tout spécialement Sabine Lévi et Christian Vannier pour m'avoir aiguillée dans les méandres de la biologie et avoir répondu à toutes mes questions avec une patience et une précision que je n'ai eu de cesse d'apprécier. Je remercie tout autant les personnes avec qui j'ai directement travaillé : Cécile Charrier, Cyril Hanus, Claude Schweizer et Hiroko Bannai.

Je remercie tous mes amis qui m'ont permis de garder tant de bons souvenirs des soirées passées au cours de ces trois années de thèse. Je remercie chaleureusement toute ma famille pour le soutien moral qu'elle m'apporte quoi qu'il arrive dans toutes les étapes de ma vie. Enfin, je remercie Nicolas, celui sans qui rien n'aurait la même saveur.

Pour finir, j'adresse une pensée à tous ceux qui liront tout ou partie de ce manuscrit. Ils justifient à eux seuls l'utilité de mes travaux de recherche.

Table des matières

1 Introduction : Contexte biologique et expérimental **13**

1.1 Diffusion des protéines dans les membranes 14

1.1.1 Structure des membranes 14

1.1.2 Le modèle de "fluide homogène bidimensionnel" 15

1.1.3 Insuffisance du modèle dans les membranes biologiques 16

1.1.4 Quelques modèles actuels 18

1.2 Diffusion latérale du récepteur de la glycine 20

1.2.1 Organisation des membranes postsynaptiques 20

1.2.2 Stabilisation du récepteur de la glycine par la géphyrine 23

1.2.3 Échanges entre les compartiments synaptique et extrasynaptique . . . 25

1.3 Descriptif des expériences 28

1.3.1 Questions biologiques 28

1.3.2 Obtention des données 29

1.3.3 Obtention des résultats 31

1.4 Objectifs et plan du manuscrit 31

2 Les nanocristaux individuels comme marqueurs biologiques **33**

2.1 Introduction 34

2.2 Structure des nanocristaux de CdSe/ZnS 34

2.2.1 Principe de fabrication 34

2.2.2 Structure fonctionnelle 35

2.3 Propriétés optiques 37

2.3.1 Structure et propriétés de fluorescence 37

2.3.2 Mesures expérimentales sur nanocristaux commerciaux 41

2.4 Marquage des molécules étudiées 52

2.4.1 Stratégies 52

2.4.2 Unicité du marquage 54

2.4.3 Avantages comparés des sondes biologiques 56
2.4.4 Influence de la sonde sur la diffusion latérale dans les membranes . . 57

3 Automatisation du suivi et de l'analyse 63
3.1 Introduction 64
3.1.1 Données types 64
3.1.2 Mouvement brownien et coefficient de diffusion 66
3.2 Suivi de nanocristaux uniques 68
3.2.1 Introduction 68
3.2.2 Les différentes étapes du suivi 69
3.2.3 Performances et limitations 71
3.3 Analyse des trajectoires 76
3.3.1 Quantification de la diffusion : les méthodes de la littérature 76
3.3.2 Méthodes utilisées pour quantifier la diffusion 85
3.3.3 Étude de la localisation des particules 91
3.3.4 Le "logiciel" d'analyse 96

4 Dynamique latérale du RGly dans des neurones adultes 99
4.1 Introduction 100
4.1.1 Stabilité des synapses et renouvellement de leurs constituants 100
4.1.2 Plasticité synaptique et diffusion latérale 100
4.1.3 Implications du cytosquelette et de l'activité 102
4.2 Influence du cytosquelette 103
4.2.1 Méthodes 103
4.2.2 Résultats 105
4.2.3 Article 106

5 Étude *in situ* de l'interaction RGly-géphyrine 117
5.1 Introduction 118
5.2 Systèmes modèles 118
5.2.1 Transfection du RGly et de la géphyrine 119
5.2.2 Cellules HeLa et neurones jeunes 120
5.2.3 Distributions cellulaires caractéristiques 121
5.3 Influence de l'interaction RGly-géphyrine sur la dynamique du RGLy 123
5.3.1 Stabilisation du RGly aux synapses par la géphyrine 124
5.3.2 Influence de la géphyrine, hors agrégats, sur la dynamique du RGly . 127
5.3.3 Effets liés au cytosquelette 133
5.4 Quantification de l'équilibre dynamique 138
5.4.1 Deux sous-populations de récepteurs intra-agrégats de géphyrine . . 138
5.4.2 Propriétés cinétiques de l'équilibre IN⇌OUT 139

5.5 Conclusion 143

6 Conclusion et perspectives **147**
6.1 Conclusion 147
6.2 Perspectives 148
6.2.1 Travaux en cours 148
6.2.2 Perspective à terme 151

Annexes **152**

Bibliographie **159**

Abréviations

RAMPA	Récepteur au glutamate activé par le α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole
IAG	Intra Agrégat de Géphryine
EAG	Extra Agrégat de Géphryrine
ENS	École Normale Supérieure
FCS	Spectroscopie à corrélation de spectroscopie (*Fluorescent Correlation Spectroscopy*)
fig.	Figure
FRAP	Retour de fluorescence après photoblanchiment (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*)
GFP	Protéine fluorescente verte (*Green Fluorescent Protein*)
ks. test	Test de Kolmogorov-Smirnov
LKB	Laboratoire Kastler Brossel
MSD	Fonction de déplacement quadratique moyen (*Mean Square Displacement*)
ON	Ouverture Numérique
PSF	Réponse impulsionnelle du système optique (*Point Spread Function*)
QDot	*Quantum Dot*, autre appellation d'un nanocristal semiconducteur
RNMDA	Récepteur au glutamate activé par le N-méthyl-D-aspartate
RGly	Récepteur de la Glycine
SNR	Rapport Signal à Bruit (*Signal to Noise Ratio*)
SPT	Suivi de particule unique (*Single Particle Tracking*)
u.a.	unité arbitraire
VeGe	Venus : :géphyrine (forme standard)
YFP	Protéine fluorescente jaune (*Yellow Fluorescent Protein*)

Chapitre 1

Introduction : Contexte biologique et expérimental

Sommaire

1.1 Diffusion des protéines dans les membranes 14
1.1.1 Structure des membranes 14
1.1.2 Le modèle de "fluide homogène bidimensionnel" 15
1.1.3 Insuffisance du modèle dans les membranes biologiques 16
1.1.3.1 Les mesures d'ensemble soulèvent rapidement des questions 16
1.1.3.2 Des précisions apportées par le suivi de molécule unique . 17
1.1.4 Quelques modèles actuels 18
1.1.4.1 Le "cloisonnement par le cytosquelette" 18
1.1.4.2 Les "piquets transmembranaires" 18
1.1.4.3 Les microdomaines membranaires 19
1.2 Diffusion latérale du récepteur de la glycine 20
1.2.1 Organisation des membranes postsynaptiques 20
1.2.1.1 Interneurones et synapse chimique 20
1.2.1.2 Récepteurs aux neurotransmetteurs inhibiteurs et excitateurs 21
1.2.1.3 Structure des synapses inhibitrices 22
1.2.2 Stabilisation du récepteur de la glycine par la géphyrine 23
1.2.2.1 Structure du RGly 23
1.2.2.2 Partenaires et structure de la géphyrine 23
1.2.3 Échanges entre les compartiments synaptique et extrasynaptique . . 25
1.2.3.1 Importance de la diffusion latérale 25
1.2.3.2 Observation du mécanisme de diffusion-capture 26
1.3 Descriptif des expériences 28
1.3.1 Questions biologiques 28
1.3.2 Obtention des données 29
1.3.2.1 Préparation des cellules 29
1.3.2.2 Marquage du RGly 29
1.3.2.3 Montage de vidéomicroscopie 29
1.3.3 Obtention des résultats 31
1.4 Objectifs et plan du manuscrit 31

1.1 Diffusion des protéines dans les membranes

1.1.1 Structure des membranes

Dès 1838, Schawnn et Schleiden initient la théorie cellulaire en proposant la cellule comme unité de base, structurelle et fonctionnelle, du vivant. Une cellule assure sa propre homéostasie (*i.e.* équilibre dynamique d'un système placé dans un environnement fluctuant) et communique avec son environnement. Une cellule eucaryote est délimitée par sa membrane plasmique et contient du cytoplasme, un noyau et de nombreux organites (voir fig. 1.1A). Chaque organite est le lieu de processus biochimiques assurant différentes fonctions : de synthèse (dans les mitochondries, le reticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi), de dégradation (dans l'endosome, les lysosomes,...) et de structure (assuré par le cytosquelette). Certains organites (tels le noyau, les mitochondries,...) sont délimités par des membranes dites intracellulaires. La membrane plasmique, interface entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule, constitue une barrière sélective qui permet d'isoler la cellule tout en autorisant une communication et des échanges spécifiques de matière avec l'extérieur. Par ailleurs, la membrane plasmique repose sur une charpente dynamique - le cytosquelette - formée d'un réseau de filaments protéiques, qui rend possible la motilité cellulaire, contribue à maintenir la forme de la cellule et la cohésion des tissus, et enfin, sert de guide pour le transport de molécules indispensables à l'activité cellulaire.

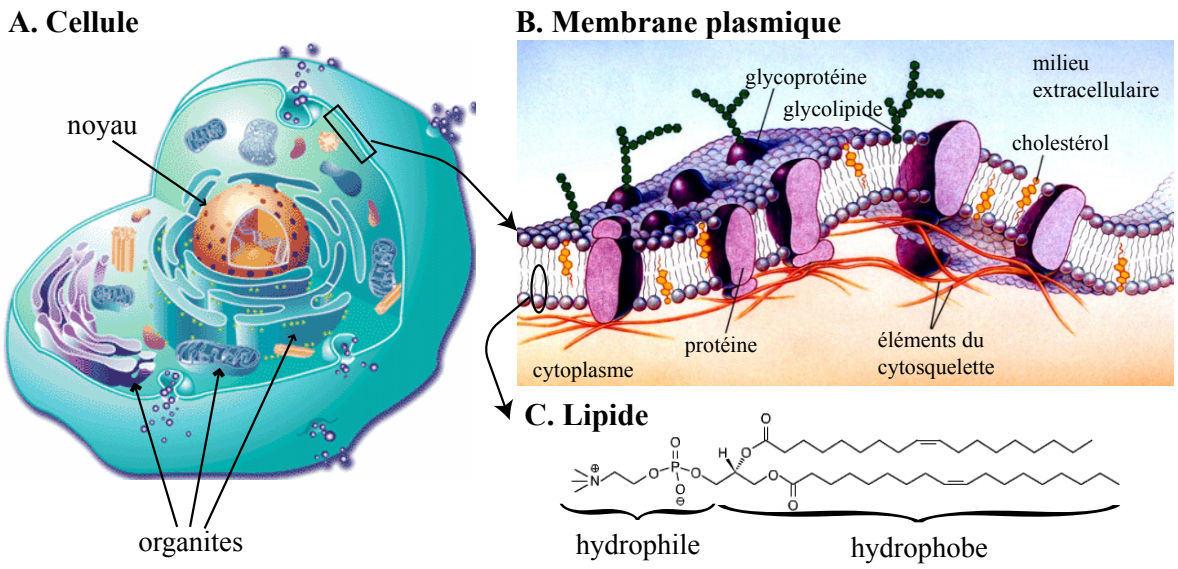

Figure 1.1 – *La membrane plasmique (B), barrière sélective entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule (A), est une bicouche fluide de lipides (C) dans laquelle sont insérées des protéines.*

Les membranes sont constituées de lipides, de protéines et de glucides dans des proportions diverses selon le type cellulaire. Les lipides (phospholipides, cholestérol et glycolipides) sont des molécules amphiphiles qui comportent une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Les membranes vont se former grâce aux propriétés amphiphiles des lipides constitutifs. En effet, dans l'eau - principal composant des cellules et du milieu extracellulaire - les lipides s'orientent spontanément pour former une double couche, dans laquelle les queues hydrophobes se font face en raison de leur affinité réciproque, et les têtes polaires sont dirigées vers l'eau (voir fig. 1.1B, C). Cette struc-

ture de la membrane, en bicouche lipidique, a été proposée dès 1925 par Gorter et Grendel. Les lipides servent alors de solvant pour les protéines membranaires. Ils constituent une matrice dans laquelle les protéines sont insérées. Les protéines sont des macromolécules moins nombreuses mais plus grosses que les molécules de lipides. Elles représentent 50 à 70% de la masse totale de la membrane. Des résidus sucrés, toujours situés sur la partie extracytoplasmique de la membrane, forment un "manteau" de protection autour de la cellule. Un lipide sur dix est glycosylé, la grande majorité des protéines le sont.

Les protéines, enchâssées dans la double couche lipidique, contribuent à sa solidité, et surtout assurent de multiples rôles fonctionnels (échanges et communications). Certaines permettent à des molécules spécifiques de traverser la membrane, d'autres sont vecteurs d'information. Par exemple, la reconnaissance d'une molécule d'intérêt par une protéine enclenche un mécanisme de signalisation cellulaire aboutissant à une réaction de la cellule ; des protéines permettent de connecter la membrane au cytosquelette, à la matrice extracellulaire ou encore aux cellules adjacentes.

De plus, la vision actuellement admise de la structure des membranes cellulaires ne limite plus le rôle des lipides à celui de solvant aux protéines membranaires. En particulier, grâce à une organisation latérale de la membrane en domaines distincts (conséquence d'une grande variété d'espèces lipidiques présentant des propriétés physico-chimiques différentes), les lipides joueraient le rôle de plateformes de recrutement pour des protéines impliquées dans des événements cellulaires importants.

1.1.2 Le modèle de "fluide homogène bidimensionnel"

Les membranes ne sont pas des structures solides mais des corps déformables dans les trois directions de l'espace. De plus, leur composition est très hétérogène, dans le temps et dans l'espace. Pour rendre compte de ces deux propriétés, Singer et Nicholson [141] ont proposé, en 1972, de considérer la membrane comme une "mosaïque fluide" dans laquelle les lipides et les protéines diffusent librement.

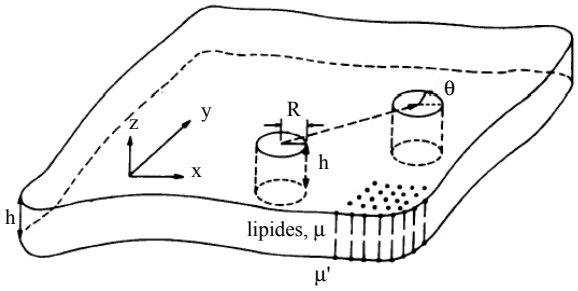

Figure 1.2 – *Modèle hydrodynamique de "fluide 2D homogène". Une protéine, modélisée par un cylindre inséré dans la membrane lipidique, peut diffuser latéralement dans le plan x-y et avoir un mouvement de rotation selon l'axe z. Figure extraite de [127].*

Sur la base du modèle de "mosaïque fluide", Saffman et Delbrück [127] utilisèrent un modèle de "fluide 2D homogène" pour prédire quantitativement la diffusion des protéines membranaires. Dans ce modèle, la bicouche est traitée comme un fluide visqueux 2D de faible épaisseur h et de viscosité μ, entouré de part et d'autre par des fluides de viscosité μ' telle que $\mu' \ll \mu$. La taille finie des lipides est

ignorée. Cette approximation est valable étant donné que le rapport entre la largeur d'une protéine et celle d'un lipide est grand. La protéine est représentée par un cylindre de hauteur h et de rayon R (voir fig. 1.2). Les coefficients de diffusion latérale (D) et rotationnelle (D_R) peuvent être exprimés comme suit :

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\mu h}\left(log\frac{\mu h}{\mu' R} - C_E\right) \tag{1.1}$$

$$D_R = \frac{k_B T}{4\pi\mu R^2 h}$$

avec k_B la constante de Boltzmann, T la température, C_E la constante d'Euler. D'après l'équation 1.1, le coefficient de diffusion d'une protéine de rayon R doit varier comme le logarithmique de R. Ainsi, la diffusion des protéines ne serait quasiment pas modifiée par leurs états d'agrégation (un complexe de 100 protéines ayant une diffusion réduite d'un facteur 1.4 uniquement par rapport à un monomère).

Dans un premier temps, de nombreuses mesures expérimentales de coefficient de diffusion (obtenues par la méthode de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP pour *Fluorescence Recovery After Photobleaching*)), faites sur des bicouches lipidiques artificielles [5,112] validèrent le modèle de Saffman et Delbrück. Ainsi, celui-ci a longtemps été considéré comme un modèle adéquat. Cependant, par la suite, les mesures effectuées dans des membranes biologiques, sont venues contredire les prédictions faites par ce modèle (voir ci-dessous). De plus, il a également été mis en défaut récemment dans les membranes artificielles. Y. Gambin et al. [167] ont mesuré les coefficients de diffusion latérale de protéines de différentes tailles, insérées dans des membranes artificielles d'épaisseur contrôlée. Ils ont alors trouvé que le coefficient de diffusion dépend fortement de la taille de la protéine et ont proposé un nouveau modèle heuristique dans lequel : $D \propto 1/R$.

1.1.3 Insuffisance du modèle de "fluide homogène 2D" dans les membranes biologiques

1.1.3.1 Les mesures d'ensemble soulèvent rapidement des questions

Le FRAP et la spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS pour *Fluorescent Correlation Spectroscopy*) sont les deux techniques de microscopie de fluorescence les plus répandues pour effectuer des mesures d'ensemble de diffusion. Elles permettent d'estimer le coefficient de diffusion, supposé constant et homogène, d'une population et peuvent révéler l'existence de plusieurs sous-populations (3 au maximum). Très tôt, la mise en évidence, dans la membrane plasmique, d'une sous-population de protéines immobiles sur l'échelle de temps des expériences de FRAP [6] a remis en question la liberté supposée des mouvements des protéines. Ces techniques permirent ensuite d'additionner des observations contradictoires avec le modèle de "fluide homogène 2D" :

- les coefficients de diffusion des lipides et des protéines dans des membranes cellulaires sont diminués d'un facteur 5 à 100 par rapport à ceux mesurés dans des membranes artificielles ainsi que par rapport aux valeurs théoriques [162,44],
- une importante réduction des coefficients de diffusion, voire une immobilisation, est observée lors de la formation de complexe ou après oligomérisation pour différentes protéines [61,108, 125]

1.1.3.2 Des précisions apportées par le suivi de molécule unique

L'émergence, à la fin des années 80, des expériences de suivi de molécules uniques (SPT pour *Single Particle Tracking*) a permis d'étudier le mouvement en temps réel de molécules au niveau de la particule unique. Par rapport aux techniques de mesure d'ensemble qui moyennent le comportement de centaines voire de milliers de molécules, la SPT rend l'obtention de trajectoires individuelles possibles. De plus, l'amélioration de la résolution spatiale permet, avec une résolution temporelle identique (de l'ordre de quelques dizaines de millisecondes), la mesure de coefficients de diffusion plus faibles d'environ 2 ordres de grandeurs. Les mesures de coefficient de diffusion faites en SPT, sur des membranes biologiques, sont également en non-adéquation avec les valeurs obtenues dans des membranes artificielles.

La force des mesures en SPT tient dans leur capacité à différencier plusieurs types de mouvement. Le développement des méthodes d'analyse des trajectoires individuelles a permis de révéler une grande hétérogénéité de comportements au sein des membranes (références dans [133]). La SPT apporte la preuve que toutes les molécules membranaires ne diffusent pas librement. Des mouvements plus complexes (comme, par exemple, une diffusion confinée ou dirigée) ont été identifiés. De plus, les caractéristiques de diffusion des protéines et des lipides sont propres aux molécules considérées, et peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre, d'un endroit de la membrane à un autre. Des modifications du type de mouvement sont aussi mesurées au sein même d'une trajectoire individuelle. L'observation la plus courante qui met en défaut le modèle de "fluide homogène 2D" concerne la visualisation de mouvements confinés (qui peuvent être transitoires) des protéines dans la membrane plasmique : une protéine diffuse rapidement dans un espace restreint duquel elle s'échappe au bout d'un temps plus ou moins long. Ce type de comportement est à l'origine de l'hypothèse d'une division de la membrane en microdomaines ou en compartiments (voir fig. 1.3).

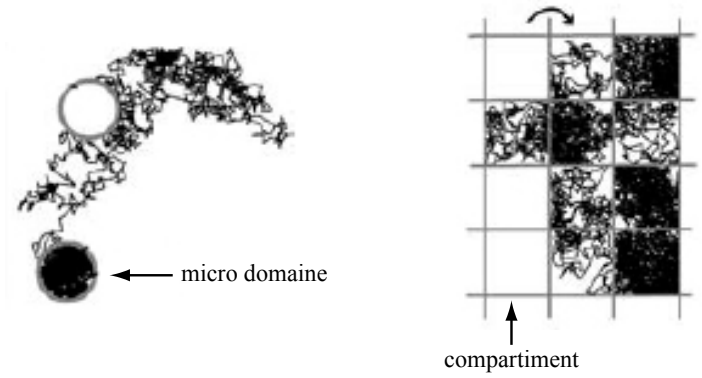

Figure 1.3 – *Exemples de trajectoires (simulées) confinées du fait d'une division de la membrane en microdomaines (à gauche) ou en compartiments (à droite). Figure extraite de [161].*

Les améliorations techniques les plus récentes en SPT ont permis à l'équipe de A. Kusumi de suivre le mouvement de lipides et de protéines avec une cadence de 40 000 images.s^{-1} dans de nombreuses cellules (non-neuronales). L'utilisation d'une très grande résolution temporelle (25 μs) leur a permis de montrer (références dans [76]) que :

1. les protéines ainsi que les lipides diffusent librement dans des compartiments, aussi vite que le prévoit le modèle de Saffman et Delbrück, mais ce mouvement libre n'est visible qu'avec cette

très grande résolution temporelle.

2. ces molécules "sautent" ensuite plus ou moins facilement d'un compartiment à l'autre. Le coefficient de diffusion correspondant à ces sauts est bien plus faible que celui mesuré au sein d'un compartiment.
3. la taille des compartiments (de 30 à 200nm) et le temps de résidence (quelques millisecondes) varie avec le type cellulaire. Notons que les résolutions temporelles couramment utilisées (quelques dizaines de millisecondes) ne permettent pas d'avoir accès à ces compartiments de petite taille.

Ces études suggèrent fortement l'existence de compartiments membranaires qui pourraient expliquer pourquoi un écart est observé entre la diffusion de molécules dans une membrane cellulaire et dans une membrane artificielle.

1.1.4 Quelques modèles actuels

De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer les divers mouvements observés dans les membranes biologiques. Nous présentons ci-dessous les trois modèles les plus couramment envisagés. Ceux-ci doivent être pris en compte conjointement pour tenter d'expliquer les effets de la structure et de l'environnement des membranes biologiques sur la diffusion des protéines et des lipides membranaires. La figure 1.4 illustre quelques origines possibles du confinement du mouvement des protéines.

1.1.4.1 Le "cloisonnement par le cytosquelette"

Le modèle de "cloisonnement par le cytosquelette" (*cytoskeleton-fence model*) est le premier modèle à être proposé pour expliquer la diffusion restreinte des protéines [78, 77] : celles-ci sont confinées dans des compartiments créés par le réseau sous-membranaire des éléments du cytosquelette, puis elles peuvent changer de compartiment soit par le biais de sauts soit à travers des trous transitoires dans ce réseau en perpétuel remaniement. En plus des interactions directes protéines-cytosquelette, des interactions indirectes sont également envisagées via des protéines d'ancrage présentes sous la membrane, elles-mêmes liées au cytosquelette. Ce modèle permet d'expliquer que la restriction de la diffusion est d'autant plus grande que la partie intracellulaire d'une protéine est importante et que son niveau d'agrégation ou de complexation est grand. De plus, notons que l'observation suivante semble valider définitivement ce modèle : les tailles caractéristiques du réseau sous-membranaire formé par le cytosquelette (obtenues par AFM [145] et par microscopie électronique [102]) correspondent aux tailles des compartiments mesurés à partir des trajectoires (de très grande résolution temporelle) de protéines transmembranaires.

Cependant, ce modèle ne peut pas rendre compte de la compartimentation du mouvement des lipides [50], dépourvus de domaine intracellulaire.

1.1.4.2 Les "piquets transmembranaires"

Le modèle des "piquets transmembranaires" propose que des protéines transmembranaires, appelées "piquets", mobiles ou immobiles et pouvant se lier au cytosquelette, appliquent une gène stérique sur les protéines et les lipides. Ces obstacles joueraient alors le rôle de barrières de diffusion au sein même de la membrane.

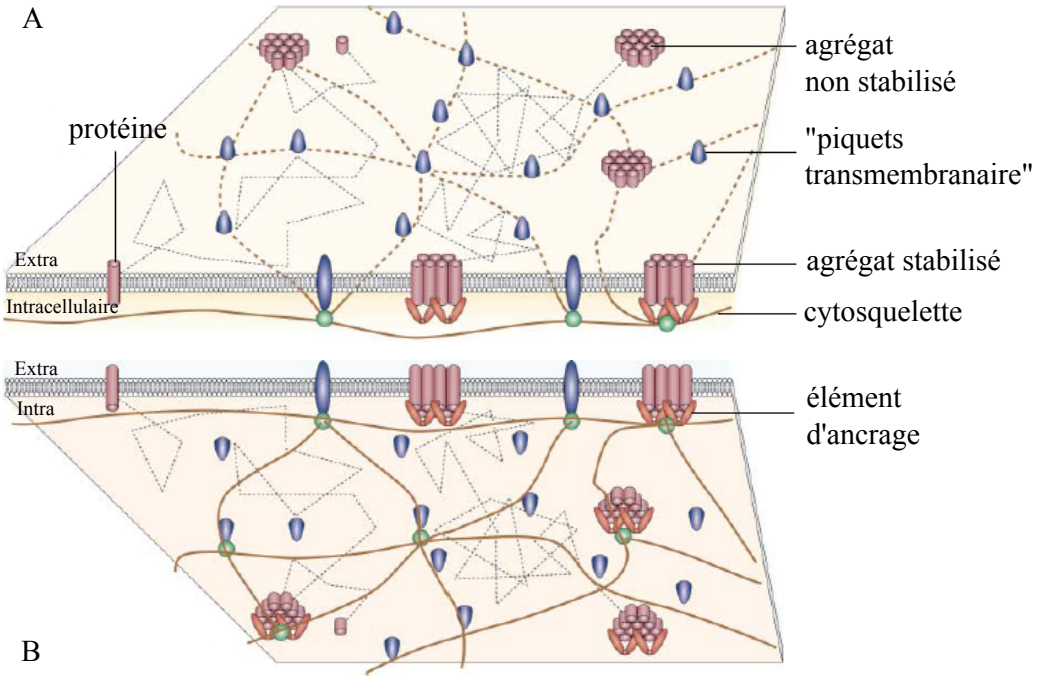

Figure 1.4 – *Représentation schématique des contraintes appliquées aux mouvements des protéines dans les membranes plasmiques. (A) Vue du dessus, (B) Vue du dessous. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de la restriction de la diffusion de protéines, parmi lesquelles : le réseau sous-membranaire du cytosquelette (lignes marron), des interactions avec des protéines d'ancrage sous-membranaires elles-mêmes stabilisées ou non, des piquets transmembranaires (bleu) immobilisés par une interaction directe ou indirecte (via un adaptateur, vert) avec le cytosquelette. Figure extraite de [28].*

Pour une description complète des deux modèles exposés ci-dessus, nous proposons de se reporter à la revue [76].

1.1.4.3 Les microdomaines membranaires

La composition de la membrane est très complexe ; les éléments du cytosquelette et les piquets transmembranaires ne suffisent pas à la décrire. En effet, les protéines et/ou les lipides peuvent également se regrouper et former des structures dynamiques variées, parmi lesquelles on peut citer :

- des complexes de protéines (tels des dimères, des pentamères),
- des agrégats de protéines,
- des domaines de composition lipidique particulière au sein desquels certaines protéines peuvent être regroupées (voir [139, 79] pour des revues sur les *lipid rafts*)

Ces microdomaines sont en perpétuel remaniement, se formant puis se dispersant au sein de la membrane, sur des échelles spatiales et temporelles diverses. Ces domaines perturbent la diffusion des protéines en agissant comme des obstacles ou des pièges sur leur passage (voir [133]).

Dans le modèle des microdomaines isolés, une molécule diffuse à l'intérieur ou à l'extérieur des microdomaines avec des coefficients de diffusion différents, les probabilités d'entrée et de sortie de ces domaines peuvent être asymétriques. Les microdomaines peuvent être considérés comme des portions de membrane de viscosités particulières. En revanche, dans les modèles de cloisonnement par le cytosquelette et par des piquets transmembranaires, la molécule diffuse librement dans un compartiment et peut sauter d'un compartiment à l'autre (voir fig. 1.3).

Notons qu'une méthode de mesure par FCS sur différentes échelles spatiales a récemment été développée [161]. Elle pourrait permettre de faire la distinction entre un confinement provenant d'un effet de cloisonnement et un confinement dû à la présence de microdomaines épars au sein de la membrane. La figure 1.3 illustre ces deux modèles.

En conclusion, retenons les deux généralités suivantes : (1) la membrane est constituée de protéines qui peuvent être isolées, agrégées ou regroupées au sein de microdomaines, (2) leur diffusion peut être libre ou alors influencée soit par des interactions spécifiques soit par des effets de gène stérique avec des éléments dans ou à proximité de la membrane.

1.2 Diffusion latérale du récepteur de la glycine

1.2.1 Organisation des membranes postsynaptiques

1.2.1.1 Interneurones et synapse chimique

Les cellules fondamentales du système nerveux sont appelées neurones. Leur rôle est de recevoir, propager et transmettre des influx électriques, provoqués par des stimuli et se propageant sous la forme d'une onde de dépolarisation appelée potentiel d'action. Chaque neurone est constitué d'un corps cellulaire ou soma qui contient, entre autres, le noyau et d'un certain nombre de prolongements qui rayonnent à partir de ce corps (fig. 1.5A). Il y a, d'une part, un seul axone qui véhicule les signaux sortants vers des cellules cibles éloignées (d'autres neurones ou des cellules effectives aux jonctions neuromusculaires) et d'autre part, de nombreux dendrites, ramifiés, qui permettent la réception des signaux. Le long des neurites (dendrites et axones), la propagation des potentiels d'action a lieu par dépolarisation locale de la membrane cellulaire. La transmission du signal d'un neurone à l'autre se fait au niveau de sites spécialisés appelés synapses. Une synapse peut être chimique, électrique ou mixte. Il existe de nombreux types de neurones qui diffèrent par leur morphologie (disposition, longueur de leur prolongement,...), leur fonction (moteurs, sensoriels), leur emplacement et le type de cellules qu'ils mettent en contact. Toutes nos expériences sont menées sur des interneurones de moelle épinière de rat.

Une synapse chimique (fig. 1.5B) est composée d'un bouton pré-synaptique, situé au niveau d'un axone, et de la membrane post-synaptique située sur un dendrite, séparés par une fente synaptique étroite (20-40 nm). La transmission du signal se fait par voie électrochimique : l'influx nerveux provoque la fusion des vésicules synaptiques à la membrane et ainsi la libération par exocytose de leurs neurotransmetteurs. Ces derniers diffusent dans la fente synaptique pour atteindre la membrane post-synaptique où ils peuvent alors se fixer sur un récepteur adapté. L'activation de ces récepteurs induit l'ouverture sous stimulation chimique de canaux ioniques. Ceci provoque alors un changement de potentiel de la membrane de la cellule cible qui va ensuite se propager vers une autre cellule

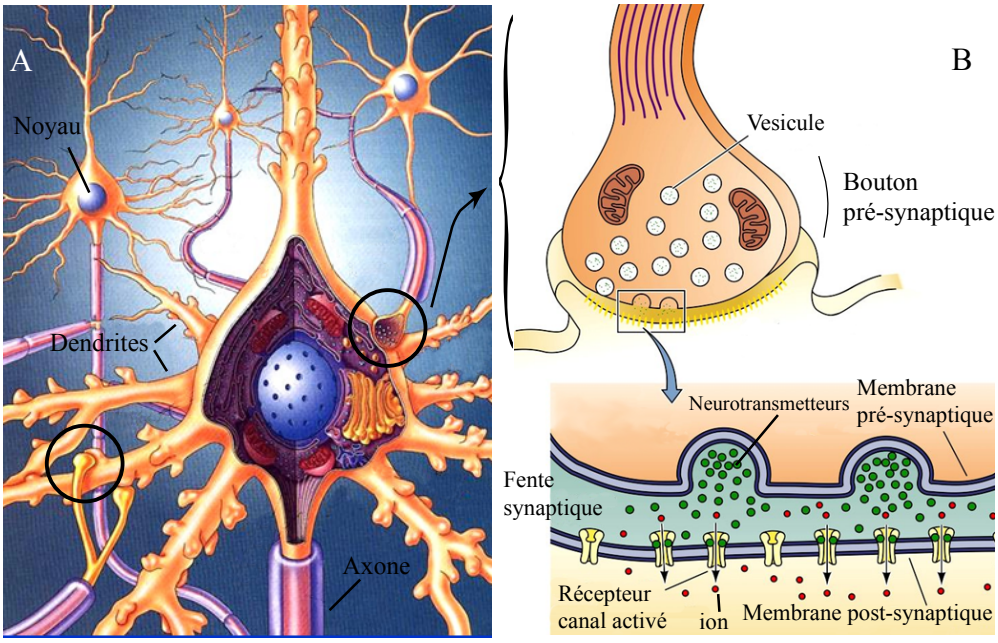

Figure 1.5 – *Du neurone (A) à la synapse chimique (B).*

cible. Les ions les plus importants pour la génération des potentiels d'action sont les ions Na^+, K^+ et Cl^-. La concentration en Na^+ est beaucoup plus faible dans la cellule qu'à l'extérieur, contrairement aux concentrations en K^+. Ce sont ces différences de concentration qui sont la source des flux ioniques responsables de la formation et de la propagation de potentiels d'action. Selon la nature des canaux activés, les synapses sont dites excitatrices ou inhibitrices : l'ouverture de canaux Na^+ tend à dépolariser la membrane post-synaptique et se produit au niveau des synapses dites excitatrices tandis que l'ouverture de canaux Cl^- ou K^+ au niveau des synapses inhibitrices tend à l'hyperpolariser [91]. C'est ensuite par sommation, dans l'espace et le temps, des signaux entrants, excitateurs et inhibiteurs, qu'un neurone donné propagera ou non un potentiel d'action dans son axone.

1.2.1.2 Récepteurs aux neurotransmetteurs inhibiteurs et excitateurs

Les récepteurs aux neurotransmetteurs sont repartis en deux grandes familles en fonction de leur mode d'action : les récepteurs ionotropiques et métabotropiques. Les récepteurs ionotropiques, ou récepteurs canaux, participent directement à la formation de canaux ioniques : la fixation de leur agoniste induit des changements de conformation permettant ainsi à certains ions de passer ; leurs réponses physiologiques sont très rapides ($\leq$ 1ms). Au contraire, l'activation des récepteurs métabotropiques induit des variations de conductance plus lentes à se mettre en place ($\geq$ 30ms) car elles s'effectuent de manière indirecte par un système de messagers intracellulaires.

Au niveau des membranes post-synaptiques, les récepteurs sont accumulés en faces des terminaisons pré-synaptiques contenant le neurotransmetteur correspondant. La formation de ces microdomaines membranaires fonctionnels est rendue possible grâce à des interactions avec des structures submembranaires. Le principal neurotransmetteur responsable de l'excitation est le glutamate. Il per-

met l'activation de récepteurs ionotropiques (tels les RAMPA (récepteurs au glutamate activés par le N-méthyl-D-aspartate), les RNMDA (récepteurs au glutamate activés par le α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole) et les récepteurs au kaïnate) et de récepteurs métabotropiques (mRGlu). L'inhibition synaptique rapide dans le système nerveux central est essentiellement assurée par deux neurotransmetteurs que sont la glycine et le GABA.

1.2.1.3 Structure des synapses inhibitrices

Les structures des synapses exitatrices et inhibitrices (fig. 1.6) , bien que composées des mêmes types d'éléments, diffèrent par la nature et l'organisation des protéines entrant dans leurs compositions respectives. Il conviendra de se reporter à la revue [151] pour une description complète des deux types de synapses.

Les synapses inhibitrices peuvent être GABAergiques, glycinergique ou mixtes. La composition de la membrane postynaptique, qu'elle soit enrichie en récepteurs du GABA (RGABA), de la glycine (RGly) ou d'un mélange des deux, est déterminée par l'identité des éléments présynaptiques [84].

La présence de molécules d'adhésion situées sur les bords de la synapse, telles les cadhérines, rend les membranes pré- et post- synaptiques solidaires. Participant à l'établissement de contacts "précoces", ces protéines ont un rôle important au cours du développement neuronal. De plus, leur domaine intracellulaire leur permet d'interagir avec d'autres protéines, telles les β-caténines, les connectant ainsi à des éléments du cytosquelette, en particulier aux filaments d'actine.

L'ancrage des récepteurs aux synapses se produit via des interactions directes (pour le RGly) ou indirectes (RGABA) avec des protéines submembranaires (denses aux synapses), elles-mêmes en liaison directe ou indirecte avec des éléments du cytosquelette. La géphyrine, qui sera décrite plus en détail par la suite (voir 1.2.2.2), est la protéine centrale des échafaudages postsynaptiques inhibiteurs.

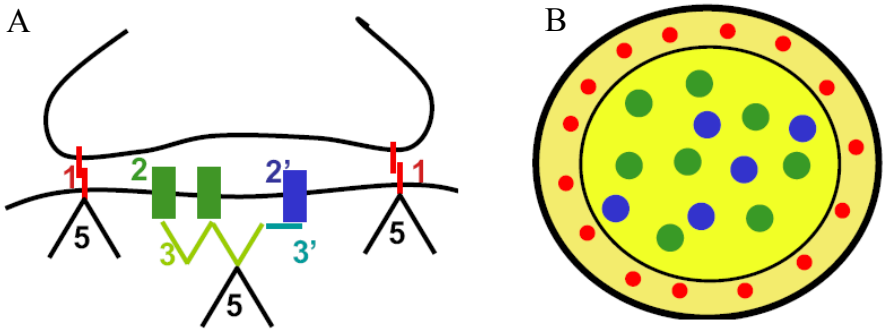

Figure 1.6 – *Organisation schématique de la synapse inhibitrice. A) Vue en coupe. Les cadhérines, molécules d'adhésions (1), sont présentes à la périphérie de la synapse ; les récepteurs de la glycine (2) et du GABA (2') lient la géphyrine (3) de manière directe et indirecte (via une molécule non identifiée (3')) respectivement. Les éléments du cytosquelette (5) interagissent avec les éléments postsynaptiques à différents niveaux. B) Vue du dessus. Figure extraite de [151].*

1.2.2 Stabilisation du récepteur de la glycine par la géphyrine

Le récepteur de la glycine et le récepteur du GABA sont les principaux récepteurs aux neurotransmetteurs inhibiteurs dans la moelle épinière. Le récepteur de la glycine est le premier récepteur pour lequel la formation de microdomaines concentrés en face des zones pré-synaptiques actives a été montrée [153]. Des expériences menées aussi bien sur des neurones en culture [72] qu'*in vivo* [48] ont démontré que la géphyrine est nécessaire à la localisation synaptique du RGLy. La capacité de la géphyrine à interagir avec le RGly et avec des éléments du cytosquelette [70] conduit à la considérer comme un pont permettant de stabiliser les RGly en les connectant au cytosquelette.

1.2.2.1 Structure du RGly

Le récepteur de la glycine est un récepteur ionotropique constitué de deux sous-unités α et de trois sous-unités β [55], ces dernières étant les seules à pouvoir interagir avec la géphyrine. La disposition relative des sous-unités β et α n'est pas connue. Chaque sous-unité est composée de quatre domaines transmembranaires (M1-M4). Les parois du canal chlore sont formées par les domaines M2. Les domaines M1, M3 et M4 assurent l'interface avec le milieu lipidique environnant (fig. 1.7). Quatre isoformes de la sous-unité α ont été identifiées dont trois présentes chez le rat (α_{1-3}). L'expression des sous-unités α_1 et α_2, présentes dans la moelle épinière, diffère au cours du développement [7]. La sous-unité α_2 est considérée comme étant la forme embryonnaire des sous-unités α des RGly. Exprimée dès le 14ème jour embryonnaire, elle est progressivement remplacée après la naissance par la sous-unité α_1 dont l'expression persiste chez l'adulte. Ainsi les sous-unités α_2 et α_1 sont dites respectivement néonatales et adultes. Quant à la sous-unité β, elle est détectée dès le 14ème jour embryonnaire. Son expression augmente après la naissance et persiste chez l'adulte.

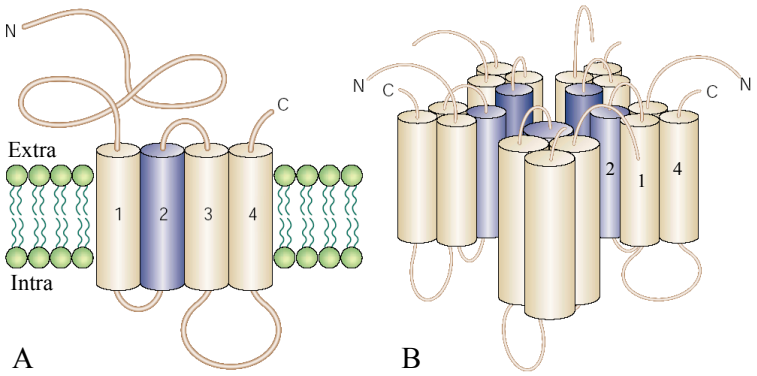

Figure 1.7 – *Structure pentamérique du récepteur de la glycine. A) Les sous-unités (ici α_1) sont composées de 4 domaines transmembranaires (M1-M4) avec une localisation extracellulaire du N-terminal. B) Formation du canal ionique par les domaines M2. Figure extraite de [103].*

1.2.2.2 Partenaires et structure de la géphyrine

La géphyrine, peptide de 93 kDa qui copurifie avec le RGly [113], est une protéine sous-membranaire [134]. La base moléculaire de l'interaction du RGly avec la géphyrine est une séquence de 18 acides aminés (le domaine βgb) située dans la boucle entre les domaines M3 et M4 de la sous-unité β

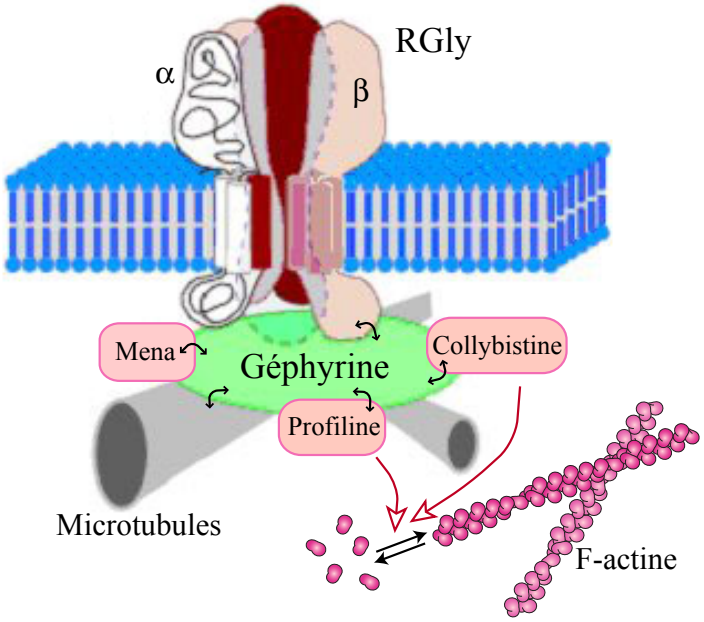

Figure 1.8 – *Illustration des interactions de la géphyrine avec le RGly d'une part, et avec des éléments (microtubules) et des protéines (Collybistine, Profiline, Mena/VASP) régulatrices du cytosquelette d'autre part.*

du récepteur [99,75]. Des méthodes protéomiques ont permis d'identifier diverses molécules capables d'interagir avec la géphyrine. Nous ne prétendons pas en faire une liste et un descriptif exhaustifs (pour plus de détails, on propose de lire la revue [151]) . Il s'agit plutôt ici de mettre en valeur ses interactions fortes avec le cytosquelette (fig. 1.8). D'une part, la géphyrine peut lier des dimères de tubuline [71], constituants à la base des microtubules. D'autre part, plusieurs de ses partenaires sont des protéines présentes sous les synapses inhibitrices et participant à la régulation du cytosquelette d'actine. La géphyrine est ainsi capable de lier : la collybistine [68] qui permet l'activation de protéines impliquées dans la régulation de la polymérisation des filaments d'actine ; la profiline [89], autre régulateur du cytosquelette d'actine [123] ; et des protéines de la famille Mena/VASP [52], impliquées dans le recrutement à la membrane des complexes actine/profiline.

La structure de la géphyrine (fig. 1.9A) résulte de la fusion de deux gènes codant des protéines, impliquées dans la biosynthèse d'un cofacteur du molybdène, qui sont fortement conservées de la bactérie à l'homme. Ces deux protéines, Mo**g**A et Mo**e**A, sont homologues aux domaines G et E respectivement. Ces deux domaines sont séparés par un domaine de liaison, domaine L. Des études de spectroscopie par rayons X (voir références dans [158, 8]), ont permis d'obtenir des informations sur la structure tridimensionnelle des domaines isolés de la géphyrine et des fonctions associées :

- le site de liaison de la sous-unité β est située dans le domaine E
- les domaines G et E forment respectivement des trimères et des dimères stables.

Si ces deux propriétés d'oligomérisation sont conservées chez la molécule entière, des réseaux de maille hexamérique (fig. 1.9B) pourraient être envisagés [74, 165].Toutefois, ce type de réseau n'a jamais été observé directement tandis que la géphyrine purifiée a été identifiée sous la forme de trimères associés à une forme monomèrique du domaine E [143, 135]. Quoi qu'il en soit, cette capa-

cité à former des trimères et éventuellement des dimères via des domaines distincts est impliquée dans la formation des agrégats de géphyrine, couplés au RGly dans la membrane postsynaptique. En effet, la formation de trimères de géphyrine est nécessaire pour avoir une localisation synaptique des RGly [8].

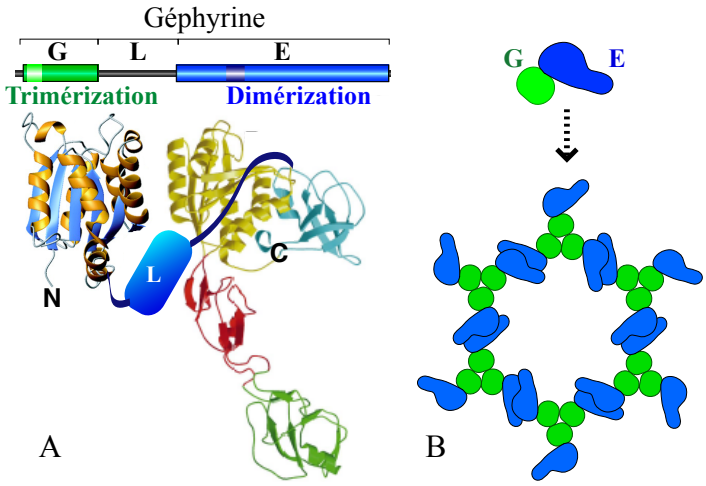

Figure 1.9 – *(A) Structure de la géphyrine. Capacité des domaines G et E à former des trimères et des dimères. (B) Modèle des agrégats de géphyrine sous la forme de réseaux de maille hexamérique. Schémas adaptés à partir de figures de C. Vannier.*

La géphyrine est codée par un gène unique. Cependant, son épissage alternatif peut conduire à la production de plusieurs variants (onze ont été identifiés) [115, 95, 118]. Chaque variant est défini par une combinaison particulière de séquences nucléotidiques (appelées cassettes). Les différents variants sont exprimés de façon variable dans la moelle épinière comme dans de nombreux tissus (cerveau, cœur,...). Si la plupart des isoformes de géphyrine sont capables d'interagir avec le RGly, elles diffèrent par leurs capacités à former des trimères et/ou des dimères. La distribution de ces isoformes sous les membranes postsynaptiques n'est pas connue. Néanmoins ces variants semblent avoir des fonctions différentes vis à vis de la stabilisation synaptique du RGly [95, 8]. La plupart des études menées jusqu'à présent (que ce soit pour étudier la distribution sub-cellulaire de la géphyrine ou ses interactions avec le récepteur ou encore sa dynamique,...) ont porté sur l'isoforme la plus abondante de géphyrine, la forme dite standard. Ce sera également le cas, sauf mention contraire, dans les expériences qui seront décrites dans ce manuscrit.

1.2.3 Échanges entre les compartiments synaptique et extrasynaptique

1.2.3.1 Importance de la diffusion latérale

Bon nombre de processus neuronaux, tels les mécanismes de la synaptogénèse (formation des synapses) ou ceux de la plasticité synaptique (comment l'efficacité synaptique peut être modifiée au cours du temps) impliquent des variations du nombre de récepteurs présents au niveau de la membrane postsynaptique (voir [88, 138, 15] pour revue). La machinerie cellulaire (orchestrant le renouvellement des récepteurs), la régulation de l'exocytose des récepteurs et de leur endocytose sont

impliquées dans les changements des quantités de récepteurs insérés dans la membrane plasmique. Cependant, ces mécanismes ne suffisent pas à eux seuls à expliquer les échanges entre synapses et compartiments intracellulaires d'une part et entre plusieurs synapses d'autre part. En effet, de nombreuses expériences, de microscopie optique, électronique et d'électrophysiologie, ont mis en valeur l'implication des mécanismes de diffusion latérale (i.e. dans la membrane plasmique) dans le contrôle du nombre de récepteurs aux synapses (voir [29, 152] pour revue). Deux types de rôle lui sont désormais prêtés :

1. la diffusion latérale est une étape permettant le renouvellement des récepteurs aux synapses (voir fig. 1.10A). En effet, plusieurs expériences ont montré que les échanges entre la surface et les compartiments intracellulaires se produisent principalement en dehors des synapses : en particulier, l'insertion des RGly se fait dans la membrane extra-synaptique [126]. Ainsi, la redistribution des RGly dans la membrane et leur accumulation aux synapses se produit via leur diffusion.
2. la diffusion latérale, couplée à la stabilisation opérée au niveau des synapses, est à l'origine d'un équilibre dynamique entre récepteurs synaptiques et extrasynaptiques (voir fig. 1.10B). Il est envisagé que les déplacements de cet équilibre soient un mécanisme de la plasticité synaptique.

1.2.3.2 Observation du mécanisme de diffusion-capture

Les expériences de suivi de particules individuelles ont permis de visualiser le mouvement de récepteurs au niveau de la molécule unique dans des cellules vivantes en temps réel (voir [152] pour revue). L'utilisation de billes de latex recouvertes d'anticorps a permis dans un premier temps de visualiser le mécanisme de diffusion-capture des RGly au niveau d'agrégats de géphyrine [96] : les récepteurs diffusent librement ou bien sont stabilisés de manière transitoire et réversible par leurs protéines d'ancrage. Cependant, la taille de ces billes ($\sim 0.5\mu$m de diamètre) ne permettait pas d'accéder au mouvement des récepteurs à l'intérieur des synapses (taille de la fente synaptique : 20 à 40 nm). Ce mécanisme de diffusion-capture est un trait commun aux récepteurs inhibiteurs et excitateurs [12]. Il a pu être visualisé à l'intérieur des synapses excitatrices pour les récepteurs du glutamate à l'aide de fluorophores organiques [147]. L'utilisation des nanocristaux semiconducteurs (leurs propriétés seront détaillées dans la partie 3) a permis d'apporter la preuve définitive de l'existence de ce mécanisme de diffusion-capture pour le RGly endogène au niveau des synapses [34] : (i) l'entrée des nanocristaux à l'intérieur des synapses est prouvée par des expériences de microscopie électronique (ii) en vidéomicroscopie, les RGly ont été observés en train d'entrer et sortir des synapses en temps réel, (iii) leur comportement diffusif est caractérisé en zones extrasynaptique et synaptique.

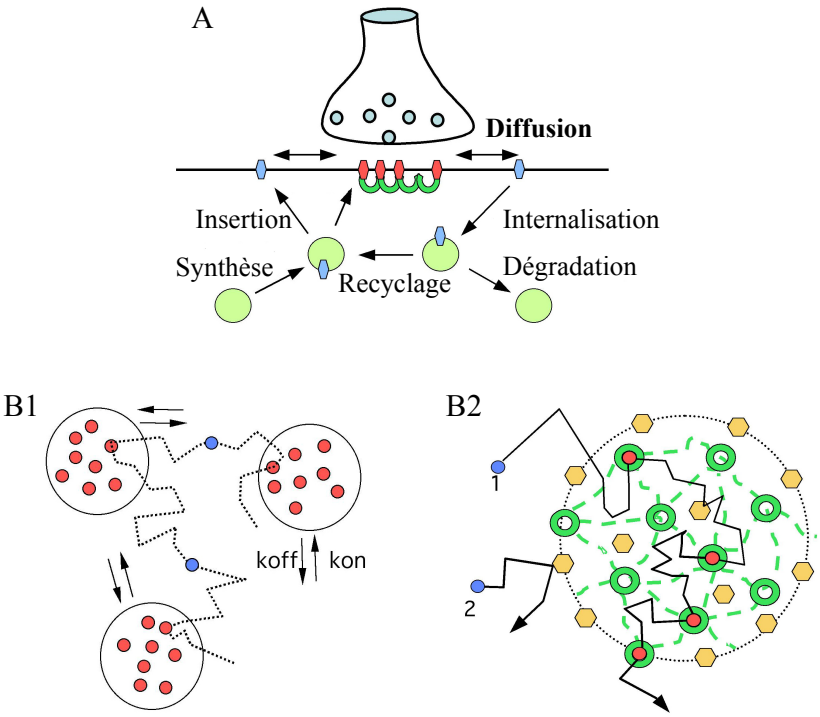

Figure 1.10 – *La diffusion latérale : vecteur d'échanges entre les compartiments synaptique et extrasynaptique. (A) Échanges de récepteurs entre la membrane plasmique et les compartiments intracellulaires. Les récepteurs insérés dans la membrane extrasynaptique (bleu) diffusent latéralement vers la synapse où ils sont stabilisés (rouge) par des protéines d'ancrage (vert). (B1) Modèle de diffusion-capture : les récepteurs extrasynaptiques (bleu) diffusent librement avant d'être stabilisés aux synapses (rouge, mouvement confiné). La distribution statistique des récepteurs dans la membrane est déterminée par les taux d'entrée (k_{ON}) et de sortie (k_{OFF}) de la synapse. (B2) Lorsqu'un récepteur entre dans la synapse (trace 1), il subit des interactions spécifiques avec les protéines d'ancrage (cercle vert), des interactions répulsives avec des éléments du cytosquelette (pointillé vert) ou des protéines transmembranaires (hexagone jaune). Ces dernières, de par leur encombrement stérique, peuvent d'ailleurs empêcher des récepteurs (trace 2) de pénétrer dans la synapse. Figures extraites de [152].*

1.3 Descriptif des expériences

La démarche expérimentale suivie pour toutes les expériences décrites dans ce manuscrit est résumée sur la figure 1.11.

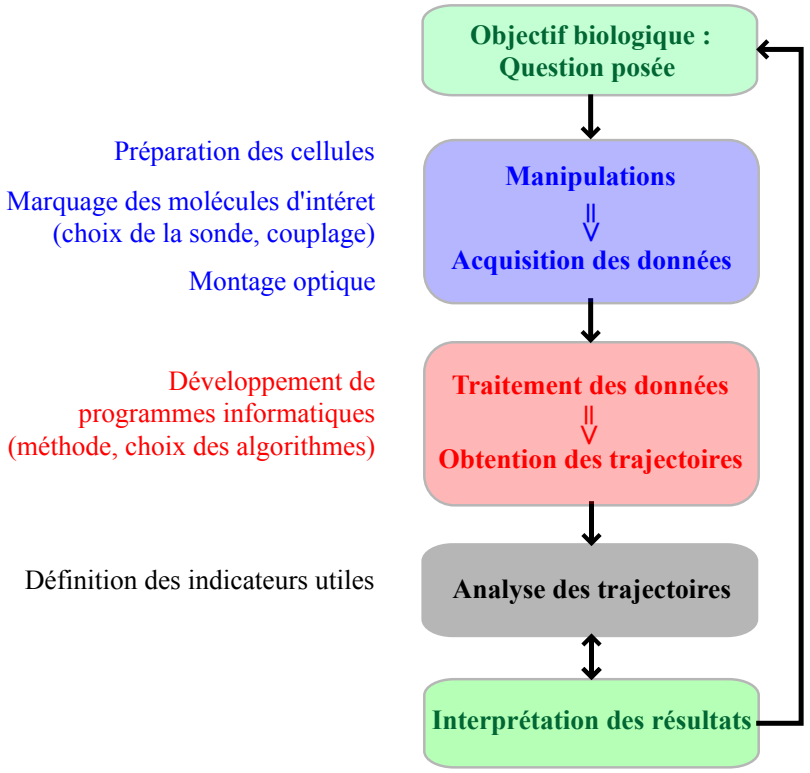

Figure 1.11 – *Les différentes étapes de la démarche expérimentale, appels successifs à la biologie, la chimie, la physique, les mathématiques appliquées,...*

1.3.1 Questions biologiques

L'article de Dahan et al. [34] peut être considéré comme l'article fondateur qui démontre l'utilité des nanocristaux dans l'étude, en milieu vivant, de la dynamique de protéines membranaires au niveau de la molécule individuelle. A la suite de ces travaux, l'équipe Optique et Biologie et le laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse ont poursuivi leur collaboration autour de plusieurs axes de recherche. Concernant l'étude de la dynamique du récepteur de la glycine, thématique dans laquelle mon travail de thèse s'insère, plusieurs sujets ont été ouverts.

La question générale d'ordre biologique qui est posée est : comment l'équilibre dynamique entre les RGly synaptiques et les RGly extrasynaptiques est-il régulé ? Les sources de régulation qui ont été examinées ou qui sont en cours d'étude concernent, entre autres, l'activité neuronale, les éléments du cytosquelette et la dynamique des agrégats de géphyrine au niveau post-synaptique. Dans cette lignée, des études menées sur les récepteurs au glutamate ont d'ailleurs montré que des modifications de l'activité neuronale [54] et des flux calciques [12] induisent des changements sur la dynamique latérale des récepteurs. Nous reviendrons sur quelques-uns de ces thèmes dans le chapitre 4. L'objectif

biologique central de mon travail à proprement parler concerne l'étude *in situ* de l'interaction RGly-géphyrine, objet du chapitre 5.

1.3.2 Obtention des données

Pour apporter des réponses à ces questions biologiques, la méthode choisie (sauf indication contraire) est l'étude de la dynamique des protéines d'intérêt au niveau de la molécule unique à l'aide de nanocristaux semiconducteurs.

1.3.2.1 Préparation des cellules

Les cultures d'interneurones de moelle épinière de rats se déroulent en trois étapes : la préparation des boîtes de culture, la dissection de la mœlle épinière et la dissociation des cellules. Une fois ces étapes terminées, on dispose de neurones répartis sur une lame de diamètre choisi (18 mm). A partir de la mise en culture, qui utilise des embryons de 14 jours, on identifie les neurones par leur nombre de jours passés *in vitro* (DIV). Selon les expériences, des neurones jeunes (3-4 DIV) ou adultes (âgés d'au moins 8 DIV) sont utilisés. C'est seulement à partir de 8 DIV que les sous-unités α du RGly sont dites adultes, lorsque les sous-unités α_1 sont largement majoritaires devant les sous-unités α_2. Notons que seuls les protocoles pour marquer α_1 sont utilisés en routine sur cellules vivantes.

L'utilisation de cellules issues de lignées immortelles est beaucoup plus simple. Il faut entretenir la lignée à un rythme très régulier et il suffit de les déposer sur une lamelle la veille ou l'avant-veille des expériences.

1.3.2.2 Marquage du RGly

Les nanocristaux semiconducteurs sont nos sondes de prédilection. Afin d'assurer la spécificité du couplage sonde-RGly, la méthode choisie consiste à passer par l'intermédiaire d'anticorps. Les anticorps, premier échelon du système immunitaire, sont des protéines capables de reconnaître très spécifiquement une molécule donnée (à l'aide d'une certaine suite d'acides aminés ou d'une certaine conformation tridimensionnelle caractérisant cette molécule) et de s'y fixer fortement. Ils constituent donc un outil puissant pour repérer une molécule donnée dans tous types d'expériences, on parle alors d'immunobiologie. Les procédés de couplage seront détaillés par la suite (voir 2.13).

1.3.2.3 Montage de vidéomicroscopie

Les expériences de videomicroscopie sont effectuées à l'aide du montage d'épifluorescence schématisé sur la figure 1.12. L'élément principal est un microscope inversé, disposant d'un objectif Olympus à immersion travaillant à l'infini, de grossissement x60 et d'ouverture numérique (ON) 1.45. Cette grande ouverture numérique permet à la fois de collecter le maximum de signal et de réduire la taille de la tâche de diffraction (qui varie en 1/ON). Il permet *a priori* de résoudre deux objets ponctuels séparés d'environ 250 nm.

La source d'excitation est conjuguée avec le plan focal arrière de l'objectif permettant ainsi d'éclairer la lame avec un faisceau collimaté. Quant aux systèmes de détection, ils sont conjugués avec la lame qui se trouve dans le plan focal avant de l'objectif. Les différents éléments optiques permettant d'effectuer ces conjugaisons ne sont pas représentés sur le schéma pour ne pas le surcharger.

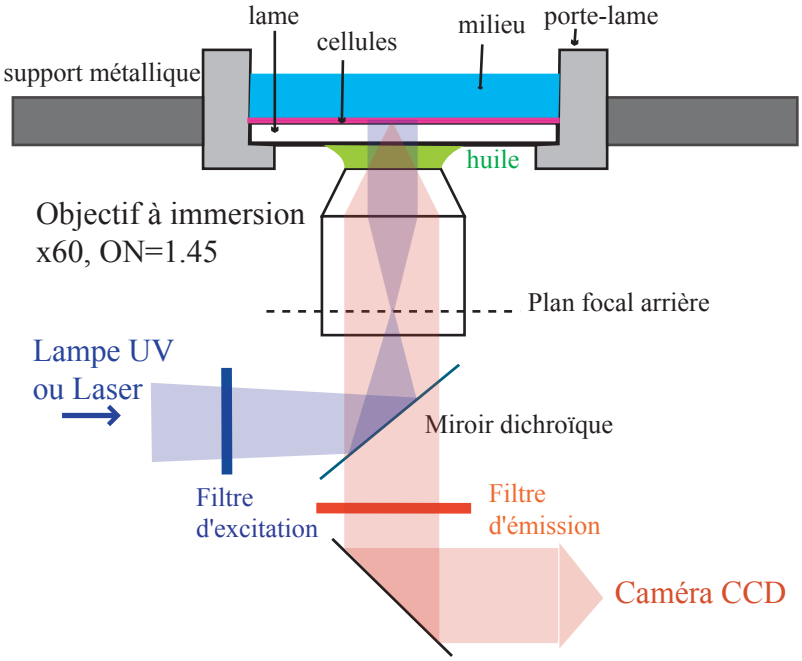

Figure 1.12 – *Schéma général du montage optique.*

Trois sources lumineuses différentes sont à disposition : une lampe UV à spectre large, un laser vert (532nm) et une lampe blanche. Les filtres (d'émission, d'excitation et miroir dichroïque) sont adaptés en fonction des lampes et des sondes utilisées.

Une camera vidéo Cohu, placée au niveau de la sortie de l'oculaire, permet une observation plus commode sur un moniteur vidéo. Une camera Micromax placée sur une sortie latérale du microscope permet d'acquérir des signaux avec une très grande sensibilité. Cette caméra Micromax 512 EBFT (Roper Scientific) est une caméra CCD de 512*512 pixels. La taille des pixels est 13μm de côté, ce qui correspond à une zone de 216.7 nm au niveau de la lame (avec l'objectif x60), elle est adaptée aux performances du reste du montage. Le capteur CCD, refroidi à -40°C, est de type *back-illuminated*. Il permet ainsi de détecter de très faibles signaux en réduisant le bruit. De plus, la caméra dispose d'un système de *frame transfert* : une fois l'acquisition effectuée, les électrons de chaque puit des N*M pixels du détecteur sont transférés sur N*M autres pixels situés au-dessous des premiers. La zone active N*M est choisie par l'utilisateur (au maximum 512*512). Ils sont ensuite lus pendant l'acquisition simultanée de l'image suivante et ainsi de suite. La lecture comprend principalement deux étapes, un basculement vers un registre de lecture suivi d'une numérisation du signal. Le taux de conversion analogique-numérique est de 1 MHz. Pour pouvoir effectuer une prise d'image en continue, il faut que le temps total de lecture soit inférieur au temps d'acquisition, sachant que le temps de lecture est d'autant plus long que la taille de l'image est grande. Par exemple, pour une image d'environ 128*128, le temps de lecture est d'environ 55 ms.

Pour pouvoir déterminer le comportement des récepteurs dans les conditions les plus proches possibles du cas *in vivo*, il est nécessaire de travailler à 37°C environ (pas au-dessus pour ne pas tuer les cellules). Deux systèmes de régulation de température sont présents (non montrés sur la figure 1.12) :

- un système de circulation d'eau est utilisé lors des étapes de marquage du RGly
- un système de circulation d'air permet de réguler la température à l'intérieur d'une enceinte adaptée au microscope, entourant le support métallique et l'objectif.

Ces deux systèmes ont été calibrés à l'aide d'une sonde en température pour évaluer leur temps d'amorçage et la température effective au niveau de la lamelle.

1.3.3 Obtention des résultats

Pour tirer des résultats à partir des données obtenues à l'issue de la prise d'image, un développement particulier a été fait au niveau du traitement et de l'analyse des données (voir chapitre 4), adapté spécifiquement aux techniques utilisées (en particulier aux propriétés d'émission des nanocristaux).

1.4 Objectifs et plan du manuscrit

Ce manuscrit a pour objectifs :

- de rendre compte de chaque étape de la démarche expérimentale (schématisée sur la figure 1.11) mise en place spécifiquement pour l'étude de la dynamique latérale du RGly au niveau de la molécule unique dans des cellules vivantes à l'aide de nanocristaux semiconducteurs
- de présenter les résultats obtenus au cours de mes trois années de thèse

Sur la figure 1.11, il apparaît clairement que mon travail de thèse se situe à l'interface entre de nombreux domaines de recherche. En effet, plusieurs disciplines, telles la physique (l'optique et la physique statistique, entre autres), les mathématiques appliquées et la chimie, sont mises au service de grandes interrogations biologiques. Un but annexe de ce manuscrit est aussi de mettre en lumière l'utilité, voire la nécessité, des collaborations qui ont été mises en place entre, d'une part, l'Équipe Optique et Biologie et, d'autre part, d'autres laboratoires aux compétences complémentaires : le Laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse, le CEREMADE, l'Équipe Optique Non Linéaire du LKB.

Les nanocristaux semiconducteurs en tant que nouveau type de sonde pour marquer des molécules individuelles sont décrits dans le chapitre 2. L'accent est mis sur leur grande photostabilitité, le fort rapport signal à bruit qu'ils permettent d'obtenir ainsi que leur propriété de clignotement. Leurs propriétés sont également mises en regard avec celles des autres sondes couramment utilisées.

Le chapitre 3 est consacré à l'automatisation du traitement et de l'analyse des données. D'une part, il décrit l'algorithme de suivi d'objets en mouvement dédié aux nanocristaux et les tests de validation qui rendent compte des performances de détection ainsi permises. Ce travail a été effectué en étroite collaboration avec Stéphane Bonneau [1] qui a notamment assuré le développement du logiciel de suivi dont les algorithmes sont présentés succinctement, à but pédagogique, dans ce manuscrit. D'autre part, la deuxième partie du chapitre 3 présente une vue d'ensemble des différentes méthodes existantes pour étudier des trajectoires individuelles et expose les développements qui ont été fait pour l'analyse des trajectoires correspondant aux mouvements des nanocristaux dans le cadre de l'étude de la dynamique du récepteur de la glycine.

[1] Thèse de Mathématiques Appliquées à l'Analyse d'Image réalisée au CEREMADE, Paris Dauphine, en collaboration avec le laboratoire Kastler Brossel

Les chapitres 4 et 5 présentent les résultats biologiques qui ont été obtenus grâce à l'utilisation de toute ou partie des techniques présentées dans les chapitres 2 et 3. Le chapitre 4 concerne l'étude de la dynamique du RGly dans des neurones matures et reporte, dans ce cadre, les résultats (publiés) obtenus par Cécile Charrier [2] [25]. Ma contribution à ces travaux a porté sur les méthodes d'analyse et les programmes correspondants développés pour le traitement des données. Les réponses biologiques apportées par ces études concernent l'influence du cytosquelette sur la dynamique du RGly. L'étude *in situ* de l'interaction RGly-géphyrine, dans des systèmes modèles, a été le cœur de l'aspect proprement biologique de ma thèse et fait l'objet du chapitre 5.

Enfin, le chapitre 6 est un chapitre de conclusion et d'ouverture. Il présente quelques-unes des perspectives envisagées aussi bien au niveau de l'étude de la dynamique de protéines membranaires qu'au niveau plus général du développement des techniques utilisées.

[2] En cours de thèse de Neuropharmacologie au Laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse, Département de Biologie de l'École Normale Supérieure, Paris 6

Chapitre 2

Les nanocristaux individuels comme marqueurs biologiques

Sommaire

2.1 Introduction **34**

2.2 Structure des nanocristaux de CdSe/ZnS **34**

2.2.1 Principe de fabrication 34

2.2.2 Structure fonctionnelle 35

2.2.2.1 Solubilisation 36

2.2.2.2 Fonctionnalisation 36

2.2.2.3 Toxicité 36

2.3 Propriétés optiques **37**

2.3.1 Structure et propriétés de fluorescence 37

2.3.1.1 Spectres d'absorption et d'émission 37

2.3.1.2 Rendement quantique et photostabilité 39

2.3.1.3 Effet de clignotement 39

2.3.2 Mesures expérimentales sur nanocristaux commerciaux 41

2.3.2.1 Acquisition des images 41

2.3.2.2 Traitement des données 42

2.3.2.3 Résultats 47

2.4 Marquage des molécules étudiées **52**

2.4.1 Stratégies 52

2.4.1.1 Couplage RGly endogène-nanocristal 52

2.4.1.2 Couplage RGly exogène-nanocristal 53

2.4.2 Unicité du marquage 54

2.4.3 Avantages comparés des sondes biologiques 56

2.4.4 Influence de la sonde sur la diffusion latérale dans les membranes . 57

2.4.4.1 Diffusion de lipides dans des membranes modèles 57

2.4.4.2 Comparaison avec la membrane plasmique 61

2.1 Introduction

Les progrès scientifiques et technologiques réalisés ces 20 dernières années ont permis de réduire la taille des structures semiconductrices pour atteindre désormais des dimensions de l'ordre du nanomètre suivant les trois directions de l'espace. Du fait du confinement quantique qui en résulte, les niveaux d'énergie des porteurs de charge sont répartis suivant un spectre discret, ce qui rend ces nano-objets comparables à des atomes. C'est tout d'abord dans le domaine de l'optoélectronique que les propriétés de fluorescence particulières de ces nanocristaux (aussi appelés QDots, pour *Quantum Dots*) ont ouvert de nombreuses voies de recherches. Citons, par exemple, leur incorporation dans des matériaux pour réaliser des structures mixtes organique/inorganique qui a permis de réaliser des diodes électroluminescentes très monochromatiques et très brillantes (voir références dans [154]).

Si leur utilisation dans le domaine de la biologie a rapidement été envisagée, l'obtention de méthodes de synthèse et de solubilisation adaptées a nécessité de nombreux développements. La première démonstration de la possibilité d'utiliser les nanocristaux comme marqueurs biologiques est faite en 1998. Les équipes de P. Alivisatos [21] et de S. Nie [24] ouvrent ainsi la voie d'un champ d'application des nanocristaux qui ne cesse depuis de se développer. Dès lors, les QDots ont été employés dans de nombreuses expériences biologiques avec succès, comme par exemple l'imagerie du développement d'embryon de Xenopus [40] , l'imagerie multiphoton sur animal vivant [82, 83] , leur utilisation comme biosenseurs (basés sur des phénomènes de FRET (pour *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) de l'environnement de molécules biologiques [93], le codage optique multicolore de biomolécules [57].

Plus particulièrement, les progrès réalisés dans la détection optique de particules uniques ont permis d'étudier les propriétés de fluorescence de nanocristaux individuels [46], et d'entrevoir ainsi le fort potentiel des QDots en tant que sondes pour des expériences en molécules uniques. Ce chapitre a justement pour but d'expliquer en quoi les QDots sont des marqueurs particulièrement adaptés à ces expériences de suivi et de décrire comment nous les avons employés pour étudier la diffusion membranaire du récepteur de la glycine.

Les nanocristaux que nous employons dans nos expériences sont des solutions colloïdales de semiconducteurs de type II-IV composés d'un cœur de CdSe recouvert d'une coquille de ZnS. Leur structure est décrite dans la partie 2.2. Dans la partie 2.3, nous présentons leurs propriétés de fluorescence remarquables et les mesures effectuées sur les nanocristaux commerciaux dont nous nous servons. Enfin, leur utilisation pratique pour marquer des molécules biologiques individuelles pour des expériences de suivi de particule unique fait l'objet de la partie 2.4. Dans cette partie, les avantages et inconvénients des différentes sondes sont également comparés.

2.2 Structure des nanocristaux de CdSe/ZnS

2.2.1 Principe de fabrication

La synthèse par décomposition de précurseurs organo-métalliques permet d'obtenir des nanocristaux homogènes en taille et en forme et de rendement quantique élevé. Cette technique a été développée dans les années 90 par les équipes de M. Bawendi (MIT) [105], P. Alivisatos (Berkeley) [2] et P. Guyot-Sionnest (Université de Chicago) [62]. Après injection des précurseurs, le diméthylcadmium et le séleniure de trioctylphosphine, dans une solution d'oxyde de trioctylphosphine (TOPO) et d'hexa-

decylamine, chauffé à ∼300°C, des noyaux de CdSe se forment rapidement. On les laisse croître jusqu'à ce qu'ils aient atteint la taille désirée. L'ajustement des paramètres de la synthèse (température, concentrations des différentes espèces atomiques, précurseurs chimiques et temps de réaction) a finalement permis d'obtenir des particules sphériques de CdSe ayant un rayon moyen contrôlé entre 1 et 10 nm dont la dispersion en taille est inférieure à 5% [146].

A l'issue de cette première étape de synthèse, le rendement quantique de ces nanocristaux de CdSe est faible (de l'ordre de 10%). En effet, des recombinaisons non-radiatives de l'état excité peuvent se produire à la surface du cœur qui n'est pas entièrement passivée par les ligands de synthèse (des molécules de TOPO sont adsorbées sur 40% à 60% de la surface tout au plus). Un rendement quantique élevé est obtenu à l'issue d'une deuxième étape dite de passivation. La passivation consiste à déposer autour du cœur de CdSe une ou deux monocouches d'un semiconducteur de plus grande bande interdite, du ZnS dans notre cas (voir fig. 2.1a). Cette coquille, d'ailleurs elle-même partiellement passivée par les ligands de synthèse, joue le rôle de barrière entre les porteurs du cœur et le milieu extérieur et réduit ainsi les processus de recombinaison non-radiative. Pour indication, le rendement quantique des solutions de nanocristaux de CdSe/ZnS ainsi obtenues peuvent atteindre 85% [122].

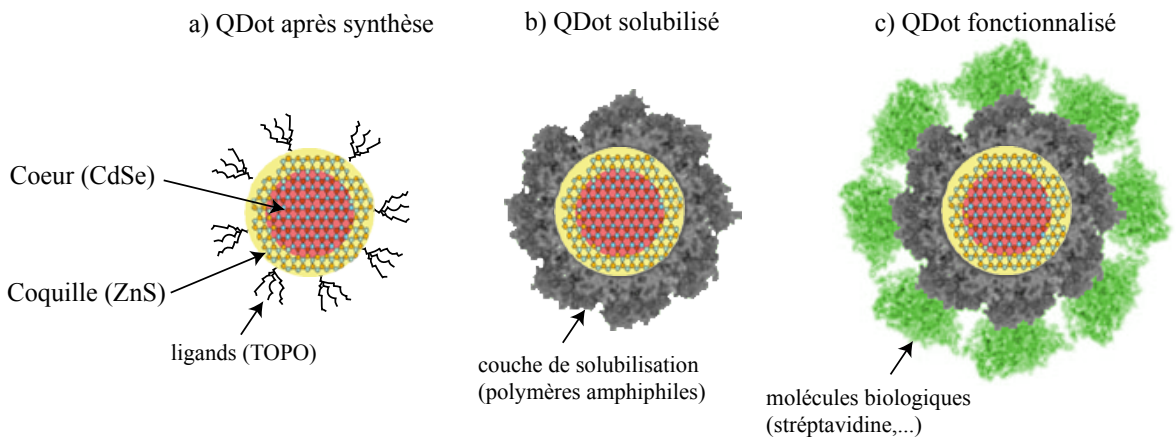

Figure 2.1 – *Structure d'un nanocristal (a) après synthèse en milieu organique (taille du cœur : quelques nm), (b) soluble en milieu aqueux, (c) conjugué à des biomolécules (taille finale de la particule : 15-20nm de diamètre).*

2.2.2 Structure fonctionnelle

Les nanocristaux obtenus à l'issue de la synthèse sont en solution dans des milieux organiques. Ils ne sont pas solubles dans des milieux polaires. Pour les rendre biocompatibles c'est à dire pour disposer de solutions de nanocristaux dispersés et stables en milieux aqueux, et préparer leur conjugaison avec des bio-molécules, de nombreuses stratégies ont été développées (voir [3,100] pour revue). Nous ne prétendons pas en faire une liste exhaustive, mais plutôt présenter les grands principes de celles les plus utilisées actuellement et en particulier de celle qui a été retenue pour leur commercialisation (Quantum Dot Corporation[1]).

[1]Fondé en 1998, Quantum Dot Corporation a été acheté par Invitrogen en 2005.

2.2.2.1 Solubilisation

Une modification chimique de la surface des nanocristaux est nécessaire pour les rendre solubles dans l'eau. Deux types de manipulation des ligands organiques hydrophobes présents à la surface des nanocristaux ont été principalement développées :

- soit ces ligands hydrophobes sont remplacés par des ligand bifonctionnels. Ces derniers se lient d'un côté à la coquille du nanocristal (via un groupe thiol (-SH)) et engendrent de l'autre côté des répulsions électrostatiques (via les éléments chimiques présents à leur autre extrémité, comme un groupe -COO^-), assurant ainsi la solubilité dans l'eau [24]. La stabilité à long terme de ces solutions est cependant limitée par la faible force du lien entre les groupes thiol et la couche de ZnS.
- soit les ligands hydrophobes sont conservés mais une encapsulation des nanocristaux par une couche de molécules amphiphiles est réalisée. La partie hydrophobe de ces molécules se lie aux ligands tandis que la partie hydrophile assure la solubilité dans le solvant aqueux. Plusieurs types de molécules peuvent être utilisés à cet effet, comme des polymères amphiphiles [164, 111] ou des micelles de phospholipides [40]. Cette méthode permet d'obtenir des particules en solution stables dans le temps. En revanche leur taille finale est relativement élevée (jusqu'à 25 nm de diamètre [111]). Les particules commercialisées par QDot Corp. sont des nanocristaux tapissés par des polymères amphiphiles (voir fig. 2.1b).

2.2.2.2 Fonctionnalisation

Plusieurs approches ont permis de lier les nanocristaux solubilisés à des molécules biologiques avec succès. Citons celles basées sur :

- l'adsorption, de petites molécules (tels des oligonucléotides [87]) pouvant être adsorbées (de manière non spécifique) à la surface des nanocristaux.
- des interactions électrostatiques, la modification de protéines (qui sont alors chargées positivement) permet de les faire interagir avec la surface (chargée négativement) des nanocristaux [92].
- des couplages par liaisons covalentes (voir fig. 2.1c).

Cette dernière méthode permet d'obtenir des liaisons fortes et stables dans le temps avec des molécules biologiques variées (références dans [3, 100]). Elle repose sur des réactions de bioconjugaison standards entre les groupes réactifs présents sur la molécule biologique et ceux en surface des nanocristaux à l'issue de leur solubilisation (groupes carboxyle -COOH, mercapto -SH ou amine -NH_2). Notons que, dans la plupart des cas, les fonctions biologiques des molécules ne sont pas modifiées suite à leur liaison aux nanocristaux.

Selon les cas, le couplage des nanocristaux aux molécules biologiques d'intérêt, celles que l'on souhaite observer, se fait en une ou plusieurs étapes de fonctionnalisation. Pour nos études, plusieurs étapes sont nécessaires, elles sont détaillées dans la section 2.4.

2.2.2.3 Toxicité

La question de la toxicité des nanocristaux pour les applications biologiques doit être soulevée du fait de la présence d'éléments comme le cadmium et le sélénium. Plusieurs études [36, 69] indiquent

que les effets cytotoxiques des nanocristaux de CdSe sont augmentés, d'une part, par le relarguage de Cd^{2+} (par exemple, suite à une exposition forte aux UV), et d'autre part, par leur agrégation.

En ce qui nous concerne, aucune toxicité n'a été détectée lors de l'utilisation, dans des conditions standards, des nanocristaux sur cellules vivantes [66]. Ceci provient de deux facteurs limitant la cytotoxicité : (1) sous les conditions de synthèse et de solubilisation précédemment décrites, les couches de ZnS et de molécules hydrophiles protègent le cœur de CdSe, réduisant alors les phénomènes d'oxydation ; (2) les nanocristaux sont utilisés en faible concentration, ils sont dispersés pour une détection au niveau de la particule individuelle.

Par ailleurs, pour des applications dans le domaine du diagnostic médical, ces effets restent à étudier pour s'assurer de l'absence de toxicité sur l'animal vivant ou sur l'homme.

2.3 Propriétés optiques

Seules sont rapportées ici les propriétés de fluorescence qui servent lors de l'utilisation des nanocristaux pour marquer des molécules biologiques dans des expériences de suivi de molécules uniques. Entre autres, leur capacité à émettre des photons individuels ne sera pas abordée.

2.3.1 Structure et propriétés de fluorescence

2.3.1.1 Spectres d'absorption et d'émission

Les propriétés spectrales d'un nanocristal semiconducteur proviennent à la fois de la nature des éléments et de la taille de son cœur. De par sa taille intermédiaire entre un solide et un atome, le spectre d'absorption d'un nanocristal est proche de celui d'un solide tandis que son spectre d'émission se rapproche de celui d'une assemblée d'atomes.

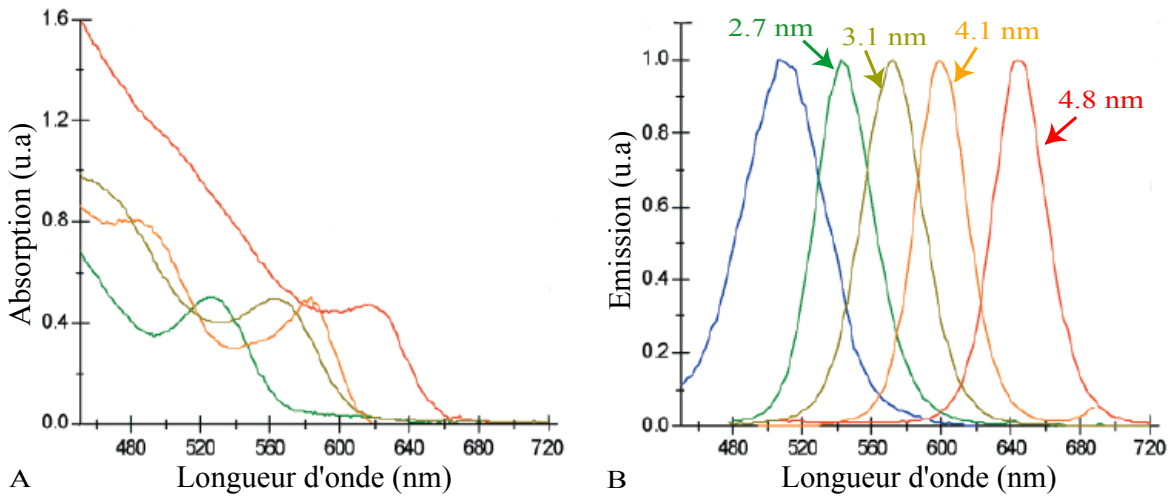

Figure 2.2 – *Spectre d'absorption (A) et d'émission (B) pour différents nanocristaux de type CdSe/ZnS émettant du bleu au rouge, pour les tailles de cœur indiquées, de l'ordre de 2 à 5 nm . D'après [51].*

Tout matériau semiconducteur est caractérisé par une bande d'énergie interdite (E_g de l'ordre de

1eV). Les solides massifs, peuvent absorber de la lumière dès lors que son énergie E_e est supérieure à E_g. Les nanocristaux ont un comportement proche de celui-ci ; ils absorbent toute longueur d'onde d'excitation inférieure à une longueur d'onde caractéristique (correspondant à une énergie d'excitation élevée, typiquement à plus d'1 eV au-dessus de E_g)(voir fig. 2.2A).

Lors de cette excitation, une paire électron-trou, appelée exciton, est crée. Lorsque l'exciton est confiné en deçà de son orbite de Bohr, les porteurs de charges sont dans un régime de confinement fort où les effets de confinement quantique sont prépondérants sur les effets de l'interaction coulombienne. La désexcitation radiative de l'exciton fait alors intervenir les niveaux d'énergie fondamentaux, discrétisés, de l'électron et du trou (fig. 2.3A). C'est le cas pour les nanocristaux que l'on utilise, la taille de leur cœur de CdSe étant inférieure au rayon de Bohr égal à 5.6 nm. Finalement, une solution de nanocristaux présente un spectre d'émission centré autour d'une valeur proche de la plus grande longueur d'onde d'absorption, étroit avec une largeur à mi-hauteur d'environ 20-30 nm et symétrique (voir fig. 2.2B).

La longueur d'onde d'émission est directement liée à la taille du cœur de CdSe : plus l'exciton est confiné dans un petit volume, plus son énergie est élevée et plus sa longueur d'onde d'émission est basse. Avec des nanocristaux de CdSe de diamètre de cœur de 1 à 5 nm, on dispose alors de sondes fluorescentes dont l'émission varie entre 480 nm et 650 nm environ. Notons que l'utilisation d'autres matériaux permet d'explorer l'infrarouge.

De par les propriétés des spectres d'absorption et d'émission respectivement, il est envisageable d'exciter simultanément, avec une même source, différents types de nanocristaux et d'éviter tout phénomène de recouvrement lors d'une détection multi-couleurs. De plus, une large gamme de source d'excitation est utilisable (de l'UV au visible).

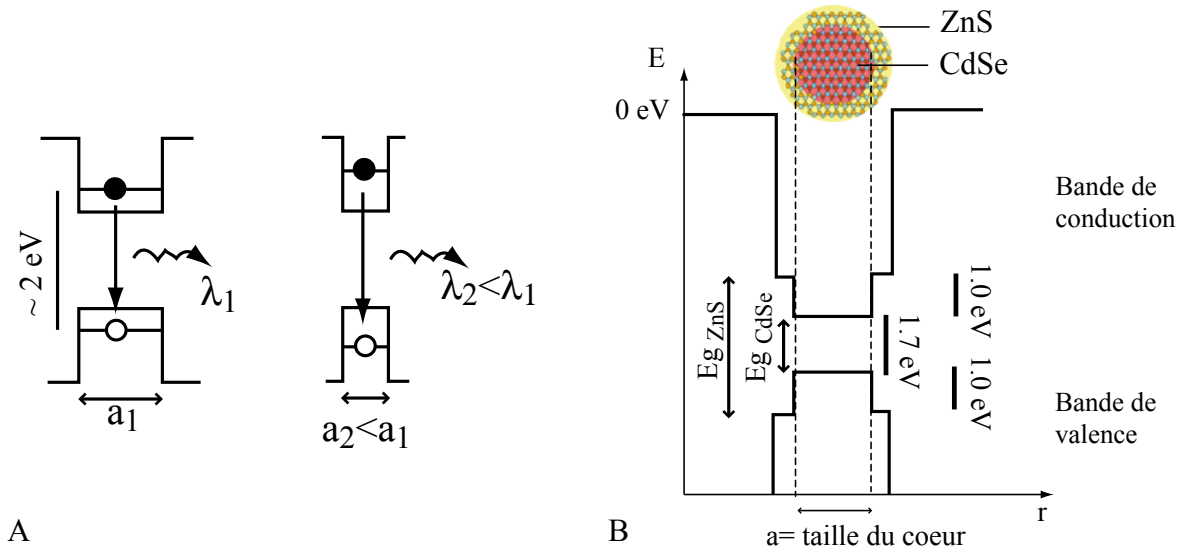

Figure 2.3 – *(A) Vue schématique de la désexcitation radiative de l'exciton en fonction de la taille du cœur, (B) Profil des potentiels électroniques de la bande de valence et de la bande de conduction d'un nanocristal CdSe/ZnS*

2.3.1.2 Rendement quantique et photostabilité

Tous les processus de recombinaison ne sont pas radiatifs. La probabilité que l'exciton créé se désexcite en émettant un photon défint le rendement quantique χ :

$$\chi = \frac{k_{\text{rad}}}{k_{\text{rad}} + k_{\text{nrad}}} \tag{2.1}$$

où k_{rad} et k_{nrad} sont les taux de recombinaison radiative et non-radiative respectivement.

La coquille de ZnS ($Eg_{\text{ZnS}} > Eg_{\text{CdSe}}$) qui recouvre le cœur de CdSe des nanocristaux permet de mieux isoler l'exciton de l'environnement extérieur (voir fig. 2.3B). En réduisant les processus de recombinaison non radiative, elle permet d'obtenir des rendements quantiques élevés (χ>50%). Cependant, ces rendements quantiques sont similaires (voire légèrement plus faibles) à ceux des fluorophores organiques.

En régime linéaire et à faible intensité d'excitation, le nombre de photons de fluorescence N_f émis en un temps τ peut être exprimé comme suit [33] :

$$N_f = \chi s_e \frac{I\lambda}{hc}\tau$$

avec χ le rendement quantique, λ la longueur d'onde d'émission, h la constante de Planck, c la célérité de la lumière, I l'intensité d'excitation et s_e la section efficace d'absorption. La plus grande fluorescence des nanocristaux par rapport aux fluorophores usuels provient de leur grande section efficace d'absorption (de l'ordre de 10^{-15} cm^2, 10 à 100 fois plus élevée que celle des molécules organiques).

De plus, contrairement aux fluorophores, sujets à des transformations chimiques (comme des oxydations) qui leur font perdre leurs propriétés de fluorescence suite à une exposition à la lumière, les nanocristaux ont une bien meilleur photostabilité. Cette propriété provient vraisemblablement d'une part de la nature cristalline des nanocristaux et d'autre part de la protection du cœur opérée par la présence de la coquille.

2.3.1.3 Effet de clignotement

L'observation de nanocristaux isolés permet d'observer que leur fluorescence alterne entre un état allumé et un état éteint où très peu de photons sont émis [109].

Origine physique du clignotement

Plusieurs expériences (voir références dans [16]) ont permis d'accéder, par différentes méthodes, à la charge d'un nanocristal. Ainsi, il a été démontré que le clignotement d'un nanocristal reflète ses passages successifs entre un état neutre (état allumé) et un état chargé positivement (état éteint). Un nanocristal éteint est un nanocristal ionisé. Deux types de mécanismes d'ionisation (voir fig. 2.4) ont été principalement proposés :

- une ionisation Auger dans laquelle l'énergie de recombinaison d'une première paire électron-trou (2 eV) est cédée à l'électron d'une seconde paire. Celui-ci peut alors être éjecté hors du cœur car l'énergie potentielle de confinement de la coquille de ZnS est de 1 eV.
- une ionisation par effet tunnel d'un porteur du cœur vers des pièges extérieurs (de même énergie que l'énergie de l'état confiné).

Suite à cette ionisation, l'électron éjecté est accueilli par un ensemble de pièges accepteurs, extérieurs au cœur. L'extinction du nanocristal cesse dès lors qu'un électron retourne dans le cœur. Un effet

tunnel d'un électron de l'extérieur vers le cœur est généralement considéré pour expliquer la neutralisation du nanocristal.

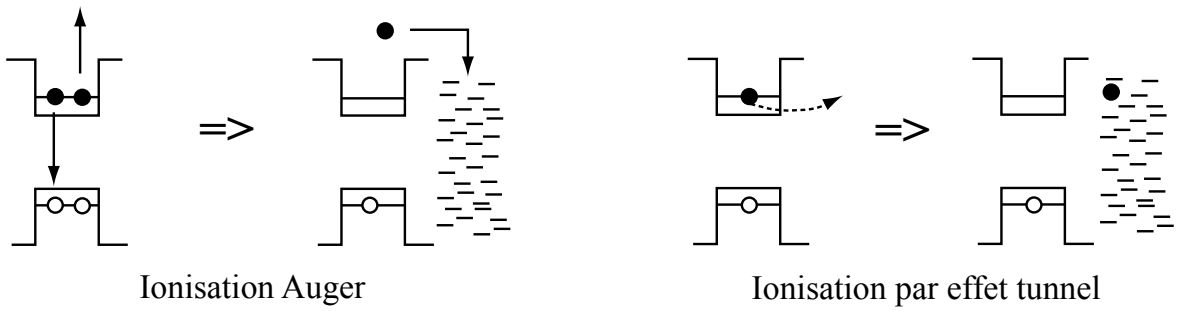

Figure 2.4 – *Vue schématique des deux processus de ionisation envisagés pour expliquer le passage d'un nanocristal d'un état allumé à un état éteint.*

Statistiques de clignotement

La durée des périodes noires et des périodes brillantes suivent des statistiques originales. Par exemple, leurs distributions cumulatives peuvent être ajustées, du moins aux temps courts, par des lois de puissance de la forme $P(\tau) \propto 1/\tau^{\mu}$, avec $\mu < 1$; et la fluorescence des nanocristaux est non ergodique [20]. Pour plus de détails, nous proposons de se reporter à la thèse de Xavier Brokmann dans laquelle se trouve une description complète des effets statistiques et des origines physiques du clignotement [16].

Retenons simplement que, indépendamment de l'intensité d'excitation ou de la température, les nanocristaux sont caractérisés par ce phénomène de clignotement et que l'on ne peut prévoir ni la durée ni la fréquence de ces périodes noires.

Suppression du clignotement

Hohng et al. [63] ont obtenu une quasi-suppression du clignotement de nanocristaux individuels en les mettant en présence de BME (β-mercaptoethanol) ou de DTT (dithiothreitol). Pour l'instant, seuls ces traitements, cytotoxiques, incompatibles avec de l'imagerie sur cellules vivantes, permettent de le faire. Cependant, ces expériences permettent d'envisager de pouvoir supprimer, à l'avenir, l'effet de clignotement par des traitements chimiques appropriés, biocompatibles, de la surface des nanocristaux.

Nous verrons par la suite quelles contraintes le clignotement entraîne sur le suivi des particules et la méthode spécialement développée pour les pallier. Par ailleurs, on tire tout de même profit de cette propriété puisqu'elle nous permet de nous assurer de l'unicité des nanocristaux observés (voir 2.4.2).

2.3.2 Mesures expérimentales sur nanocristaux commerciaux

Le but des mesures qui vont être décrites ci-dessous est de mesurer les propriétés optiques des nanocristaux semiconducteurs commerciaux dans les conditions d'utilisation lors des expériences de suivi de molécules uniques. Notre attention se porte sur le niveau de fluorescence qu'ils émettent au cours du temps pour évaluer d'une part le rapport signal à bruit et d'autre part les statistiques des durées des états allumés et éteints.

2.3.2.1 Acquisition des images

Préparation des nanocristaux

Les mesures sont effectuées à partir d'échantillons composés de nanocristaux individuels fixes sur une lamelle. Les nanocristaux sont déposés sur une lamelle, préalablement nettoyée au *plasma-cleaner*, à l'aide d'une tournette. L'ajustement des paramètres de la tournette (accélération, vitesse et temporisation) permet d'obtenir une répartition uniforme des nanocristaux. Le réglage de leur densité surfacique est obtenu en jouant sur la dilution (dans de l'eau) de la solution commerciale. Une concentration de l'ordre du nanomolaire donne une densité finale satisfaisante.

Le montage utilisé est celui représenté sur la figure 1.12 (page 30). Une fois la lamelle disposée sur le microscope, on dépose 500μL d'eau pour la recouvrir dans le but de se placer dans des conditions les plus proches possibles des expériences sur cellules vivantes (toujours en présence de milieu). En effet, lorsqu'un nanocristal est proche d'une interface diélectrique, son rayonnement est dirigé préférentiellement vers le milieu d'indice plus élevé. Ainsi le signal recueilli sera plus faible si la lamelle est recouverte d'eau ($n_{verre} \approx 1.5$, $n_{eau} \approx 1.33$) qu'en présence d'air ($n_{air} \approx 1$). Pour donner un ordre de grandeur, X. Brokmann et al. mesurent, dans des conditions similaires aux nôtres, une chute de l'intensité totale détectée d'un facteur 2.2 après suppression de l'interface air/verre [18].

Excitation

La lampe UV suivi d'un filtre *525AF45*, pour une excitation dans le vert des nanocristaux, reproduit les conditions d'excitation sur cellules vivantes. Un laser vert à 532 nm est utilisé pour faire une estimation semi-quantitative du nombre de photons émis par les nanocristaux en fonction de la puissance d'excitation. Le laser est focalisé dans le plan focal arrière de l'objectif, ce qui permet d'éclairer le plan objet avec un faisceau collimaté (voir le schéma du montage page 30). La comparaison des niveaux de signal émis par les nanocristaux, suite à une excitation par le faiseau laser d'une part, et suite à une illumination avec la lampe UV d'autre part, nous permet également d'estimer l'intensité d'excitation de la lampe UV.

Pour visualiser les profils d'excitation, on utilise des lamelles recouvertes uniformément par des colorants. La figure 2.5 présente les profils, normalisés à 1, obtenus au niveau de la lamelle. La lampe UV donne un éclairage uniforme sur toute la zone de détection. L'intensité du faisceau du laser, $I_{\text{laser}}(x, y)$, suit un profil gaussien 2D tel que :

$$I_{\text{laser}}(x, y) = A.\exp\left(-\frac{x^2}{2s_x^2} - \frac{y^2}{2s_y^2} \right)$$

On estime $s_x \approx 7.9$ μm et $s_y \approx 8.2\mu$m. Ainsi $s_x \approx s_y$, le profil peut être considéré comme isotrope. Dans la zone d'acquisition, au centre du faisceau et d'une taille d'environ 90*90 pixels, le niveau d'excitation est compris entre 50 et 100% de la valeur maximale.

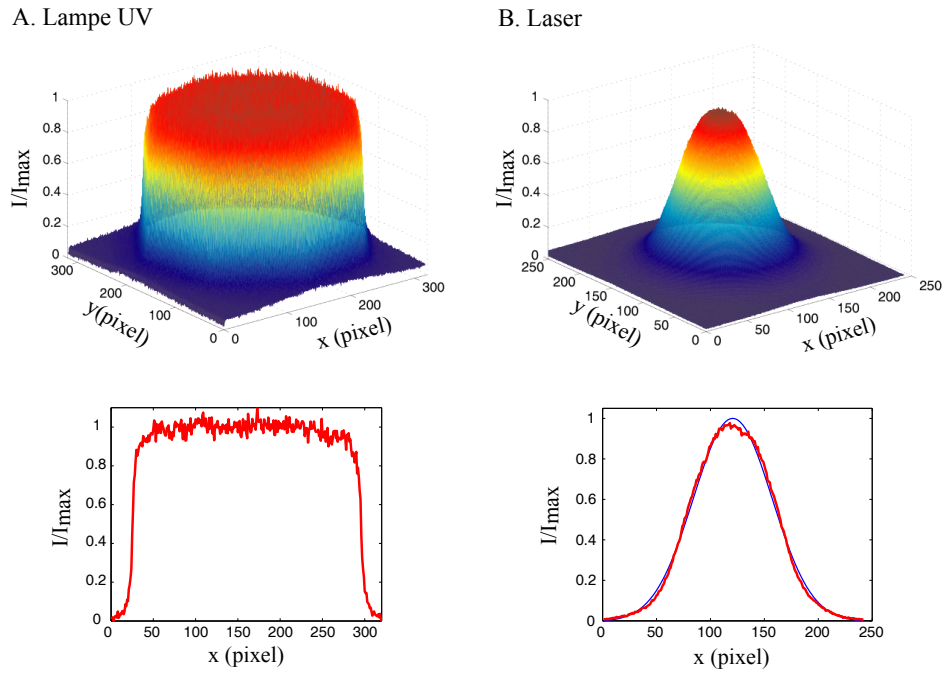

Figure 2.5 – *Profil d'intensité 2D (en haut) et 1D (en bas) obtenu dans le plan image suite à une excitation de colorants avec une lampe UV (A) ou un laser (B). L'intensité I reflète le nombre de photons collectés par chaque pixel de la caméra CCD. Le faisceau de la lampe UV est délimité par un diaphragme. L'approximation du profil du laser par une gaussienne est représentée en trait fin noir (B, en bas).*

Observation

On acquiert des séries de films, séquences de 512 images prises en continu avec un temps d'acquisition de 75ms. On fait varier deux paramètres : l'intensité d'excitation et la longueur d'onde d'émission des nanocristaux. Les images de fluorescence en sortie (voir fig. 2.6) sont composées de taches plus ou moins lumineuses correspondant à des nanocristaux seuls ou agrégés. Nous allons maintenant décrire le traitement appliqué à ces données pour en extraire les propriétés d'émission des nanocristaux individuels.

2.3.2.2 Traitement des données

Le traitement des données décrit ci-dessous est effectué à l'aide de programmes (en language Matlab, MathWorks), mis au point et implémentés par Stéphane Bonneau [9].

Modélisation de l'image idéale d'un nanocristal

La taille des nanocristaux étant largement inférieure à la longueur d'onde λ de la lumière qu'ils émettent (quelques centaines de nanomètres), ils peuvent être considérés comme des sources ponctuelles de lumière. Les différents éléments optiques contenus dans le montage étant corrigés des aberrations, on néglige les aberrations résiduelles et on considére que le système optique est limité par la diffraction. L'image d'un nanocristal correspond alors à la réponse impulsionnelle du système optique (PSF pour *Point Spread Function*). Son profil selon chaque direction, normalisé à 1, est donné

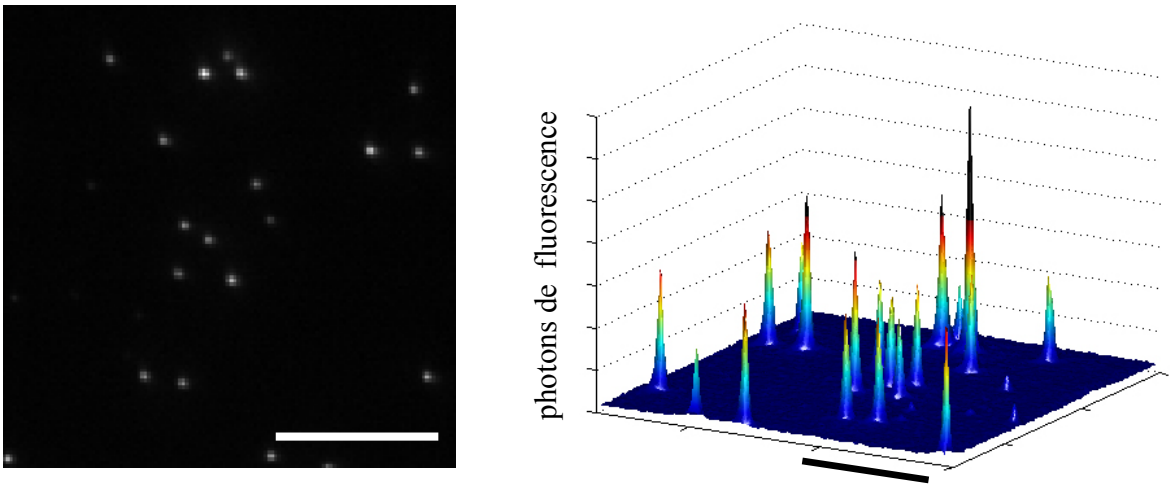

Figure 2.6 – *Nanocristaux fixes sur une lamelle : exemple d'image de fluorescence visualisée en 2D (à gauche) et 3D (à droite), barre=10μm.*

par la fonction suivante :

$$k_B(x) = \left(\frac{2J_1(r)}{r}\right)^2 \; avec \;\; r = (\frac{2\pi ON}{\lambda})|x|$$

où ON est l'ouverture numérique de l'objectif et J_1 est la fonction de Bessel de première espèce et d'ordre 1 dont le premier zéro définit le rayon d'Airy R_A . Si l'on prend le critère de Rayleigh pour définir le pouvoir séparateur de notre système optique alors celui-ci est égale à R_A et vaut en théorie :

$$R_A \approx \frac{1.22\lambda}{2ON}$$

Notons que pour ON=1.45 et λ=605nm, R_A≈254nm. Sans commettre d'erreur préjudiciable (voir fig. 2.7), on peut modéliser la PSF de profil théorique k_B par une gaussienne bidimensionnelle isotropique k_G d'écart-type s_G selon :

$$k_G(x) = \exp\left(-\frac{x^2+y^2}{2s_G^2}\right) \text{ avec } \; s_G \approx \frac{R_A}{3}$$

Cette modélisation est nécessaire de par les simplifications d'un point de vue numérique qu'elle engendre.

Modélisation de l'image en sortie de la caméra

L'image idéale en sortie du microscope est numérisée par la caméra CCD dont l'ensemble des cellules photosensibles constitue une grille sur laquelle l'image est échantillonnée spatialement. L'intensité en chaque pixel étant codée sur 16 bits, les effets dus à la discrétisation de ces valeurs après numérisation sont considérés comme étant négligeables.

La caméra fonctionne en *photon-counting mode* : l'intensité en un pixel donné d'une image correspond au nombre de photon-électrons reçus sur la cellule de la caméra CCD associée à ce pixel durant le temps d'acquisition T_{acq}. Notons que la caméra utilisée est de type *back illuminated*, ce qui permet

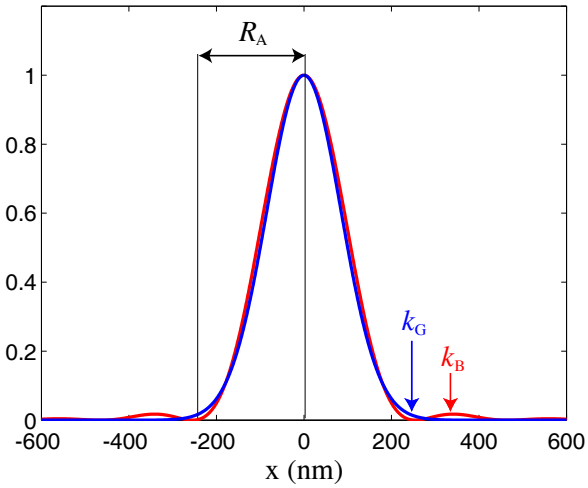

Figure 2.7 – *Profil normalisé de la réponse impulsionnelle du système optique : modèle théorique k_B (rouge, pour ON=1.45 et λ=605nm) et approximation gaussienne k_G (bleu) avec s_G=R_A/3.*

d'augmenter le rendement quantique de détection (nombre d'électrons générés par photon reçu). A ce signal vient s'ajouter un offset constant (L_B) et du bruit. L_B est une constante, appelée ligne de base, systématiquement ajoutée au signal de fluorescence par la caméra CCD. Elle peut être réglée par l'expérimentateur qui prendra soin de ne pas la prendre égale à 0 (pour permettre une estimation correcte du bruit). Trois principaux types de bruit, indépendants, peuvent entacher le signal de fluorescence utile :

- le bruit de photon (*shot noise*) est une limite fondamentale puisqu'il provient directement de la nature quantique de la lumière i.e. des fluctuations statistiques du nombre de photons émis par une source.
- le bruit noir (*dark noise*) correspond à la génération d'électrons thermiques en absence de photons reçus, ce bruit est largement diminué par le refroidissement de la caméra
- le bruit de lecture (*readout noise*) comprend les bruits propres au détecteur et aux circuits électroniques impliqués dans la lecture des pixels (bruit issu des fluctuations du rendement quantique du détecteur, bruit thermique des résistances, bruit de l'amplificateur, bruit du convertisseur analogique-numérique,...). Il augmente avec la rapidité de la lecture.

Le bruit de photon est modélisé par un processus de Poisson avec une distribution en chaque pixel de moyenne et de variance égales au nombre de photons reçus . Les bruits noir et de lecture, dus à la caméra CCD, sont modélisés par un processus gaussien avec une distribution associée de moyenne nulle et d'écart-type σ_B indépendants du nombre de photons reçus [148].

Le rapport signal à bruit (SNR pour *Signal to Noise Ratio*), défini comme le rapport entre le nombre de photons utiles reçus en un pixel, N, et l'écart type du bruit total en ce même pixel peut être exprimé comme suit :

$$SNR = \frac{N}{\sqrt{N + \sigma_B^2}} \tag{2.2}$$

Dans toute la suite, on nomme spot l'image d'un nanocristal sur une image. La grande majorité de la fluorescence associée à un spot s'étend *a priori* sur un carré de 5 pixels de côté (voir fig. 2.7).

Détection des nanocristaux

Estimation de la ligne de base et de l'écart type du bruit gaussien

Les différentes images d'un film sont traitées séquentiellement. Pour chaque image, des estimations de la ligne de base, $\widehat{L_B}$, et de l'écart-type du bruit gaussien, $\widehat{\sigma_B}$, sont calculées. Ces estimations reposent sur l'hypothèse suivante : la majorité des pixels de l'image correspond au fond de l'image. Celle-ci est justifiée étant donné que l'expérimentateur utilise une concentration modérée de marqueurs. La distribution des intensités de l'image est alors supposée être issue du mélange de deux distributions gaussiennes (voir fig. 2.8a) : une première étroite centrée sur $\widehat{L_B}$, associée au fond de l'image, et une deuxième plus large, reflétant la distribution des photons émis par les QDots.

Intercorrélation

Un moyen efficace et rapide de détecter les spots sur une image est de calculer l'intercorrélation normalisée de cette image avec l'approximation gaussienne bidimensionnelle $k_G(x, y)$ de la réponse impulsionnelle. Cette intercorrélation peut également être interprétée comme un filtrage passe-bas éliminant les fréquences spatiales supérieures à la fréquence de coupure de la fonction de transfert de modulation (FTM) du système. Les pics de l'image d'intercorrélation vont correspondre à des spots réels ou à des artefacts dus au bruit. Pour éliminer ces derniers, on stocke dans une liste la position de tous les maxima locaux (dans un voisinage de 5×5 pixels) de l'image d'intercorrélation , c'est à dire les coordonnées de chaque pixel dont l'intensité est supérieure à celle des pixels adjacents. Le fait de définir le maximum local dans un voisinage de 5×5 pixels plutôt que 3×3 limite la résolution latérale de la phase de détection : deux spots ne peuvent être discernables que s'ils sont séparés par au moins 2 pixels. Cependant, ce choix de voisinage est couramment adopté car il permet d'éviter la duplication due au bruit de maxima associés à un même spot [32, 114].

Sélection et localisation subpixellique des pics de corrélation

Pour décider si un maximum d'intercorrélation de coordonnées $(x_{\text{max}}, y_{\text{max}})$ correspond ou non à un spot, disposant des estimations $\widehat{L_B}$ et $\widehat{\sigma_B}$, on procède de la manière suivante, illustrée par la figure 2.8b :

- on recherche l'intensité $I(x_{max}, y_{max})$ du pixel de coordonnées (x_{max}, y_{max}),
- on définit un intervalle de confiance $\Delta I = s_d \sqrt{\text{var}[I(x_{\text{max}}, y_{\text{max}})]}$, où s_d est un paramètre, nommé seuil de détection, donné *a priori* par l'utilisateur et

$$\text{var}[I(x_{\text{max}}, y_{\text{max}})] = \left(I(x_{\text{max}}, y_{\text{max}}) - \widehat{L_B} \right) + \widehat{\sigma_B}^2$$

- on décide que l'on a un spot en $(x_{\text{max}}, y_{\text{max}})$ si $[\ I(x_{\text{max}}, y_{\text{max}}) - \Delta I\ ] > \widehat{L_B}$.

Cela revient à sélectionner les spots de fluorescence dont le SNR en (x_{max}, y_{max}) est supérieur au seuil de détection s_d. En effet, le nombre de photons utiles utilisé dans la définition du SNR (voir équation 2.2) peut être exprimé comme suit : $N(x,y) = (I(x,y) - \widehat{L_B})$. var(I) correspond ainsi à l'incertitude sur le nombre de photons reçus.

Enfin, la position de chacun des spots ainsi sélectionnés est estimée rapidement avec une précision subpixellique en effectuant une régression parabolique sur le pic d'intercorrélation.

Obtention des trajectoires (fixes) de nanocristaux individuels

Toutes les modélisations et les traitements des images décrits ci-dessus font partie des processus

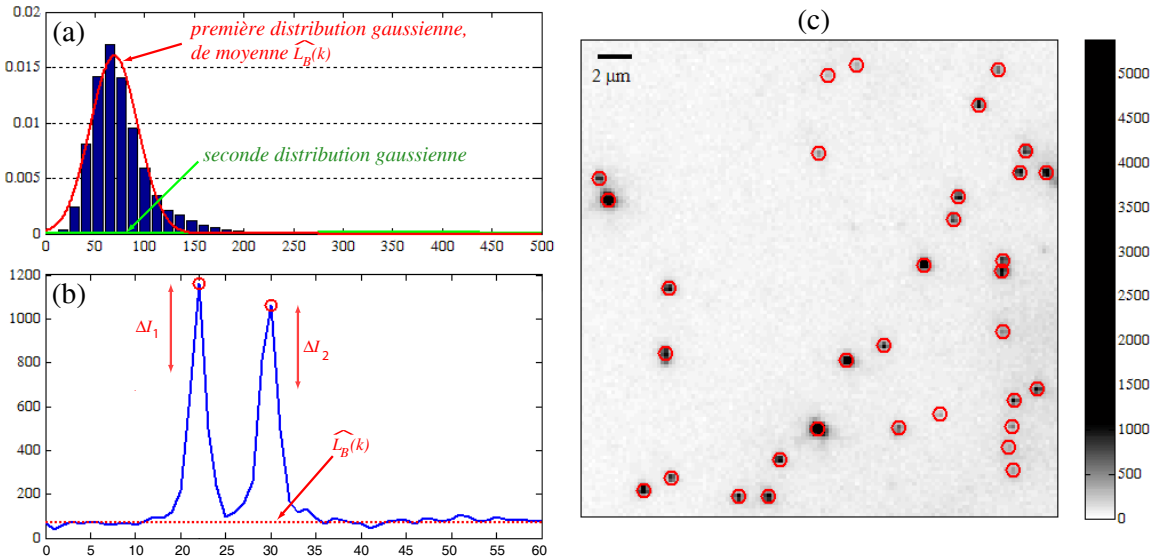

Figure 2.8 – *Illustration du processus de détection des spots de fluorescence pour un seuil s_d=12. (a) Distribution des intensités de l'image à partir de laquelle les paramètres de deux distributions mélangées sont estimés. (b) Profil d'intensité. Deux spots distincts sont détectés pour lesquels $I(x_{max}, y_{max})$ est substantiellement supérieur à la ligne de base $\widehat{L_B}$. (c) Image de fluorescence (saturée avec les niveaux de gris inversés pour une meilleur lisibilité) et spots détectés (représentés par des cercles). Figure extraite de [9].*

mis en place pour le traitement automatique des données appliqué au suivi de particules uniques. L'objectif pour l'instant est de mesurer les propriétés optiques des nanocristaux qui sont ici fixes sur la lamelle. L'étape suivante du traitement automatique, dite d'association et permettant d'obtenir des trajectoires, sera décrite en détail dans le chapitre 3, dédié au suivi d'objets en mouvement. Pour l'instant, admettons qu'en sortie du traitement les spots successifs correspondant à un même objet sont associés pour former une trajectoire.

Seuls les nanocristaux qui s'éteignent pendant au moins un temps d'acquisition complet sont pris en compte. Si cette restriction ne permet pas d'affirmer que l'on se trouve en présence d'un seul nanocristal (puisqu'il est possible qu'un deuxième nanocristal soit éteint lui-aussi durant cette période), la propriété de clignotement permet néanmoins de maximiser la probabilité d'observer un nanocristal unique. Par abus de langage, que l'on s'autorise du fait de cette probabilité maximisée, on parlera de nanocristal unique dès lors qu'il est éteint sur une image au moins.

Estimation du nombre de photons émis

Sur chaque image, une régression au sens des moindres carrés autour de chaque spot sélectionné est effectuée en utilisant la fonction bidimensionnelle suivante :

$$I(x,y) = \widehat{L_B} + A.\exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2s_x^2} - \frac{(y-y_0)^2}{2s_y^2} \right)$$

Les paramètres A, (x_0, y_0), s_x et s_y qui permettent d'approximer au mieux le signal de fluorescence, associé au spot considéré, sont estimés. On suppose ici que chaque nanocristal est parfaitement fo-

calisé. Les positions $(x_0(t), y_0(t))$ obtenues dans ces expériences seront utilisées par la suite pour déterminer la précision de localisation des spots (voir 3.2.3.1, page 71). Pour l'instant, on s'intéresse au nombre total de photons émis par chaque nanocristal unique, N_{spot}, que l'on définit comme étant le volume de la gaussienne associée :

$$N_{\text{spot}} = 2\pi A s_x s_y$$

2.3.2.3 Résultats

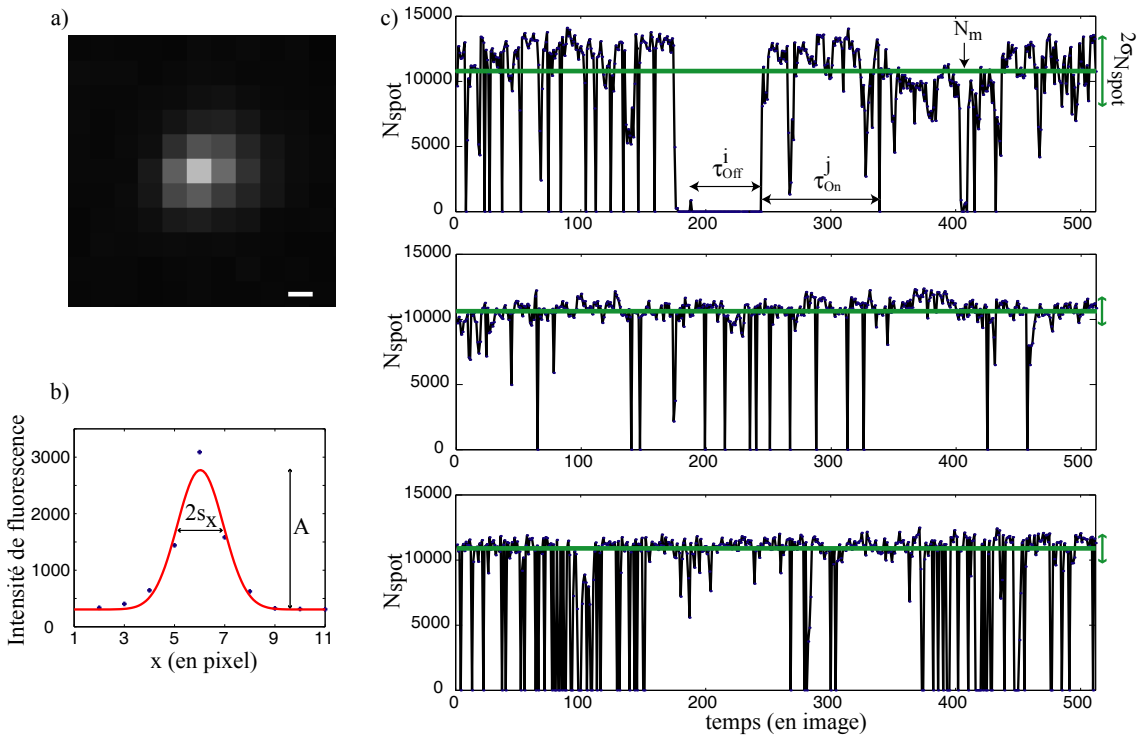

Figure 2.9 – *(a) Image de fluorescence d'un spot détecté, barre=1 pixel. (b) Profil d'intensité initial (croix) et résultat de l'ajustement par une gaussienne (trait) (c) 3 exemples du nombre de photons émis par un spot en fonction du temps, T_{acq}=75 ms ; la moyenne, N_m, et l'écart type, $\sigma_{N_{spot}}$, calculés sur les états hauts sont également indiqués (en vert)*

Suite au traitement des données décrit ci-dessus, on dispose des informations suivantes : N_{spot}(t), s_x(t), s_y(t), représentées sur la figure 2.9. Sur les exemples de l'évolution du nombre de photons émis par un spot en fonction du temps, N_{spot}(t), on constate directement que l'état haut est sujet à des variations qui peuvent être importantes. Il y a deux raisons à ces fluctuations d'intensité de l'état allumé :

- intrinsèquement, le niveau de fluorescence des nanocristaux n'est pas parfaitement constant
- leur émission est intégrée durant le temps d'acquisition fixe, l'intensité détectée est sujette à des variations du fait que le QDot peut s'éteindre pendant une fraction du temps d'acquisition.

A partir de N_{spot}(t), on extrait d'une part le nombre moyen de photons émis par un QDot, N_m, et son écart type, $\sigma_{N_{\text{spot}}}$, tous deux calculés sur les états hauts, et d'autre part les distributions des temps

passés dans l'état allumé, $\{\tau^1_{On}, \tau^2_{On}, ...\}$, et éteint, $\{\tau^1_{Off}, \tau^2_{Off}, ...\}$. Notons que le nombre de photons émis par un nanocristal est considéré comme étant nul s'il est inférieur au seuil introduit dans le processus de détection des spots. De ce fait, un état allumé correspond à un spot ayant un SNR supérieur à s_d. De plus, les temps τ^i_{On} et τ^i_{off} obtenus sont nécessairement inférieurs au temps de mesure (38.4s), ainsi leurs distributions expérimentales sont tronquées aux temps longs.

Nombre moyen de photons émis par un nanocristal unique

Les valeurs N_m sont calculées uniquement sur les QDots passant au moins 10% du temps total de détection dans un état allumé. Cette restriction a pour but d'une part d'avoir un effectif de valeurs assez important pour calculer la moyenne et l'écart type et d'autre part de se placer dans les conditions proches des expériences sur cellules (où les trajectoires doivent être assez longues pour pouvoir retirer de l'information sur leur dynamique).

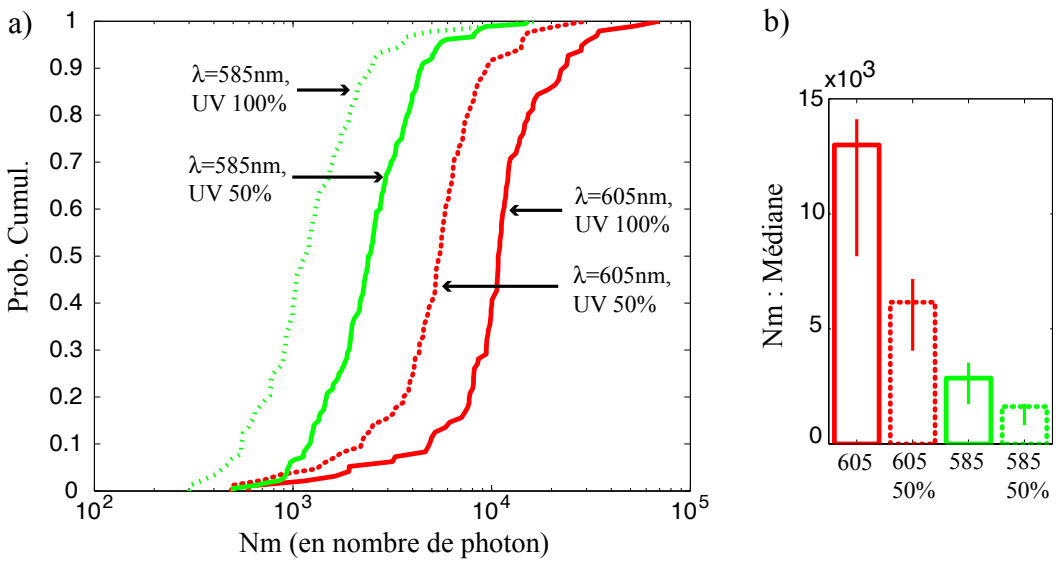

Figure 2.10 – *(a) Comparaison des probabilités cumulées du nombre moyen, Nm, de photons émis par des nanocristaux uniques de longueur d'onde d'émission λ=605 ou 585nm suite à une excitation avec une lampe UV seule ou en présence d'une densité de 50% (b) Mise en valeur de la valeur médiane de Nm, les barres indiquent les premiers et derniers quartiles*

Tout d'abord, on mesure le nombre de photons émis par les nanocristaux individuels commerciaux ayant une émission centrée autour de 605 nm ou de 585 nm. Ils sont excités uniformément avec la lampe UV seule ou suivie d'une densité laissant passer 50% de la lumière incidente. Les résultats obtenus sont indiqués sur la figure 2.10. Deux observations peuvent être faites :

1. Plus la longueur d'onde d'émission des nanocristaux est petite, plus le nombre de photons émis est faible. Cet effet provient directement du spectre d'absorption des nanocristaux : sur la figure 2.2, on voit que dans la gamme d'émission utilisée ici (585-605nm), le niveau d'absorption, pour une longueur d'onde d'excitation fixée dans le vert, diminue avec la taille des nanocristaux. Les coefficients d'extinction molaire (donnés par le fournisseur) pour des QDots émettant à 605 nm et 585 nm valent respectivement 5.80 10^5 et 3.05 10^5 $M^{-1}cm^{-1}$ pour une

excitation à 532nm.

2. Le niveau d'émission diminue avec la puissance d'excitation. En présence d'une densité de 50% placée devant la lampe UV, la valeur médiane du nombre de photon diminue d'un facteur deux. Le niveau d'émission semble alors être proportionnel à la puissance d'excitation.

Cependant, la puissance fournie par la lampe UV n'est pas connue. Pour essayer de l'estimer et de quantifier la fluorescence des QDots avec la puissance d'excitation, on utilise le laser. La puissance émise par celui-ci est mesurée à l'entrée du microscope, la valeur ainsi lue ne correspond donc pas exactement à la valeur réelle au niveau de l'échantillon mais permet déjà d'avoir un ordre de grandeur. Les distributions du nombre de photons émis par des QDots uniques, émettant à 605nm, pour des puissances d'excitation[1] P_{laser} de 0.1, 0.2, 0.5, 1, 3, 4, 5, 7, 9 et 11 mW sont indiquées sur la figure 2.11a. On vérifie à nouveau que le nombre de photons émis par les QDots augmente avec la puissance d'excitation. Il semble cependant apparaître un effet de seuil à partir duquel le niveau d'émission sature (voir fig. 2.11b). Deux phénomènes peuvent être envisagés pour expliquer la saturation observée :

- soit l'émission des QDots n'est plus dans le régime linéaire d'émission de fluorescence mais est réellement rentrée dans un régime saturé,
- soit elle est toujours dans un régime linéaire mais l'augmentation de la puissance d'excitation accroît l'instabilité des nanocristaux et de ce fait leur clignotement devient plus important. Cet effet serait alors à l'origine de la diminution du nombre de photons recueillis pendant le temps d'acquisition.

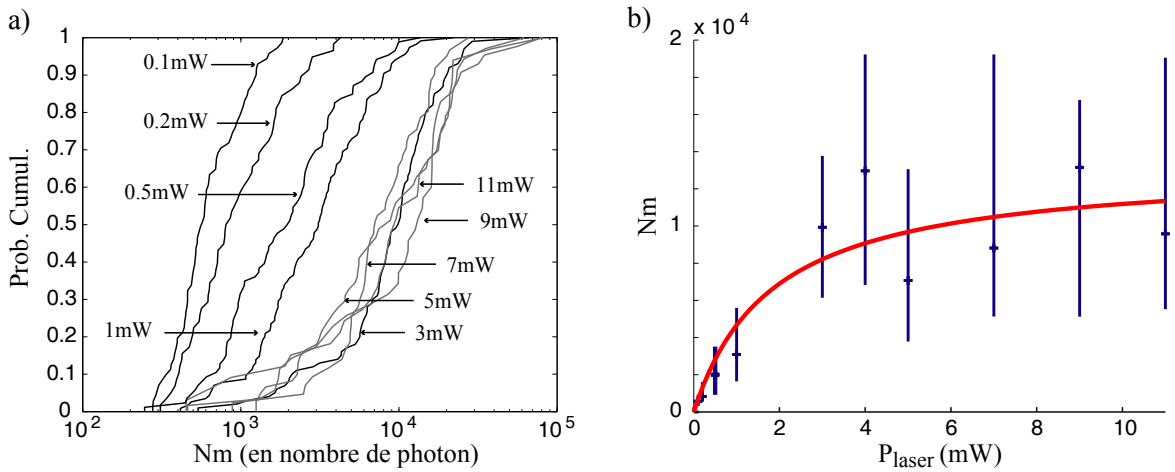

Figure 2.11 – *(a) Comparaison des probabilités cumulées du nombre moyen, N_m, de photons émis par des nanocristaux uniques de longueur d'onde d'émission λ=605 suite à une excitation avec différentes puissances de laser P_{laser} (b) Mise en valeur de la valeur médiane de N_m, les barres indiquent les premiers et derniers quartiles, et ajustement des données par l'équation 2.3.*

[1]La valeur P_{laser} à l'entrée du microscope est mesurée à l'aide d'un puissancemètre optique qui recueille le signal du faisceau laser entier. Pour estimer l'intensité laser au niveau de l'échantillon, on peut considérer en première approximation que la majeure partie de la puissance du laser est alors comprise dans un disque de diamètre 2σ, avec $\sigma \simeq 8\mu m$ l'écart type du profil du laser au niveau de l'échantillon. Une puissance laser du faisceau entier de 1mW donne alors une intensité au niveau de l'échantillon de l'ordre de $0.5kW/cm^2$.

Si l'on modélise le processus d'émission d'un nanocristal par un système fluorescent à deux niveaux, le nombre de photons émis en fonction de l'intensité d'excitation peut être exprimé comme suit :

$$N \propto \frac{I/Is}{1+I/Is} \text{ avec } Is = (k_{\text{rad}} + k_{\text{nrad}})\frac{hc}{s_e\lambda} \tag{2.3}$$

où I est l'intensité d'excitation, Is l'intensité de saturation, k_{rad} et k_{nrad} les taux de recombinaison radiatifs et non-radiatifs, λ la longueur d'onde d'émission, h la constante de Planck, c la célérité de la lumière, I l'intensité d'excitation et s_e la section efficace d'absorption. Le nombre de photons émis par les QDots en fonction de la puissance laser peut être ajusté par la fonction ci-dessus (voir fig. 2.11b), on obtient alors une puissance de saturation d'environ 1.8 mW, soit Is$\approx 900W/cm^2$. Par ailleurs, on peut également calculer la valeur attendue, Isth, de l'intensité de saturation. En prenant des valeurs typiques, s_e =10^{-15} cm^2, k_{nrad} =3μs^{-1} et k_{rad} =50μs^{-1} [17], on obtient Isth $\approx 17kW/cm^2$. Bien que plusieurs sources d'erreurs puissent entacher les estimations de Is et de Isth, les valeurs obtenues sont très différentes : Isth $\approx$ 10Is. Ceci suggère que la saturation observée expérimentalement est en fait la manifestation d'une augmentation des effets de clignotement qui compense alors l'augmentation de la fluorescence. Le raisonnement est le suivant : (1) si l'on est toujours dans le régime linéaire, le nombre de photons émis, lorsque le QDot est dans un état allumé, augmente avec l'intensité d'excitation ; (2) si le clignotement aux temps courts est augmenté, le nombre de photons recueillis pendant le temps d'acquisition, fixe, diminue.

En comparant les figures 2.11 et 2.10, on peut estimer l'ordre de grandeur de l'intensité lumineuse I_{UV} fournie par la lampe UV (au niveau de la lamelle). I_{UV} correspond à une puissance laser entre 1 et 3 mW, soit une intensité de l'ordre de 0.5-1.5kW/cm^2. Notons que cette valeur n'est qu'une estimation semi-quantitative d'une part du fait de l'étalement des distributions de N_m sur un log au moins et d'autre part du fait de l'inhomogéneité de l'illumination avec le laser. En effet, la puissance au niveau de la lamelle varie entre 50 et 100% de la valeur maximale (au centre du champ d'acquisition) (voir 2.3.2.1). Cet effet est certainement à l'origine également de la différence d'allure observée entre les distributions obtenues avec le laser et la lampe UV.

Par ailleurs, nous avons remarqué que le niveau d'émission des QDots est susceptible de varier pour des mesures effectuées à plusieurs semaines d'intervalle. Ceci peut provenir d'une part d'une variabilité entre les lots de QDots commerciaux et d'autre part d'un effet de vieillissement des ampoules utilisées dans la lampe UV. Toutefois, aucune variation important n'est notée lors d'expériences menées de manière rapprochée et le niveau de signal reste toujours bon (avec une valeur médiane pour N_m d'au moins 10^3 photons pour des QDots émettant à 605nm).

Rapport signal à bruit

La définition du SNR en un pixel (voir équation 2.2) peut être généralisée au cas d'un spot entier. Le SNR pour un spot est alors donné par la relation suivante :

$$SNR_{spot} = \frac{N_{spot}}{\sqrt{N_{spot} + \widehat{\sigma_B}^2}} \tag{2.4}$$

Une estimation, à partir des données obtenues avec la lampe UV, de l'écart type du bruit du fond de l'image nous donne en moyenne $\widehat{\sigma_B}$=(17.1$\pm$0.3) photons. Or dans ces conditions, N_{spot} est, dans la plupart des cas, de l'ordre de plusieurs milliers de photon. Ainsi $N_{spot} \gg \widehat{\sigma_B^2}$, le bruit de photon est prépondérant devant les autres sources de bruit considérées et SNR$\approx\sqrt{N_{spot}}$. Finalement, dans les

conditions de nos expériences, on a un rapport signal à bruit de l'ordre de quelques dizaines. Notons que dans le cas le moins favorable, avec N_{spot}≈300 photons, on a tout de même un SNR de 12.

États allumés et éteints

Les statistiques de clignotement des nanocristaux ont déjà été étudiées [16,20]. Nous souhaitons seulement vérifier que les lois suivies par les durées des états allumés et éteints dans les conditions de nos expériences, avec les nanocristaux commerciaux, sont similaires à celles trouvées précédemment. On calcule pour cela les distributions cumulatives inverses des durées des états allumés, τ^i_{On}, et des états éteints, τ^i_{Off}, qui donnent les probabilités $P_{On,Off}(\tau) = Prob\{\tau_{On,Off} > \tau\}$ de mesurer un état allumé, ou éteint, de durée supérieure à τ. On ajuste ensuite ces probabilités, aux temps courts, par des lois de puissance $P(\tau) \propto 1/\tau^\mu$ (voir fig. 2.12). Les exposants trouvés sur un ensemble d'environ mille nanocristaux (émettant à 605 nm, temps d'acquisition de 75 ms) valent $\mu_{On} \simeq \mu_{Off} \simeq 0.75$. Brokmann et al. trouvaient des valeurs de l'ordre de 0.5 [20], nos valeurs sont légerement plus élevées. Toutefois, on reste dans le cas où $\mu < 1$, ainsi on vérifie bien que l'on est en présence de distributions larges qui ne possèdent pas de valeur moyenne.

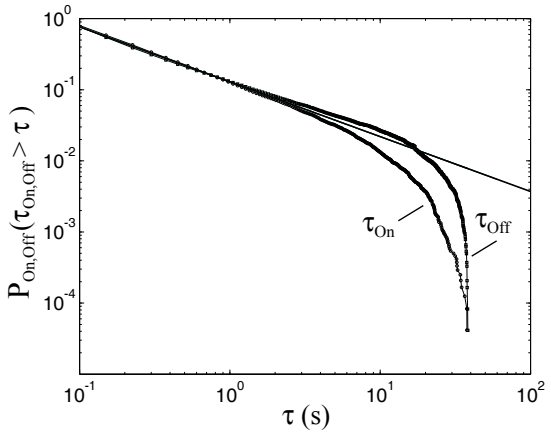

Figure 2.12 – *Distribution cumulative inverse des durées des états allumés (On) et éteints (Off). L'ajustement par une loi de puissance d'exposant inférieur à 1 (trait fin) montre que l'on est en présence de lois larges.*

Ces distributions expérimentales des durées τ^i_{On} et τ^i_{Off} sont utilisées pour simuler, de la manière la plus réaliste possible, des trajectoires avec du clignotement (dans le chapitre 3). La méthode est la suivante : on tire un nombre aléatoire χ_1 (selon une loi uniformément distribuée entre 1 et le nombre de valeurs expérimentales de τ^i_{On}), $\tau^{\chi_1}_{On}$ constitue alors la première durée dans l'état allumé ; puis on fait de même pour la première durée dans l'état éteint ; et ainsi de suite jusqu'à constituer pour chaque trajectoire un enchaînement de durées $\{\tau^{\chi_1}_{On}, \tau^{\chi_2}_{Off}, \tau^{\chi_3}_{On}, ...\}$ dont la somme est supérieure ou égale à la longueur de la trajectoire simulée.

Taille des spots

L'écart type de la gaussienne s_G qui permet de bien ajuster la PSF théorique du montage vaut ∼$R_A/3$ soit ∼84 nm pour λ=605nm. (voir fig. 2.7). Comme on peut le voir sur la figure 2.9a), l'image en sortie du montage complet (microscope + caméra) est plus étalée que le prévoit simplement la

théorie. Expérimentalement, on obtient $s_G{}^{exp}$=(179±25)nm en moyennant tous les résultats obtenus avec les nanocristaux émettant à 605nm (soit n=1410 valeurs). Ainsi l'image expérimentale d'un nanocristal est ∼2 fois plus étalée que son image idéale.

En comparant les PSF expérimentales obtenues dans différentes conditions (même système optique mais détecteur de taille de pixel différente ou même caméra avec un grossissement plus important), on constate ceci : plus la taille du pixel est grande devant la PSF théorique, plus la largeur de la PSF expérimentale s'écarte de celle de la PSF théorique. Cet effet ne provient pas du niveau de signal reçu puisque la valeur de $s_G{}^{exp}$ reste quasi-identique quel que soit le niveau d'excitation/emission. Par exemple, $s_G{}^{exp}$=(176±11)nm et $s_G{}^{exp}$=(171±14)nm pour P_{laser}=0.1mW (n=72) et P_{laser}=3mW (n=100) respectivement. L'explication vraisemblable de cet effet tient alors dans l'échantillonnage de l'image théorique opéré par la caméra CCD. Ce processus peut être décrit par une convolution de la PSF théorique avec la fonction indicatrice suivante :

$$K_E(x,y) \begin{cases} 1 & si \ \ |x| \leq (h/2) \ \ et \ \ |y| \leq (h/2) \\ 0 & sinon \end{cases}$$

où h correspond au côté d'une cellule photosensible de la caméra.

L'élargissement observé de la PSF expérimentale réduit alors la résolution de notre système. Ceci ne nous gène pas directement étant donné que l'on ne prétend pas résoudre des objets à moins de quelques pixels de distance. Notre objectif est de suivre avec la meilleur précision de pointé possible des objets uniques, ces derniers étant présents en faible densité pour éviter de trop nombreux croisements entre différentes trajectoires.

Notons que par la suite, c'est la taille expérimentale de la PSF qui sera utilisée lors de l'ajustement du signal de fluorescence (associé à un nanocristal individuel) par une gaussienne.

2.4 Marquage des molécules étudiées

2.4.1 Stratégies

La reconnaissance spécifique du récepteur de la glycine est assurée par des anticorps. Plusieurs stratégies de couplage anticorps/nanocristaux ont été utilisées selon les expériences. Notons que la mise au point des protocoles de marquage est une étape longue et laborieuse : il faut trouver les bonnes molécules mais aussi les bonnes concentrations à utiliser, et valider chaque étape rigoureusement.

2.4.1.1 Couplage RGly endogène-nanocristal

Le marquage du RGly endogène sur cellules vivantes est fait en trois étapes [34,25] (voir fig. 2.13A).

1. une première incubation des cellules permet de fixer un anticorps primaire (mAb2b) à la sous-unité $\alpha 1$ du RGly
2. un deuxième marquage permet de coupler cet anticorps primaire à un fragment Fab anti-souris biotinylé (anticorps secondaire).
3. la dernière étape s'appuie sur la très forte affinité entre la streptavidine et la biotine (couramment exploitée en biologie) et consiste à fixer un nanocristal saturé en streptavidine sur l'anticorps secondaire.

Les nanocristaux fonctionnalisés par une couche de streptavidine sont directement achetés auprès d'un fournisseur. Les nanocristaux streptavidinés de première génération nécessitaient la présence d'un milieu particulier (dont la recette n'était pas dévoilée par le fabricant) pour leur assurer un comportement convenable (spécificité du marquage et stabilité). Désormais des progrès ont été réalisés et la deuxième génération disponible ne requiert pas de milieu particulier. En revanche, une grande variabilité est observée d'un lot à l'autre ainsi qu'au cours du temps. Les concentrations utilisées sont alors en permanence sujettes à des réajustements.

Un anticorps comprend deux fragments Fab reliés à la partie centrale FC par des ponts disulfures, les sites de reconnaissance spécifiques de l'antigène se trouvant sur les fragments Fab. L'utilisation du seul fragment Fab à la place de l'anticorps complet (qui en contient deux) permet ainsi d'augmenter la probabilité de n'avoir qu'un seul anticorps primaire par anticorps secondaire ainsi que la probabilité de n'avoir qu'un seul nanocristal par anticorps secondaire. La question de l'unicité des RGly observés sera abordée en détail par la suite (voir 2.4.2)

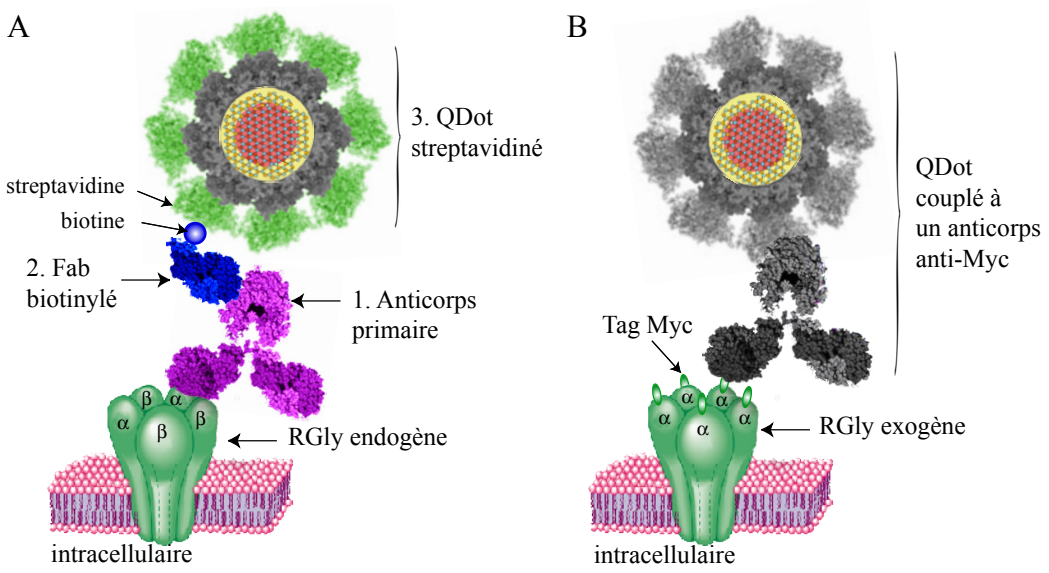

Figure 2.13 – *Marquage du RGly endogène (A) et exogène (B) avec un nanocristal. Schéma de principe non à l'échelle réelle, avec une stoechiométrie idéale 1 :1.*

2.4.1.2 Couplage RGly exogène-nanocristal

Les RGly exogènes que l'on souhaite marquer pour les études sur cellules modèles (voir 5.2.1.1) sont étiquetés avec un épitope Myc situé sur leur partie extracellulaire. Cet épitope peut être reconnu par un anticorps anti-Myc. Le marquage des RGly exogènes requiert deux étapes :

1. les anticorps anti-Myc sont préalablement couplés à des nanocristaux
2. puis les cellules sont incubées en présence de la solution précédemment obtenue (après dilution) pour que les anticorps couplés viennent se lier aux récepteurs.

Le couplage anticorps-QDot est effectué selon le protocole du fournisseur. Brièvement, des traitements chimiques, appliqués d'une part aux QDots déjà fonctionnalisés (contenant des groupes de

type amine sur leur surface) et d'autre part aux anticorps, permettent d'induire des liaisons covalentes entre ces deux éléments. Ce couplage préliminaire permet d'obtenir un meilleur contrôle du nombre d'anticorps liés à un QDot (voir 2.4.2). Cependant, la mise au point des conditions de la réaction (concentrations des différentes espèces, temps de réaction) ainsi que les étapes de purification sont très coûteuses en anticorps. De plus, j'ai pu constater que la stabilité de ce couplage était satisfaisante durant 6 mois environ. Pour ces raisons financières, il est possible d'appliquer cette stratégie avec des anticorps anti-Myc (bon marché et dont on dispose en grande quantité) alors que ce n'est pas envisageable dans le cas des anticorps utilisés pour détecter le récepteur endogène (trop chers).

La figure 2.14 illustre la spécificité du marquage des RGly exogènes obtenue avec les anticorps couplés.

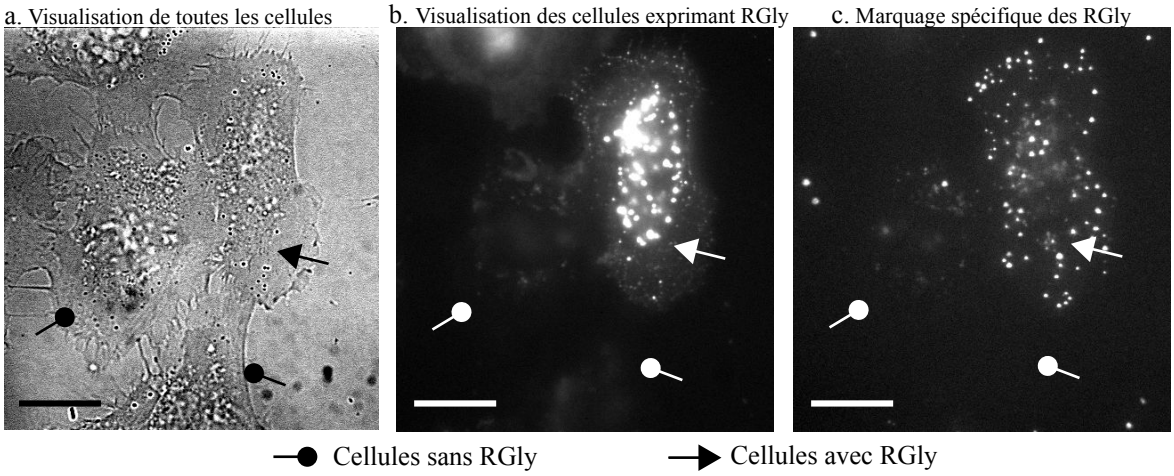

Figure 2.14 – *Spécificité du marquage des RGly exogènes au niveau de la molécule individuelle. Le nombre de nanocristaux (image c) présents sur des cellules contenant du RGly est bien plus élevé que dans le cas de cellules qui n'en contiennent pas. Ces images correspondent à des cellules HeLa (visualisée en transmission sur l'image a) exprimant ou non de la géphyrine fluorescente (image b) et du RGly. Le signal de fluorescence correspondant à la géphyrine (image b) permet d'identifier les cellules qui expriment du RGly (car plus de 90% des cellules cotransféctées et exprimant la géphyrine fluorescente expriment aussi le RGly). Se reporter à la section 5.2 pour plus de détails sur la cotransfection des cellules HeLa. La barre d'échelle représente 20 microns.*

2.4.2 Unicité du marquage

Le but d'un marquage pour des expériences de SPT est de pouvoir suivre une particule unique qui reflète le mouvement d'une seule molécule biologique d'intérêt. Ci-dessous sont exposés les avantages et les limites des stratégies employées jusqu'à présent. Les améliorations envisagées dans un futur proche seront abordées dans le chapitre 6.

Unicité des nanocristaux observés

Seuls les nanocristaux qui s'éteignent pendant au moins un temps d'acquisition complet (75ms)

sont suivis. On considère alors que l'on est en présence de nanocristaux individuels.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que bon nombre de nanocristaux peuvent également être dans un état noir permanent [43, 168]. Toutefois, en raison des effets d'encombrement stérique qui ne favorisent pas la présence de plusieurs nanocristaux sur un même anticorps, il est vraisemblable que l'on soit en présence de nanocristaux uniques.

Stoechiométrie du couplage RGly-nanocristaux

La création d'agrégats artificiels, provenant du marquage, est envisageable. Les effets impliquant plusieurs nanocristaux ne sont pas abordés ici puisque l'unicité de chaque nanocristal suivi est supposée acquise. Dans le cas du marquage du RGly endogène, plusieurs sources d'agrégations sont possibles : elles sont schématisées sur la figure 2.15, représentant des cas extrêmes de marquages avec une mauvaise stoechiométrie. Pour augmenter la probabilité d'avoir un seul RGly par nanocristal, trois techniques ont été mises en place pour combattre les trois facteurs favorisant une agrégation artificielle des récepteurs : (i) l'utilisation de fragments Fab (l'anticorps secondaire utilisé dans le marquage du RGly endogène n'est plus divalent), (ii) la diminution du nombre d'étapes (réalisation d'un précouplage anticorps/QDot dans le cas du marquage du RGly exogène) et (iii) l'utilisation de solutions très diluées d'anticorps (de l'ordre du μg/ml), de nanocristaux ou de nanocristaux couplés à des anticorps (0.2-0.3 nM). Par ailleurs, les effets de gène stérique associés à la géométrie quasi 2D du système jouent en notre faveur : par exemple, si plusieurs anticorps peuvent être attachés au même QDot, leur proximité nécessaire pour pouvoir se lier à des récepteurs dans la membrane est peu favorable du fait de leur encombrement stérique.

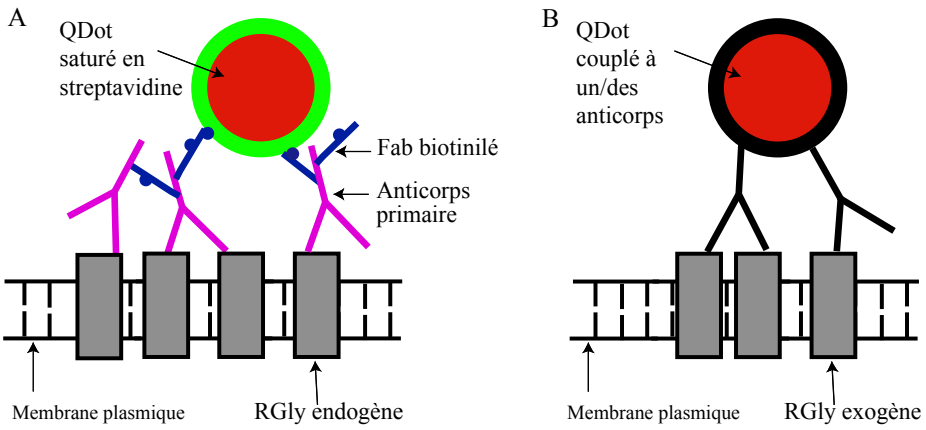

Figure 2.15 – *Agrégation artificielle de récepteurs. Cas extrêmes de marquage du RGly endogène (A) et exogène (B) avec une mauvaise stoechiométrie dûe à la divalence des anticorps et à la présence de multiples Fab (A) sur un même anticorps et/ou sur un même QDot ou de multiples anticorps (B) sur un même QDot.*

Unicité des RGly suivis

L'utilisation du clignotement des nanocristaux et la mise au point des conditions de marquage permettent de maximiser la probabilité d'avoir un QDot par RGly suivi. Cependant, il reste encore la possibilité que ce récepteur soit lui-même au sein d'un agrégat de récepteurs (créé par des ef-

fets d'interactions, indépendamment du marquage, avec des éléments sous-membranaires ou dans la membrane ou encore entre récepteurs). L'état d'oligomérisation du récepteur étant inaccessible, il est impossible d'agir à ce niveau là.

2.4.3 Avantages comparés des sondes biologiques

Pour effectuer des expériences de SPT, quatre types de sondes sont disponibles : les fluorophores organiques (Cy3, Cy5, FITC, Rhodamine, Alexa488,...), les protéines fluorescentes (GFP, YFP,...), les nanocristaux semiconducteurs (CdSe/ZnS émettant à 585nm, 605 nm, 655nm,...) et les billes (d'or, de latex). Pour estimer leurs performances, quatre critères doivent être pris en compte et mis en regard avec les attentes et les contraintes introduites par le système biologique que l'on souhaite étudier : leur taille, leur photostabilité, leur facilité à être détectées et leur capacité à être conjuguées à la molécule d'intérêt avec un bon rapport stoechiométrique (idéalement 1 :1). La table 2.1 donne un aperçu des valeurs des différents paramètres utiles pour comparer les sondes entre elles.

Excepté pour les billes qui peuvent être observées en lumière blanche (contraste de phase ou contraste interférentiel différenciel (DIC)), la bonne détection des sondes dépend directement du rapport signal à bruit de la fluorescence qu'elles émettent (voir 2.3.2.2). Rappelons que le SNR est lié au nombre de photons N détectés pour un émetteur unique en un temps d'acquisition τ selon : SNR $\approx \sqrt{N}$. N est donné par l'équation suivante :

$$N = \alpha \chi s_e \frac{I\lambda}{hc}\tau \;\; avec \;\; s_e = \frac{2.303\varepsilon}{N_A}$$

α étant l'efficacité de détection (0.1-5%), χ le rendement quantique, λ la longueur d'onde d'émission, h la constante de Planck, c la célérité de la lumière, I l'intensité d'excitation (exprimée en nombre de photons par unité de surface), s_e est la section efficace d'absorption, ε le coefficient d'absorption molaire et N_A le nombre d'Avogadro. Finalement, le SNR est d'autant plus grand que le coefficient d'extinction molaire (ε) des molécules est important. C'est ce dernier paramètre, valeur intrinsèque à la sonde, qui est indiqué dans la table 2.1.

Sonde	Taille	Photostabilité	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	Stoechiométrie
Fluorophore organique	1 nm	1-10s	$\sim 10^5$	Bonne
GFP	2-4 nm	100 ms	$\sim 10^4$-10^5	Excellente
QDot	~10-25 nm	>20 min	$\sim 10^6$	Moyenne
Bille	40 nm-1 μm	∞	-	Faible

Table 2.1 – *Tableau comparatif des différentes sondes utilisées pour le suivi de molécules uniques (extrait de [33]). La taille désigne le diamètre de la sonde (une fois qu'elle est biocompatible). La photostabilité correspond à la durée pendant laquelle la sonde peut être observée en continu. Le coefficient d'extinction molaire (ε) reflète la capacité de la sonde (en solution) à absorber un rayonnement. Le paramètre de stoechiométrie indique qualitativement dans quelle mesure la sonde peut être couplée avec la molécule d'intérêt dans un rapport avoisinant 1 :1.*

En résumé, les nanocristaux sont des sondes de taille raisonnable (par rapport aux billes), même après fonctionnalisation, qui permettent d'effectuer des acquisitions sur de longues durées, avec un très bon rapport signal à bruit (par rapport aux fluorophores organiques et à la GFP). De plus, de nombreuses molécules marquées avec différents nanocristaux peuvent être facilement visualisées simultanément (difficile voire impossible avec les autres sondes), ce qui ouvre la voie à des détections multiplexes [23]. L'intérêt qu'ils suscitent est donc à la mesure du nombre de facteurs positifs qu'ils permettent d'associer.

2.4.4 Influence de la sonde sur la diffusion latérale dans les membranes

2.4.4.1 Diffusion de lipides dans des membranes modèles

Dans un premier temps, nous avons souhaité étudier expérimentalement l'influence de la sonde sur la diffusion latérale des lipides dans une bicouche lipidique, membrane la plus simple possible. Ce travail a été effectué avec l'aide d'un stagiaire de M2, Alexander Podzorov.

Composition des bicouches, marquage des lipides

Tous les lipides utilisés sont achetés chez Avanti Polar Lipides, USA. Le phospholipide qui va constituer la matrice principale de la bicouche est du DOPC (1,2-Dioléoyl-sn-Glycero-3-Phosphocoline). Pour éviter la démixion des lipides, les autres lipides qui seront insérés dans cette matrice se doivent d'avoir des chaînes hydrophobes identiques à celles du DOPC. De plus, pour éviter leur agrégation, leur concentration ne doit pas dépasser 2$\%$. En plus du DOPC, voici les différentes compositions que nous avons employées :

- le 1,2-Dioléoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoéthanolamine-N-(Carboxyfluorésceine) est un lipide qui a la même chaîne grasse que le DOPC et qui contient au niveau de sa tête polaire un fluorophore organique qu'est la fluorescéine. On l'utilise fortement concentré (1%) pour obtenir un marquage uniforme de la bicouche lors des expériences de FRAP (pour vérifier la qualité de la bicouche, voir ci-dessous).
- le 1,2-Dioléoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoéthanolamine-N-(Lissamine Rhodamine B Sulfonyl) est quant à lui marqué avec de la Rhodamine B. Il est utilisé pour suivre en molécule unique la diffusion d'un lipide directement marqué avec un fluorophore unique (ici, la stoechiométrie est de fait dans un rapport 1 :1). Une concentration très faible (de l'ordre de $10^{-6}\%$) permet alors d'obtenir une dizaine de molécules marquées dans un champ d'observation d'environ 20μm*20μm (l'aire moléculaire d'un lipide étant de l'ordre de 1 nm^2).
- le 1,2-Dioléoyl-sn-Glycéro-3-Phosphoéthanolamine-N-(Biotinyl) contient une biotine que l'on va pouvoir exploiter pour réaliser deux types de marquage. Une incubation de la bicouche en présence de Cy3-streptavidinés ou de QDots-streptavidinés (concentration de l'ordre du nanoMolaire) permet d'obtenir un marquage de ces lipides biotinylés au niveau de la molécule individuelle, avec différentes tailles de sonde.

En résumé, on dispose de trois types de sondes pour marquer un lipide et suivre sa dynamique en SPT : (1) la rhodamine seule, d'une taille de l'ordre d'un nanomètre, (2) du Cy3-streptavidiné (*Cy3-Sav*), la taille de l'ensemble étant de l'ordre de 5-6 nm, (3) des QDots-streptavidinés (*QDot-Sav*) de diamètre 15-20 nm.

Fabrication et qualité des bicouches

Pour fabriquer des bicouches lipidiques, nous avons utilisé une technique dite par "éclatement de vésicules". Celle-ci repose sur la formation spontanée d'une bicouche lors du dépôt de liposomes sur un substrat hydrophile. Brièvement, le protocole consiste en quatre étapes principales : (1) la solution initiale de lipide est parfaitement séchée, (2) la réhydratation du film de lipides secs conduit à la formation de liposomes (de tailles et de structures différentes), (3) une sonication de la solution ainsi obtenue suivie d'une centrifugation permet d'obtenir une solution contenant uniquement de petits liposomes unilamellaires (d'une centaine de nanomètres de diamètre), (4) le dépôt d'une goutte sur une lamelle de verre préalablement nettoyée conduit à la formation de la bicouche. De plus, nous avons mis au point un support facilement utilisable sur notre microscope : une boite de pétri trouée, sur laquelle on colle préalablement une lamelle de verre où l'on vient déposer directement la bicouche.

Toutes les expériences sont effectuées à température ambiante (≈25°C), c'est à dire au dessus de la température de transition de phase du DOPC ($T_m = -20°C$). Les phospholipides sont alors dans une phase complètement désordonnée, la bicouche est fluide. Nous avons alors effectué quelques mesures de FRAP pour vérifier la qualité de la bicouche (principalement, pour tester son homogénéité). On photoblanchie une petite zone d'une bicouche contenant 1% de lipides marqués à la fluoresceïne, et on mesure le retour de fluorescence (voir fig. 2.16). *A priori*, ces mesures permettent de retirer deux types d'information : la fraction immobile de lipide est donnée par la valeur asymptotique du retour de fluorescence ; le taux de retour permet d'estimer le coefficient de diffusion des lipides marqués.

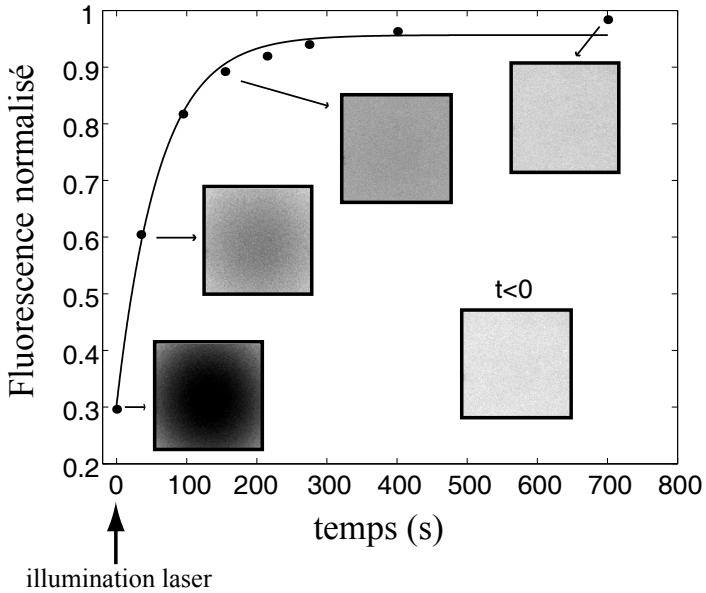

Figure 2.16 – *Exemple d'expérience de FRAP. Données (points) et ajustement par une fonction de type mono-exponentielle (trait plein) du retour de fluorescence. La zone est photoblanchie à t= 0.*

En raison de limitations techniques (notre montage n'est initialement pas dédié à faire des mesures de FRAP), les courbes obtenues ne permettent pas d'estimer précisément le coefficient de diffusion des lipides. En effet, chaque prise d'image introduit une diminution du niveau de fluorescence et perturbe ainsi le retour observé. Ceci n'est pas gênant pour estimer la valeur asymptotique du

retour de fluorescence puisqu'il suffit pour cela de prendre une image avant photoblanchiment, une image juste après et une image au bout d'un temps long (quelques dizaines de minutes). Une estimation grossière du coefficient de diffusion nous donne une valeur de l'ordre de $1\mu m^2.s^{-1}$. La fraction immobile estimée est inférieure à 2%. Cette fraction peut refléter des lipides immobilisés comme la présence de trous éventuels dans la bicouche. Nous jugeons ce niveau d'homogénéité de la bicouche suffisant pour pouvoir effectuer des mesures en SPT. Étant donné que notre but n'est pas ici de comparer les techniques de FRAP et de SPT, nous ne nous sommes pas attardés à faire les modifications nécessaires pour faire des mesures de coefficient de diffusion précises.

Par ailleurs, notons qu'il existe une deuxième méthode très répandue pour réaliser des bicouches : la technique de Langmuir-Blodgett. Celle-ci repose sur quatre étapes principales : (1) un film de lipides, de pression contrôlée, est constitué à la surface d'un bain d'eau, (2) lorsque l'on retire une lamelle de verre préalablement trempée dans le bain, une monocouche se forme à sa surface, (3) un deuxième film de lipide est à nouveau constitué sur la surface du bain, (4) la bicouche est formée lorsque la lamelle est replongée dans le bain. Cette technique permet un meilleur contrôle de l'homogénéité et offre la possibilité de former des bicouches avec des monocouches de constitutions différentes. Toutefois, sa mise en œuvre demande beaucoup plus de temps (au moins une heure par lamelle) et un matériel bien plus important. Finalement, la technique par "éclatement de vésicules" a été retenue car elle permet d'obtenir facilement et rapidement des bicouches de qualité satisfaisante.

Résultats

Pour chaque type de sonde, on fait l'acquisition de plusieurs films dont on extrait des trajectoires de marqueurs individuels. L'unicité du fluorophore (rhodamine ou Cy3) est donné par son photoblanchiment en une étape, et seuls les QDots qui s'éteignent durant un temps d'acquisition complet sont suivis. On calcule ensuite la fonction de déplacement quadratique moyen (notée $\rho(t)$) pour chaque trajectoire individuelle. Sa linéarité en fonction du temps nous permet de vérifier que la diffusion des lipides dans la bicouche est bien libre et nous permet d'estimer le coefficient de diffusion correspondant. Les techniques utilisées pour extraire les trajectoires et pour estimer le coefficient de diffusion seront reprises en détail dans la partie suivante (3.3), retenons simplement pour l'instant que pour une diffusion libre dans un espace 2D (ici la bicouche), on a $\rho(t)$=4Dt.

Les histogrammes des coefficients de diffusion sont indiqués sur la figure 2.17. Les temps d'acquisitions, les longueurs moyennes des trajectoires et les coefficients de diffusions moyens sont résumés dans la table 2.2.

Sonde	Taille	$T_{acq}(ms)$	$L_{moyen}(s)$	$D_{moyen}(\mu m^2.s^{-1})$	nb
Rhodamine	1 nm	10	1.5	1.6±0.3	36
Cy3-Sav	5-6 nm	55	1.9	1.8±0.7	36
QDot-Sav	15-20 nm	75	27.3	0.2±0.2	32

Table 2.2 – *Pour les trois types de sondes : temps d'acquisition (T_{acq}), nombre (nb) et longueur moyenne (L_{moyen}) des trajectoires, coefficient de diffusion moyen ± écart type obtenus.*

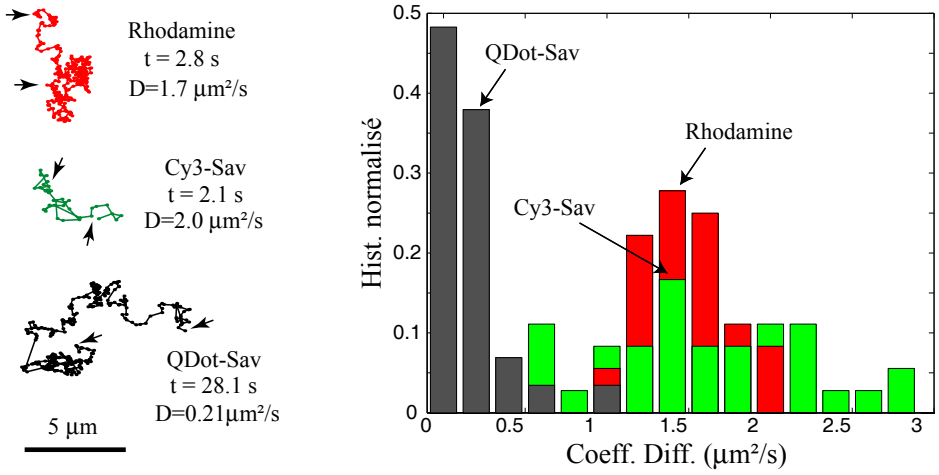

Figure 2.17 – *Influence de la sonde sur la mesure de la diffusion de lipides dans des bicouches modèles. (à gauche) Exemples de trajectoires, les extrémités sont marquées par des flèches. On indique la durée totale de la trajectoire (t) et son coefficient de diffusion (D). (à droite) Histogramme normalisé des coefficients de diffusion lorsque le lipide est marqué avec une molécule de rhodamine (∼ 1nm), de Cy3 streptavidiné (5-6nm) et un QDot streptavidiné (15-20 nm).*

Les coefficients de diffusion mesurés avec la rhodamine ou avec du Cy3-Sav sont similaires. Les valeurs moyennes sont équivalentes avec un étalement (donné par l'écart type) plus grand dans le cas du Cy3-Sav. Toutefois, étant donné, qu'avec Cy3-Sav, on mesure aussi bien des coefficients de diffusion plus grands que plus petits que ceux obtenus avec la rhodamine, on peut supposer que cela provient uniquement du faible effectif utilisé. En revanche, les valeurs mesurées avec un QDot-Sav sont bien éloignées de celles obtenues avec des fluorophores organiques. Les histogrammes correspondants ne se recouvrent pas ou très faiblement et la valeur moyenne des coefficients de diffusion pour des QDots-Sav est quasiment 10 fois plus faible.

Interprétations

Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer la diminution du coefficient de diffusion observée lorsque l'on utilise un QDot-Sav comme sonde :

1. sa taille (15-20 nm de diamètre) n'est pas négligeable et ralentit la diffusion du lipide
2. comme un QDot contient de nombreuses molécules de streptavidine sur sa surface, il recrute plusieurs lipides et induit la formation d'agrégats de lipides. C'est le coefficient de diffusion de ces agrégats que l'on mesure et non pas celui d'un lipide individuel.

De manière générale, la diffusion libre d'une particule dans un milieu homogène est donnée par la relation d'Einstein : $D = (k_B T)/\gamma$, où D est le coefficient de la particule, T la température absolue, γ le coefficient de friction et k_B la constante de Boltzmann. La sonde peut être modélisée par une particule sphérique de rayon R', plongée dans un milieu de viscosité μ'. Le coefficient de friction d'une telle particule est bien connu et donne : $\gamma_{\text{sonde}} = 6\pi\mu' R'$. La viscosité de l'eau est $\mu' \approx 1cP$ (P pour Poise, $1P = 0.1kg.m^{-1}.s^{-1}$). Le coefficient de diffusion d'un QDot-Sav, à température ambiante, vaut alors $20\mu m^2.s^{-1}$, soit dix fois plus que celui d'un lipide. Ainsi, on peut considérer, qu'en raison de la différence de viscosité entre le milieu extérieur et la bicouche (μ est 100 à 1000 fois plus élevée

que μ'), l'influence de la taille du QDot-Sav est négligeable.

Ainsi, il semble que le QDot-Sav soit à l'origine de la formation d'agrégats artificiels de lipides biotinylés, via les multiples molécules de streptavidine sur sa surface. Notons que la streptavidine est un tétramère [110], ainsi chaque molécule de streptavidine peut potentiellement s'accrocher à quatre molécules de biotine. Toutefois, étant donné que la diffusion en présence de rhodamine et de Cy3-Sav est similaire, on peut supposer que ce n'est pas cet effet qui est responsable de la formation éventuelle d'agrégats de lipides.

2.4.4.2 Comparaison avec la membrane plasmique

Nos expériences sur membranes réelles diffèrent notablement des expériences sur membranes modèles :

- d'une part, la viscosité apparente d'une membrane réelle est bien plus élevée que celle d'une bicouche lipidique simple. Pour preuve, les coefficients de diffusion de protéines (et de lipides [104]) mesurés dans des membranes réelles sont environ 10 fois plus faibles que ceux mesurés dans des membranes artificielles (ceci provient certainement d'interactions avec des obstacles membranaires et/ou sous-membranaires). Ainsi, l'influence de la taille de la sonde utilisée est négligeable (jusqu'à $1\mu m$ de diamètre).
- d'autre part, la probabilité qu'un même QDot soit à l'origine de la formation d'un agrégat de récepteur est bien plus faible que dans le cas des lipides. Ceci vient de la présence d'étapes intermédiaires de marquage (basées sur l'utilisation d'anticorps) et des effets d'encombrement stérique qui en résultent (voir 2.4.1).

De plus, des résultats expérimentaux ont démontré que les coefficients de diffusion du RGly endogène mesurés avec du Cy3-Sav et avec des QDot-Sav sont identiques [34].

Finalement, on peut donc être confiant dans l'absence d'artefacts introduits par l'utilisation de QDots comme marqueur de protéines membranaires individuelles. Bien évidemment, ceci n'est valable qu'en l'absence d'obstacles dans la partie extracellulaire de la membrane.

Chapitre 3

Automatisation du suivi et de l'analyse

Sommaire

3.1 Introduction **64**
3.1.1 Données types 64
3.1.2 Mouvement brownien et coefficient de diffusion 66
3.2 Suivi de nanocristaux uniques **68**
3.2.1 Introduction 68
3.2.1.1 Les différentes méthodes de suivi 68
3.2.1.2 Problématique 69
3.2.2 Les différentes étapes du suivi 69
3.2.2.1 Suivi automatique 69
3.2.2.2 Post-traitement manuel 71
3.2.3 Performances et limitations 71
3.2.3.1 Précision de pointé 71
3.2.3.2 Performances du suivi 73
3.3 Analyse des trajectoires **76**
3.3.1 Quantification de la diffusion : les méthodes de la littérature 76
3.3.1.1 Fonction de déplacement quadratique moyen 76
3.3.1.2 Les outils pour distinguer différents types de mouvement . 81
3.3.2 Méthodes utilisées pour quantifier la diffusion 85
3.3.2.1 Coefficient de diffusion aux temps courts 86
3.3.2.2 Diffusion libre et diffusion restreinte 88
3.3.3 Étude de la localisation des particules 91
3.3.3.1 Définition de la localisation 91
3.3.3.2 Quantification de la diffusion en fonction de la localisation 93
3.3.3.3 Temps de résidence et nombre de transitions 94
3.3.4 Le "logiciel" d'analyse 96

3.1 Introduction

Les améliorations des techniques de microscopie combinées à l'élaboration de sondes fluorescentes, permettant le marquage de bon nombre de protéines, ont permis à l'imagerie biologique sur cellules vivantes de se développer de manière considérable [144]. L'imagerie biologique ne se réduit plus à une prise d'images offrant des vues statiques mais permet de visualiser directement les processus, nécessairement dynamiques, se produisant au sein des cellules. Pour les comprendre, une analyse quantitative des données est nécessaire. Étant donné la quantité et la complexité des images obtenues, leurs traitements tendent à être automatisés. Du fait de la grande diversité des systèmes biologiques étudiés, les analyses doivent être spécifiquement adaptées.

Les expériences de suivi de molécules uniques permettent l'acquisition de séquences d'images de fluorescence reflétant le mouvement de nombreuses particules simultanément. Plusieurs traitements sont nécessaires pour permettre d'extraire de ces données brutes des informations caractérisant le système biologique étudié. Tout d'abord, un traitement des images adapté doit être appliqué pour disposer des trajectoires des particules présentes dans la séquence d'image. Pour obtenir de l'information utile, il s'ensuit une étape d'analyse de ces trajectoires basée sur l'utilisation de paramètres physiques pertinents.

L'automatisation du suivi et de l'analyse doivent permettre un traitement des données rapide, reproductible et objectif. De plus, les outils de suivi et d'analyse se doivent d'être distincts et modulaires pour pouvoir rajouter tout type d'analyse des trajectoires sans avoir à relancer un nouveau suivi. Notons que tous les programmes de suivi et d'analyse décrits dans ce chapitre ont été développés sous Matlab (MathWorks).
Dans la partie 3.2, nous décrivons les outils de suivi automatique développés dans l'équipe. Le choix des algorithmes utilisés et le développement des programmes spécifiquement destinés au suivi de nanocristaux uniques fait partie du travail de thèse de Stéphane Bonneau [1] [9]. Nous en présentons les principes et insistons sur leurs performances. La partie 3.3 expose les différentes méthodes d'analyse des trajectoires de la littérature et détaille celles que nous avons utilisées et/ou développées.

Les nombreux avantages des nanocristaux comme sonde pour le suivi de molécules biologiques ont été précédemment présentés (voir 2). Tout au long de ce chapitre, l'accent est mis sur les moyens de prendre en compte et de pallier les contraintes issues de leur propriété de clignotement.

Avant de nous pencher sur les méthodes de suivi et d'analyse, nous allons présenter les différentes données dont on dispose à l'issue des manipulations, et introduire des notions auxquelles nous ferons appel dans toute la suite.

3.1.1 Données types

Toutes les données sont acquises avec le logiciel Metaview (Universal Imaging) sur le montage décrit précédemment (voir 1.3.2). L'illumination de la lamelle est déclenchée automatiquement au moment de l'acquisition. Classiquement, trois types de données (voir fig. 3.1) sont prises pour chaque zone d'observation, de taille typique 28μm*28μm (dans le plan objet) :

1. une image en transmission, pour visualiser les cellules présentes sur la zone d'observation. Elle sert de contrôle pour vérifier la morphologie des cellules et l'état de la culture (absence de

[1] Thèse de Mathématiques Appliquées à l'Analyse d'Image réalisée au CEREMADE, Paris Dauphine, en collaboration avec le laboratoire Kastler Brossel

contamination, de débris). Elle est également utilisée pour vérifier la spécificité du marquage (pour voir la proportion de sondes accrochées spécifiquement aux cellules par rapport aux sondes qui s'attachent à la lamelle)

2. une séquence d'image, appelée film, des nanocristaux. Typiquement, on acquiert 512 ou 1024 images en continu avec un temps d'acquisition, T_{acq}, de 75 ms. On limite la durée des films non pas en raison de la photostabilité des nanocristaux mais du fait de la masse informatique des données générées.

3. une image de localisation qui permet d'obtenir une cartographie d'une autre composante des cellules que l'on souhaite mettre en relation avec les molécules marquées par les nanocristaux.

Pour étudier l'influence des synapses sur la dynamique du récepteur endogène, on utilise une image dite FM. Celle-ci correspond au marquage des terminaisons pré-synaptiques de manière spécifique à l'aide du marqueur fluorescent FM 4-64 (Molecular Probes). Lors de l'étude de l'interaction récepteur-géphyrine dans des systèmes modèles (voir chapitre 5), on utilise une image dite Venus. Celle-ci permet de visualiser les agrégats de molécules de géphyrine, marquées avec une protéine fluorescente jaune (YFP) très brillante appelée Venus. Ces marqueurs fluorescents (FM et Venus) sont bien moins stables que les nanocristaux, cette image est donc la première a être acquise. De plus, pour éviter tout signal parasite lors de l'acquisition des films, on éteint préalablement le signal FM avec le laser à 532 nm. Cette étape est inutile dans le cas d'une image Venus car les spectres d'émission de la Venus et des nanocristaux utilisés sont bien séparés.

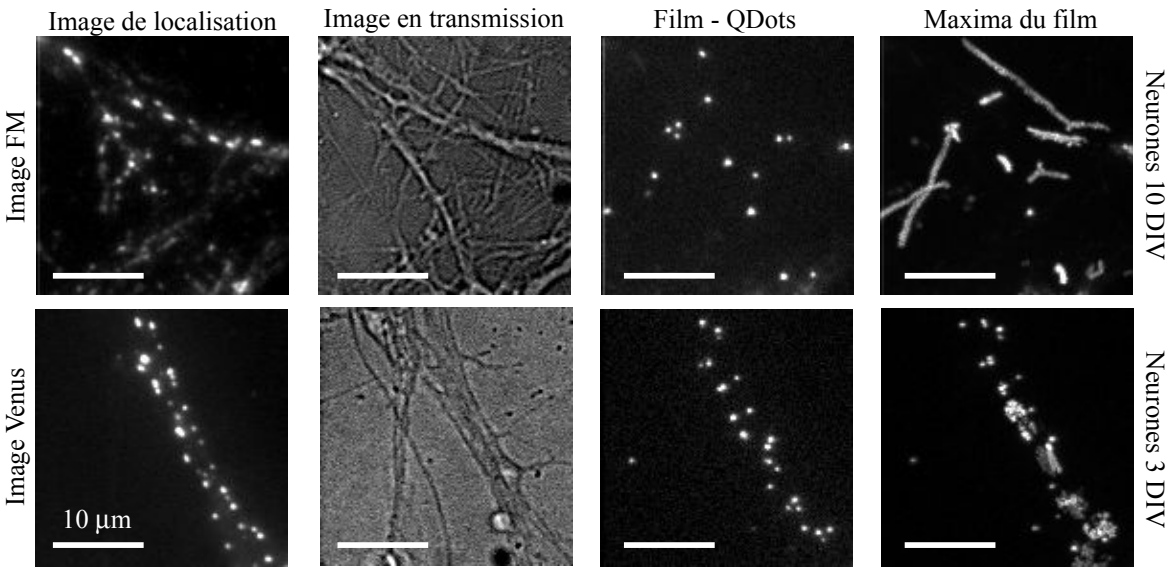

Figure 3.1 – *Données types. (en haut) Dans des neurones adultes (10DIV), l'image FM permet de localiser les synapses, les QDots marquent des RGly endogènes. (en bas) Dans des neurones jeunes (3DIV), l'image Venus permet de localiser les agrégats de géphyrine, les QDots marquent des RGly exogènes*

3.1.2 Mouvement brownien et coefficient de diffusion

Dans le cas d'une diffusion pure (sans vitesse d'entraînement ni source quelconque de confinement), le mouvement des protéines dans la membrane plasmique résulte principalement de l'agitation thermique des molécules environnantes. Cette marche, aléatoire et statistiquement isotrope, peut être modélisée par un mouvement brownien bidimensionnel.

Le mouvement brownien tire son nom du botaniste anglais Brown qui observa, en 1928, les déplacements erratiques de grains de pollens immergés dans de l'eau. Ce phénomène a ensuite été décrit à partir du début du XXème siècle, notamment grâce aux contribution d'Einstein, Smoluchowski et Langevin [60, 42]. Plusieurs formulations mathématiques du mouvement brownien ont été mises au point. Nous en présentons ici succinctement quelques-unes : d'une part, le modèle de Langevin pour introduire physiquement le coefficient de diffusion et d'autre part, les formulations que nous avons directement utilisées.

Modèle de Langevin

Pour plus de simplicité, traitons le mouvement brownien dans le cas 1D. Considérons une particule, de masse m, immergée dans un fluide, de coordonnée x(t) à l'instant t. Sa dynamique, dans le modèle de Langevin [121] est régie par l'équation suivante :

$$m\frac{d^2x}{dt^2} = \sum F = F_{visc} + F_{ext} + F_T \tag{3.1}$$

$F_{visc} = -\gamma\frac{dx}{dt}$ est la force de frottement visqueux, γ étant le coefficient de friction. F_{ext} désigne une force extérieure supplémentaire (comme une force élastique de rappel ou une force électrique). F_T est une force d'origine thermique liée au fait que la particule est soumise à de multiples collisions avec les autres molécules du fluide. F_T est modélisée par un processus aléatoire stationnaire, elle est définie par les propriétés statistiques suivantes :

- $\langle F_T(t)\rangle = 0$ ainsi F_T n'a pas de direction privilégiée
- $\langle F_T(t)F_T(t+\tau)\rangle = 2\gamma^2 D\delta(t)$, où $\delta(t)$ est une distribution de Dirac, ainsi les corrélations temporelles (dues aux interactions entre molécules) sont négligées.

L'équation 3.1 est une équation stochastique qui permet de déterminer uniquement des propriétés statistiques sur la position et sur la vitesse de la particule. En la résolvant dans le cas simple où $F_{ext} = 0$, on obtient finalement après calculs :

$$\left\langle (x(t+\tau) - x(\tau))^2 \right\rangle = 2Dt \text{ pour } t \gg \frac{m}{\gamma}$$

Ce résultat permet alors d'interpréter D, relié aux fluctuations de la force thermique due aux petites molécules du fluide, comme le coefficient de diffusion spatial de la particule.

La relation d'Einstein, $D = (k_B T)/\gamma$ relie le coefficient de diffusion D à la température absolue T et à la friction γ, k_B étant la constante de Boltzmann. Elle met en valeur l'augmentation du coefficient de diffusion avec la température et son invariance vis à vis de la masse de la particule.

Marche au hasard

Le mouvement de la particule suit une marche au hasard. Sa position à l'instant t+τ, x(t+τ), dépend de sa position à l'instant t suivant la fonction suivante :

$$x(t+\tau) = x(t) + \sqrt{2D\tau\xi} \tag{3.2}$$

où ξ est une réalisation d'une variable aléatoire gaussienne de moyenne nulle et de variance 1. Notons que cette formulation est équivalente à celle de Langevin dans la limite où les effets inertiels sont négligeables ($\tau \gg \frac{m}{\gamma}$).

Pour une diffusion pure en deux dimensions, les déplacements selon les deux directions, x et y, sont indépendants. Tous deux peuvent ainsi être exprimés selon la même relation 3.2.

Équation de diffusion

Replaçons nous désormais dans le cas de mouvement 2D. On considère une particule soumise à un mouvement brownien dans un système homogène bidimensionnel. Soit $f_B(r,t)$ la densité de probabilité de la particule brownienne d'avoir parcourue une distance r en une durée t. Cette densité obéit à l'équation de diffusion :

$$\frac{\partial f_B(r,t)}{\partial t} = D\triangle f_B(r,t)$$

En prenant, $r = 0$ pour $t = 0$, $f_B(r,t)$ s'écrit :

$$f_B(r,t) = \left(\frac{1}{4\pi Dt}\right)\exp\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right) \tag{3.3}$$

Le déplacement quadratique moyen, $\rho(t)$, en tant que moment d'ordre 2 de la distribution de probabilité des déplacements de la particule peut alors être évalué selon :

$$\rho(t) = \int_0^\infty r^2 f_B(r,t) 2\pi r dr = 4Dt \tag{3.4}$$

Finalement, en notant $\overrightarrow{r}(t)$ de coordonnées (x(t),y(t)) la position de la particule à l'instant t, on peut exprimer $\rho(t)$ ainsi :

$$\rho(t) = \langle \| \overrightarrow{r}(t+\tau) - \overrightarrow{r}(\tau) \|^2 \rangle = 4Dt \tag{3.5}$$

Simulation numérique de mouvements browniens 2D

D étant fixé, on souhaite disposer de trajectoires correspondant à une diffusion pure en deux dimensions. Plusieurs méthodes sont envisageables pour simuler numériquement des trajectoires composées de N points de coordonnées $\{x_k, y_k\}_{k=1...N}$ et séparés par un pas de temps τ :

1. A chaque pas de temps τ, on tire deux variables aléatoires d_x et d_y dans une distribution gaussienne de moyenne nulle et de variance $2D\tau$. La trajectoire est construite selon la relation 3.2 en prenant : $x(k+1) = x(k) + d_x$, $y(k+1) = y(k) + d_y$.
2. A chaque pas de temps τ, une direction est choisie au hasard (pour avoir un mouvement isotrope en moyenne) et la longueur du pas est tiré aléatoirement au sein de la distribution $f_B(r,t)$ donné par la relation 3.3
3. Chaque pas séparés par un temps τ est subdivisé en n sous-pas de longueur fixe.

Cette dernière possibilité, équivalente aux autres [132], est plus lente mais est aussi bien plus simple numériquement. En effet, elle ne nécessite pas de disposer de générateur de nombre aléatoire au sein de distributions gaussiennes, elle requiert uniquement un générateur aléatoire de loi uniforme. C'est sur ce dernier principe que j'ai effectué toutes les simulations numériques de trajectoires. Concrètement, on tire n valeurs d'angle θ_i au sein d'une distribution uniforme définie sur l'intervalle $[0 \;\; 2\pi[$ et on prend $x_{k+1} = x_k + \sum(l\cos(\theta_i))$, $y_{k+1} = y_k + \sum(l\sin(\theta_i))$, avec $l = \sqrt{4D(\tau/n)}$.

3.2 Suivi de nanocristaux uniques

3.2.1 Introduction

Après avoir fait l'acquisition d'un film, on dispose d'une série d'images qui sont composées de taches, suffisamment lumineuses pour sortir du bruit, que l'on appelle "spots". On souhaite suivre chaque spot, c'est à dire le reconnaître spécifiquement sur chaque image, et lui attribuer sa trajectoire (sa position en fonction du temps).

3.2.1.1 Les différentes méthodes de suivi

Le suivi automatique d'objets en mouvement est un thème très important en analyse d'image avec de nombreuses applications telles que la vidéo-surveillance, la compression des séquences d'images, la vision robotique, l'imagerie médicale ou biologique. Dans le domaine de la biophysique et de la biologie, différentes méthodes ont été introduites pour suivre des sondes fluorescentes [22, 26, 97, 11, 128].

Ces méthodes peuvent être classées en deux catégories : soit les images sont traitées de manière séquentielle (une par une), soit la séquence d'image 2D, assimilée à un volume 3D spatiotemporel, est traitée *a posteriori*. Dans un premier tant, notre choix s'est porté sur un traitement des images "à la volée". Ce type d'analyse est d'une part beaucoup plus étudié, et d'autre part il permet d'envisager à terme un traitement en temps réel des données. Une approche *a posteriori*, potentiellement plus robuste mais par définition inapplicable en temps réel, a par la suite également été développée (voir chapitre 6).

Les techniques de traitement image par image peuvent être divisées en deux groupes avec, d'une part celles qui permettent de suivre un objet à la fois, et d'autre part les approches plus élaborées qui permettent le suivi de nombreux objets en parallèle. Les techniques du premier type, les premières à avoir été mises en place, exigent une grande interaction avec l'utilisateur et ne permettent pas de suivre des objets s'ils se croisent. Leur mécanisme est le suivant : (1) l'utilisateur sélectionne sur une image une zone d'intérêt contenant une sonde fluorescente, (2) une méthode choisie est appliquée pour localiser la sonde en question (estimation du centre de masse de la zone d'intérêt, régression gaussienne du signal de fluorescence, ...), (3) la position ainsi trouvée est utilisée pour re-positionner la zone d'intérêt sur l'image suivante et ainsi de suite. L'analyse dite "manuelle" des séquences d'images, à laquelle les biologistes ont encore parfois recours, est un exercice très laborieux qui, de plus, manque de reproductibilité. Le développement de méthodes susceptibles d'analyser les films de manière automatique, robuste et rapide fait aujourd'hui l'objet d'une forte attente de la part des biologistes et biophysiciens. De manière générale, ces techniques procèdent en deux étapes principales appliquées à chaque $k^{ème}$ image de la séquence :

- une étape de détection où les spots de fluorescence sont détectés, cette étape requiert généralement la réduction du bruit par un système de filtrage adapté (tels un seuillage par ondelette ou un filtrage adaptatif établi à partir d'une modélisation du montage optique)
- une étape d'association où les spots détectés sont mis en correspondance avec les trajectoires partielles obtenues à partir des (k-1) images précédentes. Toute la difficulté du problème réside dans cette étape. En effet, les méthodes utilisées pour apparier les points doivent être spécifiquement adaptées au type d'objet étudié et à leur comportement dynamique.

3.2.1.2 Problématique

Avec ses premières expériences en molécules uniques, l'équipe Optique et Biologie a développé un logiciel de suivi de type manuel. Cependant, l'automatisation du suivi est rapidement devenue nécessaire à la vue de l'augmentation du nombre de données et de l'utilisation des nanocristaux semiconducteurs.

Le problème posé est *a priori* difficile à résoudre. Par exemple, le nombre et la position de ces spots évoluent le long du film, d'une part pour des raisons biologiques (les molécules marquées pouvant entrer et sortir du champ observé), et d'autre part, en raison du clignotement aléatoire des nanocristaux. C'est d'ailleurs dans cette propriétés que réside la principale difficulté d'association des spots d'une image à l'autre. Dans la mesure où l'on essaie de suivre des objets ponctuels dont l'intensité lumineuse varie dans le temps d'une manière non prévisible, les attributs visuels couramment utilisés en traitement d'images pour identifier un même objet au cours du temps (taille, forme, intensité, texture) [155] ne sont pas utilisables . De plus, le fait que les nanocristaux n'émettent de la lumière que par intermittence rend caduque l'usage de contraintes topologiques [157] susceptibles de limiter le nombre de trajectoires erronées. Enfin, les protéines membranaires ont un mouvement de type diffusif. Par conséquent, les algorithmes classiques de mise en correspondance de points en mouvement, utilisant la directivité des trajectoires pour parvenir à les reconstruire, ne sont pas applicables [159].

L'obtention des trajectoires est alors d'autant plus compliquée que la densité en QDot est élevée et que le clignotement est important. S'il sera toujours impossible de suivre un spot qui va en croiser un autre s'ils s'éteignent tous les deux lors de leur rencontre, nous allons maintenant décrire une solution qui a été mise en place pour pallier au mieux au phénomène de clignotement.

3.2.2 Les différentes étapes du suivi

Le processus permettant d'obtenir les trajectoires est résumé sur la figure 3.2. Il comprend un suivi automatique à l'issue duquel on obtient des trajectoires (complètes ou partielles) et une étape de post-traitement manuel qui permet d'obtenir les trajectoires finales qui seront analysées.

3.2.2.1 Suivi automatique

La méthode de suivi automatique que j'ai utilisée au cours de ma thèse a été présentée en conférence dès 2004 [10]. Les trajectoires sont construites par itération, les étapes de détection et d'association étant appliquées successivement à chaque image du film. L'étape de détection a déjà été décrite dans la partie 2.3.2.2. Intéressons nous ici à l'étape d'association.

Supposons que le suivi a déjà été effectué sur les $(k-1)^{\text{è}me}$ premières images. Nommons T_j les trajectoires qui en sont issues. r_j^l désigne le dernier élément d'une trajectoire T_j, l étant le numéro de l'image correspondante. Notons r_i^k la position d'un spot i détecté sur la $k^{\text{è}me}$ image. Le but de cette étape est alors de trouver à quelle T_j, r_i^k peut être associé.
Pour tenir compte du clignotement des QDots, on définit un paramètre p, nommé persistance, qui peut être réglé par l'utilisateur. p désigne le nombre d'images maximal pendant lesquelles un spot a pu être éteint de manière continue sans pour autant être considéré comme disparu. Concrètement cela signifie que toutes les trajectoires T_j de derniers éléments r_j^l qui vérifient $(k-1) \leq l \leq (k-p)$ sont des candidates potentielles pour l'attribution de r_i^k. La valeur de p prise par défaut est $p = 10$ images. Diminuer cette valeur accroît le nombre de trajectoires partielles correspondant à un même spot,

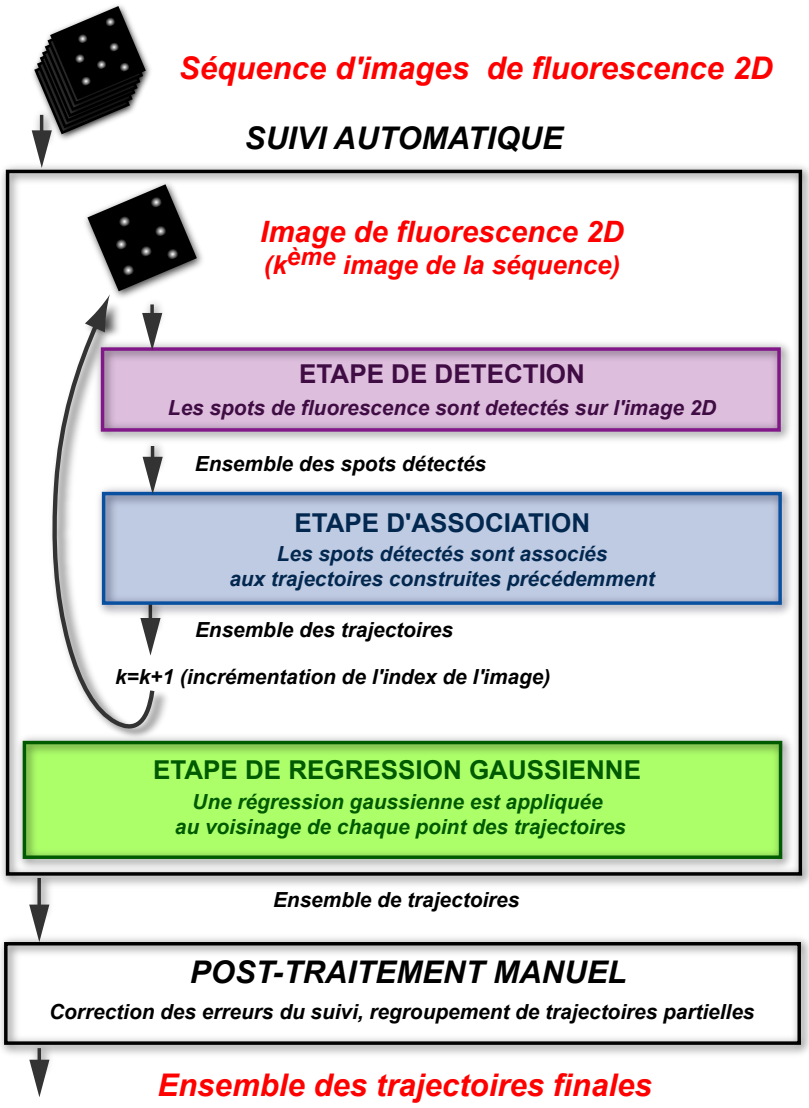

Figure 3.2 – *Diagramme fonctionnel de la méthode de suivi des nanocristaux*

tandis que prendre une valeur plus grande risque d'augmenter les erreurs d'association. On peut noter que la probabilité d'avoir un état éteint de durée supérieur à 10 images, soit 0.75 secondes, est en moyenne d'environ 15% (voir fig. 2.12, page 51).
On cherche ensuite la paire de spots $(r_i^k, r_j^{(k-1)\leq l\leq(k-p)})$ qui présente un moindre coût d'association. La fonction de coût choisie est ici la distance entre les deux spots $d_{i,j} = \|r_i^k - r_j^l\|$. r_i^k est donc assigné à son plus proche voisin.
De plus, un deuxième critère est ajouté pour prendre en compte la diffusion supposée Brownienne des particules suivies, et pour limiter les erreurs d'association. En effet, on considère la probabilité P_j d'avoir parcourue une distance $d_{i,j}$ pendant le temps séparant les images l et k (à partir de l'équation 3.3) pour chaque r_j^l. Seuls les r_j^d vérifiant $P_j \geq P_{\text{min}}$ sont pris en compte. Pour calculer P_j, le coefficient de diffusion instantané de T_j est estimé sur les 30 derniers points de la trajectoire. Si T_j ne contient pas assez de points pour ce calcul, un coefficient de diffusion par défaut est pris.

Si r_i^k ne peut être assigné à aucune des $T_j^{(k-1)\leq l\leq (k-p)}$ alors il devient le premier point d'une nouvelle trajectoire.

A l'issue de l'étape d'association, un ajustement par une gaussienne bidimensionnelle est effectué autour de chaque spot appartenant à une trajectoire (voir 2.3.2.2). Ceci permet de les pointer avec une grande précision (voir 3.2.3.1)

3.2.2.2 Post-traitement manuel

A l'issue du traitement automatique, on peut être en présence de plusieurs configurations :
- le suivi est optimal pour certains spots ;
- des artefacts (comme de petits débris sur la lamelle) ont donné lieu à des trajectoires ;
- des erreurs se sont produites (comme des sauts d'un spot à un autre) ;
- plusieurs trajectoires partielles correspondent à un même spot (qui aurait par exemple changé de dynamique brusquement).

L'étape de post-traitement manuel repose sur l'utilisateur qui va pouvoir agir sur chaque trajectoire : il peut ôter des trajectoires (où une erreur s'est produite ou encore trop courtes) et associer des trajectoires distinctes pour en former une seule plus longue. De plus, lors de cette étape, il est possible d'afficher les trajectoires et une autre image simultanément. Ceci permet d'ôter les trajectoires éventuelles qui ne sont pas pertinentes. Par exemple, en affichant l'image en transmission de la cellule considérée, il est possible de supprimer les trajectoires correspondant à des nanocristaux qui seraient attachés non spécifiquement à la lamelle.

La figure 3.3 illustre les résultats obtenus à l'issue du suivi automatique et suite au post-traitement manuel.

3.2.3 Performances et limitations

3.2.3.1 Précision de pointé

La détermination de la position d'un spot ne peut pas être absolue, elle est donnée à la précision de pointé près. Nous nous intéressons ici à la précision obtenue suite à l'ajustement de la fluorescence d'un spot par une gaussienne bidimensionnelle. Notons σ_x, σ_y les précisions suivant les directions x et y respectivement.

Limite théorique

Thompson et al. ont proposé, dans [148], un modèle théorique de cette erreur de pointé qui peut alors être exprimée comme suit :

$$\sigma_i^{th} = \sqrt{\left(\frac{s_i^2}{N} + \frac{h^2/12}{N} + \frac{8\pi s_i^4 \sigma_B^2}{h^2 N^2}\right)} \tag{3.6}$$

$$avec \begin{cases} i & : \text{direction considérée}, i = x \; ou \; y \\ N & : \text{nombre total de photons reçus pour ce spot sur cette image} \\ s_i & : \text{écart type de la gaussienne, dans la direction i, approximant la PSF} \\ \sigma_B & : \text{écart type du fond de l'image} \end{cases}$$

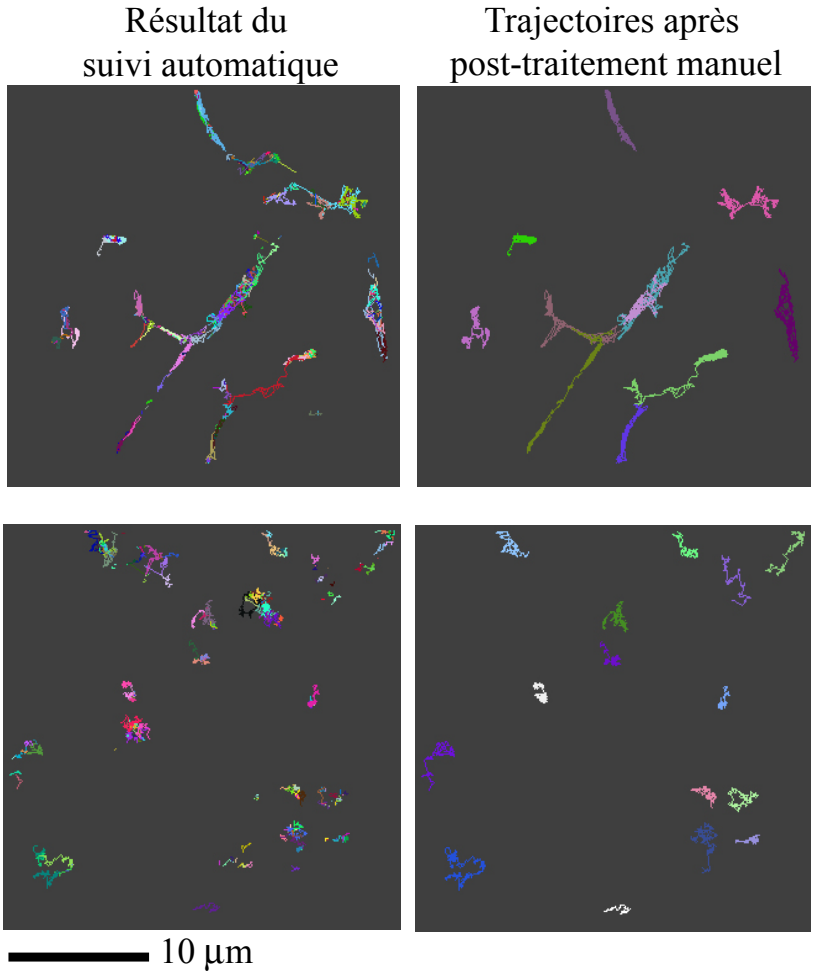

Figure 3.3 – *Intérêt du post-traitement manuel. Pour les exemples du haut et du bas respectivement, 200 et 217 trajectoires (partielles) sont obtenues à l'issue du suivi automatique, 11 et 15 trajectoires (complétées et/ou corrigées) sont directement exploitables à la fin du post-traitement. Chaque trajectoire est visualisée par une couleur aléatoire.*

Le premier terme (s_i^2/N) provient du bruit de photon, le second de l'effet de la pixelisation (qui introduit ici une incertitude sur l'endroit exact où arrive le photon) et le dernier des variations du fond de l'image. D'après cette formule, σ_i dépend essentiellement du nombre de photons reçu.

Mesures expérimentales

Pour déterminer la précision de pointé expérimentale, on utilise les films de nanocristaux fixes sur une lamelle déjà décrits dans la partie 2.3.2. Pour chaque spot, on recueille sa position (x_k, y_k) sur toutes les images k du film. Après avoir vérifié que ces positions sont distribuées selon une loi gaussienne, on calcule leur valeur moyenne et leur écart type au cours du film. Les déviations standards σ_x^{exp} et σ_y^{exp} ainsi obtenues donnent une mesure expérimentale des précisions de pointé en x et y du spot. Par ailleurs, le nombre moyen de photons reçus (N_m), les écarts types de la gaussienne dans les deux directions ainsi que σ_B ont été estimés dans la partie 2.3.2. Rappelons d'ailleurs que l'on avait

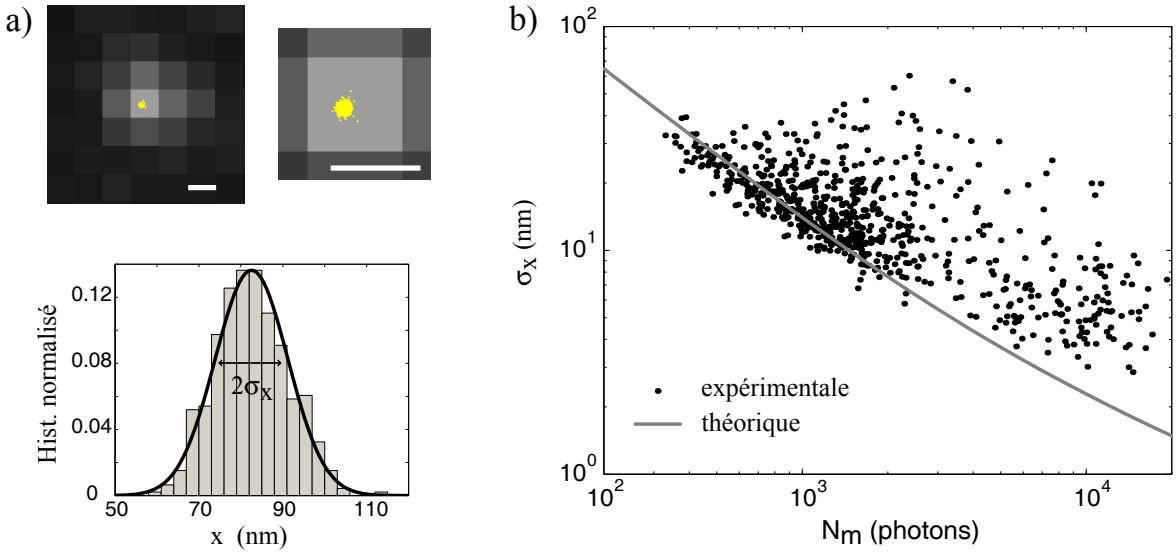

Figure 3.4 – *(a) Ensemble des positions détectées pour un spot donné (N_m=1600 photons, σ_x =8.7nm) : (en haut) superposition des positions (en jaune) avec une image de fluorescence associée au spot, pour 2 zooms successifs, barre=1 pixel soit 216.7 nm, (en bas) distribution des positions selon l'axe x. (b)Précision de pointé (σ_x) en fonction du nombre moyen de photons émis (N_m). Mesures expérimentales et valeurs théoriques*

trouvé $s_x \approx s_y \approx s_G$.

On trace sur la figure 3.4, σ_x^{exp} (pour toutes les données de QDots fixes, émettant à 605nm et illuminés avec la lampe UV) et σ_x^{th} en fonction du nombre de photons moyen N_m du spot correspondant. On se contente de tracer σ_x après avoir vérifié que l'erreur de pointé dans les deux directions est globalement la même. Ceci vient de la forme isotrope de l'image des spots. La précision expérimentale est proche de la précision théorique. L'écart entre ces valeurs est faible à la vue des nombreuses approximations faites lors de leurs estimations. Par exemple σ_x^{th} est calculé pour des valeurs moyennes de s_x et σ_B, et surtout chaque point $(\sigma_x^{\text{exp}}, N_m)$ est obtenu en considérant que ce QDot émet un nombre constant de photons tout le long du film. Finalement, retenons que dans les conditions similaires aux expériences menées sur cellules vivantes, la médiane des précisions mesurées vaut 14 nm et que 80% des valeurs obtenues sont inférieures à 20 nm.

Par ailleurs, on signale qu'une étude de la précision de pointé à partir d'images simulées donne une courbe $\sigma_x^{\text{simulation}} = f(\text{SNR})$ bien ajustée par la courbe théorique [9].

3.2.3.2 Performances du suivi

Estimer les performances d'une méthode de suivi de molécules uniques n'est pas évident. En effet, trouver des indicateurs pertinents est délicat [160]. Aucune mesure de performances standardisée n'existe, ce sujet reste ouvert.

Indicateurs objectifs

Pour valider ses algorithmes et donner des mesures quantitatives de l'efficacité de suivi de ses

méthodes, Stéphane Bonneau [9,11] utilise deux indicateurs :

1. le taux de détection R_d, défini comme le rapport (N_c/N_v), où N_v est le nombre d'objets visibles sur une image donnée et N_c est le nombre d'objets de cette image qui ont été attribués à une trajectoire.
2. l'erreur de suivi E_t, précédemment définie [160] par $E_t = 1 - (M_c/M_v)$, où M_v, est le nombre total de trajectoires reconstruites et M_c le nombre de trajectoires reconstruites dont les premiers et derniers points correspondent bien à la trajectoire réelle.

R_d et E_t sont estimés à partir de films artificiels, obtenus par des simulations numériques. Quatre paramètres sont modifiés pour générer des séries de films reflétant différentes conditions : le rapports signal à bruit, le nombre d'objets dans le champs, le coefficient de diffusion des particules et les durées d'extinction possibles des objets (pour simuler l'effet du clignotement des QDots).

Les résultats ainsi obtenus sont présentés dans l'article [11]. Notons cependant que si la méthode de détection présentées dans [11] est identique à celle que nous avons utilisée, la méthode de suivi n'est pas la même. Les performances de détection estimées sont excellentes avec $R_d > 99\%$ toutes conditions confondues. En revanche, E_t dépend fortement des paramètres testés. Le suivi est particulièrement mis à l'épreuve lorsque le nombre d'objets présents dans le champ d'observation est grand et lorsque les objets disparaissent longtemps.

Estimer la valeurs de ces paramètres est une étape importante du point de vue du traiteur d'image, qui valide ainsi ses algorithmes. Cependant, l'utilisateur (biophysicien ou biologiste) peut émettre des réserves sur la signification de ces chiffres. En effet, lorsque l'on se place dans le cas de données réelles, les différents paramètres utilisés pour les simulations ne sont plus constants. Par exemples, toutes les molécules biologiques présentes dans le champ d'observation n'ont pas le même coefficient de diffusion (qui, de plus, peut varier dans le temps) et tous les QDots n'ont pas les mêmes statistiques de clignotement. Par ailleurs, on peut se demander si E_t est un indicateur réellement pertinent. En effet, il ne permet pas de faire de distinction entre des erreurs de suivi imputables aux limites de l'algorithme et celles qui proviennent des limites physiques et/ou de la complexité biologique du système. Par exemple, si un objet est initialement isolé puis qu'un autre objet vient à sa rencontre et se trouve à une distance inférieure à la résolution de notre système, le suivi ne saurait être efficace sur toute la durée du film. Toutefois, l'utilisateur se contentera aisément de la portion correcte de la trajectoire.

Indicateurs subjectifs

Nous avons vu qu'il est très difficile de définir un indicateur objectif, mathématique, qui permette d'évaluer les performances du suivi. De plus, le système visuel humain est capable de repérer et de suivre des particules fluorescentes dans un régime pour lequel aucun algorithme de suivi n'est efficace. D'ailleurs, des études psychophysiques et neurologiques suggèrent que cet écart de performances est en partie dû au fait que le système visuel humain intègre les stimuli visuels de manières spatiotemporelle [97] (contrairement à notre algorithme où la détection et la mise en correspondance sont indépendantes). Concernant le suivi sur données expérimentales, nous proposons alors "la satisfaction de l'utilisateur" comme indicateur le plus adapté. Celui-ci a l'inconvénient d'être subjectif et certainement dépendant de l'utilisateur. Toutefois, pour une personne donnée, il est assez robuste.

Finalement, on énonce les principes suivants : l'utilisateur est d'autant plus satisfait que le résultat du suivi est conforme à ce qu'il aurait prédit après avoir visualisé le film ; l'utilisateur tolère les échecs

du suivi lorsque lui-même n'aurait pas fait mieux ; l'utilisateur souhaite avoir un programme rapide et simple à utiliser.

Performances et limites

La figure 3.5 donne une visualisation des performances du suivi. On représente d'une part la projection des maxima de fluorescence, qui met en valeur, à partir des données brutes, les trajectoires des QDots ; et d'autre part les résultats obtenus à l'issue du suivi complet (automatique et post-traitement manuel). On vérifie ainsi que la plupart des trajectoires sont bien extraites. Celles qui n'ont pas pu l'être correspondent à des zones où plusieurs QDots sont trop proches et/ou clignotent trop.

Les personnes (une dizaine environ) utilisant fréquemment ce programme de suivi se déclarent satisfaites. Néanmoins, les améliorations réclamées sont : une plus grande rapidité d'exécution de la partie automatique et à terme la suppression de la nécessité de l'étape de post-traitement. Pour obtenir une meilleur mise en correspondance automatique, une autre méthode a été mise au point (voir chapitre 6).

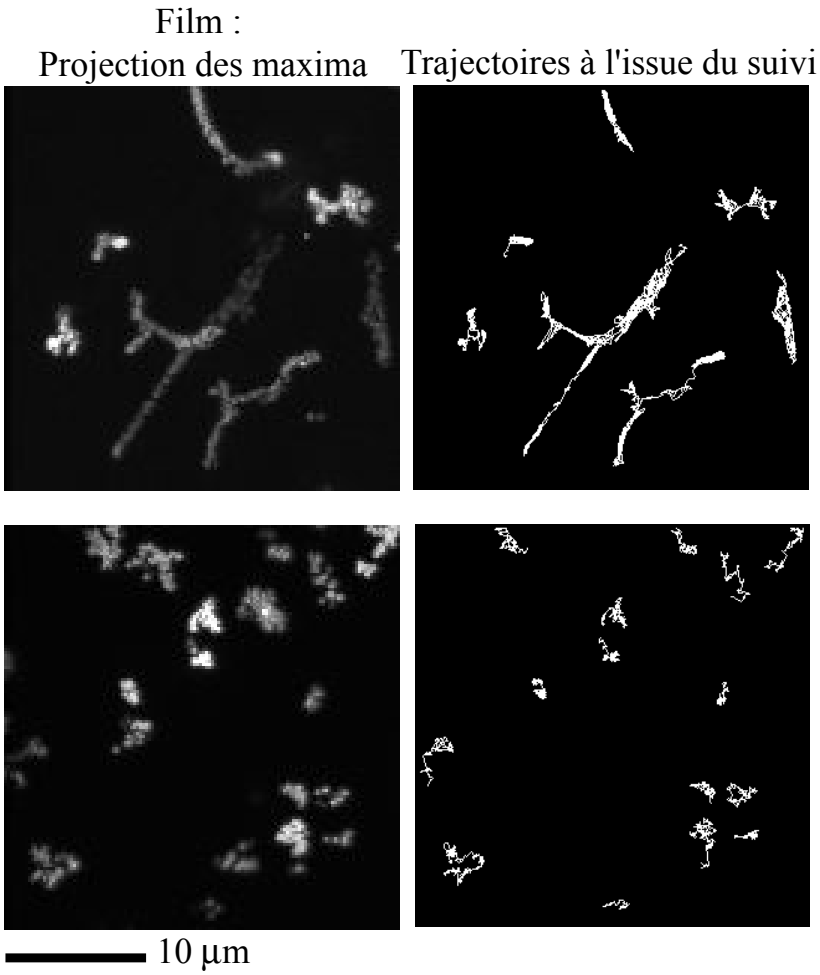

Figure 3.5 – *Visualisation des performances du suivi. Sur les deux exemples donnés, 11 et 15 trajectoires (pour les figures du haut et du bas, respectivement) sont extraites à l'issue du suivi. Remarquons que ce sont les exemples de la figure 3.3 qui sont repris ici.*

3.3 Analyse des trajectoires

3.3.1 Quantification de la diffusion : les méthodes de la littérature

3.3.1.1 Fonction de déplacement quadratique moyen

Définition et calcul La fonction de déplacement quadratique moyen (MSD, pour *Mean Square Displacement*) $\rho(t)$ est initialement défini sur une population infinie et homogène de particules se déplaçant sous l'effet des mêmes lois physiques. $\rho(t)$ est alors obtenu à partir d'une moyenne sur l'ensemble des trajectoires $\{r_i\}_{i\epsilon\mathbb{N}}$. Pour un processus stationnaire, cette moyenne d'ensemble peut être calculée à partir d'une moyenne temporelle effectuée sur une trajectoire individuelle de durée infinie [116] d'où :

$$\rho(t) = \langle (r(t) - r(0))^2 \rangle = \lim_{T\to\infty} \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} (r(t+t') - r(t'))^2 dt'$$

En pratique, on dispose de trajectoires de longueur finie, contenant N éléments de coordonnées $r_n = (x_n, y_n)_{n=1..N}$ aux instants $n\Delta$t (n=0, 1, ...,N-1), avec Δt l'intervalle de temps entre deux images successives. Une estimation du déplacement quadratique moyen peut être obtenue par le calcul de la fonction discrète suivante [116, 132] :

$$\widehat{\rho}(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \left(\sum_{i=1}^{N-n} (x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2 \right) \tag{3.7}$$

Signature des différents types de mouvements La fonction de déplacement quadratique moyen est l'outil le plus répandu pour faire la distinction entre différents modes de mouvement. En résumé, voici les formules analytiques de la MSD en fonction du temps principalement utilisées dans la littérature [133, 35] :

- dans le cas d'une diffusion Brownienne, également appelée diffusion normale ou libre,

$$\rho(t) = 4Dt \tag{3.8}$$

- lorsqu'un mouvement brownien est combiné avec une dérive de vitesse moyenne V,

$$\rho(t) = 4Dt + (Vt)^2 \tag{3.9}$$

- pour une diffusion anormale (*anomalous diffusion* en anglais),

$$\rho(t) = 4Dt^{\alpha} \text{ avec } \alpha < 1 \tag{3.10}$$

  Une grande variété de mécanismes peuvent donner une diffusion anormale. Dans les membranes, les plus pertinents correspondent à un mouvement en présence d'obstacles [130] et à des effets de liaisons [131]. Par exemple, plus la densité d'obstacles est grande, plus la diffusion est anormale sur des échelles de temps longs.
- pour une particule diffusant librement dans un domaine limité (de taille caractéristique L) duquel elle ne sort pas pendant toute la durée d'observation,

$$\rho(t) = \frac{L^2}{3} \left(1 - \exp(-\frac{12Dt}{L^2}) \right) \tag{3.11}$$

  Ce type de mouvement est appelé diffusion restreinte ou confinée.

– dans le cas où une diffusion plus lente (de coefficient de diffusion D_{mac}) vient s'ajouter à la diffusion confinée aux temps courts,

$$\rho(t) = \frac{L^2}{3}\left(1 - \exp(-\frac{12Dt}{L^2})\right) + 4D_{\text{mac}}t \tag{3.12}$$

La figure 3.6 illustre les différentes formes de $\rho(t)$ données ci-dessus.

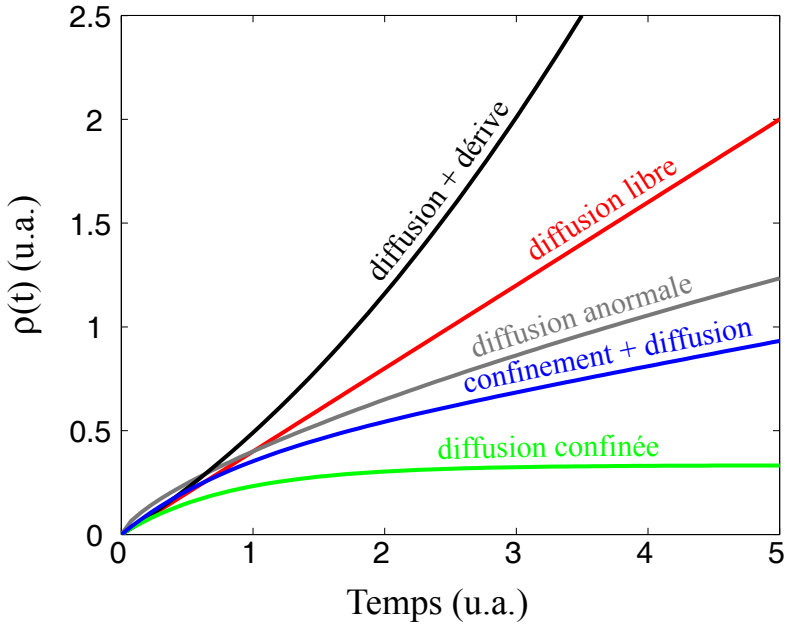

Figure 3.6 – *Allure de la MSD ($\rho(t)$) pour les différents types de mouvements de protéines dans les membranes. Se conférer au texte pour les formules analytiques, D est identique pour tous les tracés.*

L'expression exacte de $\rho(t)$ pour une particule diffusant librement dans un puits unidimensionnel à bords réfléchissants de dimension finie est donné dans [78]. La formule 3.11 correspond en fait à l'approximation au premier ordre de cette formule exacte. Nous utilisons cette forme générique de par les simplifications numériques qu'elle permet. Plusieurs mécanismes peuvent conduire à une MSD de type 3.12. Le plus couramment envisagé correspond à une particule qui diffuse librement (aux temps courts avec un coefficient D) dans des microdomaines (de taille L) et qui effectue des sauts de domaine en domaine (avec un coefficient D_{mac}) [124]. Ce type de diffusion est couramment appelée diffusion par sauts (*hop diffusion*). Notons que 3.12 permet également de décrire une diffusion confinée seule (pour $D_{\text{mac}} = 0$, on retrouve la formule 3.11).

En pratique, étant donné la longueur de nos trajectoires, il est délicat de faire la distinction entre les formes 3.10 et 3.12. Nous avons alors choisi de ne prendre en compte que trois formes possibles de $\rho(t)$: 3.8 pour une diffusion libre, 3.9 pour un mouvement dirigé et 3.12 pour une diffusion restreinte.

Sources d'erreurs sur la MSD expérimentale Trois principales sources d'erreur peuvent venir entacher les valeurs expérimentales de la MSD calculée selon l'équation 3.7.

• *L'erreur statistique*

L'erreur statistique est inévitable. Elle provient du nombre fini de points de la trajectoire. En effet, du fait de la nature stochastique de la diffusion, il faudrait disposer de trajectoires infiniment longues pour que les MSD expérimentales et les formules analytiques coïncident parfaitement.

Cette erreur sera d'autant plus petite que le nombre N de points de la trajectoire sera grand. D'autre part, plus n est grand c'est à dire plus le point de la MSD considéré correspond à un intervalle de temps long, plus l'erreur statistique est grande. Ceci provient du fait que le nombre de points intervenant dans le calcul de $\widehat{\rho}(n\Delta t)$ diminue avec n. Le cas extrême est atteint pour $n = N - 1$ où la moyenne est faite sur deux termes uniquement. Les derniers points de la MSD n'ont alors aucun sens physique et ce quel que soit le nombre N de points de la trajectoire. On peut alors considérer que pour une trajectoire individuelle, seul le premier quart des points de la MSD est statistiquement significatif [132]. Seule cette portion de la MSD sera alors prise en compte pour distinguer différents types de diffusion.

Le calcul de l'erreur statistique a été effectué dans le cas d'un mouvement brownien [116], la variance de $\widehat{\rho}(n\Delta t)$ en chaque point de la MSD est donnée par :

$$var(\widehat{\rho}(n\Delta t)) = (4Dt)^2 F \;\; avec \;\; \begin{cases} F = (4n^2 N_A + 2N_A + n - n^3)/6nN_A^2 & pour N_A \geq n \\ F = 1 + (N_A^3 - 4nN_A + 4n - N_A)/6nN_A^2 & pour N_A \leq n \end{cases} \tag{3.13}$$

où $N_A = N - n$ est le nombre de termes servant au calcul de $\widehat{\rho}(n\Delta t)$. Les formules 3.13 tiennent compte de la non-indépendance des sous-trajectoires extraites de la trajectoire totale lors du calcul de la MSD. Elles sont valables pour une MSD obtenue à partir de l'équation 3.7. Pour visualiser cette erreur, on représente sur la figure 3.7A la MSD, obtenue à partir d'une trajectoire simulée de 500 points pour D= 0.001μm^2/s, et les barres d'erreur correspondantes associées à l'erreur statistique.
Cependant, l'erreur statistique dépend du type de diffusion considéré, ainsi la formule 3.13 n'est *a priori* pas généralisable à tous les modes de diffusion. Les calculs pour une diffusion autre que brownienne pure sont significativement plus compliqués.

Au lieu de calculer sa forme analytique, il est possible de faire une estimation de l'erreur statistique à l'aide de simulations numériques. Pour un type de mouvement donné (tel un mouvement dirigé avec D et V connus ou un mouvement confiné avec D et L connus), de nombreuses trajectoires (de N points, N fixé) sont simulées. Pour chaque trajectoire, $\widehat{\rho}(n\Delta t)$ est calculé. La mesure de la variance empirique de $\widehat{\rho}(n\Delta t)$ donne alors l'erreur statistique au temps $n\Delta t$ pour une trajectoire de N points. Cette méthode a été employée efficacement par Cédric Bouzigues [13] pour estimer l'erreur statistique pour des trajectoires, de différentes longueurs, correspondant à un mouvement dirigé, avec D et V fixés. Toutefois, dans les études présentées dans ce manuscrit, cette méthode n'est pas envisageable en routine. En effet, les mouvements des récepteurs de la glycine, objets de nos études, sont très divers (avec des valeurs de coefficients de diffusion et de tailles de confinement étalées sur plusieurs ordres de grandeur). Il faudrait alors effectuer la procédure décrite ci-dessus pour chaque trajectoire individuelle. Nous ne l'avons pas fait en raison de l'importance des temps de calculs nécessaires.

Par ailleurs, il est possible de réduire l'erreur statistique d'un facteur $\sqrt{N_t}$ en moyennant N_t trajectoires indépendantes. Il faut cependant être sûr que toutes les trajectoires reflètent bien un même comportement.

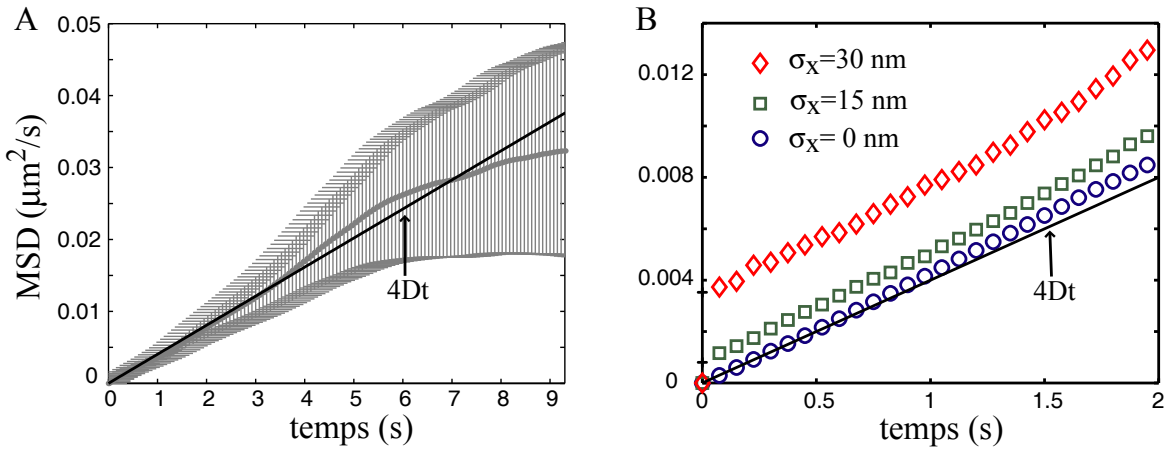

Figure 3.7 – *Visualisation de l'erreur statistique (A) et de l'effet de la précision de pointé (B) sur la MSD pour une diffusion libre (D= $0.001\mu m^2$/s). (A) $\widehat{\rho}(t) \pm \sqrt{var(\widehat{\rho}(t))}$ (en gris) pour une trajectoire simulée (N=500 points), seul le premier quart des points est tracé. (B) Plus l'erreur de pointé (σ_x) est grande, plus la courbe est translatée verticalement par rapport à la valeur théorique de 4Dt.*

• *Influence de la précision de pointé*

L'erreur moyenne commise sur l'estimation de la position de chaque particule suivie vaut $\sigma \simeq \sqrt{2}\sigma_x$ où σ_x est la précision de pointé dans une direction. Cette erreur se traduit sur la MSD expérimentale, $\widehat{\rho}_e$, par l'ajout d'un terme constant, $2\sigma^2$ [90,38]. Ainsi, pour une diffusion Brownienne, on a (voir fig. 3.7B) :

$$\widehat{\rho}_e(t) = 4Dt \ + \ 4\sigma_x^2. \tag{3.14}$$

Pour un intervalle de temps Δt fixé, l'effet de ce décalage verticale de la MSD expérimentale sera négligeable lorsque $D \gg \sigma_x^2/\Delta t$. Pour des valeurs typiques Δt =$\mathrm{T_{acq}}$ = 75ms et σ_x = 14nm, on trouve la condition $D \gg 2.10^3 \mu m^2.s^{-1}$. Étant donné que les coefficient de diffusion dans nos expériences s'étalent en général sur quatre ordres de grandeur, entre 10^{-4} et 1 $\mu m^2.s^{-1}$, l'effet de la précision de pointé doit être pris en compte.

De plus, en effectuant le raisonnement inverse, lorsque $D \ll \sigma_x^2/\Delta t$ l'effet de la précision de pointé est prépondérant et masque alors la diffusion Brownienne. Pour cette raison, on définit un coefficient de diffusion minimale $D_{\min}$ en deçà duquel on considère la MSD expérimentale comme inexploitable (une MSD plate dominée par la précision de pointé). On prend $D_{\min} = 10^{-4}\mu m^2.s^{-1}$, soit $D_{\min} = (\sigma_x^2/\Delta t)/20$ dans les conditions expérimentales usuelles. Par abus de langage, les particules correspondantes sont désignées comme étant immobiles.

• *Influence du temps d'acquisition*

Du fait du temps d'acquisition (T_{acq}) nécessairement non nul, la position mesurée, R_m, d'une particule correspond en fait à sa position moyenne : $R_m(t) = \frac{1}{T_{\mathrm{acq}}} \int_t^{t+T_{\mathrm{acq}}} r(u)du$, où $r(t)$ est la position réelle de la particule à l'instant t. Ainsi, la fonction de déplacement quadratique moyen mesurée, $\widehat{\rho}_m(t)$, ne correspond pas aux déplacements réels mais aux déplacements mesurés de la particule, c'est-à-dire $\widehat{\rho}_m(t) =< (R_m(t+t') - R_m(t))^2 >$.

Dans le cas d'une diffusion brownienne pure, la courbe correspondant à la MSD mesurée reste une droite de même pente que celle de la MSD théorique. Toutefois, le temps d'acquisition fini intro-

duit une translation verticale de cette droite selon [53] : $\widehat{\rho}_m(t) = 4Dt - 4DT_{\text{acq}}/3$. Cet effet est analogue à celui introduit par l'erreur de pointé et peut être traité comme ce dernier. En revanche, des effets supplémentaires apparaissent dans le cas de mouvements plus complexes (dirigés ou confinés).

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 $v \ll \sqrt{4D/T_{\text{acq}}}$ [13].

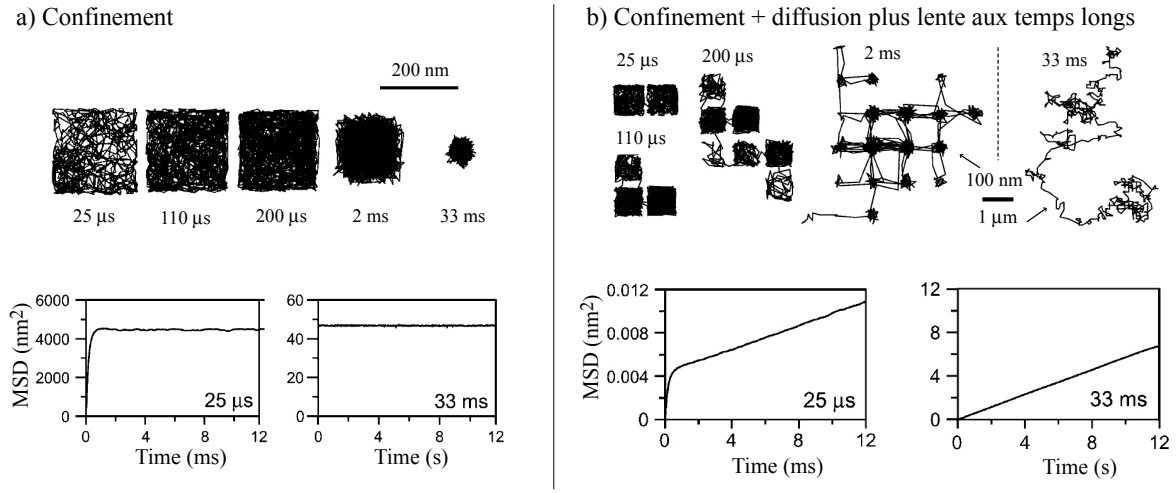

Figure 3.8 – *Exemples de trajectoires simulées et des MSD correspondantes pour différentes valeurs de temps d'acquisition. (a) Cas d'une diffusion confinée dans un domaine (carré) de taille 240 nm. Pour $T_{acq} = 25\mu s$, la MSD calculée a la forme théorique attendue (voir équation 3.11) et permet de retrouver les valeurs de D et de L introduites dans les simulations. Pour $T_{acq} = 33ms$, le temps d'acquisition est trop grand (compte tenu des valeurs de D et L), la trajectoire obtenue et la MSD calculée ne rendent plus compte du mouvement réel de la particule. (b) La particule suit une diffusion par sauts (voir équation 3.12). Aux temps d'acquisition grands (par rapport au temps de résidence dans un domaine), seule la diffusion plus lente (correspondant aux sauts) est visible. Les figures sont extraites de [124].*

Dans le cas de mouvement confinés, les erreurs de mesure dues au temps d'acquisition fini ont été étudiées et quantifiées par des études numériques [124] puis par des calculs analytiques [37]. Les effets du temps d'acquisition sur les trajectoires de mouvements confinés et les MSD correspondantes sont illustrés sur la figure 3.8. Voici, en résumé, les résultats principaux de ces études :

- l'influence du temps d'acquisition est négligeable pour $T_{\text{acq}} \ll \tau_m$, $\tau_m = L_m^2/(12D_m)$ étant le temps de résidence mesuré dans un domaine
- si τ_m est inférieur à quelques T_{acq}, la précision des valeurs mesurées n'est plus satisfaisante. La mesure des tailles de confinement et des coefficients de diffusion entraîne une sous-estimation de ces grandeurs.
- toutefois, des formules de corrections permettent d'obtenir les valeurs réelles (indice r) à partir des valeurs mesurées (indice m) :

$$\tau_r = \tau_m - T_{\text{acq}}/3 \ , \ L_r = L_m \left(2\frac{\tau_r}{T_{\text{acq}}} - 2\left(\frac{\tau_r}{T_{\text{acq}}}\right)^2 \left(1 - e^{\frac{-T_{\text{acq}}}{\tau_r}}\right)\right)^{-\frac{1}{2}}$$

Ces formules sont applicables si $\tau_m \geq 2T_{\text{acq}}/3$.

– en revanche, les phénomènes de confinement dans des domaines tels que $\tau_r \ll T_{\text{acq}}$ ne sont pas accessibles. Plus le temps d'acquisition est grand, plus la position de la particule est moyennée et se situe au centre du domaine de confinement. Concrètement, pour un confinement total, la MSD ainsi mesurée sera plate et inexploitable. Pour un confinement auquel s'ajoute une diffusion plus lente aux temps longs (formule 3.12), seule cette dernière composante sera visible et on mesurera D_{mac} uniquement.

Finalement, après avoir mis en regard ces résultats avec nos données, nous pouvons tirer deux conclusions :

1. tout d'abord, nous avons vérifié que toutes nos mesures effectuées sur des mouvements de type confiné ne nécessitent pas de correction puisqu'elles vérifient $T_{\text{acq}} \ll \tau_m$.
2. les mouvements vus comme une diffusion libre (MSD linéaire) sont peut être en réalité plus complexes (superposition d'un confinement et d'une diffusion plus lente). Nous sommes conscients des limites de notre système.

3.3.1.2 Les outils pour distinguer différents types de mouvement

Jusqu'à présent, il n'existe aucune méthode standard d'analyse des données obtenues en SPT. Chaque laboratoire utilise des techniques différentes pour trier et caractériser les différents types de mouvements.

Classement des trajectoires selon leur type de mouvement global Voici trois des méthodes les plus utilisées (voir [133] pour revue) pour classer les trajectoires en fonction de leur type de mouvement (diffusion libre, anormale, dirigée ou confinée) :

– toutes les formes analytiques de la MSD sont testées. Celle qui permet d'ajuster au mieux la MSD expérimentale est retenue [142, 163].
– toutes les MSD sont ajustées par la formule 3.10, pour une diffusion anormale [47]. Les trajectoires sont classées en fonction de l'exposant α obtenu (à partir d'un tracé en log-log de $\rho(t)$). Plus α est proche de 1, plus la diffusion est libre.
– la MSD expérimentale est analysée en terme de déviation relative par rapport à la forme linéaire attendue dans le cas d'une diffusion libre [78]. Un paramètre RD (pour *Relative Deviation*) est défini comme le rapport entre la MSD expérimentale et la MSD attendue dans le cas d'une diffusion libre. L'étude de RD permet alors de classer les trajectoires selon trois types de mouvements : libre ($RD = 1$), dirigé ($RD > 1$) et confiné ($RD < 1$). C'est cette méthode d'analyse que nous avons choisi d'utiliser. Dans la section 3.3.2.2, nous reviendrons en détail sur sa mise en œuvre.

Ces méthodes, toutes basées sur l'allure de la MSD expérimentale, permettent de déterminer le type de mouvement moyen sur l'ensemble d'une trajectoire. Toutefois, il est possible que des changements de dynamique se produisent au sein même d'une trajectoire.

Uniformité des mouvements Pour savoir si le mouvement est uniforme au sein d'une trajectoire (ou d'un ensemble de trajectoire), il est possible d'utiliser la fonction de densité de probabilité pour le déplacement quadratique [136, 147], notée $P(r^2, t)$. Le calcul de $P(r^2, t)$ est particulièrement utile

dans des expériences qui ne permettent d'obtenir que des trajectoires très courtes. Dans ce cas, l'exploitation des MSD issues de trajectoires individuelles est limitée du fait de l'importance de l'erreur statistique. La fonction $P(r^2, t)$ est alors une bonne alternative pour caractériser les différents types de mouvement présents globalement dans l'ensemble des trajectoires.

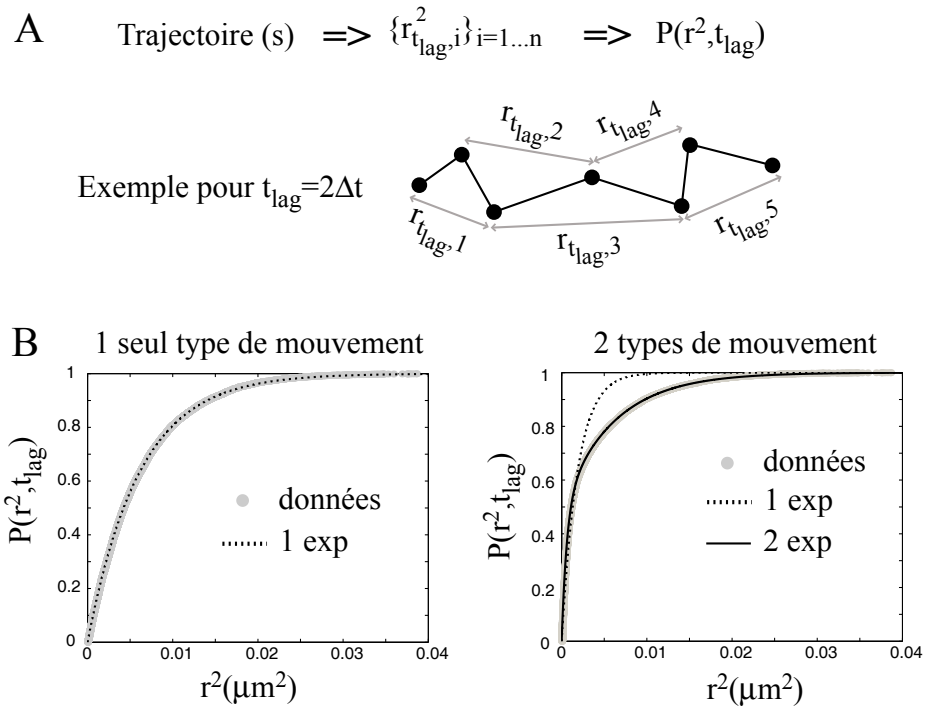

Figure 3.9 – *Principe du calcul (A) et ajustement (B) de la fonction $P(r^2, t_{lag})$, exemple pour $t_{lag} = 2\Delta t$. (B) Données obtenues pour des trajectoires simulées. Lorsqu'un seul type de comportement est introduit (à gauche), $P(r^2, t_{lag})$ est bien ajusté par une simple exponentielle (1exp). Si deux populations sont mélangées (à droite), l'ajustement doit être fait avec une bi-exponentielle (2exp).*

Nous allons maintenant décrire le fonctionnement de cet outil, illustré sur la figure 3.9. Soit une trajectoire ou un ensemble de trajectoire. Pour chaque t_{lag} fixé ($t_{\text{lag}} = n\Delta t$, Δt étant le temps séparant deux points d'une trajectoire, n un nombre entier), on calcule l'ensemble des déplacements quadratiques $r^2_{t_{\text{lag}}} = (\overrightarrow{r}(t + t_{\text{lag}}) - \overrightarrow{r}(t))^2$. A partir de ces valeurs, on obtient la distribution de probabilité $P(r^2, t_{\text{lag}})$. Si pour tout t_{lag}, $P(r^2, t_{\text{lag}})$ est bien ajustée par une mono-exponentielle de type $P(r^2, t) = 1 - \exp(-r^2/r_0^2)$, alors on est en présence d'un seul type de mouvement. La fonction $r_0^2 = f(t_{\text{lag}})$ est alors en principe confondue avec la fonction de déplacement quadratique moyen. En revanche, si une mono-exponentielle ne suffit pas à ajuster $P(r^2, t_{\text{lag}})$, la trajectoire n'est pas uniforme mais résulte de la combinaison de plusieurs types de mouvement. Chaque distribution est alors ajustée par une fonction multi-exponentielle. Par exemple, une bi-exponentielle de type $P(r^2, t) = 1 - [a.\exp(-r^2/r_1^2) + (1 - a).\exp(-r^2/r_2^2)]$ permet de distinguer deux types de populations, P1 et P2, présentes dans des proportions respectives a et (1-a). Les fonctions $r_1^2 = f_1(t_{\text{lag}})$ et $r_2^2 = f_2(t_{\text{lag}})$ correspondent alors aux MSD globales de ces deux types de mouvements. Elles peuvent être à leur tour ajustées par une forme adéquate (pour un mouvement libre, anormale, confiné ou dirigé).

$P(r^2, t)$ peut être un outil puissant pour montrer qu'une trajectoire ou qu'un ensemble de trajectoire est homogène. Toutefois, des limitations existent lorsqu'il est utilisé pour caractériser plusieurs populations. Premièrement, des erreurs peuvent se propager du fait des nombreux ajustements (un pour chaque t_{lag}) à effectuer avec des fonctions de type multi-exponentielles. Deuxièmement, se limiter à trois exponentielles parait indispensable (ce qui correspond déjà à un ajustement avec 5 variables à déterminer). Ceci réduit alors le nombre de populations identifiables. Troisièmement, si cette technique permet d'identifier plusieurs types de dynamique, les informations obtenues ne sont pas locales mais globales.

Cet outil n'est pas vraiment adapté à nos études. Nous avons essayé de l'appliquer à des trajectoires uniques mais ce fut sans succès. En effet, le nombre d'exponentiel à utiliser pour ajuster correctement $P(r^2, t_{\text{lag}})$ est soit trop élevé (supérieur à 3), soit il varie avec t_{lag}. Les fonctions $r_i^2(t)$ ainsi obtenues ne sont pas exploitables. Vraisemblablement, nos trajectoires expérimentales reflètent des mouvements trop complexes pour être analysés avec cette méthode. En revanche, cette méthode est applicable lorsque l'on considère un ensemble de trajectoires. Nous avons alors vérifié que dans nos expériences nous avons globalement affaire à deux types de mouvements : de la diffusion libre et des mouvements confinés. Cependant, aucune information supplémentaire ne nous est fournie par rapport à une étude basée sur l'utilisation du paramètre RD, qui permet de trier les trajectoires individuelles en fonction de leur type de mouvement globale. Pour ces raisons, nous n'avons donc pas utilisé cette méthode en routine.

Détection de changements locaux de dynamique Les méthodes que nous avons exposées jusqu'à présent permettent de caractériser la ou les dynamique(s) présentes au sein d'une ou plusieurs trajectoire(s). Cependant, elles ne permettent pas d'identifier de manière automatique les moments où se produisent les changements de dynamique. Pour exploiter toute l'information contenue dans une trajectoire, il semble nécessaire de faire une analyse locale de la dynamique. Des méthodes d'analyse automatique de ce type sont en forte demande. Plusieurs outils ont été développés pour faire une analyse locale de la dynamique au sein d'une trajectoire individuelle. Chaque méthode est adaptée à la détection d'un type particulier de comportement transitoire. Quelques fonctions disponibles pour faire une analyse locale de la dynamique sont illustrées sur la figure 3.10.

• *Diffusion rapide / diffusion lente*

Considérons le cas où une trajectoire est composée de phases de diffusion plus ou moins rapide. Le calcul du coefficient de diffusion le long de la trajectoire peut permettre de détecter les périodes de diffusion lente et rapide [34,12,64] (voir fig. 3.10a). Cette méthode nécessite d'ajuster la taille de la fenêtre glissante utilisée. Celle-ci doit être assez petite pour détecter des événements courts et assez grande pour avoir une estimation précise du coefficient de diffusion. De plus, les changements de dynamique doivent être assez contrastés pour sortir du bruit.

• *Diffusion libre / mouvement dirigée*

Pour détecter des mouvements dirigés transitoires, deux propriétés caractéristiques d'un mouvement dirigé peuvent être mises à profit. D'une part, à l'inverse d'un mouvement brownien, un mouvement dirigé présente des corrélations temporelles dans sa vitesse. Pour faire une estimation locale des corrélations dans la vitesse, un Indice de Corrélations en Vitesse, a récemment été mis au point [14]. Il permet ainsi de détecter les périodes de mouvement dirigé. D'autre part, un mouvement dirigé

donne des trajectoires qui présentent une asymétrie spatiale très forte. Un paramètre d'asymétrie [64], calculé le long de la trajectoire, peut alors être utilisé pour identifier un mouvement dirigé.

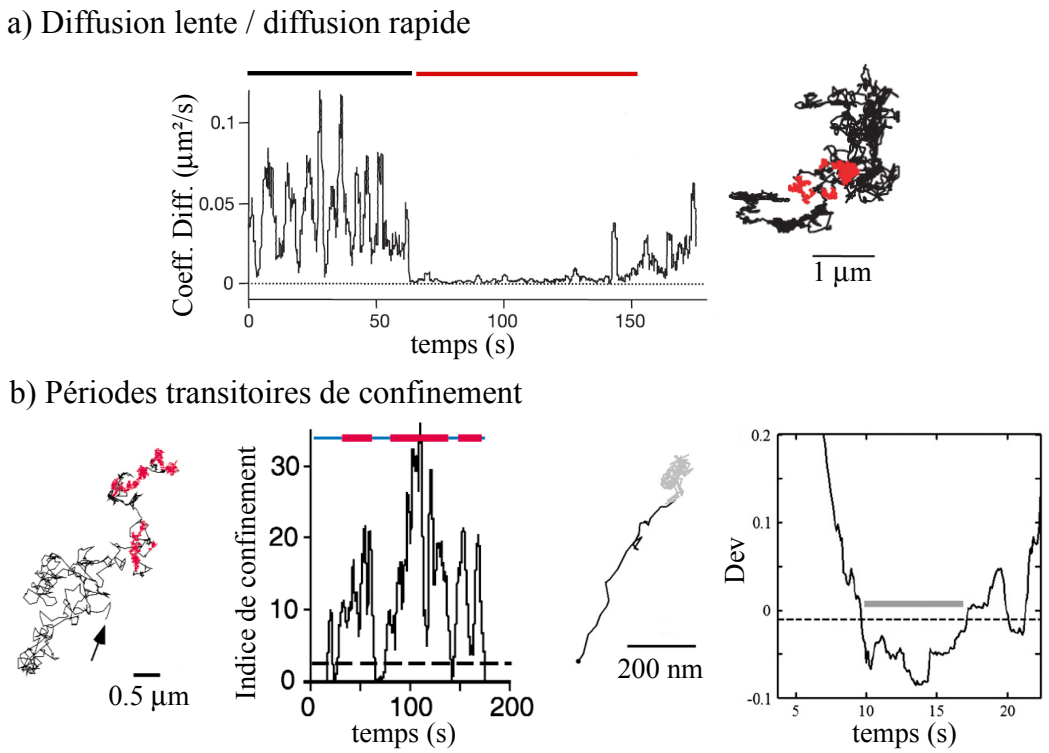

Figure 3.10 – *Exemples d'analyses locales de la dynamique de trajectoires individuelles. (a) Le calcul du coefficient de diffusion instantané permet d'identifier des périodes de diffusion rapide (en noir) et lente (en rouge). (b) Détection de périodes de confinement (en rouge et gris) grâce au calcul de l'indice de confinement (à droite) ou à l'aide de la fonction Dev (à droite). Les trois figures sont extraites de [12], [96] et [64].*

• *Diffusion libre / diffusion confinée*

Pour détecter des périodes transitoires de confinement au sein d'une trajectoire exhibant principalement une diffusion libre, un indice de confinement a été mis au point par Simson et al. [140], à partir des travaux théoriques de Saxton [129]. La méthode repose sur le principe suivant : une particule subit un confinement dès qu'elle passe, dans une région de taille R, un temps plus long qu'elle ne devrait le faire si elle suivait une diffusion libre. L'indice de confinement est alors basé sur la probabilité qu'une particule de coefficient de diffusion D reste dans une région de rayon R pendant un temps t. Son calcul nécessite le réglages de deux paramètres (la longueur des portions de trajectoires utilisées dans le calcul et le coefficient de diffusion D pris comme référence). Ensuite deux autres paramètres doivent être ajustés pour déterminer les périodes de confinement réel (une valeur seuil de l'indice et le temps minimal pendant lequel l'indice doit être supérieur à ce seuil). Pour régler tous ces paramètres, Simson et al. ont utilisés des simulations numériques en parallèle de leurs données pour maximiser le nombre de périodes de confinement dans les données tout en minimisant le nombre de fausses détections dans les simulations. Un second indice de confinement

a été récemment développé [98]. Il repose sur le même principe que celui de Simson mais, au lieu d'utiliser la distance R, il se base sur la variance des déplacements mesurés. D'après les résultats exposés dans l'article [98], cette méthode est plus robuste (moins de fausses détections) et plus efficace (moins de non détection). De plus, elle peut également permettre de détecter des sauts d'un domaine de confinement à un autre.

Par ailleurs, une toute autre méthode a très récemment été proposée [64]. Elle est basée sur le fait que la MSD d'un mouvement confiné n'est pas linéaire mais présente une courbure vers l'axe des abscisse (voir fig. 3.6). Une nouvelle fonction, *Dev*, est introduite. Celle-ci permet de quantifier la déviation moyenne entre la courbe MSD=f(t) et la droite attendue pour une diffusion libre. Le calcul de *Dev* le long de la trajectoire permet alors de détecter des périodes transitoires de confinement, ce après optimisation des différents paramètres impliqués dans le calcul de *Dev* et dans la détection des périodes de confinement.

Détecter des changements de dynamique au sein d'une trajectoire individuelle est un exercice délicat. Toutes les méthodes citées ci-dessus requièrent le réglages de nombreux paramètres. De plus, elles permettent de détecter des transitions uniquement à conditions que chaque phase dure un temps suffisamment long. Finalement, nous n'utilisons pour l'instant que le coefficient de diffusion en fonction du temps et ce à titre illustratif.

3.3.2 Méthodes utilisées pour quantifier la diffusion

L'objectif générale de l'étude de nos trajectoires expérimentales est de mettre en lien la dynamique du récepteur avec sa localisation (sa position par rapport aux synapses ou aux agrégats de géphyrine, voir 3.18). Deux méthodes sont alors envisageables :

- soit on étudie les changements locaux de dynamique au sein d'une même trajectoire et l'on regarde s'ils sont concordants avec des changements de localisation
- soit on découpe tout d'abord une trajectoire en plusieurs portions en fonction de la localisation et on étudie le mouvement globale sur chacune de ces portions

La première méthode n'a pas pu être mise en place en raisons de limitations techniques évoquées précédemment. En effet, supposons que l'on souhaite distinguer les changements de dynamique au sein d'une même trajectoire. L'utilisation correcte de l'indice de confinement ou de la fonction *Dev*, pour distinguer des alternances entre mouvements libres et confinés, requiert une mise au point délicate de nombreux paramètres. De plus, cette difficulté est encore accrue dans notre cas du fait du clignotement des QDots (qui ne nous permet pas d'avoir des trajectoires continues sur une longue durée). Ainsi les incertitudes sur la détermination de ces paramètres et les limitations inhérentes à la méthode (tel le temps minimal d'une période de confinement détectable) sont susceptibles d'introduire des biais. Quant au calcul de $P(r^2, t)$, nous avons vu que cette fonction n'est pas utilisable sur nos trajectoires individuelles. De plus, quand bien même nous aurions pu la mettre en œuvre, cette méthode ne permet pas de faire une analyse véritablement locale de la dynamique.

Notre choix s'est alors naturellement porté sur une étude globale, c'est à dire une caractérisation du mouvement moyen, de chaque trajectoire ou portion de trajectoire, après découpage de la trajectoire en fonction de sa localisation. La mesure du coefficient de diffusion et la détermination du type de mouvement aux temps longs sont basés sur l'étude de la fonction de déplacement quadratique moyen.

3.3.2.1 Coefficient de diffusion aux temps courts

Pour chaque trajectoire, quel que soit son type de mouvement aux temps longs, on souhaite estimer son coefficient de diffusion aux temps courts, D_{ini} (ini pour initial). Il est clair que ce coefficient sera donnée par la pente de la droite ajustant au mieux la MSD. Deux questions se posent alors. Combien de points de la MSD doit-on prendre en compte ? Quel type de fonction, linéaire ou affine, doit-on utiliser ?

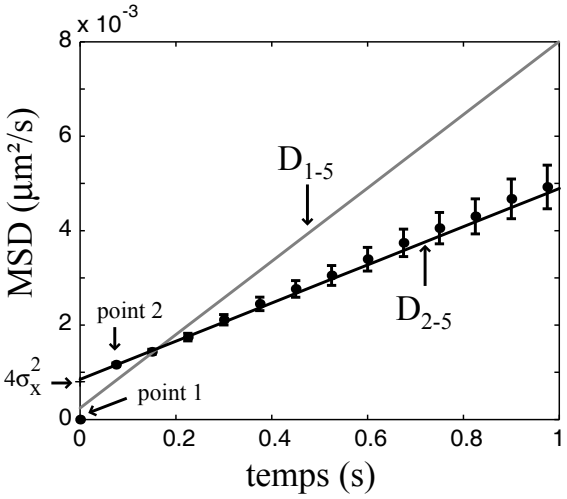

Figure 3.11 – *Exemple de MSD calculée pour une trajectoire simulée avec D=* $0.001\mu m^2.s^{-1}$ *et une erreur de pointé* $\sigma_x = 15nm$*. L'ajustement des points 1 à 5 (en gris) ou des points 2 à 5 (en noir) de la MSD par une fonction affine donne respectivement* $D_{1-5} = 1.9.10^{-3}\mu m^2.s^{-1}$ *et* $D_{2-5} = 1.0.10^{-3}\mu m^2.s^{-1}$

Dans la littérature, le coefficient de diffusion est souvent désigné selon la nomenclature suivante : $D_{\text{P1-P2}}$ désigne le résultat d'une régression effectuée sur les points P1 à P2 de la MSD. Précisons que, par définition, le premier point de la MSD est de coordonnée (0,0). Plusieurs types de calculs sont employés, en résumé citons ceux qui prennent en compte le premier point (D_{1-3}, D_{1-4},D_{1-5} [12, 147,34]) et ceux qui l'exclu (D_{2-4} [96,124,59]). De plus, lorsque cette nomenclature n'est pas utilisée, souvent on ne sait pas ce qui est fait du premier point. Par ailleurs, le type de fonction employée est rarement précisé.

On insiste ici sur la réflexion qui doit être faite sur ces deux questions car des choix corrects de ces deux paramètres (les points de la MSD à considérer et le type de courbe) permettent de prendre en compte les erreurs sur le calcul de la MSD expérimentale et d'optimiser ainsi le calcul du coefficient de diffusion. Saxton [132] a démontré, à l'aide de simulations numériques, que pour maximiser la précision sur l'estimation du coefficient de diffusion, il faut d'une part se restreindre aux premiers points de la MSD (les 4 premiers par exemple) et d'autre part pondérer chacun de ces points. Ces deux règles permettent de prendre en compte l'influence de l'erreur statistique inévitable lors du calcul de la MSD d'une trajectoire brownienne. De plus, étant donné que la précision de pointé et le temps d'acquisition fini introduisent l'ajout d'une constante (voir 3.3.1.1), l'ajustement de la MSD expérimentale doit se faire par une fonction affine.

Pour ces raisons, nous estimons le coefficient de diffusion via une régression (pondérée), au sens

des moindres carrés, des points 2 à 5 de la MSD, par la fonction affine suivante : $\widehat{\rho}_{\text{libre}}(t) = 4D_{\text{ini}}t + b$, avec $D_{\text{ini}} = D_{2-5}$. On attribue à chaque point 2 à 5 de la MSD un poids égale à l'inverse de l'écart type de l'erreur statistique en ce point (donné par la relation 3.13). La procédure est illustrée sur la figure 3.11.

Pour étudier l'influence de la procédure choisie pour le calcul du coefficient de diffusion, on compare D_{1-5} et D_{2-5} sur une large palette de valeurs. Sur la figure 3.12, on représente les résultats obtenus d'une part sur des trajectoires simulées[1] (sans erreur de pointé) et d'autre part sur des trajectoires réelles. On vérifie bien sur les trajectoires simulées qu'en l'absence d'erreur de pointé, les distributions D_{1-5} et de D_{2-5} sont similaires. Sur les coefficients de diffusion obtenus à partir de trajectoires réelles (avec un effectif d'environ 2000 valeurs), des tests de Kolmogorov-Smirnov entre les deux distributions donnent des valeurs de p suivantes : $p \ll 10^{-4}$ en considérant tous les coefficients de diffusion ou en prenant seulement ceux vérifiant $D \geq 0.001\mu m^2.s^{-1}$; alors que $p \simeq 0.1$ en prenant $D \geq 0.002\mu m^2.s^{-1}$ et $p \simeq 0.95$ pour $D \geq 0.005\mu m^2.s^{-1}$. On ne peut alors plus dire que les distributions de D_{1-5} et de D_{2-5} sont différentes à partir d'une valeur seuil $D_{seuil} \simeq 0.005\mu m^2.s^{-1}$. Ceci est cohérent avec les prévisions que nous avions faites précédemment (voir page 79).

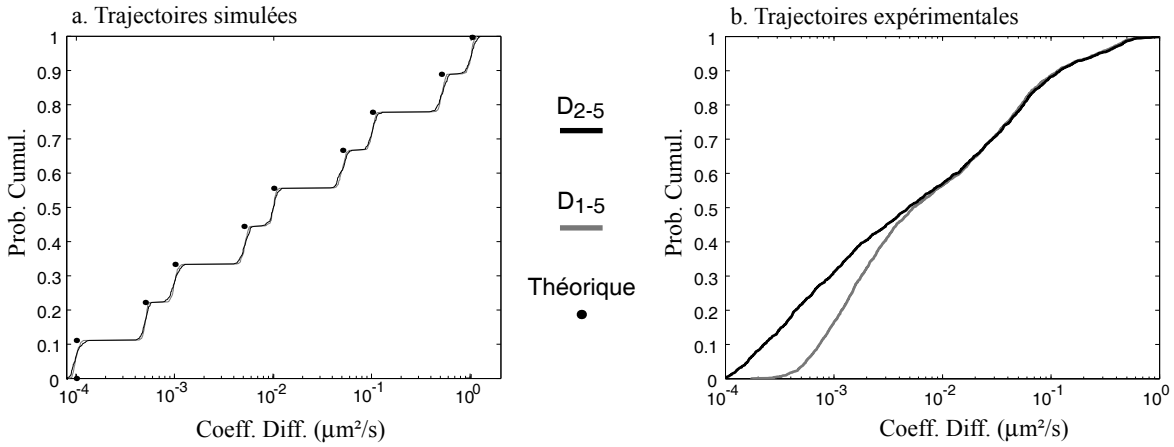

Figure 3.12 – *Probabilités cumulées des coefficients de diffusion de type D_{1-5} (gris) et D_{2-5} (noir). (a) Pour 720 trajectoires simulées, les points correspondent à la courbe théorique (d'après les coefficients de diffusion utilisés dans la simulation), (b) Pour environ 2000 trajectoires expérimentales*

Notons qu'une erreur supplémentaire dans le calcul de la MSD expérimentale est introduite par le clignotement des nanocristaux. On simule alors des trajectoires[1] continues et discontinues[2]. Sur la figure 3.13, sont représentés les distributions cumulatives ainsi obtenues. Elles sont similaires. Ceci montre bien que l'erreur sur l'estimation des coefficients de diffusion introduite par le clignotement est négligeable par rapport à l'erreur statistique.

[1]Soit N le nombre de point d'une trajectoire. On simule 20 trajectoires pour chaque coefficient de diffusion de l'ensemble $\{10^{-4},\ 5.10^{-4},\ 10^{-3},\ 5.10^{-3},\ 10^{-2},\ 5.10^{-2}, 10^{-1},\ 5.10^{-1},\ 1\}\mu m^2.s^{-1}$. On répète cette opération pour N=200, 300, 400 et 500 points. Finalement, on a un total de 720 trajectoires. 80 pour chaque coefficient de diffusion, 180 pour chaque longueur de trajectoire.

[2]Les trajectoires discontinues correspondent aux trajectoires continues dans lesquelles a été ajouté un effet de clignotement. Le clignotement introduit suit les distributions expérimentales des durées des états allumés et éteints, selon la procédure décrite dans la partie 2.3.2.3, page 47)

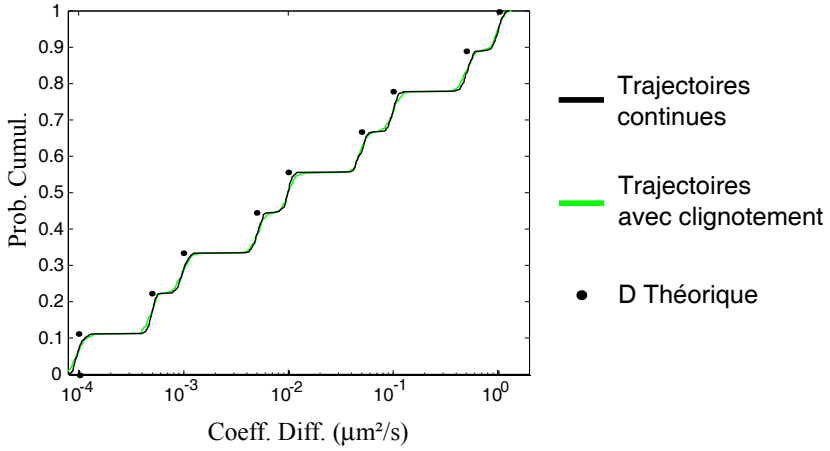

Figure 3.13 – *Absence d'effet du clignotement sur l'estimation du coefficient de diffusion. Probabilités cumulées des coefficients de diffusion de trajectoires simulées, continues (noir) ou discontinues (vert).*

Il est possible de quantifier plus précisément l'erreur introduite par le clignotement. On considère un ensemble de trajectoires simulées de même coefficient de diffusion théorique D_{th}, la valeur moyenne du coefficient de diffusion mesurée D_m vaut D_{th} à moins de 1% près qu'il y ait du clignotement ou non. En revanche, l'écart type sur D_m est d'environ 20% en présence de clignotement et d'environ 15% pour les trajectoires continues. Par exemple, pour 2000 trajectoires simulées, avec N compris entre 50 et 500 points, pour $D_{th} = 0.1\mu m^2.s^{-1}$, on obtient $D_m = (0.101 \pm 0.019)\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ pour les trajectoires discontinues et $D_m = (0.100 \pm 0.014)\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ sans clignotement. De plus, il faut remarquer que lorsque l'on introduit du clignotement dans nos trajectoires, on se base sur les distributions des durées des états allumés et éteints obtenues expérimentalement sur nanocristaux fixes. Ces distributions reflètent donc un cas extrême de clignotement puisque lors de l'obtention de trajectoires réelles (correspondant à la dynamique d'une protéine marquée), on ne permet pas d'avoir des disparitions trop longues. Finalement, on peut donc considérer que l'erreur sur les coefficients de diffusion dans nos expériences est comprise entre 15 et 20%.

3.3.2.2 Diffusion libre et diffusion restreinte

Tri des trajectoires

Pour déterminer le type de mouvement correspondant globalement à une trajectoire, nous avons décidé de baser notre étude sur le paramètre RD précédemment défini par Kusumi et al. [78]. RD est donné par la relation suivante :

$$RD(t) = \frac{\widehat{\rho}_e(t)}{\widehat{\rho}_{\text{libre}}(t)}$$

RD est un indicateur de l'écart entre la MSD expérimentale et la MSD attendue pour une diffusion libre. Il permet de faire la distinction entre trois modes de mouvements : libre, dirigé et restreint. Pour l'utiliser, il faut régler deux types de paramètres : le temps, t_0, pour lequel on va mesurer $RD(t_0)$ et les valeurs seuils $RD_{\text{min}}(t_0)$, $RD_{\text{max}}(t_0)$ auxquels $RD(t_0)$ sera comparé.

Le choix de t_0 est issu d'un compromis : il doit être assez grand pour correspondre à un endroit de la MSD assez incurvé et il doit être assez petit pour que $\widehat{\rho}_e(t_0)$ ne soit pas trop entaché de l'erreur statistique. A l'œil, on remarque que la plupart des MSD, qui nous paraissent être caractéristiques

d'un mouvement confiné, s'éloignent du comportement linéaire aux alentours de $t = 1s$. On décide alors de prendre $t_0 = 1.5s$. Pour $T_{\text{acq}} = 75$ms, $\widehat{\rho}_e(t_0)$ est le 20ème point de la MSD. Étant donnée que la plupart de nos trajectoires expérimentales sont composées de plus de 100 points, on peut considérer que l'erreur statistique n'est pas trop grande en ce point.

$RD_{\text{min}}(t_0)$ et $RD_{\text{max}}(t_0)$ sont déterminés de la manière suivante (d'après [78]) :

- un ensemble de trajectoires browniennes est simulé
- on calcule alors l'histogramme des valeurs de $RD(t_0)$ dans le cas d'une diffusion libre. Du fait des fluctuations statistiques, cet histogramme n'est pas un dirac mais plutôt une gaussienne centrée en 1.
- 2.5% des $RD(t_0)$ sont inférieurs à $RD_{\text{min}}(t_0)$ et 2.5% des $RD(t_0)$ sont supérieurs à $RD_{\text{max}}(t_0)$

D'après [78], $RD_{\text{min}}(t_0)$ et $RD_{\text{max}}(t_0)$ dépendent fortement du nombre de points total, N, des trajectoires. Plus précisément, ces valeurs varient beaucoup en fonction du rapport t_0/t_{total}, t_{total} étant la durée totale des trajectoires. Plus t_0/t_{total} est grand, plus $RD_{\text{min}}(t_0)$ est petit et $RD_{max}(t_0)$ grand. Étant donné que nous ne sommes pas dans les mêmes conditions que Kusumi et al. (nos valeurs de t_0 et t_{total} ne sont pas les mêmes que les leurs), nous avons donc estimé nos propres valeurs seuils.

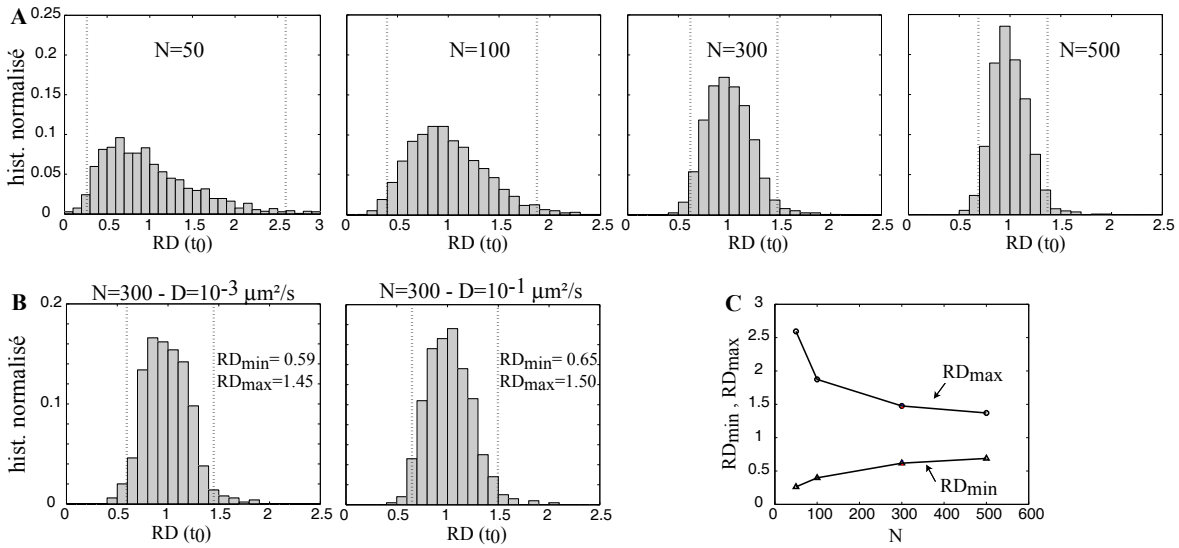

Figure 3.14 – *Détermination des valeurs seuils RD_{min} et RD_{max} à l'aide de trajectoires simulées. (A) histogrammes normalisés des $RD(t_0)$ (RD_{min} et RD_{max} sont indiquées par des lignes verticales en pointillés) pour différentes valeurs de N (1500 trajectoires pour chaque valeur de N). (B) Pour $N = 300$, histogrammes obtenus pour 500 trajectoires de coefficients de diffusion $D = 0.001\ \mu m^2.s^{-1}$ et $D = 0.1\ \mu m^2.s^{-1}$. (C) Résumé des valeurs seuils obtenues en fonction de N.*

Pour ce faire, nous avons simulés 500 trajectoires (suivant une diffusion libre) pour chaque couple (D,N) possible avec D= $0.1,\ 0.01$ ou $0.001\ \mu$m^2.s^{-1} et $N = 50,\ 100,\ 300$ ou 500. De plus, nous avons introduit du clignotement dans ces trajectoires avec la procédure décrite précédemment (nous avons vu que l'effet du clignotement est négligeable sur la MSD aux temps courts mais ce n'est peut être plus le cas aux temps plus longs). La figure 3.14 permet d'illustrer la procédure de détermination de $RD_{\text{min}}(t_0)$ et $RD_{\text{max}}(t_0)$ et leurs variations avec D et N. On observe que RD_{min} et RD_{max} ne varient pas de manière significative avec le coefficient de diffusion D (voir fig. 3.14B). En revanche, ils sont

fortement dépendant de N (voir fig. 3.14C).

Ainsi, pour chaque trajectoire expérimentale de longueur N_i, la valeur de RD^i_{min} est extraite de la courbe $RD_{\text{min}}(N, t_0) = f(N)$ (voir fig. 3.14C). On fait de même pour RD_{max}. On détermine ensuite le type de mouvement de la trajectoire : restreint pour $RD^i \leq RD^i_{\text{min}}$, dirigé pour $RD^i \geq RD^i_{\text{max}}$), ou libre. Sur la figure 3.15, sont donnés deux exemples de trajectoires expérimentales restreinte et libre.

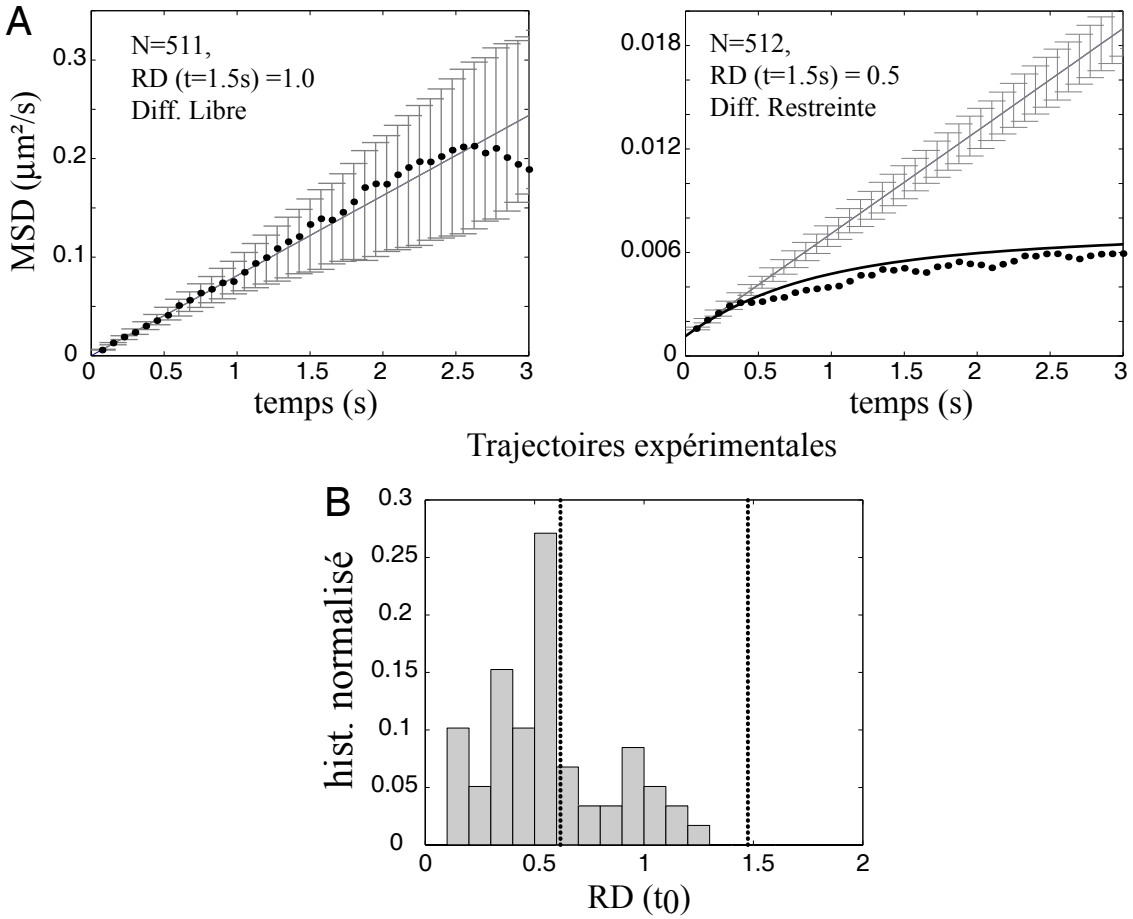

Figure 3.15 – *(A) Deux exemples de trajectoires expérimentales : l'une classée comme libre et l'autre comme restreinte. On trace $\widehat{\rho}_e(t)$ (points noirs) et $\widehat{\rho}_{libre}(t)$ (en gris). Pour la trajectoire restreinte, on indique également l'ajustement de la MSD par la fonction 3.12 (trait noir). Les barres d'erreurs indiquent l'erreur statistique entachant chaque point des MSD linéaires. (B) Histogramme normalisé des $RD(t_0)$ pour des trajectoires expérimentales (pour des RGly exogènes colocalisés avec des agrégats de géphyrine) longues. N étant compris entre 280 et 512 points, on indique les valeurs de RD_{min} et RD_{max} (lignes verticales en pointillés) pour $N = 300$. Au moins 70% des RD sont ici inférieurs à RD_{min}.*

Pour mettre en valeur le fait que bon nombre de récepteurs de la glycine suivent une diffusion restreinte, on représente, sur la figure 3.15B, l'histogramme des RD obtenus sur des données expérimentales. On ne peut pas extraire directement de cet histogramme le pourcentage de trajectoires restreintes puisque toutes les trajectoires n'ont pas la même longueur. Toutefois, on voit bien

que l'histogramme sur ces données expérimentales est largement décalé vers les faible valeur de RD (par rapport aux histogrammes sur trajectoires purement browniennes).

Dans toutes nos expériences, moins de 1% des trajectoires sont identifiées comme suivant un mouvement dirigé. Nous ne parlerons donc plus dans la suite de ce type de diffusion, marginal dans nos études. On considère que la diffusion du récepteur de la glycine est soit libre soit confinée.

Estimation du diamètre de confinement

Sur les trajectoires qui ont été classées comme étant restreintes, on effectue un ajustement de la MSD par la fonction suivante :

$$\widehat{\rho}_e(t) - b = \frac{L^2}{3}\left(1 - \exp\left(\frac{-12D_{\text{ini}}t}{L^2}\right)\right) + 4D_{\text{mac}}t \tag{3.15}$$

où D_{ini} et b ont été précédemment obtenus lors de l'estimation du coefficient de diffusion aux temps courts. Du fait de l'erreur statistique, seul le premier quart des points de la MSD est pris en compte lors de cet ajustement. Par ailleurs, on préfère considérer une géométrie circulaire du domaine de confinement, on retourne alors son diamètre $d_{\text{conf}} = 2L/\sqrt{\pi}$.

Notons que toutes les trajectoires que l'on classe comme étant confinées ont plus de 97.5% de chance de l'être réellement. En revanche, le nombre de trajectoires réellement libres est vraisemblablement sur-estimé. Il conviendra de se reporter à l'article [78] pour une étude du pourcentage de trajectoires faussement classées comme étant libre en fonction du paramètre L^2/D.

3.3.3 Étude de la localisation des particules

Dans la plupart de nos études, on souhaite mettre en relation le comportement dynamique du récepteur avec sa localisation. On entend par localisation sa position par rapport à un autre élément du système biologique. Cet élément peut être soit une synapse soit un agrégat de géphyrine (voir 3.1.1). La membrane plasmique est alors divisée en deux zones : une zone où il y a un marquage positif de cet élément (zone synaptique ou intra-agrégat de géphyrine) et une zone non marquée (zone extra-synaptique ou extra-agrégats de géphyrine). Nous les nommerons zones $\oplus$ et $\ominus$, respectivement.

3.3.3.1 Définition de la localisation

Pour délimiter les zones $\oplus$ et $\ominus$, l'image de localisation doit être filtrée. Deux techniques ont été successivement utilisées :

1. on applique à l'image FM (marquage des synapses) une transformation chapeau haut-de-forme suivie d'un seuillage, ces deux fonctions étant disponibles sur la version commerciale du logiciel Metamorph. Ceci permet de retrouver les objets fortement contrastés indépendamment du fond de fluorescence avoisinant.
2. l'image Venus (marquage des agrégats de géphyrine) est traitée via une interface d'analyse d'image multidimensionnelle (MIA[1] pour *Multidimensional Image Analysis*) qui tourne sous Metamorph. Basé sur un seuillage des coefficients en ondelette, ce filtrage permet la détection simultanée d'objets sur une large palette de contraste.

[1]MIA est un logiciel qui n'est pas distribué librement. Il a été développé, au sein de l'Institut Curie, par Victor Racine qui a effectué une thèse [117] dans le Laboratoire Cell and Tissue Imaging, sous la direction de Bruno Goud. Des descriptions succinctes du logiciel se trouvent dans les références suivantes [101, 81]

Ces deux techniques requièrent une grande interaction avec l'utilisateur. En effet, celui-ci doit déterminer la taille optimale de l'élément structurant et le seuil appliqué pour détecter un maximum d'objets réels en évitant au mieux les fausses détections. En sortie de ces programmes (voir fig. 3.16 pour illustration), on dispose alors d'une image binaire où les zones $\oplus$ et $\ominus$ sont respectivement blanches et noires.

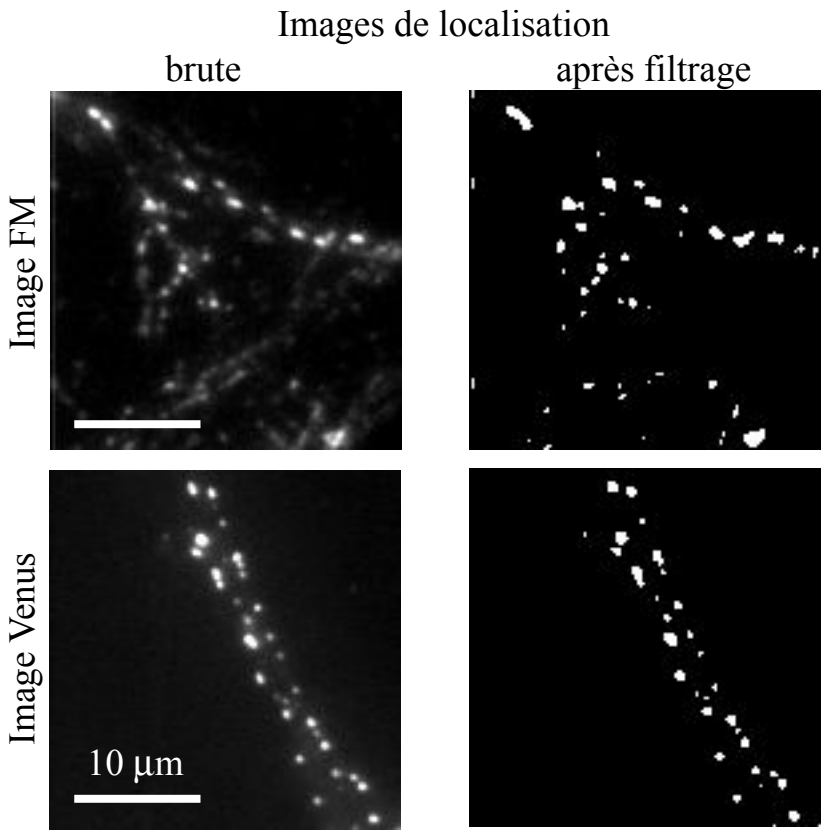

Figure 3.16 – *Image FM (en haut) et Venus (en bas) brutes (à gauche) et après filtrages (à droite). L'image obtenue est une image binaire, les zones $\oplus$ et $\ominus$ sont respectivement blanches et noires.*

La localisation d'un spot de fluorescence est alors défini par la position de son centre par rapport à cette image binaire. Dans des études précédentes [34], une troisième zone avait été définie. Cette zone, dite perisynaptique, de 2 pixels de largeur autour de la zone synaptique, a une signification biologique dans le cas d'études en fonction de la localisation des synapses : elle correspond à une partie de la membrane de densité intermédiaire entre les zones synaptiques et extrasynaptiques. Toutefois, en raison de l'augmentation des difficultés d'interprétations des résultats en fonction du nombre de zones considérées, cette zone intermédiaire a progressivement été abandonnée. De plus, cette zone n'a aucune signification biologique dans le cas où la zone $\oplus$ correspond à des agrégats de géphyrine. Pour ces deux raisons, dans toute la suite, je ne considérerai que les deux zones $\oplus$ et $\ominus$.

3.3.3.2 Quantification de la diffusion en fonction de la localisation

Pour caractériser les propriétés de diffusion des récepteurs dans chaque zone, les trajectoires sont classées en fonction du temps global passé dans chacune des zones. Trois catégories de trajectoires sont définies :

1. si le spot est observé plus de 90% du temps dans la zone $\oplus$, la trajectoire est dite $\oplus$
2. de même, si le spot est observé plus de 90% du temps dans la zone $\ominus$, la trajectoire est dite $\ominus$
3. sinon, la trajectoire est dite "mixte".

Pour chaque trajectoire $\oplus$ ou $\ominus$, la trajectoire entière est utilisée pour caractériser la diffusion des récepteurs dans la zone en question. En revanche, si la trajectoire est "mixte", on essaye de trouver une portion de trajectoire assez longue (on fixe un seuil minimal de 30 points) dans chaque zone. Ces deux portions de trajectoires sont analysées séparément pour caractériser chaque zone. Un seuil de 90% du temps a été choisi car il permet à la fois de maximiser le nombre de trajectoires entières considérées (et ainsi d'augmenter la précision sur le calcul de la MSD) et de minimiser les effets de la fraction du temps passée dans l'autre zone (inférieure à 10%).

Pour chaque trajectoire entière ou partielle, on mesure ensuite son coefficient de diffusion aux temps courts et on détermine son type de mouvement aux temps longs avec les méthodes exposées précédemment. Notons que cette méthode de traitement automatique des trajectoires(basée sur l'utilisation de trajectoires entières et partielles pour caractériser la diffusion dans chaque zone) permet de se rapprocher au mieux d'une analyse manuelle. A titre illustratif, la figure 3.17 présente les résultats obtenus sur un film.

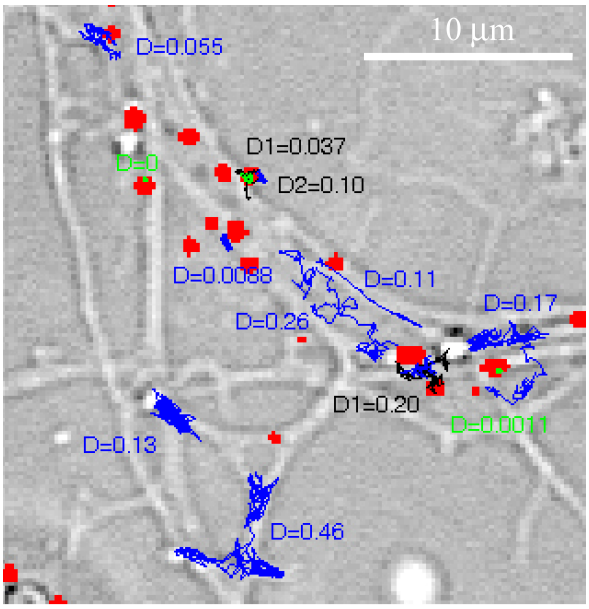

Figure 3.17 – *Superposition de l'image en transmission, de l'image de localisation (les zones $\oplus$ sont en rouge) et des trajectoires ($\ominus$ en bleu, $\oplus$ en vert, mixte en noir). Pour les trajectoires mixtes, on indique respectivement en bleu et en vert les portions de trajectoires dans les zones $\ominus$ et $\oplus$ utilisées pour calculer un coefficient de diffusion dans ces zones (notés D1 et D2). Les coefficients de diffusion sont indiqués en $\mu m^2.s^{-1}$. $D = 0$ indique une trajectoire classée comme étant immobile.*

3.3.3.3 Temps de résidence et nombre de transitions

En plus des propriétés de diffusion des récepteurs dans chaque zone, nous avons souhaité développer des outils qui permettent véritablement de caractériser leur localisation au cours du temps. Pour ce faire, les trajectoires sont divisées en deux catégories : celles qui restent au sein d'une même zone tout le long du film et celles qui en change.

Problématiques et traitements des données

A l'issue du suivi, la localisation d'un QDot individuel en fonction du temps consiste en un enchaînement de 3 états possibles : le QDot est détecté dans la zone $\oplus$ (état 1) ; le QDot est détecté dans la zone $\ominus$ (état 0) ; le QDot n'est pas détecté, il est dans un état noir (état -1). Ce dernier état, dû au clignotement des QDots, représente un obstacle considérable, puisqu'il est impossible de connaître la localisation du QDot dans ces moments. Toutefois, pour extraire un maximum d'information à partir de ces données brutes, nous proposons de faire les hypothèses les plus simples possibles sur la localisation d'un QDot lorsqu'il est dans l'état -1 :

1. si le QDot est dans le même état avant et après s'être éteint (enchaînement d'états de type $\{1\ -1\ 1\}$ ou $\{0\ -1\ 0\}$), on suppose qu'il est resté dans la même zone durant tout son temps d'extinction
2. sinon (enchaînement d'états de type $\{1\ -1\ 0\}$ ou $\{0\ -1\ 1\}$), pour redistribuer la durée passée dans l'état -1 aux états 0 et 1 de manière équitable, on suppose que la QDot a changé de zone à la moitié de son temps d'extinction.

Pour chaque trajectoire, à partir de la séquence brute des états et des temps associés $\{E_i^0, t_i^0\}$ et des hypothèses ci-dessus, on obtient alors une nouvelle séquence $\{E_i^1, t_i^1\}$ qui ne contient plus que des états 0 ou 1 (voir fig. 3.18).

D'autre part, un deuxième facteur limite notre connaissance de la localisation précise des QDots : l'imprécision sur la délimitation des zones $\oplus$ et $\ominus$. En effet, même si on considère que le seuil utilisé pour obtenir l'image binaire de localisation est parfaitement choisi, les zones ont une forme "en escalier" due à l'échantillonnage par les pixels de la caméra. Bien évidemment, cette forme ne correspond à aucune réalité biologique. L'imprécision sur la détermination des bords des zones (de l'ordre de la largeur d'un pixel) est alors environ 10 fois plus grande que l'imprécision de pointé sur la position des QDots. Comme illustré sur la figure 3.18, cet écart de précision peut alors entraîner une surestimation des temps très courts (1 à 2 images) passés dans un état. Pour pallier ce phénomène, on applique un lissage à la courbe des états en fonction du temps. Les paramètres de la fonction de lissage (taille de la fenêtre glissante et seuil appliqué ensuite) ont été déterminés expérimentalement. Notons que nous avons vérifié que cette étape introduit une variation minime ($< 2.6\%$) du temps global passé dans chaque zone.

La figure 3.18 résume les traitements appliqués aux séquences brutes $\{E_i^0, t_i^0\}$ qui permettent d'obtenir les séquences finales $\{E_i, t_i\}$ utilisées pour mesurer les temps de résidences et le nombre de transition (voir définition ci-dessous).

Temps de résidence, nombre de transition et temps moyen passé dans l'état 1

On définit ensuite plusieurs indicateurs qui permettent de donner des mesures quantitatives des changements de localisation au cours du temps. Les temps $\{t_i^{\text{état 0 ou 1}}\}$ passés dans chaque état, directement obtenus à l'issue des traitements précédemment décrits, sont appelés temps de résidence

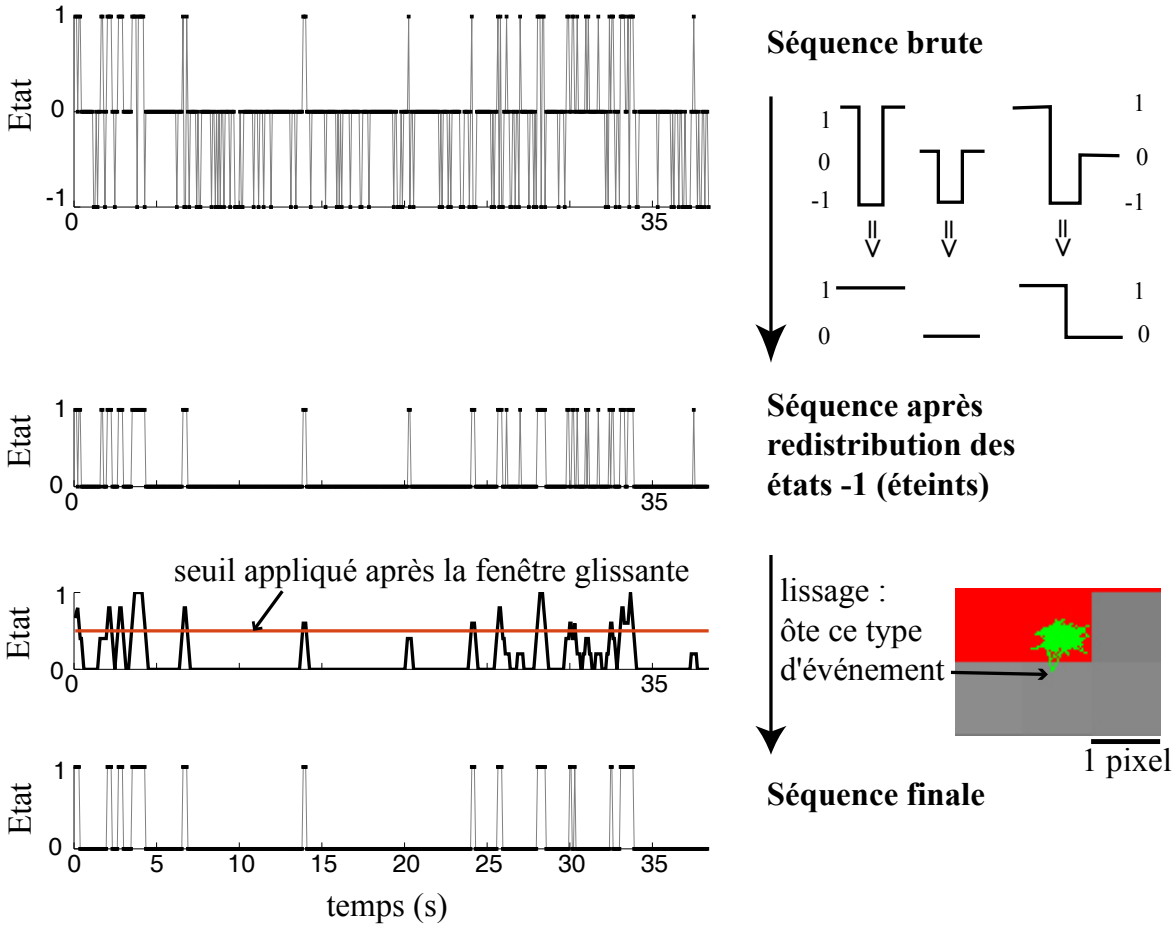

Figure 3.18 – *Traitements appliqués aux données brutes de localisation. Exemple sur une trajectoire (à gauche) et vue schématique (à droite). (à gauche) Lors de l'étape de lissage, on représente le résultat intermédiaire, suite à l'application d'une fenêtre glissante mais avant seuillage (le seuil est donné par la droite rouge).*

($t_r^{\text{état } 0}$ et $t_r^{\text{état } 1}$). Si l'on dispose d'un nombre important de QDots changeant de localisation au cours du temps, on obtient alors les distributions statistiques de ces temps de résidence.

Pour chaque film, on définit le nombre de transition, n_t, comme suit :

$$n_t = \frac{n_e + n_s}{n_{QDot} * t_{\text{QDots}}}$$

où n_e et n_s sont le nombre d'entrées à l'intérieur de la zone 1 (état 0 suivi d'un état 1) et de sorties (état 1 suivi d'un état 0) de cette zone respectivement, n_{QDot} est le nombre de QDots dans le champ (tous QDots confondus) et t_{QDots} le temps total pendant lequel des QDots sont observés. n_t est exprimé en nombre de transitions par nombre de QDots par minute.

Pour chaque film, un temps moyen passé dans l'état 1, $t_m^{\text{état } 1}$ est défini selon :

$$t_m^{\text{état } 1} = \frac{t_{\text{total}}^{\text{état } 1}}{n_s}$$

où $t_{\text{total}}^{\text{état } 1}$ est la durée totale de détection de QDots dans l'état 1.

Les temps de résidences ($t_r^{\text{état } 0}$ et $t_r^{\text{état } 1}$) sont utilisés pour étudier spécifiquement la localisation des QDots changeant de localisation au cours du temps (voir 5.4.1). En revanche, $t_m^{\text{état } 1}$ est utilisé pour avoir une mesure (rapide) du temps passé dans l'état 1, sur l'ensemble des QDots d'un film (qu'ils soient toujours dans un état 1 où qu'ils passent d'une zone à l'autre). Ainsi, $\langle t_r^{\text{état } 1} \rangle$ est à priori différent de $t_m^{\text{état } 1}$.

3.3.4 Le "logiciel" d'analyse

Le logiciel d'analyse a été développé spécifiquement pour les biologistes avec lesquels nous collaborons. L'interface est très épurée (son esthétique n'a jamais été une priorité), à base de boutons sur lesquels l'utilisateur choisit d'appuyer, d'options à cocher, de paramètres modifiables, de fenêtres supplémentaires pour visualiser les résultats. Ce logiciel, simple d'utilisation, a été un outil de choix pour mettre au point les différents outils d'analyse. En effet, il permet aux biologistes, d'une part de visualiser rapidement leurs données et les résultats obtenus après chaque étape des traitements, et d'autre part d'écrire des fichiers (de type Excel) regroupant les résultats. Ainsi, chaque nouvelle idée de fonction est rajoutée après avoir été testée et validée sur des données réelles par plusieurs personnes. Les visualisations autorisées par l'interface permettent d'ajuster les valeurs des paramètres pour chaque nouveau cas. Le nombre de fonctions disponibles dans le logiciel n'a eu de cesse d'augmenter aux cours de ces trois années. Seules les fonctions principales ont été décrites dans ce manuscrit.

En résumé, l'interface est divisée en trois parties (voir fig. 3.19) : la première pour visualiser les trajectoires obtenues à l'issue du suivi, la deuxième pour étudier spécifiquement la localisation des QDots en fonction du temps et la troisième pour caractériser les propriétés de diffusion (en lien ou non avec une image de localisation).

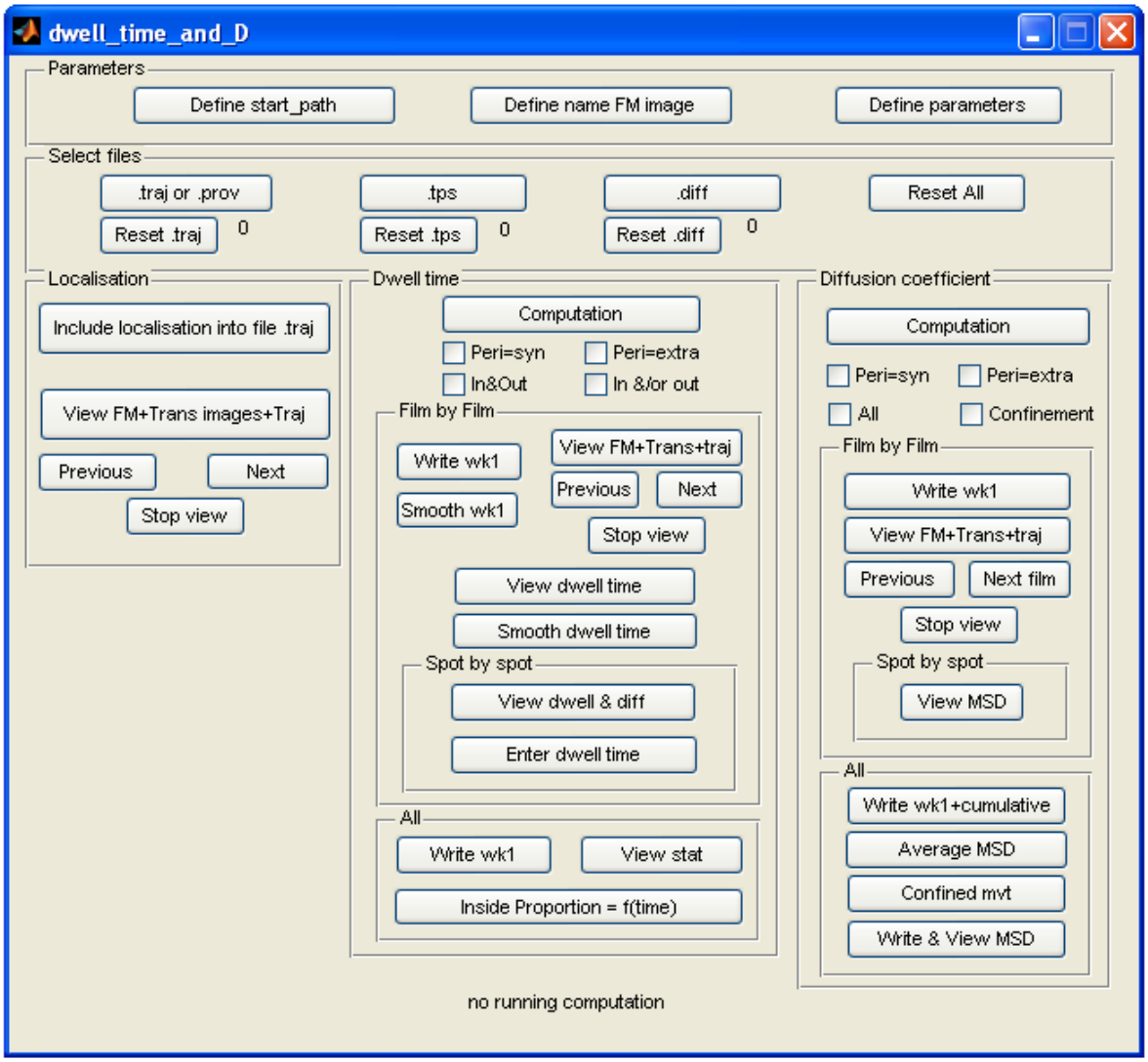

Figure 3.19 – *Interface permettant d'accéder aux différentes fonctions d'analyse des trajectoires.*

Chapitre 4

Dynamique latérale du RGly dans des neurones adultes

Sommaire

4.1 Introduction 100

4.1.1 Stabilité des synapses et renouvellement de leurs constituants 100

4.1.2 Plasticité synaptique et diffusion latérale 100

4.1.3 Implications du cytosquelette et de l'activité 102

4.2 Influence du cytosquelette 103

4.2.1 Méthodes 103

4.2.2 Résultats 105

4.2.3 Article 106

4.1 Introduction

4.1.1 Stabilité des synapses et renouvellement de leurs constituants

La structure des synapses peut être stable sur de grandes durées, de l'ordre de la journée jusqu'à plusieurs années. Au contraire, la durée de vie des éléments la constituant est au plus de l'ordre de quelques jours. Par exemple, la durée de vie des récepteurs dans la membrane est très faible (la demi-vie du RGly est ∼14h [120]) comparée à la durée de vie d'une synapse. Les relations exactes entre ces deux échelles de temps de vie ne sont pas entièrement connues. Pour chaque élément constitutif, tels les récepteurs ou les éléments de l'échafaudage post-synaptique, des flux d'insertion/extraction se produisent en permanence au niveau de la synapse. De plus, au recyclage permanent de ces éléments, s'ajoute leur mobilité. Toutefois, ces phénomènes dynamiques aboutissent à une situation d'équilibre qui permet de maintenir une stabilité structurelle. Pour concilier cette stabilité des synapses avec le renouvellement constant de ses composants, la synapse doit être considérée comme un ensemble qui résulte de multiples équilibres.

4.1.2 Plasticité synaptique et diffusion latérale

La transmission synaptique dépend à la fois des éléments pré- et post-synaptiques. Au niveau de la membrane post-synaptique, il a été démontré que le nombre de récepteurs aux synapses varie lorsque la force de la transmission synaptique est modifiée (voir [88,138,15] pour revue). Ceci suggère en retour que la modification du nombre de récepteurs au niveau de la membrane post-synaptique constitue un mécanisme important de la plasticité synaptique.

L'endocytose et l'exocytose ont longtemps été les seuls mécanismes considérés pour expliquer des variations du nombre de récepteurs aux synapses. De nombreuses expériences suggèrent fortement que la diffusion latérale des récepteurs entre les membranes synaptique et extrasynaptique est également un processus clé (voir [29, 152] pour revue). Un récepteur peut sortir/entrer dans la synapse par endocytose/exocytose mais également par diffusion latérale. De plus, dans le cas du RGly entre autres, le phénomène d'endocytose est nécessairement couplé à la diffusion latérale pour permettre l'accumulation des récepteurs aux synapses puisque l'insertion des RGly se fait dans la membrane extra-synaptique [126].

La visualisation directe d'échanges de récepteurs entre les membranes synaptiques et extrasynaptique [34, 12, 147, 54] sur des temps de l'ordre de la minute, a menée à formuler l'hypothèse suivante : la diffusion latérale n'est pas uniquement impliquée dans les processus de recyclage, des modifications de la diffusion à des échelles de temps faibles (plus petites que les temps caractéristiques de recyclage) permettraient de mener à des variation rapides du nombre de récepteurs aux synapses.

Le comportement des récepteurs peut être schématisé par un système à deux états (voir fig. 4.1) : un état S (synaptique) et un état E (extrasynaptique). Aux synapses, les récepteurs interagissent de manière transitoire avec des protéines d'ancrage. Pour traduire l'effet de ces interactions sur la rétention des récepteurs aux synapses, on peut considérer que le récepteur tombe dans un puit de potentiel lorsqu'il rentre dans l'état S. La forme et la valeur du potentiel dépendent de la distribution des protéines d'ancrage au sein de la synapse et des constantes d'association / dissociations entre les récepteurs et les protéines d'ancrage. Par diffusion latérale, le récepteur transite entre l'état S et l'état E. L'accumulation des récepteurs à la synapse résulte d'un équilibre entre les deux populations de récepteurs. Des changements rapides de l'efficacité synaptique seraient alors engendrés par des

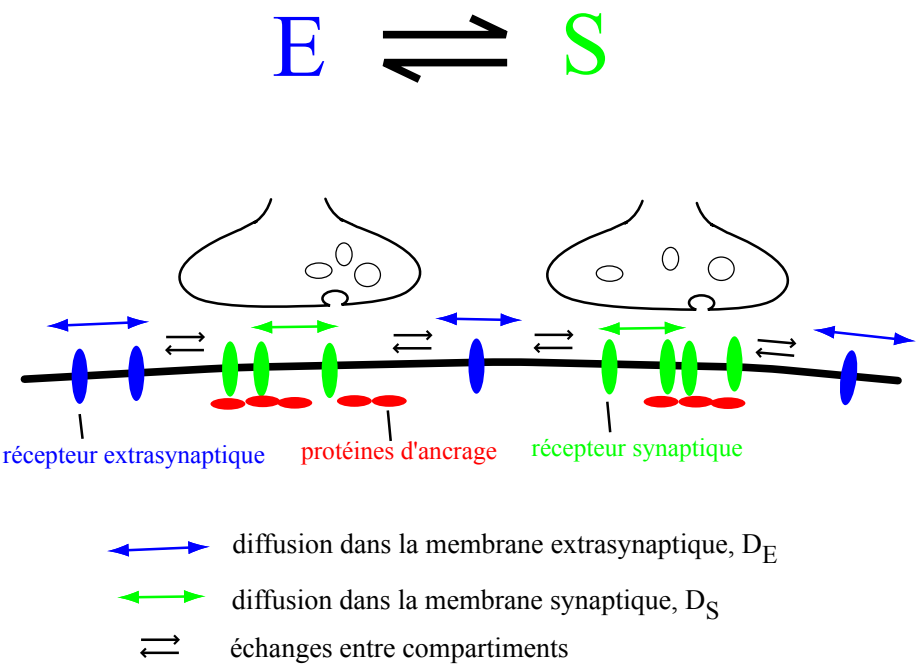

Figure 4.1 – *Vue schématique de la dynamique membranaire des récepteurs. Équilibre entre deux états synaptique (S) et extrasynaptique (E). La diffusion latérale dans les membranes synaptique et extrasynaptique, et les échanges de récepteurs entre ces deux domaines sont des indicateurs utiles pour caractériser l'équilibre.*

variations de l'équilibre dynamique entre récepteurs synaptiques et extrasynaptiques via des modifications de la diffusion latérale.

Dans la membrane neuronale, l'équilibre dynamique entre récepteurs synaptiques et extrasynaptiques est de fait très complexe. Il est lui-même issu de la combinaison de multiples équilibres, pouvant se produire à des échelles de temps différentes. La concentration des récepteurs aux neurotransmetteurs au niveau des synapses résulte principalement de leur interaction avec les échafaudages moléculaires post-synaptiques qui les stabilisent. Ces échafaudages contiennent de multiples molécules de fonctions diverses (telles des protéines d'ancrage, des molécules d'adhésion, des molécules de signalisation) qui peuvent interagir à leur tour avec le cytosquelette. Du fait de cette complexité structurelle et fonctionnelle, le comportement des récepteurs n'est pas homogène. Par exemple, pour une durée d'observation donnée, certains récepteurs sont stables aux synapses, d'autres sont mobiles mais restent aux synapses, d'autres s'échappent des synapses. Une description complète de tous les sous-equilibres participant à l'équilibre global, directement dans la membrane neuronale mature, n'est pas réalisable pour l'instant.

L'approche que nous utilisons consiste à caractériser l'équilibre globale entre récepteurs extrasynaptiques et synaptiques via deux indicateurs que sont : (1) la facilité des récepteurs à diffuser dans chaque compartiment de la membrane (synaptique et extrasynaptique) qui dépend de la viscosité apparente de la membrane et (2) la facilité des récepteurs à entrer et sortir de la synapse qui dépend principalement de l'affinité de liaison entre le récepteur et les protéines d'ancrage de

l'échafaudage post-synaptique. La mesure de ces deux facteurs est obtenue par quantifications de la diffusion latérale et des échanges entre compartiments. On vient ensuite perturber spécifiquement certains éléments du système et l'on mesure les modifications de l'équilibre qui en résulte.

4.1.3 Implications du cytosquelette et de l'activité

Schématiquement, on peut considérer que le nombre de récepteurs aux synapses peut être modifié par les facteurs principaux suivant :

- le nombre total de récepteurs présents dans la membrane plasmique,
- le nombre de sites de liaison disponibles dans l'échafaudage post-synaptique,
- la diffusion latérale dans les membranes synaptique et extrasynaptique,
- les échanges entre les compartiments extrasynaptiques et synaptiques.

L'hypothèse de travail est que la dynamique des récepteurs permet de jouer sur le nombre de récepteurs aux synapses. Tirant partie du concept d'équilibre dynamique qui a été exposé ci-dessus, l'étude de l'équilibre entre récepteurs synaptiques et extrasynaptiques, via la quantification de la diffusion et des flux entre compartiments, devrait nous permettre de valider ou d'infirmer cette hypothèse.

Dans le cadre des travaux menés sur la dynamique du RGly, il faut alors trouver des facteurs qui sont connus pour agir sur le nombre de récepteurs aux synapses et étudier leurs influences sur la dynamique du récepteur. Dans cette optique, le cytosquelette est un bon candidat pour plusieurs raisons :

1. le cytosquelette est impliqué dans la transmission synaptique et dans bon nombre de plasticités synaptiques (voir [80,39] pour revue)
2. le cytosquelette participe à la stabilisation du RGly aux synapses : les échafaudages postsynaptiques inhibiteurs sont en interaction forte avec le cytosquelette. La géphyrine, protéine centrale de ces échafaudages, peut *a priori* lier la tubuline et plusieurs protéines régulatrices des filaments d'actine (voir partie 1.2.2, page 23). De plus, il a été montré que l'agrégation post-synaptique du RGly et de la géphyrine dépend du cytosquelette d'actine et des microtubules [70,169].
3. le cytosquelette régule la dynamique des agrégats post-synaptiques de géphyrine [58]
4. il a été montré, dans plusieurs types de cellules non neuronales, que le réseau sous-membranaire créé par le cytosquelette agit sur la viscosité apparente de la membrane et modifie ainsi les propriétés de diffusion des protéines membranaires ([76], voir partie 1.1).

Nous verrons dans la section 4.2 comment l'étude de l'influence des éléments du cytosquelette sur la dynamique du RGly a permis d'établir un lien de cause à effet entre la diffusion du récepteur et le nombre de RGly aux synapses.

De plus, le cytosquelette est à la fois un acteur et une cible dans la régulation des fonctions synaptiques. En particulier, il est envisagé que l'activité synaptique contrôle le nombre de récepteurs aux synapses en agissant sur le cytosquelette. L'étude de l'influence du cytosquelette constitue alors une étape dans la compréhension des modifications de la dynamique des récepteurs suite à des changements de l'activité neuronale. L'activité tient un rôle très important, elle participe à la régulation de nombreux processus neuronaux, citons : la morphologie du cytosquelette (cela a été démontré dans

les épines dendritiques [39]), la dynamique des agrégats de géphyrine aux synapses inhibitrices [58], la stabilisation des récepteurs aux synapses [85], la dynamique cellulaire des récepteurs (via leur endocytose/exocytose) (voir références dans [151]).

Plusieurs expériences de suivi de molécules uniques ont été menées ou sont en cours pour étudier l'influence de l'activité synaptique sur la dynamique latérale des récepteurs (voir références dans [152]). Pour modifier l'activité neuronale, de nombreux traitements peuvent être appliqués aux cellules en culture. Par exemples, certains traitements permettent de bloquer un type particulier de canal (le 4-AP bloque les canaux à potassium, le TTX bloque les canaux à sodium) ce qui permet d'induire une augmentation ou une diminution globale de l'activité (par dépolarisation ou hyperpolarisation des neurones) ; l'utilisation d'antagoniste de récepteurs (tels la strychnique pour le RGly, la gabazine pour la RGABA, le CNQX pour le RAMPA) permet de réduire l'inhibition ou l'excitation plus spécifiquement. Des données montrent qu'une augmentation de l'activité globale du réseau neuronal (sur des neurones d'hippocampe en culture) accroît la mobilité des RAMPA mais pas celle des RNMDA [54]. Ceci suggère que l'activité contrôle spécifiquement la dynamique de certains récepteurs. Des études sont actuellement en cours[1] pour étudier comment l'activité contrôle la dynamique des récepteurs inhibiteurs (le RGly dans des neurones de moelle épinière et le RGABA dans des neurones d'hippocampe). Leurs observations suggèrent que la diffusion des récepteurs dépend des niveaux relatifs de l'excitation et de l'inhibition. Ainsi, la diffusion latérale pourrait être impliquée dans le contrôle de l'équilibre entre l'activité des synapses excitatrices et celle des synapses inhibitrices. Par ailleurs, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la diffusion par l'activité restent à être identifiés. Il est envisagé que des modifications des interactions entre récepteurs et protéines d'ancrage et/ou des changements dans l'organisation du cytosquelette sous-membranaire en fassent partie.

4.2 Influence du cytosquelette

Le but des travaux présentés dans l'article [25], fourni dans ce manuscrit page 107, est d'étudier l'influence des éléments du cytosquelette sur la dynamique du RGly dans la membrane plasmique et sur la régulation du nombre de RGly aux synapses. L'objectif sous-jacent est de mettre en relation la régulation du nombre de RGly aux synapses avec leurs propriétés diffusives. Ceci est permis par la combinaison des analyses morphologiques classiques sur cellules fixées et d'expériences de SPT sur cellules vivantes.

J'ai assuré le développement d'outils d'analyses pertinents qui ont permis de retirer des informations utiles à partir des données obtenues en SPT. Dans cette optique, les méthodes expérimentales et résultats clés sont résumés ci-dessous. Pour la description complète des résultats obtenus et une discussion détaillée, il conviendra de se reporter à l'article.

4.2.1 Méthodes

Ces études sont faites sur des interneurones de moelle épinière de rat, de 10 à 12 DIV. A ce stade de développement, les neurones sont adultes et forment des réseaux fonctionnels, les contacts synaptiques sont matures [119].

[1] Travaux menés par A. Triller, S. Lévi, H. Bannai et C. Schweizer au laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse

Dépolymérisation des filaments d'actine et des microtubules

Les filaments d'actine et les microtubules sont dépolymérisés par des traitements pharmacologiques que sont des incubations en présence de latunculine A[1] et de nocodazole[2] respectivement. La concentration et la durée d'application des drogues sont déterminées pour obtenir une dépolymérisation efficace mais compatible avec la survie des neurones.

Immunocytochimie sur cellules fixées

Une immunocytochimie consiste à fixer des cellules, puis à venir marquer à l'aide d'anticorps (un anticorps primaire suivi d'un anticorps secondaire couplé à un fluorophore) un ou plusieurs éléments que l'on souhaite observer. Dans ces expériences, des anticorps dirigés contre le RGly, la géphyrine et la synapsine I permettent de visualiser les agrégats de RGly, de géphyrine et les synapses respectivement. Des images sont ensuite acquises en microscopie optique standard. Notons que seuls les agrégats de fluorophores sont détectés. Les images obtenues sont ensuite traitées pour permettre une quantification du niveau de fluorescence associé à chaque marquage. Le marquage avec la synapsine I permet d'identifier, par colocalisation, les agrégats synaptiques de RGly (et de géphyrine). La comparaison de la fluorescence des RGly synaptiques dans des conditions contrôle et suite aux traitements pharmacologiques permet d'estimer les variations relatives de la quantité de RGly aux synapses.

Expériences de suivi de molécules uniques

Concernant les expériences de suivi de molécules uniques, la sous-unité α_1 (prédominante à partir d'environ 7 DIV) du récepteur endogène est marquée à l'aide de nanocristaux semiconducteurs selon la procédure décrite précédemment (voir page 52). Le suivi des récepteurs et l'analyse des trajectoires sont faits selon les méthodes détaillées dans la partie 3.

D'une part, la diffusion des récepteurs suivis est quantifiée, par la mesure du coefficient de diffusion, l'identification du type de mouvement et l'estimation de la zone de confinement le cas échéant. D'autre part, on souhaite mettre en lien les propriétés de diffusion des récepteurs (dans les zones synaptique et extrasynaptique) avec les variations de leur nombre aux synapses. En considérant la diffusion d'une protéine en terme de surface explorée, il semble que l'augmentation de la mobilité des récepteurs à l'intérieur des synapses (dans la membrane extrasynaptique respectivement) accroît la probabilité de sortir de la synapse (d'entrer dans une synapse). Toutefois, d'autres facteurs peuvent intervenir dans les échanges entre les compartiments extrasynaptique et synaptique. Par exemple, les protéines d'adhésion, localisées sur le bords des synapses peuvent faire obstacle à la diffusion des récepteurs et agir comme des barrières limitant le nombre d'entrée/sortie. Pour cette raison, il était indispensable de définir un indicateur des échanges entre compartiments, indépendamment de la quantification de la diffusion. Le nombre de transition, n_t (voir définition page 94) tient ce rôle. Il permet de rendre compte de la facilité accrue des récepteurs à changer de compartiment suite à l'application de drogues (dans ces travaux, ceci était visible à l'œil).

Ces études qui utilisent pour la première fois ce nouveau paramètre ont alors démontré son efficacité pour quantifier ces changements de compartiment. En effet, ce paramètre, associé à la mesure

[1] La latrunculine A est un composé isolé de l'éponge de mer *Latrunculia magnifica* qui séquestre l'actine en formant des complexes de stoechiométrie 1 :1.

[2] Le nocodazole inhibe la dynamique des microtubules en interagissant avec la β-tubuline

du temps moyen passé aux synapses, a permis de faire le pont entre les propriétés de diffusion et le nombre de récepteur aux synapses.

4.2.2 Résultats

Quantité de RGly et de géphyrine aux synapses

Les résultats obtenus à l'aide d'expériences d'immunocytochimie démontrent que les éléments du cytosquelette contrôlent les quantités de RGly et de géphyrine aux synapses. En effet, après 1h de traitement à la latrunculine et au nocodazole respectivement, la fluorescence associée aux RGly synaptiques ne vaut plus que $\sim$48% et $\sim$58% de la fluorescence mesurée dans les conditions contrôles. Pour le niveau de géphyrine aux synapses, une diminution, moindre mais significative, est également observée ($\sim$59% et $\sim$69%).

Diffusion latérale des RGly

Les expériences en SPT permettent de quantifier les échanges entre compartiments et la diffusion au sein des membranes extrasynaptique et synaptique. La déstabilisation des éléments du cytosquelette augmente les échanges entre les compartiments synaptiques et extrasynaptiques (d'un facteur 2.4 et 2.5 après traitement à la latrunculine et au nocodazole respectivement). Elle diminue le temps moyen passé aux synapses (d'un facteur 4 et 5.4 en présence de latrunculine et de nocodazole respectivement). De plus, suite aux traitements pharmacologiques, les récepteurs diffusent avec des coefficients de diffusion plus élevés et sont confinés (au niveau des synapses) dans des domaines moins restreints. Chaque élément du cytosquelette contrôle différemment des propriétés de diffusion des récepteurs. Celles-ci sont principalement modifiées par la déstabilisation des microtubules au niveau de la membrane extrasynaptique et par la dépolymérisation des filaments d'actine aux synapses.

Lien entre la quantité de RGly aux synapses et les propriétés de diffusion du RGly

En résumé, suite à l'application de drogues déstabilisant les éléments du cytosquelette, on constate d'une part une diminution du nombre de RGly présents aux synapses et d'autre part une augmentation du nombre de transition, une diminution du temps de résidence aux synapses et une augmentation des coefficients de diffusion.

Une étude de l'évolution temporelle des effets de la dépolymérisation du cytosquelette est alors menée pour voir si ces deux types de modifications sont liées. Le nombre de transition et le temps moyen aux synapses sont modifiés dès 4 à 10 minutes après ajout des drogues. La quantité de RGly est significativement modifiée dès 5 minutes après ajout des drogues et atteint son maximum dès 15 minutes de traitement. Ainsi, les modifications des propriétés observés en SPT sur la dynamique du RGly et la diminution de sa quantité aux synapses sont concomitantes. De plus, la diminution de la quantité de géphyrine est observée après celle de la quantité de RGly.

Finalement, tous ces résultats démontrent que la régulation des propriétés de diffusion des récepteurs permet d'agir sur le nombre de récepteurs présents aux synapses. Par exemple, lors de la dépolymérisation de l'actine, on peut proposer l'enchaînement suivant : (1) les récepteurs diffusent plus rapidement et sont moins confinés, (2) le nombre de transitions entre compartiments est alors augmenté, les temps de résidence aux synapses sont diminués, (3) ceci favorise une dispersion des récepteurs dans la membrane extrasynaptique et (4) ainsi le nombre de récepteurs aux synapses est

diminué. De plus, le fait que la quantité de géphyrine aux synapses diminue après le départ des RGly suggère qu'il existe un phénomène de stabilisation réciproque entre les récepteurs et la géphyrine.

Toutefois, le mode d'action des éléments du cytosquelette, c'est à dire par quel(s) processus ils permettent de stabiliser le RGly aux synapses, reste une question ouverte. Plusieurs mécanismes agissant à différents niveaux peuvent être envisagés : via des modifications d'affinité entre les récepteurs et les éléments de l'échafaudage post-synaptique ; via des changements de densité des différents éléments présents dans et sous la membrane post-synaptique ; via les molécules d'adhésion, présentes à la périphérie des synapses et agissant comme des barrières à la diffusion.

4.2.3 Article

8502 • The Journal of Neuroscience, August 16, 2006 • 26(33):8502–8511

Cellular/Molecular

Cytoskeleton Regulation of Glycine Receptor Number at Synapses and Diffusion in the Plasma Membrane

Cécile Charrier,[1] Marie-Virginie Ehrensperger,[2] Maxime Dahan,[2] Sabine Lévi,[1] and Antoine Triller[1]

[1]Laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 789, Ecole Normale Supérieure, 75005 Paris, France, and [2]Laboratoire Kastler Brossel, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8552, Ecole Normale Supérieure and Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

Lateral diffusion of neurotransmitter receptors in and out of synapses has been postulated as a core mechanism for rapid changes in receptor number at synapses during plastic processes. In this study, we have used single particle tracking to investigate how changes in glycine receptor (GlyR) lateral diffusion properties might account for changes in receptor number at synapses after disruption of the cytoskeleton in dissociated spinal cord neurons. We found that pharmacological disruption of F-actin and microtubules decreased the amount of GlyR and gephyrin, the backbone of the inhibitory postsynaptic scaffold, at synapses. F-actin and microtubule disruption increased GlyR exchanges between the synaptic and extrasynaptic membranes and decreased receptor dwell time at synapses. GlyR lateral diffusion was predominantly controlled by microtubules in the extrasynaptic membrane and by actin at synapses. Both diffusion coefficients and confinement at synapses were affected after F-actin disruption. Our results indicate that receptor exchanges between the synaptic and extrasynaptic compartments depend on the properties of both the postsynaptic differentiation and the extrasynaptic membrane. Consequently, GlyR number at synapses may be rapidly modulated by the cytoskeleton through the regulation of lateral diffusion in the plasma membrane and of receptor stabilization at synapses.

Key words: **inhibitory synapses; glycine receptor; lateral diffusion; single particle tracking; cytoskeleton; plasma membrane**

Introduction

The accumulation of neurotransmitter receptors at synaptic sites is thought to result from their interaction with submembrane scaffolding proteins. The number of synaptic receptors is one of the main determinants of synaptic weight, whose fluctuations must be controlled to preserve neuronal homeostasis (Turrigiano and Nelson, 2004). The glycine receptor (GlyR) is the main inhibitory receptor in the spinal cord and controls the excitability of motoneurons. Antisense (Kirsch et al., 1993) and knock-out experiments (Feng et al., 1998) have shown that GlyR accumulation at synapses relies on gephyrin, the core scaffolding protein of inhibitory postsynaptic differentiations (Moss and Smart, 2001). Light has been shed on the mechanisms underlying receptor stabilization at synapses by the observation that, despite the apparent stability of synapses, the various components of the postsynaptic differentiations are constantly renewed over short timescales (Choquet and Triller, 2003). Lateral diffusion of excitatory and inhibitory receptors has been highlighted as a key process in receptor renewal and concentration at synapses by imaging (Dahan et al., 2003; Tardin et al., 2003; Groc et al., 2004) and electrophysiological (Tovar and Westbrook, 2002; Adesnik et al., 2005; Thomas et al., 2005) studies. More specifically, single particle tracking (SPT) experiments have demonstrated that GlyR stabilization by gephyrin clusters is transient (Meier et al., 2001). GlyRs continuously exchange between the synaptic and extrasynaptic membranes, where they respectively diffuse with brownian and confined motion (Dahan et al., 2003). Therefore, the number of receptors at synapses likely depends on both the regulation of diffusion in the plasma membrane and the capacity of synapses to capture receptors.

The cytoskeleton is a good candidate to regulate GlyR lateral dynamics. Previous studies have shown that GlyR and gephyrin postsynaptic levels and cluster size depend on actin and microtubules (Kirsch and Betz, 1995; van Zundert et al., 2004). Moreover, the submembrane skeleton cortex controls the "apparent viscosity" of mammalian plasma membranes (Kusumi et al., 2005). A well accepted hypothesis is that the cytoskeleton cortex hinders protein movements by creating fences below the membrane or by anchoring transmembrane molecules, which then act as obstacles to lateral diffusion (Kusumi and Sako, 1996; Saxton and Jacobson, 1997). In the context of inhibitory synapses, one must stress that many gephyrin partners are cytoskeleton-related proteins. In addition to tubulin (Kirsch et al., 1991), gephyrin interacts with actin-regulating proteins, such as the GDP/GTP exchange factor collybistin (Kins et al., 2000), profilin (Mammoto et al., 1998), and mammalian enabled (Mena)/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) (Giesemann et al., 2003).

In this study, we investigated the implication of the cytoskel-

Received April 25, 2006; revised June 14, 2006; accepted June 15, 2006.

This work was supported by grants from Institut de la Recherche sur la Moelle Epinière and from Association Française contre les Myopathies. C.C. is a recipient of a fellowship from Ministère de la Recherche et de la Technologie, France. We thank B. Riveau for help in cell culture and C. Hanus for helpful discussions.

Correspondence should be addressed to Antoine Triller, Laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 789, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France. E-mail: triller@biologie.ens.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1758-06.2006

Copyright © 2006 Society for Neuroscience 0270-6474/06/268502-10$15.00/0

eton in the regulation of GlyR lateral diffusion in relation to changes in GlyR and gephyrin concentration at synapses. We confirm that pharmacological disruption of either F-actin or microtubules decreases the amounts of GlyR and gephyrin at synapses. Using SPT, we found that cytoskeleton disruption increased GlyR exchanges between the synaptic and extrasynaptic membranes and decreased receptor dwell time at synapses. Lateral diffusion of GlyRs was predominantly controlled by actin inside synapses and by microtubules outside synapses.

Materials and Methods

Cell culture and transfection. Primary cultures of spinal cord neurons were prepared from embryonic Sprague Dawley rats at day 14 as described previously (Levi et al., 1998). Cells were plated at a density of 5×10^4 cells/cm^2 onto 18 mm diameter glass coverslips (Assistent, Winigor, Germany) precoated with 70 μg/ml poly-D,L-ornithine (Sigma, St Louis, MO) and 5% fetal calf serum (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cultures were maintained in serum-free Neurobasal medium supplemented with B27 (1×), glutamine (2 mM), and antibiotics (Invitrogen) at 36°C in a 5% CO_2 atmosphere for 10–12 d. The medium was changed at 7 d *in vitro* (DIV). Transfections were done 8 d after plating using the Lipofectamine 2000 method (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with 2 μg in 20 mm wells of plasmid DNA. The plasmid encoded a gephyrin (Prior et al., 1992) and Venus-yellow fluorescent protein (Nagai et al., 2002) chimera (Hanus et al., 2006). Cells were imaged 48 h after transfection.

Drug treatment. Actin filaments and microtubules were depolymerized using, respectively, latrunculin A (3 μM; Sigma) and nocodazole (10 μM; Sigma) initially solubilized in DMSO (Sigma). The final concentrations of DMSO were 0.2 and 0.03%, respectively, and had no effect on GlyR lateral diffusion (data not shown). For immunochemistry, drugs were added directly to the culture medium for the indicated duration before fixation. For SPT experiments, cells were preincubated for 50 min with drugs added to the culture medium, and then stained for GlyRs (see below) and imaged in the MEM recording medium containing the appropriate drug, except in "time course" experiments in which the drug was added to the MEM recording medium at the beginning of the recording. The MEM recording medium consisted of phenol red-free minimal essential medium supplemented with glucose (33 mM; Sigma) and HEPES (20 mM), glutamine (2 mM), Na-pyruvate (1 mM), and B27 (1×) from Invitrogen. To test the reversibility of the drug treatments, cells were treated for 1 h with latrunculin or nocodazole, washed, and incubated overnight in the conditioned culture medium without drug.

Immunofluorescence labeling of fixed cells. Cells were fixed for 15 min at room temperature in 4% (w/v) paraformaldehyde (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Germany) in PBS, and permeabilized for 4 min with 0.25% (v/v) Triton X-100. They were then incubated for 30 min at 37°C in 10% (w/v) bovine serum albumin (BSA) (Sigma) in PBS to block nonspecific staining and incubated for 1 h at 37°C with primary antibodies in 3% BSA. After washes with PBS, cells were incubated for 45 min at 37°C in secondary antibodies, washed, and mounted on slides with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The primary antibodies used were mouse anti-GlyR α1-subunit (mAb2b; 1.25 μg/ml; Alexis Biochemicals, San Diego, CA), mouse anti-gephyrin (mAb7a; 1.25 μg/ml; Alexis Biochemicals), and rabbit anti-synapsin I (0.2 μg/ml; Chemicon, Hampshire, UK). Secondary antibodies were Cy3-conjugated goat anti-mouse (1.9 μg/ml) and FITC-conjugated goat anti-rabbit (3.75 μg/ml) from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). Sets of neurons compared for quantitation were fixed and labeled simultaneously.

Fluorescence image acquisition and quantitative analysis. The effects of latrunculin and nocodazole on the synaptic levels of GlyR and gephyrin were quantified by double-labeling experiments of GlyR or gephyrin and synapsin I as synaptic marker. Isolated cells immunoreactive to GlyR or gephyrin were randomly chosen. Images were acquired in 12-bit mode with a Micromax CCD camera (Princeton Instruments, Trenton, NJ) under 100× objective lenses of 1.3 numerical aperture (NA) on a Leica (Nussloch, Germany) DRM upright microscope using MetaView (Meta Imaging, Downingtown, PA). Exposure time was determined on bright untreated cells to avoid pixel saturation. All GlyR or gephyrin images from a given culture were then acquired with the same exposure time. Quantitations were performed using MetaMorph (Meta Imaging). Images were first flat field divided to prevent nonuniformity in illumination, the background was subtracted, and the images were then median-filtered (kernel size, $3 \times 3 \times 1$) to enhance cluster outlines. A user-defined intensity threshold was applied to select clusters and avoid their coalescence. Thresholded synapsin clusters were dilated using a circular morphology filter (2 pixel diameter). For fluorescence intensity measurements, cell bodies were centered in a 780×780 pixel field, and only receptor or gephyrin clusters comprising at least 3 pixels and apposed on at least 1 pixel with a synapsin cluster were considered.

GlyR live-cell staining for single particle imaging. Neurons were incubated for 5 min in mAb2b (0.6–1.25 μg/ml), washed, and incubated for 5 min in biotinylated anti-mouse Fab antibody (0.35–2.8 μg/ml; Jackson ImmunoResearch). After washes, cells were incubated for 1 min in streptavidin-coated quantum dots (QDs) emitting at 605 nm (0.2–0.3 nM; Quantum Dot Corporation, Hayward, CA) in borate buffer (50 mM) supplemented with sucrose (200 mM) and extensively washed. After GlyR labeling, active presynaptic terminals were stained for 30 s with *N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-diethylamino)phenyl)-hexatrienyl)pyridinium dibromide (FM4-64) (2 μM; Invitrogen) in the presence of KCl (40 mM) to stimulate vesicular recycling. Cells were then washed extensively. All incubation steps and washes were performed at 37°C in the MEM recording medium.

Single particle imaging. Neurons were imaged in the MEM recording medium at 37°C in an open chamber mounted onto a IX70 inverted microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a 60× objective (NA, 1.45; Olympus). QDs and FM4-64 were detected using an Hg^+ lamp (excitation filter, 525DF45) and appropriate emission filters (605WB20 and 695AF55, respectively; Omega Filters, Brattleboro, VT). QD real-time recordings were acquired with a CCD camera (Micromax 512EBFT; Princeton Instruments) during 512 consecutive frames with an exposure time of 75 ms using MetaView. GlyR labeled with QDs (GlyR-QDs) were recorded on proximal dendrites of isolated cells randomly chosen with transmission illumination. Cells were imaged within 30 min after GlyR staining. Intracellular GlyR staining was not detected during this time period, as checked by acid wash assays on untreated and treated cells (data not shown) or with immunoelectron microscopy (Dahan et al., 2003), indicating no massive internalization of GlyRs.

Single particle tracking and quantitative analysis. In all quantitations, single QDs were identified by their blinking, that is, the random alternation between an emitting state and a nonemitting state (Alivisatos et al., 2005). GlyR-QD location (synaptic, perisynaptic, or extrasynaptic) was determined by comparison with the FM4-64 image, as described by Dahan et al. (2003).

Diffusion coefficients and confinement at synapses. Diffusion coefficients and size of confinement domains were determined from short trajectories (30–150 frames) during which QDs did not blink and remained in the same compartment. Single QD tracking was performed with homemade software (Matlab; The Mathworks, Natick, MA). The center of the spot fluorescence was determined using a Gaussian fit with a spatial resolution of ~10 nm. Values of the mean square displacement (MSD) were calculated from the trajectories applying the relation: $\mathrm{MSD}(ndt) = (N - n)^{-1}\Sigma_{i=1}^{N-n}((x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2)$ (Saxton, 1997), where x_i and y_i are the coordinates of an object on frame i, N is the total number of steps in the trajectory, dt is the time interval between two successive frames, and ndt is the time interval over which displacement is averaged. Diffusion coefficients (D) were calculated by fitting the first five points of the MSD curves versus time (t) with the equation $\mathrm{MSD} = 4Dt$. For synaptic trajectories, the size of the domain of confinement was estimated by fitting the convenient MSD with the expected generic expression for a confined diffusion (Kusumi et al., 1993) as follows:

$$\mathrm{MSD}\ (t) = \frac{L^2}{3}\left(1 - \exp\left(\frac{-12Dt}{L^2}\right)\right)$$

where L is the side of a square domain in which diffusion is supposed to be restricted. We considered that receptors were confined in circular synaptic areas whose diameter d_{conf} was related to L by

$$d_{conf} = (2/\sqrt{\pi})L.$$

Transitions between synaptic and extrasynaptic compartments and dwell time at synapses.

Because of QD blinking, single GlyR-QD trajectories were reconstructed over the recordings using homemade software (Bonneau et al., 2004). To analyze the reconstructed trajectories, the synaptic compartment was extended to the perisynaptic area so that GlyR-QDs could be detected in three states: synaptic (state 1), extrasynaptic (state 0), and nonemitting (state −1). The state of single GlyR-QDs was plotted over time (see also Fig. 6*A*). Then, GlyR-QD location during nonemitting events was approximated as follows. When GlyR-QD was detected in the same compartment before and after the nonemitting event, we considered that GlyR-QD remained in the same compartment and the duration of the nonemitting event was added to the time spent in this compartment. When GlyR-QD was not detected in the same compartment before and after the nonemitting event, we considered that one transition occurred during this time period and the duration of the nonemitting event was equally shared between the two compartments. After this time reallocation, transitions between states 0 and 1 were filtered to avoid overestimating their number. This processing introduced a variation <2.6% in the time spent in each compartment, independently of the pharmacological treatment. The number of transitions was calculated for each recording by dividing the sum of entries and exits of synapses by the number of GlyR-QDs in the field and by the total duration of GlyR-QDs detection. Dwell time at synapses was defined as the duration of detection of GlyR-QDs at synapses on a recording divided by the number of exits from synapses.

Statistical analysis and image preparation. Statistical analyses were done using StatView (Abacus Concepts, Berkeley, CA) on data compiled and analyzed using Microsoft Excel (Microsoft, Les Ulis, France). Images were prepared for printing using Photoshop and Illustrator (Adobe Systems, San Jose, CA).

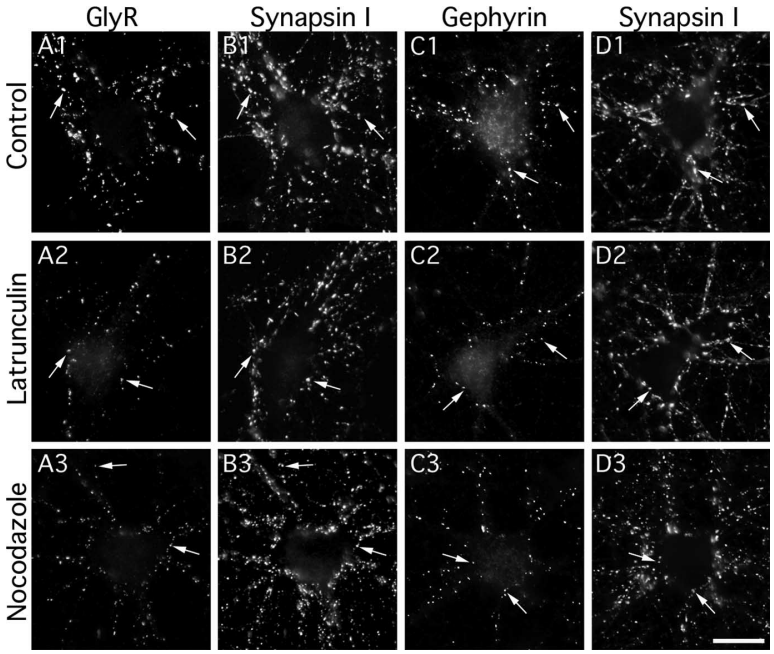

Figure 1. Effects of F-actin and microtubule disruption on GlyR and gephyrin clusters. Double detection of GlyR (***A***) and synapsin (***B***) or gephyrin (***C***) and synapsin (***D***) in cultured spinal cord neurons (10–12 DIV). GlyR (***A1–A3***) and gephyrin (***C1–C3***) formed aggregates (arrows) apposed to presynaptic terminals (***B1–B3*** and ***D1–D3***, respectively) in control conditions (***A1–D1***) or after 1 h treatment with 3 μM latrunculin (***A2–D2***) or 10 μM nocodazole (***A3–D3***). Note that GlyR-, gephyrin-, but not synapsin-associated immunoreactivity decreased in the presence of latrunculin or nocodazole. Scale bar, 20 μm.

Results

The involvement of the cytoskeleton in GlyR lateral dynamics was studied using a pharmacological approach in 10–12 DIV spinal cord neurons. At this age, cultured spinal cord neurons form biochemically "mature" synaptic contacts (Ransom et al., 1977). F-actin and microtubules were disrupted using the depolymerizing agents latrunculin A (Lat) (3 μM) and nocodazole (Nz) (10 μM), respectively. Immunofluorescence experiments were used to establish the efficiency and reversibility of drug application protocols, thus also ensuring their compatibility with neuron survival. We analyzed the GlyR α1-subunit, the predominant adult GlyR α-subunit isoform (Becker et al., 1988).

Cytoskeleton disruption and GlyR and gephyrin levels at synapses

GlyR and gephyrin levels at synapses were quantified using immunocytochemistry on fixed cells. In control conditions, GlyRs (Fig. 1*A1*) and gephyrin (Fig. 1*C1*) formed clusters apposed to presynaptic terminals identified with synapsin I immunofluorescence (Fig. 1*B1*,*D1*, respectively). After 1 h of treatment with latrunculin or nocodazole, GlyR and gephyrin clusters were smaller and less fluorescent, but still apposed to presynaptic terminals (Fig. 1*A2*,*B2*;*A3*,*B3*, respectively, for GlyR; and *C2*,*D2*; *C3*,*D3*, respectively, for gephyrin). Synapsin I immunofluorescence was not modified after latrunculin (Fig. 1*B2*,*D2*) or nocodazole (Fig. 1*B3*,*D3*) treatments, consistent with the notion that maintenance of presynaptic proteins is independent of F-actin and microtubule integrity (Kirsch and Betz, 1995; Allison et al., 1998; Zhang and Benson, 2001; van Zundert et al., 2004). GlyR and gephyrin levels at synapses were quantified by measuring the integrated fluorescence intensity associated with the postsynaptic clusters. After 1 h of latrunculin or nocodazole treatment, GlyR-associated fluorescence at synapses was 48 ± 4 and 58 ± 4%, respectively, of the fluorescence measured in control conditions (Fig. 2*A1*) ($n_{Ctr} = 79$; $n_{Lat} = 48$; $n_{Nz} = 46$; from at least three independent cultures; $p < 10^{-4}$, ANOVA, PLSD test). Gephyrin-associated fluorescence at synapses was 59 ± 3 and 69 ± 3%, respectively, of the fluorescence measured in control conditions after the same treatments (Fig. 2*A2*) ($n_{Ctr} = 63$; $n_{Lat} = 46$; $n_{Nz} = 43$; from at least three independent cultures; $p < 10^{-4}$, ANOVA, PLSD test). In line with previous reports (Kirsch et al., 1995; van Zundert et al., 2004), these results demonstrate that GlyR and gephyrin levels at synapses depend on actin and microtubule cytoskeleton integrity.

We then analyzed the time course of latrunculin- and nocodazole-induced decreases in GlyR- and gephyrin-associated fluorescence at synapses. For normalization, the effect of treatments was expressed as a percentage of the maximal effect, as seen

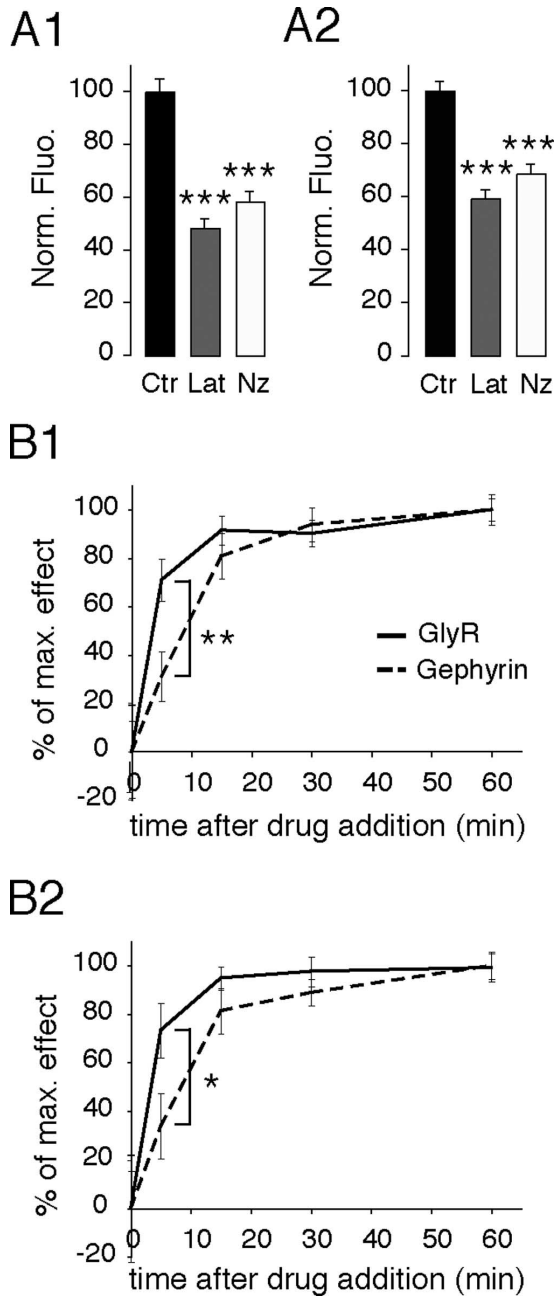

Figure 2. Decrease of GlyR- and gephyrin-associated fluorescence at synapses after F-actin and microtubule disruption. ***A***, Normalized intensity of GlyR- (***A1***) and gephyrin- (***A2***) associated fluorescence at synapses, expressed as percentage of control, in control conditions (Ctr) (black), or after 1 h treatment with Lat (gray) or Nz (white). GlyR- and gephyrin-associated fluorescence significantly decreased in the presence of latrunculin or nocodazole. Values are averages ± SEM. ***$p < 10^{-4}$, ANOVA, PLSD test. ***B***, Time course of latrunculin (***B1***) and nocodazole (***B2***) effects on GlyR (full line) and gephyrin (dashed line) synaptic cluster fluorescence intensity. The effects of latrunculin and nocodazole treatments on GlyR-associated fluorescence precede those on gephyrin. Values (mean ± SEM) are expressed as the percentage of the maximum effect. In all cases, 18–23 cells from two independent cultures were analyzed 0, 5, 15, 30, and 60 min after the addition of the drug. *$p < 5 \times 10^{-2}$, **$p < 10^{-2}$, Mann–Whitney test.

after 1 h of treatment. GlyR- and gephyrin-associated fluorescence decline leveled off ~15 min after the addition of latrunculin or nocodazole (Fig. 2*B1*,*B2*, respectively). This indicates that, between 15 and 60 min of latrunculin and nocodazole treatment, a subpopulation of molecules remains insensitive to actin and microtubule disruption. GlyR-associated fluorescence decreased sharply to 71 and 73% of the maximal effect after only 5 min of treatment with latrunculin or nocodazole (Lat, $p < 10^{-3}$; Nz, $p < 10^{-2}$; Mann–Whitney test) (Fig. 2*B1*,*B2*, respectively). This indicates that cytoskeleton disruption induces rapid variations in GlyR number at synapses. Gephyrin-associated fluorescence decreased to 31 and 34% of the maximal effect after 5 min of the latrunculin and nocodazole treatments, respectively. Therefore, the observed nocodazole and latrunculin effects on gephyrin occurred slower than those seen for GlyR. Indeed, we cannot exclude that this delay was attributable to differences in immunoreactivity, or to limits in the detection of the fluorescence. However, fluorescence was detected using a high dynamic range camera (see Materials and Methods) and the GlyR- and gephyrin-associated fluorescence was far from the background noise of the preparation.

Antibody binding experiments on living cells followed by an acid wash (pH 2; 4 min) indicated that endocytosis was not responsible for the decrease in GlyR-associated fluorescence at synapses (data not shown). In line with previous experiments (Kirsch and Betz, 1995), this favors the notion that GlyRs rapidly spread in the extrasynaptic membrane after cytoskeleton disruption, and suggests that actin and microtubules control the previously demonstrated (Dahan et al., 2003) lateral diffusion of GlyRs in the somatodendritic membrane.

Effects of F-actin and microtubule disruption on GlyR lateral diffusion

Actin and microtubule involvement in GlyR lateral diffusion was analyzed using SPT. Endogenous GlyRs were immunodetected with low concentrations of antibodies using QDs as fluorescent probe. QDs allow the tracking of GlyRs (GlyR-QD) in and out of synapses for long durations with a high precision of localization (≈10 nm) (Dahan et al., 2003). Active presynaptic terminals were stained with FM4-64. GlyRs were tracked in 13 Hz recordings. Single QDs were identified thanks to their blinking (Alivisatos et al., 2005). In control conditions, as seen on a sequence (Fig. 3*A1*–*A3*; supplemental movie 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and better viewed on the projection (Fig. 3*B*), GlyR-QDs displayed various diffusive behaviors. They could be mobile (purple symbols, elongated trajectories on the projection) over extrasynaptic portions of the membrane, or more stable (green symbols, circular trajectories on the projection) at synapses. GlyR-QDs could also exchange between the synaptic and extrasynaptic membranes (not shown in this example) in agreement with previous observations (Dahan et al., 2003). In the presence of latrunculin, GlyR-QDs tended to diffuse over broader areas. GlyR-QDs were more frequently found to exchange between the synaptic and extrasynaptic membranes (Fig. 3*C*,*D*, yellow arrowheads; supplemental movie 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and to swap from one synapse to another (Fig. 3*C*,*D*, yellow arrows). In the presence of nocodazole, receptor diffusion was dramatically increased. Large surface areas of the extrasynaptic membrane were explored during the recording sessions, and GlyR-QDs were frequently seen passing through synapses (Fig. 3*E*,*F*, yellow symbols; supplemental movie 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Stable receptors at synapses

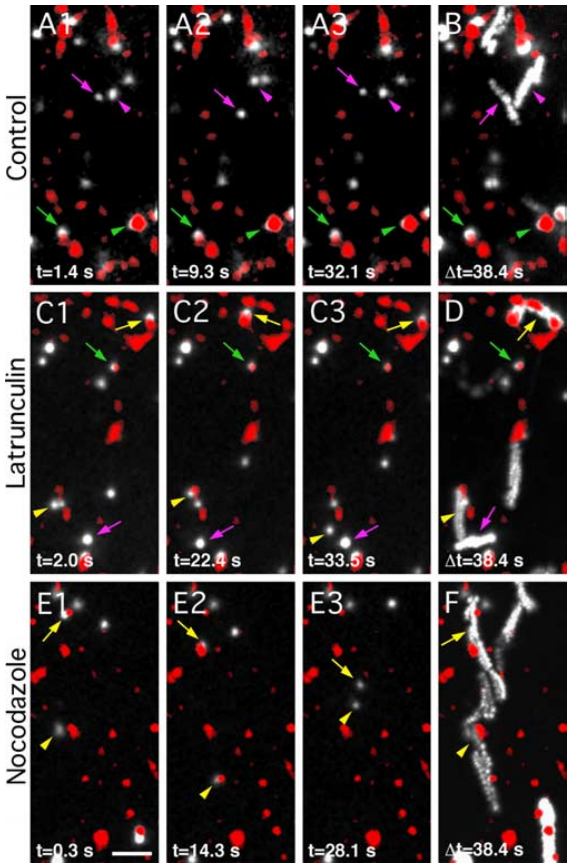

Figure 3. Effects of F-actin or microtubule disruption on GlyR lateral diffusion. Examples of GlyR SPT recordings in cultured spinal cord neurons (10–12 DIV) in control conditions (***A***, ***B***), or after 1 h incubation with latrunculin (***C***, ***D***) or nocodazole (***E***, ***F***). Active presynaptic terminals were labeled with FM4-64 (red). GlyRs were immunodetected with QDs (GlyR-QDs) (white). ***A1–A3***, ***C1–C3***, ***E1–E3***, Sequences of pictures extracted from a recording at the indicated times. ***B***, ***D***, ***F***, Maximum intensity projections emphasizing the surface area explored by GlyR-QDs during a 38.4 s recording sequence. Note the differences in the explored surface area and the transitions between synaptic and extrasynaptic compartments in control, latrunculin, and nocodazole conditions. Symbols: arrows, arrowheads, and crossed arrows are for identified GlyR-QDs; colors: green and purple, synaptic and extrasynaptic GlyR-QDs, respectively; yellow, GlyR-QDs swapping between the synaptic and extrasynaptic compartments. Scale bar, 5 μm.

were rarely found after microtubule disruption. This shows that actin and microtubules control lateral diffusion of GlyRs.

In the presence of latrunculin and nocodazole, GlyR-QDs explored large portions of dendrites. During their journey in the plasma membrane, they passed through different landscapes including surfaces associated with FM4-64 staining. The consequence of the presence of a synaptic bouton on a receptor trajectory was evaluated using diffusion coefficient measurements (Dahan et al., 2003). In the examples illustrated in Figure 4, we have selected trajectories with rapid motions and which were associated only for short periods of time with FM4-64-stained profiles (Fig. 4*A1*, example in the presence of latrunculin; *A2*, example in the presence of nocodazole). The averaged diffusion coefficients of GlyR-QDs were determined over continuous periods, the duration of which corresponded to the presence of a GlyR-QD in the synaptic compartment (i.e., apposed to FM4-64 staining) or out of synapses (i.e., not apposed to FM4-64 staining). In the presence of latrunculin (Fig. 4*B1*) or nocodazole (Fig. 4*B2*), the diffusion coefficients were consistently slower when the GlyR-QDs were associated with labeled synaptic boutons. This supported the notion that, on these trajectories, stretches associated with FM4-64 staining corresponded to passages in the synaptic membrane, and not to diffusion on other bundled dendrites.

We then questioned whether changes in GlyR diffusive behavior at synapses occurred at inhibitory synapses. SPT experiments were performed on neurons transfected with a fluorescent gephyrin chimera. A Venus-tagged gephyrin (Vege) was used to visualize inhibitory postsynaptic structures. As previously demonstrated, almost all endogenous synaptic gephyrin clusters contain the fluorescent chimera 24–48 h after transfection in cultured spinal cord neurons (Hanus et al., 2006). In our experiments, the codetection of FM4-64 and Vege allowed identification of inhibitory synapses. As illustrated in a latrunculin experiment (Fig. 5), GlyR-QDs could exhibit various behaviors. Some GlyR-QDs diffused rapidly through inhibitory synapses and swapped from a synaptic Vege cluster to another one (Fig. 5, GlyR-QD 1). Other GlyR-QDs remained stable at Vege clusters (Fig. 5, GlyR-QD 2) or were mobile in the extrasynaptic membrane (Fig. 5, GlyR-QD 3). GlyR-QDs were also detected at synapses not labeled by a Vege cluster (Fig. 5, GlyR-QDs 1 and 4). These synaptic contacts could (1) be located on dendrites from nontransfected neurons; (2) correspond to excitatory synaptic contacts, which represent 35% of synaptic contacts in comparable cultured spinal cord neurons (Dumoulin et al., 1999); and (3) correspond to inhibitory synapses, which, although on a transfected neuron, were not colonized by the venus::gephyrin chimera. Despite the rapid motion of GlyR-QD 1, the instantaneous diffusion coefficients slowed down during passages through gephyrin clusters at inhibitory synapses (Fig. 5*C*), which is consistent with previous observations (Meier et al., 2001).

Together, these results demonstrate that the rapid diffusion of GlyRs through synapses observed after cytoskeleton disruption occurs at inhibitory synapses.

Effect of cytoskeleton disruption on exchange of GlyRs between the synaptic and extrasynaptic compartments and dwell time at synapses

Although the relationship between receptor lateral diffusion and local concentration at synapses has not been established, it is implicit through the concept of stabilization. Stabilization of receptors at synapses, which is responsible for receptor local concentration, is related to receptor dwell time (that is, to the probability that a receptor leaves a synapse once it has entered it). In this section, we have analyzed the effects of latrunculin and nocodazole treatments on the number of receptor transitions between the synaptic and extrasynaptic compartments and on receptor dwell time at synapses. Quantification of these parameters required the determination of GlyR-QD location throughout the recording despite QD blinking. After reconstruction of the trajectories, we plotted the state of each GlyR-QD (synaptic, 1; extrasynaptic, 0; blink, −1) as a function of time (Fig. 6*A1*). We then approximated the behavior of the GlyR-QDs during the blinking events. Because transitions between the synaptic and extrasynaptic compartments were not frequent in control recording sessions, we considered that there was either one transition (Fig. 6*A*, purple stars) or none (Fig. 6*A*, black stars) between the synaptic and extrasynaptic compartments depending on GlyR-QD location before and after a blinking event, and time was then reallocated to each compartment (see Materials and Meth-

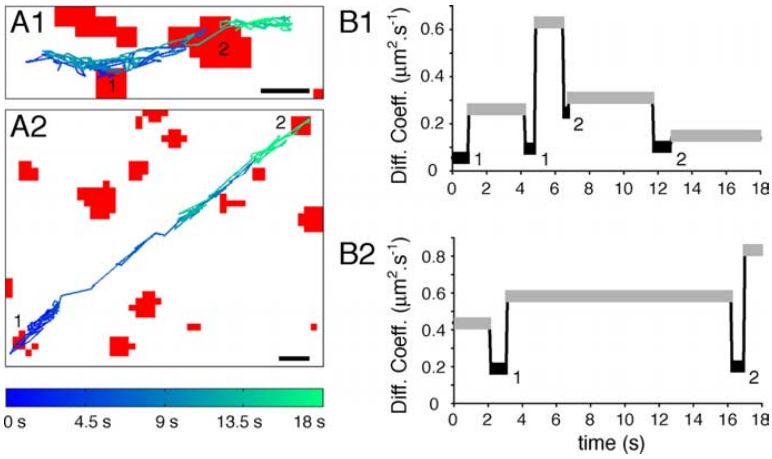

Figure 4. Decrease in GlyR diffusion coefficients at synapses independently of cytoskeleton-disrupting treatments. ***A***, Reconstruction of 18 s GlyR-QD mass center trajectory over the FM4-64-stained synapses (red) images after 1 h treatment with latrunculin (***A1***) or nocodazole (***A2***). Scale bars, 1 μm. ***B***, Comparison of diffusion coefficients averaged during extrasynaptic (gray) and synaptic (black) sequences from the trajectory illustrated in ***A*** in latrunculin (***B1***) or nocodazole (***B2***) condition. Numbers correspond to synapses in ***A***. Note that, despite the latrunculin- and nocodazole-induced increase in GlyR lateral mobility, receptors are consistently slowed down at synapses.

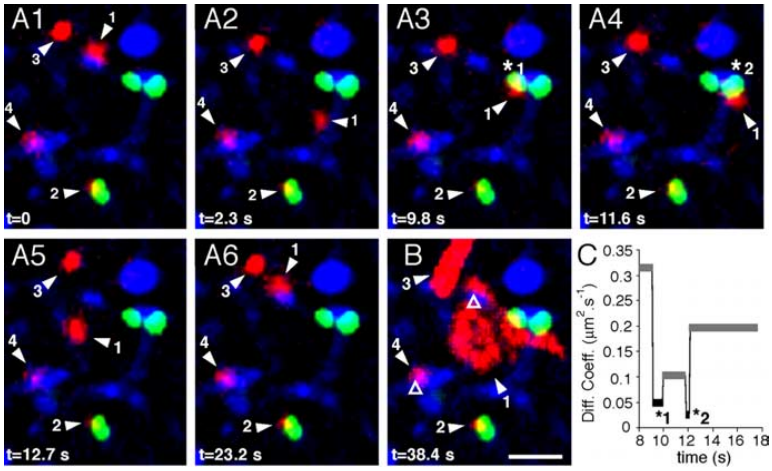

Figure 5. GlyR lateral diffusion at inhibitory synapses. Example of a recording session of GlyR-QDs on neurons transfected with Vege chimera in the presence of latrunculin. Blue, FM4-64-stained synapses; red, GlyR-QDs; green, Vege-containing inhibitory postsynaptic microdomains. ***A1–A6***, Sequence of pictures extracted from a 38.4 s recording session at the indicated times. ***B***, Maximum intensity projection showing the surface area explored by GlyR-QDs during the recording session. Various diffusive behaviors are found in this field. GlyR-QD 1 swaps between a Vege-devoid synapse (***B***, open triangle) and Vege-containing synapses (***A3***, star 1; ***A4***, star 2). GlyR-QD 2 remains at the same Vege cluster. GlyR-QD 3 and 4 are mobile in the extrasynaptic membrane and stable at a Vege-devoid synapse (***B***, open triangle), respectively. Scale bar, 2 μm. ***C***, Averaged diffusion coefficients of GlyR-QD 1 during extrasynaptic (gray) and synaptic (black) sequences.

ods). GlyR-QDs could then be classified in two states: extrasynaptic, 0; or synaptic, 1 (Fig. 6*A2*). Subsequently, the location of GlyR-QDs as a function of time was filtered (Fig. 6*A3*) to avoid an overestimation of the exchanges between the compartments (Fig. 6*A*, red circles). Overestimation may result from the lower resolution of FM4-64 fluorescence detection (pixel edges) compared with the pointing accuracy of QDs (≈10 nm, independent of pixel size) (see Materials and Methods), which creates a background of false transitions. The location of GlyR-QDs along the trajectory (Fig. 6*A4*) was determined at the end of this processing.

After 1 h of treatment with latrunculin or nocodazole, the number of transitions between the synaptic and extrasynaptic compartments was 2.4 and 2.5 times higher than in control conditions, respectively (Fig. 6*B*) ($n_{\text{recordingCtr}} = 10$; $n_{\text{recordingLat}} = 12$; $n_{\text{recordingNz}} = 8$; 13 ± 1 GlyR-QDs by recording; Lat, $p < 0.01$; Nz, $p < 0.05$; Mann–Whitney test). The increase in transition number was associated with a 4- and 5.4-fold decrease in the mean dwell time of GlyRs at synapses in the presence of latrunculin and nocodazole, respectively (Fig. 6*C*) (Lat, $p < 0.05$; Nz, $p < 0.05$; Mann–Whitney test). Because no change in FM4-64 staining was noted, which is consistent with the independence of F-actin of synaptic vesicle clusters (Sankaranarayanan et al., 2003), these effects were not attributable to changes in the number of synapses. Our results establish that actin and microtubules control GlyR exchanges between the synaptic and extrasynaptic compartments and GlyR dwell times at synapses.

We then compared the time course of latrunculin and nocodazole effects on GlyR diffusion with those seen in immunofluorescence. The maximum effect on the transitions between the compartments and dwell time at synapses was reached 4–10 min after the addition of the drugs (Fig. 6*D*). These effects on GlyR lateral dynamics were concomitant with those seen for GlyR cluster-associated fluorescence at synapses, which was already significantly decreased 5 min after the addition of the drugs (Fig. 2*B1*). Our data correlate the regulation of receptor number at synapses with receptor flux and dwell time at synapses.

Distinct effects of F-actin and mictrotubule disruption on GlyR diffusion coefficients and confinement at synapses

We then analyzed the effects of latrunculin and nocodazole treatments on GlyR diffusive behavior. We plotted the MSD as a function of time, which provides information on diffusive behavior (brownian, directed, or confined) and diffusion coefficients (references in Saxton and Jacobson, 1997). Diffusion coefficients and confinement were calculated from parts of trajectories (30–150 frames) during which QDs remained in the same compartment and did not blink. For the analyses of diffusion coefficients, because of the large dispersal of the values (over four orders of magnitude), we compared the distributions rather than the mean values.

GlyRs were tracked in Vege-transfected neurons at identified inhibitory synapses (FM staining apposed and Vege-containing

areas) (Fig. 5) and in nontransfected neurons in the synaptic and extrasynaptic compartments. The MSD versus time curves of GlyR-QDs tracked at identified inhibitory contacts in transfected neurons and at unidentified synapses in nontransfected neurons were superimposable (Fig. 7*A*). The mean diameter of the domain of confinement (d_{conf}) (Fig. 7*B*) and the diffusion coefficients (D) (Fig. 7*C1*) at FM-stained synapses in nontransfected neurons did not differ from what was found at inhibitory synapses in Vege-transfected neurons (nontransfected neurons: $n = 90$, $D_{median} = 0.001\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$, $d_{conf} = 166 \pm 19$ nm; Vege-transfected neurons: $n = 33$, $D_{median} = 0.001\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$, $d_{conf} = 159 \pm 35$ nm). These results support the notion that GlyRs tracked at FM4-64-stained synapses were mainly located at inhibitory synapses. This is consistent with (1) the predominance of inhibitory contacts on spinal cord neurons (Dumoulin et al., 1999) and (2) the low probability of finding GlyRs at excitatory synapses where they are not accumulated (Dumoulin et al., 2000).

Pharmacological experiments were performed on nontransfected neurons. At synapses, latrunculin induced a marked change in GlyR diffusive behavior, as illustrated by the average MSD versus time curves (Fig. 7*A*). Latrunculin treatment induced a large decrease in the confinement corresponding to an increase in the explored surface area. The mean diameter of the domain of confinement increased from 166 ± 19 to 305 ± 24 nm (Fig. 7*B*). This was consistently accompanied by an increase in the diffusion coefficients, which was reflected by a 10-fold increase in the median diffusion coefficient (Fig. 7*C1*) (control: $D_{median} = 0.001\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$; Lat: $D_{median} = 0.01\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$, $n = 173$; $p < 10^{-4}$, Kolmogorov–Smirnov test). It is noticeable that diffusion coefficients $<10^{-3}\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$ were not concerned in this increase. The latrunculin-resistant GlyR-QDs may correspond to the pool of GlyRs whose associated fluorescence was not affected with the same treatments (Fig. 2*A1*,*B1*). This strong effect seen on the more rapid GlyR-QDs was reversed on removal of the drug ($D_{median} = 0.002\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$) (supplemental Fig. 1*A1*, available at www.jneurosci.org as supplemental material). The nocodazole treatment affected neither the confinement (Fig. 7*B*) ($d_{conf} = 227 \pm 19$ nm) nor the diffusion coefficients (Fig. 7*C1*) ($D_{median} = 0.002\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$; $n = 51$) at synapses. This absence of effects of nocodazole contrasts with the observed rapid passages of GlyR-QDs through synapses. It may be attributable to our analyses of diffusion at synapses in which short trajectories (< to 30 frames) were excluded because they do not allow reliable analyses of the MSD. In the extrasynaptic membrane (Fig. 7*C2*), latrunculin also shifted the distribution of diffusion coefficients but to a lesser extent than what was seen at synapses (control: $D_{median} = 0.007\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$; Lat: $D_{median} = 0.02\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$). In contrast, nocodazole induced a pronounced increase in diffusion coefficients: the median diffusion coefficient reached 0.1 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$, which was 14 times faster than in control conditions (Fig. 7*C2*) (control: $n_{Ctr} = 231$; Lat: $n_{Lat} = 476$, $p < 10^{-4}$; Nz: $n_{Nz} = 268$; $p < 10^{-4}$, Kolmogorov–Smirnov test). These effects were also reversed on drug removal (Lat: $D_{median} = 0.007\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$; Nz: $D_{median} = 0.004\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$) (supplemental Fig. 1*A2*,*B*, respectively, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Our results indicate that actin and microtubules contribute differently to the control of GlyR diffusion. Actin mainly controls GlyR diffusion at synapses, whereas microtubules mainly control GlyR diffusion out of synapses.

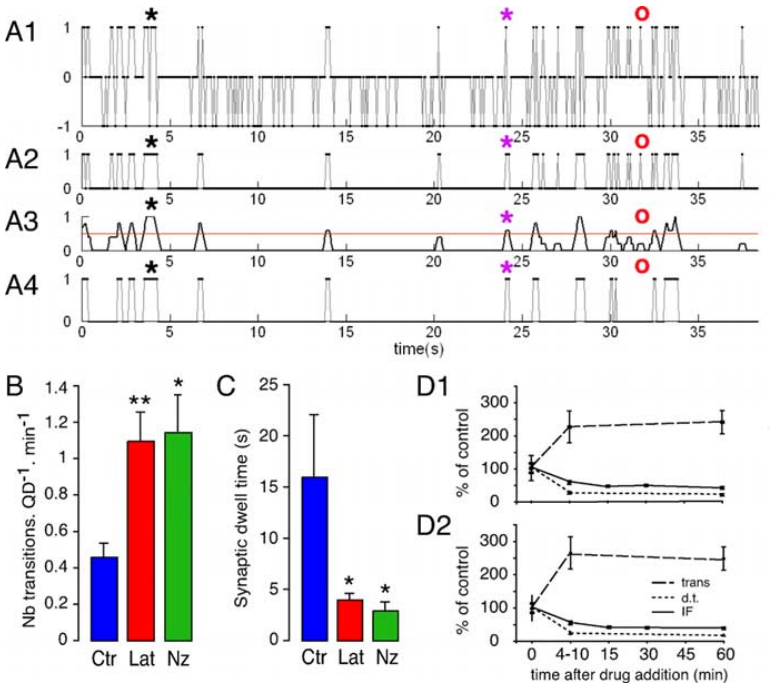

Figure 6. Effects of latrunculin and nocodazole on transitions between the compartments and dwell times at synapses. ***A***, Processing of single GlyR-QD reconstructed trajectories: example in latrunculin conditions. *x*-axis, Recording time (in seconds). *y*-axis, QD state: 1, synaptic; 0, extrasynaptic; −1, nonemitting. ***A1***, State of the GlyR-QD plotted as a function of time from a 13 Hz recording. ***A2***, State of the GlyR-QD after blink removal and time reallocation. ***A3***, Filtering of GlyR-QD transitions between the synaptic and extrasynaptic locations. The red line ($y = 0.5$) corresponds to the criteria chosen to remove artificial transitions attributable to pixelization of the FM image. ***A4***, Resulting location of the GlyR-QD. The black and purple stars indicate nonemitting events in which zero or one transition is estimated, respectively. The red circles indicate an example in which filtering attenuates the number transitions. The dwell times and number of transitions are determined after this processing. ***B***, Increased number of transitions between the synaptic and extrasynaptic compartments after Lat (red) and Nz (green) treatments compared with control conditions (Ctr) (blue). ***C***, Decreased dwell time at synapses after latrunculin and nocodazole treatment. ***D***, Latrunculin (***D1***) and nocodazole (***D2***) effects on transitions between the synaptic and extrasynaptic compartments (trans) (dashed line) and dwell time at synapses (d.t.) (dotted line) compared with fluorescence intensity of GlyR synaptic clusters (IF) (full line). The intermediate time for transitions and dwell time at synapses corresponds to the average of 9 recordings in latrunculin and 12 in nocodazole conditions acquired 4–10 min after the addition of the drug. Note that drug effects on single GlyR-QD dynamics and GlyR synaptic levels are rapid and concomitant. All data are from two independent cultures. Values are mean ± SEM. Statistical analyses: $*p < 5 \times 10^{-2}$, $**p < 10^{-2}$, $***p < 10^{-3}$; dwell times and transitions: Mann–Whitney test; fluorescence intensity: ANOVA, PLSD test.

Discussion

We have characterized the involvement of the cytoskeleton in the control of GlyR lateral diffusion. Using SPT, we found that actin and microtubules predominantly reduce diffusion in the synaptic and extrasynaptic compartments, respectively. Moreover, disruption of actin and microtubules increased GlyR exchanges between the syn-

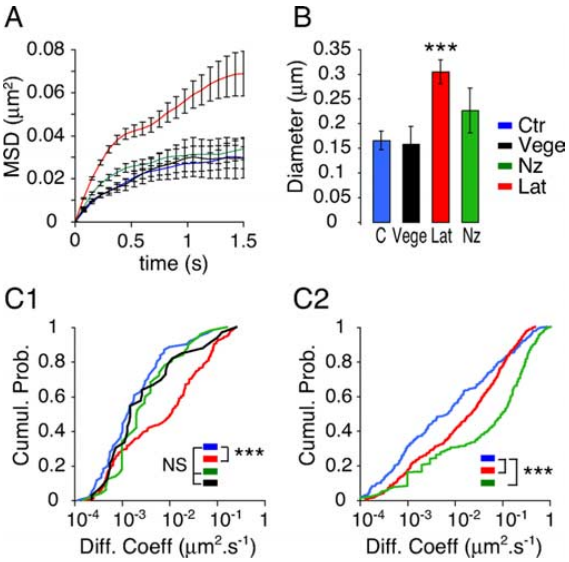

Figure 7. Distinct effects of latrunculin and nocodazole on GlyR diffusion coefficients and confinement at synapses. ***A***, Averaged MSD as a function of time of GlyR-QDs at synapses in control (Ctr) (blue), Lat (red), or Nz (green) conditions. The black curve corresponds to GlyR-QDs tracked on neurons transfected with Vege chimera at identified inhibitory synapses. Values are mean ± SEM. ***B***, Size of the domain of confinement at synapses (mean ± SEM). Latrunculin but not nocodazole treatment decreased the confinement. ***$p < 10^{-3}$, ANOVA, PLSD test. ***C***, Cumulative probabilities of GlyR-QD diffusion coefficients when tracked in the synaptic (***C1***) or extrasynaptic membrane (***C2***). Latrunculin and nocodazole treatments have the greatest effects in the synaptic and extrasynaptic compartments, respectively. Note the similarity between GlyR-QD diffusive behavior at FM4-64-stained synapses in nontransfected neurons (blue) and at inhibitory synapses in Vege-transfected neurons (black). Five, three, and two independent cultures were analyzed for untreated cells, drug-treated cells, and Vege-transfected cells, respectively. ***$p < 10^{-3}$; NS, not significant, Kolmogorov–Smirnov test.

aptic and extrasynaptic compartments and decreased receptor dwell time at synapses. These changes in GlyR diffusion were concomitant with a decrease in GlyR number at synapses, which was associated with lower gephyrin levels at synapses.

Control of lateral diffusion in the plasma membrane

SPT allows investigation of plasma membrane organization. Most SPT studies have been performed in non-neuronal cells. They have led to the model in which lateral diffusion is constrained by the submembrane skeleton that creates "fences" and anchors "transmembrane protein pickets" (references in Kusumi et al., 2005). However, little is known about the organization of the submembrane cytoskeleton in neurons. Here, we found that actin controls diffusion at synapses, whereas both actin and microtubules control diffusion in the extrasynaptic membrane. This is consistent with an early ultrastructural study by Gulley and Reese (1981), which reports that microfilaments belong to a large cortical meshwork and are concentrated beneath excitatory and inhibitory postsynaptic membranes, just below the postsynaptic scaffold. Microtubules are often enmeshed within the microfilaments but not specifically concentrated at postsynaptic sites. Direct contacts between the cytoskeleton and the plasma membrane were observed at extrasynaptic locations (Gulley and Reese, 1981). Moreover, the major effect of nocodazole on GlyR lateral diffusion in the extrasynaptic compartment supports the idea that the submembrane microtubule network is crucial in the control of the "apparent viscosity" of the neuronal membrane and might be quite dynamic, as seen in polarized epithelial cells (Reilein and Nelson, 2005).

We observed that the increase in GlyR diffusion after cytoskeleton disruption was associated with an increase in the exchanges between the synaptic and extrasynaptic compartments. Increased GlyR mobility in the extrasynaptic membrane raises the probability of entering a synapse, whereas increased GlyR mobility inside synapses raises the probability of exiting from a synapse. Interestingly, increased neuronal activation accelerates the lateral mobility of AMPA receptors in the extrasynaptic membrane (Groc et al., 2004), whereas a protocol of chemical long-term depression, known to reduce synaptic receptor number, leads to increased diffusion of AMPA receptors inside synapses (Tardin et al., 2003). Thus, modulation of the "apparent viscosity" of the membrane because of rapid remodeling of the submembrane skeleton could be a way to control the "influx" and "efflux" of receptors at synapses.

Cytoskeleton and receptor stabilization at synapses

Receptor stabilization at synapses is crucial in determining the equilibrium between the pools of synaptic and extrasynaptic receptors. Actin and microtubules can regulate GlyR stabilization at synapses at many levels and by distinct mechanisms. This regulation involves (1) the avidity of the postsynaptic scaffold for receptors; (2) molecule crowding that relies on the density of receptors, which act as pickets in the synapses, and on the submembrane accumulation of proteins, which exert a global corralling effect on receptors; and likely (3) adhesion molecules, which create permeable barriers at the edge of excitatory and inhibitory synapses (Triller and Choquet, 2003) and depend on both actin (Juliano, 2002; Yamagata et al., 2003; Bamji, 2005) and microtubules (Barth et al., 1997; Schoenwaelder and Burridge, 1999). Disruption of F-actin and microtubules leads to comparable decreases in both GlyR levels and dwell time at synapses. However, the two types of disruption affect GlyR diffusion at synapses differently. F-actin disruption increased GlyR diffusion coefficients inside synapses and the mean diameter of the domain of confinement to 305 ± 24 nm, a size comparable with that of inhibitory postsynaptic differentiations (Colin et al., 1998). In contrast, after microtubule disruption, despite short and rapid passages of GlyR-QDs through synapses, there were no significant changes in GlyR diffusion at synapses. Furthermore, differences in receptor mobility at synapses were observed with latrunculin and nocodazole treatments, despite similar amounts of gephyrin. Nonetheless, these treatments have different effects on gephyrin cluster dynamics (Hanus et al., 2006). This suggests that gephyrin cluster dynamics contribute to the avidity of the postsynaptic scaffold for receptors, in addition to the number of binding sites available for receptors.

Importantly, we found a pool of GlyRs resistant to the disruption of the cytoskeleton in both immunofluorescence and SPT experiments. In SPT, this pool corresponded to the slowest synaptic receptors (diffusion coefficients $<10^{-3}\ \mu m^2 \cdot s^{-1}$) and represented ~30% of the receptors tracked at synapses. This suggests that the stabilization of a population of very slow synaptic GlyRs is strong and insensitive to cytoskeleton disruption. This population might be important, in situations of important plastic or pathologic cytoskeleton remodeling, in limiting fluctuations in synaptic receptor number, and in stabilizing the synapse with a basal level of neurotransmission.

Receptor lateral diffusion and receptor level at synapses

Receptor number at synapses is one of the main determinants of synaptic strength and undergoes fluctuations in the most common forms of synaptic plasticity. We found here that the maintenance of GlyR and gephyrin levels at synapses is controlled by actin and microtubules. This is consistent with the direct interaction of gephyrin with polymerized tubulin (Kirsch et al., 1991) and actin-regulating proteins (Mammoto et al., 1998; Kins et al., 2000; Giesemann et al., 2003). It is also compatible with previous studies indicating that F-actin disruption decreases the size of gephyrin clusters (Kirsch and Betz, 1995), and that microtubule disruption generates a loss of gephyrin and the lateral spread of GlyRs from synapses in spinal cord neurons (Kirsch and Betz, 1995; van Zundert et al., 2004). Our quantitative analyses revealed that, during cytoskeleton depolymerization, GlyR-associated fluorescence diminished within a few minutes and before gephyrin-associated fluorescence. This suggests that GlyRs leave synapses before the disruption of the gephyrin-based subsynaptic scaffold and that a cytoskeleton-dependent process modulates within minutes the time it takes for a receptor to exit a synapse. These data support the notion that, whereas the accumulation of inhibitory receptors at synapses relies on gephyrin (Kirsch et al., 1993; Essrich et al., 1998; Feng et al., 1998; Kneussel et al., 1999; Levi et al., 2004; Jacob et al., 2005), receptors may also help stabilize the cytoplasmic protein gephyrin below the subsynaptic membrane. This is compatible with the notion that, independently of the local turnover of the constitutive elements of the synapse, reciprocal interactions within the postsynaptic differentiation are crucial for the stability of a synaptic contact. Furthermore, the decrease in GlyR level at synapses was concomitant with a decrease in receptor dwell time at synapses and with an increase in receptor exchanges between the synaptic and extrasynaptic compartments. This suggests that, whereas long-term regulations of synaptic strength are coupled to global remodeling of the postsynaptic scaffold (McGee and Bredt, 2003; Collingridge et al., 2004; Perez-Otano and Ehlers, 2005), changes in receptor number at synapses on short timescales can result from changes in receptor flux at synapses.

Excitatory neurotransmission has been shown to regulate inhibitory neurotransmission, gephyrin cluster size and dynamics (Gonzalez-Forero et al., 2005; Hanus et al., 2006), and, through an action on the cytoskeleton, diffusion in the plasma membrane (Richards et al., 2004). At the cellular level, cytoskeleton-regulating proteins, such as profilin, Mena/VASP, or GDP/GTP exchange factors, which also regulate microtubules dynamics (Gundersen et al., 2004), are components of both inhibitory (Kins et al., 2000; Giesemann et al., 2003) and excitatory (Dillon and Goda, 2005) postsynaptic differentiations and ubiquitous components of the submembrane cytoskeleton cortex. Some of these proteins are regulated by synaptic activity (Ackermann and Matus, 2003; Lamprecht and LeDoux, 2004; Oertner and Matus, 2005) and may be involved in the activity-dependent regulations of actin dynamics (Star et al., 2002; Oertner and Matus, 2005), which differ between dendritic spines and the dendritic shaft during synaptic plasticity (Furuyashiki et al., 2002). Thus, depending on the extracellular cues, the submembrane cytoskeleton might be regulated (1) globally in the extrasynaptic compartment, leading to changes in receptor influx at synapses, and/or (2) locally at synapses, with consequences for postsynaptic differentiation properties and thereby for receptor stabilization.

In conclusion, our data demonstrate that GlyR exchanges between the synaptic and extrasynaptic membranes and GlyR stabilization at synapses can be regulated in response to actin or microtubule cytoskeleton remodeling, and can change receptor number at synapses. Modulations of the submembrane cytoskeleton, in relation to synaptic activity, may have various consequences for the dynamics of the receptor/scaffold complexes. Considering the synapse as a self-organized structure, whose plasticity relies on the transient nature of the interactions among its components (Misteli, 2001), it will be important to characterize the collective dynamics of receptor and scaffolding molecules and how they are regulated.

References

Ackermann M, Matus A (2003) Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. Nat Neurosci 6:1194–1200.

Adesnik H, Nicoll RA, England PM (2005) Photoinactivation of native AMPA receptors reveals their real-time trafficking. Neuron 48:977–985.

Alivisatos AP, Gu W, Larabell C (2005) Quantum dots as cellular probes. Annu Rev Biomed Eng 7:55–76.

Allison DW, Gelfand VI, Spector I, Craig AM (1998) Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. J Neurosci 18:2423–2436.

Bamji SX (2005) Cadherins: actin with the cytoskeleton to form synapses. Neuron 47:175–178.

Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ (1997) Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. Curr Opin Cell Biol 9:683–690.

Becker CM, Hoch W, Betz H (1988) Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. EMBO J 7:3717–3726.

Bonneau S, Cohen L, Dahan M (2004) A multiple target approach for single quantum dot tracking. Proceeding of the IEEE International Symposium on Biological Imaging, Arlington, VA, April.

Choquet D, Triller A (2003) The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. Nat Rev Neurosci 4:251–265.

Colin I, Rostaing P, Augustin A, Triller A (1998) Localization of components of glycinergic synapses during rat spinal cord development. J Comp Neurol 398:359–372.

Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT (2004) Receptor trafficking and synaptic plasticity. Nat Rev Neurosci 5:952–962.

Dahan M, Levi S, Luccardini C, Rostaing P, Riveau B, Triller A (2003) Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. Science 302:442–445.

Dillon C, Goda Y (2005) The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. Annu Rev Neurosci 28:25–55.

Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Levi S, Isambert MF, Henry JP, Triller A, Gasnier B (1999) Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. J Cell Sci 112:811–823.

Dumoulin A, Levi S, Riveau B, Gasnier B, Triller A (2000) Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. Eur J Neurosci 12:3883–3892.

Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B (1998) Postsynaptic clustering of major $GABA_A$ receptor subtypes requires the $\gamma 2$ subunit and gephyrin. Nat Neurosci 1:563–571.

Feng G, Tintrup H, Kirsch J, Nichol MC, Kuhse J, Betz H, Sanes JR (1998) Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. Science 282:1321–1324.

Furuyashiki T, Arakawa Y, Takemoto-Kimura S, Bito H, Narumiya S (2002) Multiple spatiotemporal modes of actin reorganization by NMDA receptors and voltage-gated Ca^{2+} channels. Proc Natl Acad Sci USA 99:14458–14463.

Giesemann T, Schwarz G, Nawrotzki R, Berhorster K, Rothkegel M, Schluter K, Schrader N, Schindelin H, Mendel RR, Kirsch J, Jockusch BM (2003) Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. J Neurosci 23:8330–8339.

Gonzalez-Forero D, Pastor AM, Geiman EJ, Benitez-Temino B, Alvarez FJ (2005) Regulation of gephyrin cluster size and inhibitory synaptic currents on Renshaw cells by motor axon excitatory inputs. J Neurosci 25:417–429.

Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D

(2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. Nat Neurosci 7:695–696.
Gulley RL, Reese TS (1981) Cytoskeletal organization at the postsynaptic complex. J Cell Biol 91:298–302.
Gundersen GG, Gomes ER, Wen Y (2004) Cortical control of microtubule stability and polarization. Curr Opin Cell Biol 16:106–112.
Hanus C, Ehrensperger MV, Triller A (2006) Activity-dependent movements of postsynaptic scaffolds at inhibitory synapses. J Neurosci 26:4586–4595.
Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, Saliba RS, Kittler JT, Haydon PG, Moss SJ (2005) Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic $GABA_A$ receptors. J Neurosci 25:10469–10478.
Juliano RL (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. Annu Rev Pharmacol Toxicol 42:283–323.
Kins S, Betz H, Kirsch J (2000) Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. Nat Neurosci 3:22–29.
Kirsch J, Betz H (1995) The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. J Neurosci 15:4148–4156.
Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H (1991) The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. J Biol Chem 266:22242–22245.
Kirsch J, Wolters I, Triller A, Betz H (1993) Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. Nature 366:745–748.
Kneussel M, Hermann A, Kirsch J, Betz H (1999) Hydrophobic interactions mediate binding of the glycine receptor β-subunit to gephyrin. J Neurochem 72:1323–1326.
Kusumi A, Sako Y (1996) Cell surface organization by the membrane skeleton. Curr Opin Cell Biol 8:566–574.
Kusumi A, Sako Y, Yamamoto M (1993) Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. Biophys J 65:2021–2040.
Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, Kasai RS, Kondo J, Fujiwara T (2005) 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. Annu Rev Biophys Biomol Struct 34:351–378.
Lamprecht R, LeDoux J (2004) Structural plasticity and memory. Nat Rev Neurosci 5:45–54.
Levi S, Vannier C, Triller A (1998) Strychnine-sensitive stabilization of postsynaptic glycine receptor clusters. J Cell Sci 111:335–345.
Levi S, Logan SM, Tovar KR, Craig AM (2004) Gephyrin is critical for glycine receptor clustering but not for the formation of functional GABAergic synapses in hippocampal neurons. J Neurosci 24:207–217.
Mammoto A, Sasaki T, Asakura T, Hotta I, Imamura H, Takahashi K, Matsuura Y, Shirao T, Takai Y (1998) Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. Biochem Biophys Res Commun 243:86–89.
McGee AW, Bredt DS (2003) Assembly and plasticity of the glutamatergic postsynaptic specialization. Curr Opin Neurobiol 13:111–118.
Meier J, Vannier C, Serge A, Triller A, Choquet D (2001) Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. Nat Neurosci 4:253–260.
Misteli T (2001) The concept of self-organization in cellular architecture. J Cell Biol 155:181–185.
Moss SJ, Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. Nat Rev Neurosci 2:240–250.
Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. Nat Biotechnol 20:87–90.
Oertner TG, Matus A (2005) Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. Cell Calcium 37:477–482.
Perez-Otano I, Ehlers MD (2005) Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. Trends Neurosci 28:229–238.
Prior P, Schmitt B, Grenningloh G, Pribilla I, Multhaup G, Beyreuther K, Maulet Y, Werner P, Langosch D, Kirsch J, Betz H (1992) Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. Neuron 8:1161–1170.
Ransom BR, Christian CN, Bullock PN, Nelson PG (1977) Mouse spinal cord in cell culture. II. Synaptic activity and circuit behavior. J Neurophysiol 40:1151–1162.
Reilein A, Nelson WJ (2005) APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks. Nat Cell Biol 7:463–473.
Richards DA, De Paola V, Caroni P, Gahwiler BH, McKinney RA (2004) AMPA-receptor activation regulates the diffusion of a membrane marker in parallel with dendritic spine motility in the mouse hippocampus. J Physiol (Lond) 558:503–512.
Sankaranarayanan S, Atluri PP, Ryan TA (2003) Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. Nat Neurosci 6:127–135.
Saxton MJ (1997) Single-particle tracking: the distribution of diffusion coefficients. Biophys J 72:1744–1753.
Saxton MJ, Jacobson K (1997) Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. Annu Rev Biophys Biomol Struct 26:373–399.
Schoenwaelder SM, Burridge K (1999) Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. Curr Opin Cell Biol 11:274–286.
Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. Nat Neurosci 5:239–246.
Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D (2003) Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. EMBO J 22:4656–4665.
Thomas P, Mortensen M, Hosie AM, Smart TG (2005) Dynamic mobility of functional $GABA_A$ receptors at inhibitory synapses. Nat Neurosci 8:889–897.
Tovar KR, Westbrook GL (2002) Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. Neuron 34:255–264.
Triller A, Choquet D (2003) Synaptic structure and diffusion dynamics of synaptic receptors. Biol Cell 95:465–476.
Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. Nat Rev Neurosci 5:97–107.
van Zundert B, Alvarez FJ, Tapia JC, Yeh HH, Diaz E, Aguayo LG (2004) Developmental-dependent action of microtubule depolymerization on the function and structure of synaptic glycine receptor clusters in spinal neurons. J Neurophysiol 91:1036–1049.
Yamagata M, Sanes JR, Weiner JA (2003) Synaptic adhesion molecules. Curr Opin Cell Biol 15:621–632.
Zhang W, Benson DL (2001) Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. J Neurosci 21:5169–5181.

Chapitre 5

Étude *in situ* de l'interaction RGly-géphyrine

Sommaire

5.1 Introduction **118**

5.2 Systèmes modèles **118**

5.2.1 Transfection du RGly et de la géphyrine 119

5.2.1.1 Des récepteurs capables ou non d'interagir avec la géphyrine 119

5.2.1.2 Géphyrine : forme standard fluorescente et variant 120

5.2.2 Cellules HeLa et neurones jeunes 120

5.2.3 Distributions cellulaires caractéristiques 121

5.3 Influence de l'interaction RGly-géphyrine sur la dynamique du RGLy . . **123**

5.3.1 Stabilisation du RGly aux synapses par la géphyrine 124

5.3.1.1 RGly $\alpha_1\beta$gb intra- et extra-agrégats de géphyrine 124

5.3.1.2 Comparaison avec les RGly synaptiques et extrasynaptiques 124

5.3.1.3 Comparaison cellules HeLa - Neurones jeunes 126

5.3.2 Influence de la géphyrine, hors agrégats, sur la dynamique du RGly 127

5.3.2.1 RGly $\alpha_1\beta$gb extra-agrégats de géphyrine et RGly α_1 127

5.3.2.2 Des complexes RGly $\alpha_1\beta$gb-gephyrine hors agrégats 128

5.3.2.3 Fraction des RGly associés à de la géphyrine hors agrégats 130

5.3.2.4 Généralisation au cas des RGly endogènes extrasynaptiques 132

5.3.2.5 Conséquences et modèle supporté 133

5.3.3 Effets liés au cytosquelette 133

5.3.3.1 Traitements pharmacologiques 134

5.3.3.2 Résultats obtenus dans des neurones jeunes 134

5.3.3.3 Résultats obtenus dans des cellules HeLa 136

5.4 Quantification de l'équilibre dynamique **138**

5.4.1 Deux sous-populations de récepteurs intra-agrégats de géphyrine . 138

5.4.2 Propriétés cinétiques de l'équilibre IN⇌OUT 139

5.4.2.1 Temps de résidences t_{IN} et t_{OUT} 139

5.4.2.2 Proportion de récepteurs dans l'état IN 141

5.4.2.3 Comparaison des deux approches et discussion 142

5.5 Conclusion **143**

5.1 Introduction

La diffusion membranaire et l'ancrage transitoire aux synapses des récepteurs sont deux processus qui participent à l'établissement d'un équilibre entre les récepteurs synaptiques et extrasynaptiques. La géphyrine est un partenaire clé du RGly que celui-ci soit intracellulaire ou inséré dans la membrane. En effet, la présence de la géphyrine est nécessaire à la formation des agrégats de RGly en face des sites de relargage de glycine [72] ; l'association intracellulaire du RGly avec la géphyrine accélère l'accumulation du récepteur dans la membrane plasmique [59] ; le confinement du RGly est augmenté au niveau des agrégats de géphyrine [96]. Ainsi, l'interaction du récepteur avec la géphyrine joue un un rôle primordial dans l'ancrage du récepteur aux niveaux des synapses inhibitrices, denses en géphyrine.

L'idée initiale qui a conduit aux travaux rapportés dans ce chapitre consiste à considérer les zones intra-/extra-agrégats de géphyrine de manière analogue aux zones synaptique/extrasynaptique. Pour se concentrer sur l'interaction RGly-géphyrine nous nous sommes placés dans des systèmes modèles qui reposent d'une part sur l'expression exogène des molécules d'intérêts par le biais de la transfection et d'autre part sur le type de cellules dans lesquelles les observations sont effectuées. Dans un premier temps, nous détaillons les propriétés des types de géphyrine et de récepteurs utilisés et justifions le choix des cellules hôtes. Dans un deuxième temps, l'influence de l'interaction RGly-géphyrine sur les propriétés diffusives du récepteur est étudiée. Les propriétés de diffusion du RGly dans des cellules transfectées que nous mesurons sont similaires à celle du RGly endogène dans des neurones de 10-12 DIV (en présence de synapses matures). Ceci confirme le rôle prépondérant de la géphyrine dans la régulation de la dynamique membranaire du RGly. De plus, l'utilisation de deux sous-unités du RGly, capable ou non d'interagir avec la géphyrine, nous permet de montrer qu'une fraction non négligeable des récepteurs est liée à des molécules de géphyrine même en dehors des agrégats de géphyrine. Ceci met en valeur le rôle important des protéines d'échafaudage dans la membrane extrasynaptique et soutient l'idée d'une implication des interactions géphyrine-géphyrine dans la stabilisation du RGly aux synapses. L'influence du cytosquelette et de la trimérisation de la géphyrine sur la dynamique du récepteur sont également abordés. Enfin dans un troisième temps, nous nous appliquons à caractériser les échanges de récepteurs entre les zones intra- et extra-agrégats de géphyrine (dans toute la suite, par soucis de clarté et de concision de la rédaction, les abréviations IAG et EAG seront utilisées pour designer ces deux types de zones de la membrane plasmique). Deux sous-populations de récepteurs IAG sont identifiées et caractérisées. Les paramètres cinétiques gouvernant l'équilibre dynamique entre les RGly IAG et EAG sont analysés. Finalement, les résultats que nous avons obtenus suggèrent que l'équilibre global entre les RGly IAG et EAG est régi par de multiples équilibres que nous décrirons dans la conclusion.

La plupart des résultats exposés dans ce chapitre sont l'objet de l'article intitulé "Multiple association states between glycine receptors and gephyrin identified by SPT analysis", accepté pour publication dans *Biophysical Journal*.

5.2 Systèmes modèles

Les systèmes cellulaires dans lesquels sont menées nos expériences reposent sur deux principes :

- la transfection de RGly et de géphyrine choisis nous permet de contrôler la capacité des récepteurs que l'on observe à interagir avec la géphyrine et de visualiser cette dernière,

– l'utilisation de cellules dépourvues de synapses réduit le nombre de facteurs pouvant parasiter l'étude spécifique de l'interaction RGly-géphyrine.

L'appellation "système modèle" vient de la maîtrise accrue des éléments en jeu dans ces systèmes par rapport à une étude du RGLy endogène dans des neurones matures.

5.2.1 Transfection du RGly et de la géphyrine

La transfection transitoire consiste à introduire un ADN étranger dans des cellules en culture qui exprimeront alors la protéine codée par l'ADN pendant plusieurs jours. L'entrée dans la cellule se fait par le biais d'agents de transfection. Dans notre cas, ces derniers forment des complexes lipides-ADN, encapsulant ainsi l'ADN dans des vésicules lipidiques. Ces dernières sont ensuite endocytées par la cellule hôte, ce qui permet le relarguage de l'ADN à l'intérieur de la cellule. Une séquence nucléotidique particulière appelée promoteur, placée en amont du gène, assure le contrôle de la transcription de l'ADN. La plupart de nos expériences ont été menées sur des cellules cotransfectées avec deux ADN : elles expriment ainsi de la géphyrine et du RGly simultanément. Toutes les observations sont faites 24 heures après transfection.

5.2.1.1 Des récepteurs capables ou non d'interagir avec la géphyrine

Deux types d'ADN permettant aux cellules d'exprimer le récepteur ont été utilisés séparément. Chacun code une sous-unité possédant un épitope (*tag*) Myc situé en N-terminal (extracellulaire). La première construction correspond à la sous-unité α_1 du récepteur, qui est l'isoforme prédominante chez le rat adulte [7]. La deuxième construction est une forme chimérique de α_1 qui contient la séquence βgb (composée de 18 acides aminés), nécessaire et suffisante pour une interaction avec la géphyrine [99]. La figure 5.1 donne un aperçu de la structure de ces deux sous-unités, α_1 et $\alpha_1\beta$gb, dont les constructions ont été précédemment décrites [94]. Les récepteurs ainsi exprimés, RGly α_1 ou RGly $\alpha_1\beta$gb, sont alors des pentamères homomériques. RGly $\alpha_1\beta$gb possède ainsi cinq sites de liaison avec la géphyrine contrairement au récepteur natif qui en possède trois (voir 1.2.2.1).

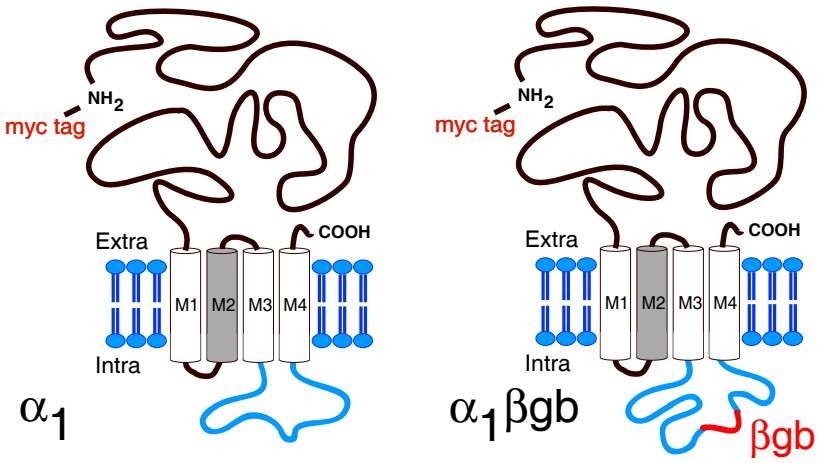

Figure 5.1 – *Structure des sous-unités α_1 et $\alpha_1\beta$gb, respectivement incapable et capable de lier la géphyrine. Adaptée à partir de figures réalisées par C. Vannier.*

5.2.1.2 Géphyrine : forme standard fluorescente et variant

La géphyrine utilisée dans la plupart des expériences, VeGe [58], correspond à sa forme dite standard (voir 1.2.2.2) sur laquelle a été ajoutée, au niveau de son N-terminal, un marqueur fluorescent. Ce marqueur, la "Venus" est une protéine fluorescente jaune (YFP pour Yellow Fluorescent Protein) modifiée, particulièrement stable et brillante [106]. Dans une série d'expériences de contrôle, la version non marquée de cette géphyrine est aussi utilisée.

Si la forme standard de la géphyrine a été la première à être clonée (clone P1 [115]), six autres variants ont été produits au laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse. Parmi eux, le variant Ge(2,4,5) (numérotation basée sur sa composition en cassettes [95,158]) ne peut pas former de trimère (présence de la cassette 5) et il est essentiellement trouvé sous forme de monomère *in vitro* [8]. La chimère VeGe(2,4,5), sa version marquée avec une "Venus", est utilisée pour étudier l'influence de la trimérisation.

Sauf indication contraire, les expériences décrites dans ce chapitre sont menées sur des cellules cotransfectées, exprimant du RGly (dont le type est toujours précisé) et de la géphyrine VeGe.

5.2.2 Cellules HeLa et neurones jeunes

Dans les réseaux de neurones matures, la structure fonctionnelle des synapses est complexe (voir 1.2.1.3). La diffusion latérale du récepteur peut être gênée par la forte densité de molécules présentes dans la membrane post-synaptique ou par la présence des molécules d'adhésion sur les bords de la synapse. Les nombreux partenaires de la géphyrine présents sous la membrane (voir 1.2.2.2) sont susceptibles de moduler l'interaction géphyrine-RGly. A ces effets provenant du système biologique même, une contrainte due à la technique utilisée peut éventuellement venir s'ajouter. En effet, le marquage par les QDots ($\sim$20 nm de diamètre), ajoutant un volume au niveau de la partie extracellulaire des récepteurs, pourrait générer des contraintes stériques à l'entrée et à l'intérieur de la fente synaptique ($\sim$20-40 nm). La comparaison de la dynamique de récepteurs marqués soit avec des fluorophores (Cy3, quelques nm de diamètre) soit avec des QDots a conduit Groc et al. [54] à conclure à un ralentissement des récepteurs AMPA ,dans les synapses excitatrices, dû à la présence des QDots. Au contraire, Dahan et al. [34] n'observent pas de différence significative sur la dynamique du RGly, dans les synapses inhibitrices. Pour ces raisons, d'ordre biologique et technique, nous avons souhaité nous affranchir de la présence des synapses.

Les premières cellules que nous avons utilisées sont des cellules non neuronales. Celles-ci n'expriment pas le RGly de manière endogène. De ce fait, un point particulièrement intéressant est qu'elles ne contiennent pas d'autres sous-unités (α ou β) du récepteur, lesquelles auraient pu être à l'origine d'interactions parasites avec les sous-unités transfectées que l'on souhaite étudier. Ainsi, ces cellules sont utilisées comme système neutre vis à vis de l'interaction géphyrine-récepteur puisque celle-ci y est introduite de manière tout à fait artificielle. Parmi les cellules non neuronales couramment utilisées, on peut nommer les cellules COS, HEK et HeLa. Les cellules COS utilisées couramment au Laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse ont l'inconvénient d'avoir une membrane plasmique comportant de nombreuses bosses et replis. Au contraire, les HEK et les HeLa ont l'avantage d'avoir une morphologie qui se prête plus aux expériences de videomicroscopie puisqu'elles présentes de larges zones régulières et plates. La facilité à se procurer des cellules HeLa nous a alors conduit à les choisir.

Dans l'optique de se rapprocher du système dans lequel se produit l'interaction géphyrine-RGly de façon endogène, nous nous sommes également placés dans des neurones en culture de 3-4 DIV. Ces neurones, dits jeunes, sont à un stade de développement auquel très peu de boutons synaptiques sont déjà formés [41].

De plus, la composition de la membrane et l'organisation du cytosquelette, deux facteurs qui peuvent modifier la dynamique latérale des protéines membranaires, sont différentes dans les cellules neuronales et non-neuronales. En particulier, les neurones sont susceptibles de contenir des molécules qui agissent sur la dynamique du RGly de manière spécifique. Ainsi, la comparaison des résultats obtenus, concernant la diffusion du RGly et son interaction avec la géphyrine, dans ces deux types de cellules semble être un vecteur d'information pertinent.

5.2.3 Distributions cellulaires caractéristiques

Les distributions cellulaires caractéristiques (également appelées *patterns*), du RGly et de la géphyrine, obtenues suite à des transfections (dans des cellules COS et neurones jeunes) du RGly (α_1 ou $\alpha_1\beta$gb), seul ou en présence de géphyrine (standard ou Ge(2,4,6)) ont été précédemment décrites [94,96,59,8]. Les expériences d'immunocytochimie sur cellules fixées qui permettent d'observer et de caractériser ces *patterns* ont été utilisées pour étudier la formation des agrégats et co-agrégats GlyR-géphyrine. Nous avons reproduit ces expériences (hors quantification) pour plusieurs raisons :

- vérifier que les *patterns* obtenus dans des cellules HeLa sont similaires à ceux observés dans des cellules COS, les cellules non-neuronales utilisées précédemment,
- valider nos protocoles de transfection sur cellules HeLa et neurones jeunes,
- pour des raisons pédagogiques i.e. pour se familiariser avec ces *patterns*.

L'interaction RGly-géphyrine modifie les distributions de la géphyrine et du RGly. Les images de la fig. 5.2 illustrent les principales caractéristiques des distributions surfaciques types des RGly et de la géphyrine, d'ailleurs identiques à celles décrites dans la littérature. Pour une lecture rapide et efficace de cette figure, l'attention du lecteur doit se porter principalement sur la périphérie des cellules (zone propice à la visualisation de la membrane et correspondant au plan de mise au point). Le signal correspondant au récepteur est issu d'un marquage de surface, les RGly intracellulaires ne sont donc pas visibles ici. En revanche, le marquage de la géphyrine par la Venus permet de voir sa distribution immédiatement sous la membrane et aussi sa distribution intracellulaire (floue du fait de la mise au point au niveau de la membrane). Résumons à présent les propriétés de ces distributions :

1. En absence d'interaction RGly-géphyrine, dans les cellules cotransfectées avec VeGe et RGly α_1, VeGe forme de gros agrégats intracellulaires uniquement (1 à 3 μm de diamètre dans des cellules COS [59]). Ceux-ci ne sont pas associés avec le RGly présent intracellulairement sous la forme de petits agrégats (non montrés ici, voir [59]). A la surface, le récepteur est diffus dans le cas des cellules HeLa (comme dans les cellules COS) et forme de petits agrégats (0.105 μm^2 [96]) non associés à la VeGe dans des neurones jeunes.

2. Au contraire, dans les cellules cotransfectées avec VeGe et RGly $\alpha_1\beta$gb, VeGe forme de plus petits agrégats intracellulaires, les agrégats de RGly intracellulaires étant souvent colocalisés avec eux (non montrés ici, voir [59]). A la surface, dans les neurones jeunes comme dans les cellules HeLa, le RGly forme des agrégats (0.161 μm^2 dans les neurones jeunes [96]) qui sont colocalisés avec des agrégats de VeGe présents sous la membrane.

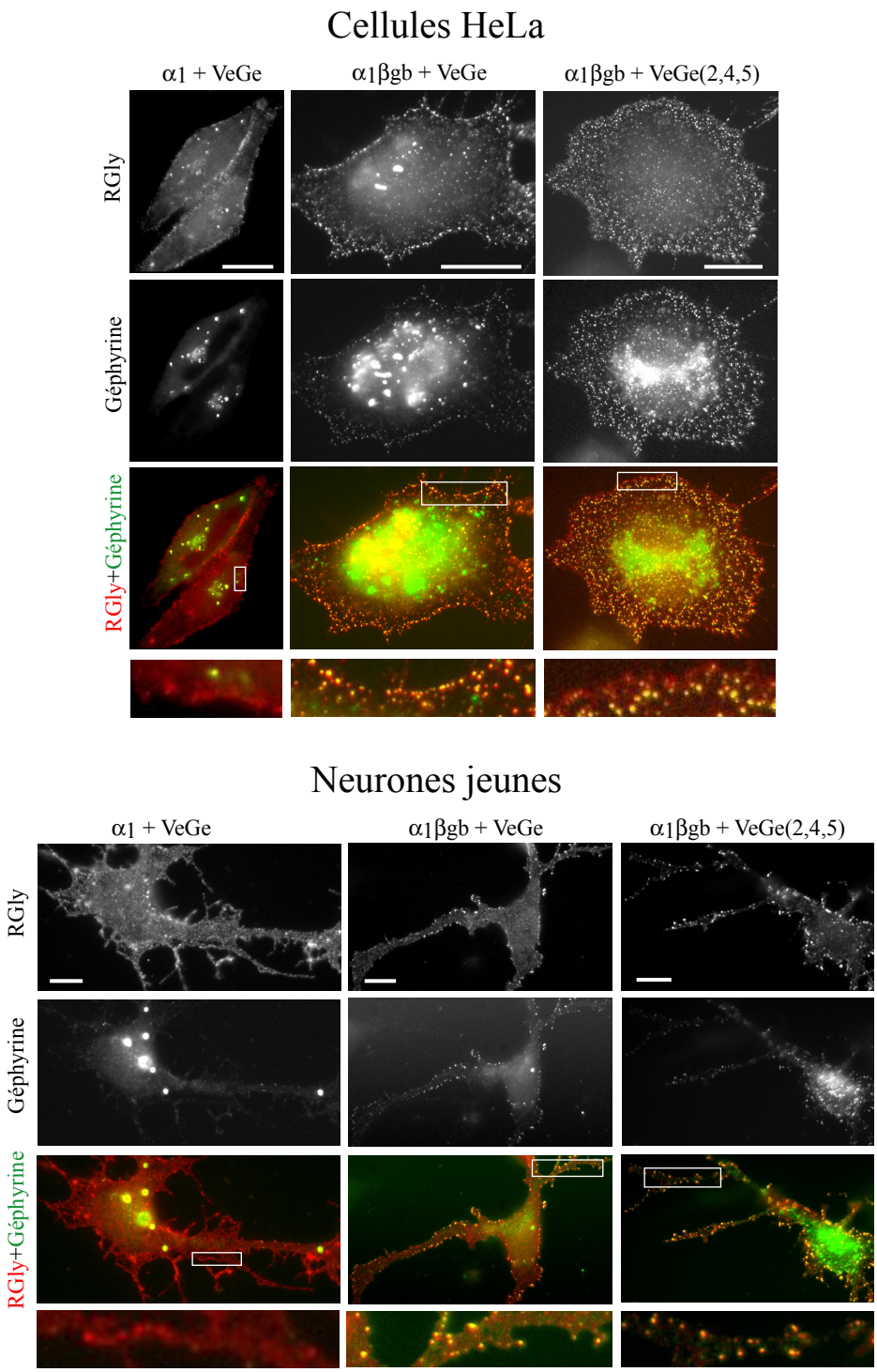

Figure 5.2 – *Dans des cellules HeLa (panneau du haut) et des neurones de 3-4 DIV (panneau du bas), distributions caractéristiques du RGly et de la géphyrine suite à diverses co-transfections (le RGly α_1 ou $\alpha_1\beta gb$ avec la VeGe standard ou la VeGe(2,4,5)). Barre d'échelle, valable pour les trois premières lignes d'images : 10μm. Les images du bas correspondent à des grossissements des zones repérées par un carré blanc. Se reporter au texte pour la description de ces distributions.*

3. Avec la VeGe(2,4,5), qui ne peut pas former de trimères, les distributions observées sont similaires à celles obtenues avec la VeGe (forme standard). La seule différence notable tient dans la taille des agrégats de géphyrine qui sont plus petits dans le cas de la VeGe(2,4,5) [8]. Étant donné que la formation d'agrégats de géphyrine est supposée dépendre à la fois de ses capacités de dimérisation et de trimérisation [143], la détection d'agrégats de VeGe(2,4,5) semble être contre-intuitive. Cependant, on peut envisager que ces agrégats résultent de la combinaisons du grand nombre de sites de liaison disponibles (5 à priori) sur les RGly transfectés (homomériques) et de la capacité potentielle à dimériser de la VeGe(2,4,5).

Dans des cellules cotransfectées avec la géphyrine non marquée et le récepteur (α_1 ou $\alpha_1\beta$gb), nous avons également vérifié que les distributions du récepteur étaient identiques à celles observées avec la version marquée de la géphyrine (VeGe).

5.3 Influence de l'interaction RGly-géphyrine sur la dynamique latérale du RGLy

La dynamique latérale des récepteurs est quantifié en utilisant la fonction de déplacement quadratique moyen (voir partie 3.3). Celle-ci est calculée sur tout ou partie des trajectoires et permet une analyse de la diffusion aux temps courts (par la mesure du coefficient de diffusion initial) et aux temps longs (type de diffusion, libre ou confinée, et dans ce dernier cas, valeur du diamètre de confinement). Dans toute cette section, les propriétés de diffusion des RGly $\alpha_1\beta$gb à l'intérieur et à l'extérieur des agrégats sont traitées de manière indépendantes. Concernant les RGly α_1, leur diffusion est caractérisée indépendamment de la position des agrégats de géphyrine puisque ceux-ci ne peuvent interagir avec ce type de récepteur. Les propriétés d'interaction des RGly avec la géphyrine et quelques trajectoires sont illustrées sur la figure 5.3.

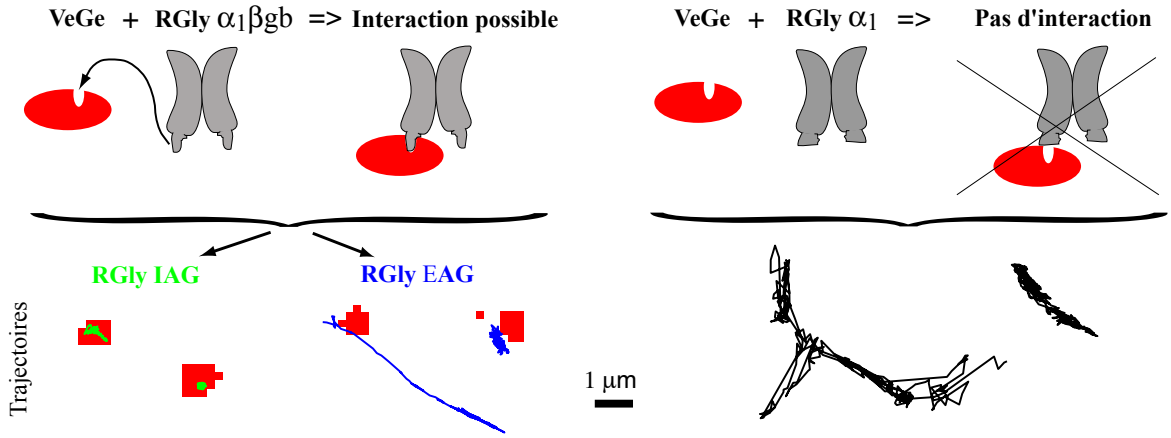

Figure 5.3 – *Rappel des propriétés d'interaction des RGly $\alpha_1\beta$gb et α_1 avec VeGe, et exemples de trajectoires. Pour les RGly $\alpha_1\beta$gb, des trajectoires à l'intérieur (IAG, vert) et à l'extérieur (EAG, bleu) des agrégats de géphyrine (en rouge) sont représentées. (noir) trajectoires de RGly α_1.*

5.3.1 Rôle prépondérant de la géphyrine dans la stabilisation du RGly aux synapses

5.3.1.1 Dynamique du RGly $\alpha_1\beta$gb intra- et extra-agrégats de géphyrine

Les cumulatives des coefficients de diffusion initiaux D_{2-5} des RGly $\alpha_1\beta$gb IAG et EAG sont représentées sur la figure 5.4. Les distributions correspondantes sont significativement différentes avec des valeurs médianes (voir table 5.1) pour les RGly $\alpha_1\beta$gb EAG qui sont 12 et 10 fois plus grandes que celles des RGly $\alpha_1\beta$gb IAG, dans les cellules HeLa et les neurones respectivement.

Sur les trajectoires exhibant un mouvement de type confiné (voir partie 3.3), les diamètres de confinement mesurés à l'intérieur des agrégats de géphyrine sont en moyenne 1.7 et 3 fois plus petits que ceux mesurés à l'extérieur, dans les cellules HeLa et les neurones respectivement (voir table 5.1 et fig. 5.5).

Ainsi, que ce soit dans les cellules HeLa ou dans des neurones jeunes, RGly $\alpha_1\beta$gb diffuse plus lentement, dans un domaine de confinement plus petit, à l'intérieur qu'à l'extérieur des agrégats de géphyrine. Ces résultats confirme bien que l'interaction RGly-géphyrine engendre un mécanisme de diffusion-capture au niveau des agrégats de géphyrine comme il a été précédemment montré [96].

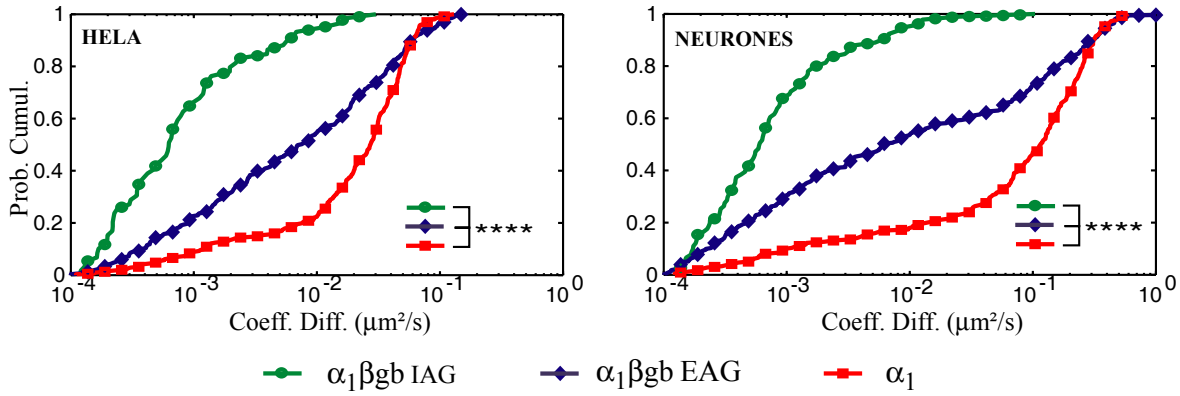

Figure 5.4 – *Probabilités cumulées des coefficients de diffusion, dans des cellules HeLa (sur la gauche) et dans des neurones (sur la droite). Comparaison entre RGly $\alpha_1\beta$gb IAG (vert, n_{HeLa}=59 et $n_{Neurone}$=91), EAG (bleu, n_{HeLa}=279 et $n_{Neurone}$=332), et RGly α_1 (rouge, n_{HeLa}=313 et $n_{Neurone}$=213). ks. test : **** $p<10^{-4}$.*

5.3.1.2 Comparaison avec les RGly synaptiques et extrasynaptiques

Des expériences de suivi de particules uniques, menées précédemment dans l'équipe, ont permis d'étudier la dynamique latérale du RGly endogène dans des neurones de 10 à 12 DIV [34, 25]. A ce stade de développement, les contacts synaptiques sont matures [119]. Nos mesures dans des neurones jeunes, de 3 à 4 DIV sont très proches des valeurs obtenues dans des neurones adultes (voir table 5.1) :

- les distributions de D_{2-5} des RGly EAG et extrasynaptiques ne sont pas différentes et leurs valeurs médianes sont quasi identiques,
- la médiane des D_{2-5} est 10 fois plus grandes à l'extérieur qu'à l'intérieur des agrégats de VeGe et 7 fois plus grande à l'extérieur qu'à l'intérieur des synapses,

– d_{conf} dans les agrégats de VeGe et aux synapses ne sont pas significativement différents. Toutefois, on peut noter que les coefficients de diffusion à l'intérieur des agrégats de géphyrine sont légèrement plus faibles qu'aux synapses. Cela peut provenir du fait que les RGly $\alpha_1\beta$gb des neurones transfectés comporte 2 sites de liaison avec la géphyrine de plus que les RGly endogènes qui sont des hétéropentamères (voir 5.2.1.1). Ces résultats montrent cependant que la diffusion des RGly en zone synaptique/extrasynaptique est bien modélisée par le comportement diffusif de RGly $\alpha_1\beta$gb en zone IAG/EAG. Ainsi l'équilibre dynamique entre RGly IAG et RGLy EAG tient vraisemenblablement un rôle prépondérant dans l'équilibre dynamique entre RGly synaptiques et RGly extrasynaptiques.

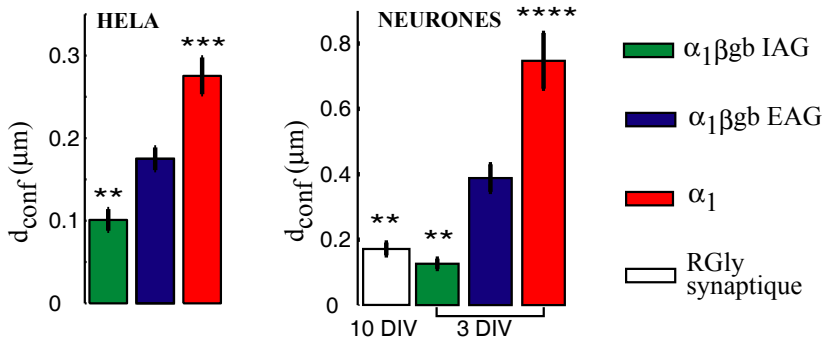

Figure 5.5 – *Diamètre de confinement (moyenne±sem) calculé sur les trajectoires exhibant un mouvement confiné, dans des cellules HeLa (sur la gauche) et dans des neurones (sur la droite). Test de Mann Whitney entre la distribution indiquée et la valeur pour les RGly $\alpha_1\beta$gb EAG : ** $p<10^{-2}$, ***$p<10^{-3}$, ****$p<10^{-4}$.*

Meier et al. ont montré précédemment que dans des neurones jeunes cotransféctés avec du RGly $\alpha_1\beta$gb et de la géphyrine marquée GFP (*Green Fluorescent Protein*), la géphyrine forme des agrégats à la surface de la membrane, colocalisés avec les agrégats de RGly. Les tailles des agrégats de géphyrine mesurées dans ces neurones jeunes ($\simeq$0.16μm^2 [96]), en absence de synapses, sont du même ordre de grandeur que celles dans des neurones de 9-12 DIV ($\simeq$0.3μm^2 [58]). Dans ces neurones adultes, les agrégats de VeGe sont de mêmes dimensions que des agrégats de géphyrine endogène [58]. Ces mesures indiquent que l'interaction GlyR-géphyrine est suffisante pour former des agrégats de géphyrine de taille appropriée. Ainsi, les interactions entre les éléments pré- et post-synaptique ne semblent pas intervenir dans la régulation de la taille de ces agrégats. En revanche, étant donné que les propriétés de diffusion et de confinement aux synapses sont principalement contrôlées par la présence des agrégats de géphyrine, nous proposons que ce soient ces propriétés qui règlent la taille des co-agrégats GlyR-géphyrine.

Par analogie aux mesures effectuées précédemment dans les neurones de 10 DIV pour quantifier les échanges de RGly aux synapses (voir partie 3.3 et [25]), le nombre de transitions entre les compartiments IAG et EAG ainsi que le temps moyen passé dans la zone IAG sont estimés. Les valeurs obtenues dans des neurones de 3DIV et 10 DIV sont représentées sur la figure 5.6. Contrairement à la similarité des propriétés de diffusion (coefficient de diffusion et confinement), on observe une faible augmentation (d'un facteur 1.5) du nombre de transitions associée à une légère baisse du temps de résidence, lorsque les résultats obtenus sur le RGly transfectés, au niveau des agrégats de géphyrine, et ceux concernant les RGly endogènes, aux synapses, sont comparés. Ces différences sont probablement imputables à la présence de protéines transmembranaires [156], telles les molécules

d'adhésion, se trouvant en périphérie de la synapses. En effet, celles-ci, agissant comme des obstacles sur le passage des RGly, pourraient ainsi créer des barrières de diffusion limitant les entrées/sorties des récepteurs [152, 107].

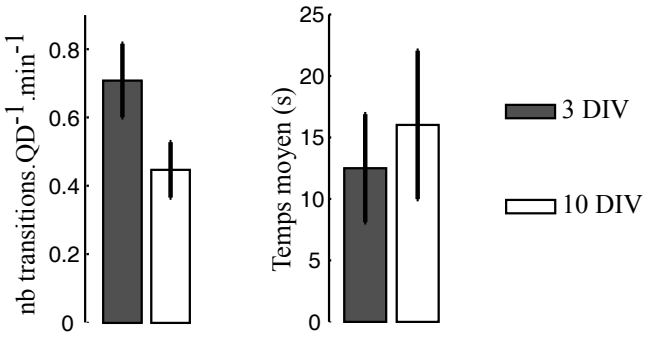

Figure 5.6 – *Comparaison (moyenne±sem) du nombre de transitions entre compartiments et du temps moyen (IAG ou à la synapse) dans des neurones jeunes (n=44 films) et adultes (n=12 films).*

D'un point de vue technique, la similarité des propriétés de diffusion en présence et en absence de synapses indique que les QDots n'introduisent pas de contraintes stériques suffisantes pour gêner le mouvement des RGly aux synapses inhibitrices. Ce résultat confirme ce que d'autres expériences avaient déjà suggéré (voir [34] et 5.2.2). Vraisemblablement, la gène stérique introduite par les QDots aux synapses excitatrices [54] vient de l'organisation moléculaire spécifique à ces synapses.

Type cellulaire	Type de RGly	n	Médiane D ($\mu m^2.s^{-1}$)	Mvt confiné (%)*	d_{conf} † (nm)
Cellules HeLa	$\alpha_1\beta$gb inside	59	6.0 10^{-4}	56	101±13
	$\alpha_1\beta$gb outside	279	7.6 10^{-3}	45	175±14
	α_1	313	2.7 10^{-2}	27	275±22
Neurones 3 DIV	$\alpha_1\beta$gb inside	91	6.0 10^{-4}	62	126±16
	$\alpha_1\beta$gb outside	332	6.1 10^{-3}	47	388±42
	α_1	213	1.2 10^{-1}	36	747±85
Neurones 10 DIV ‡	synaptic	90	1.0 10^{-3}	51	166±19
	extrasynaptic	231	7.0 10^{-3}	-	-

Table 5.1 – *Comparaison des coefficients de diffusion initiaux (valeurs médianes) et des diamètres de confinement (d_{conf}) des RGly α_1, $\alpha_1\beta$gb et endogènes, dans des cellules HeLa, des neurones jeunes (3 DIV) et adultes (10 DIV). * hors objets immobiles - † moyenne±sem sur les trajectoires confinées - ‡ données issues de [25].*

5.3.1.3 Comparaison cellules HeLa - Neurones jeunes

Dans toutes les expériences décrites précédemment, les coefficients de diffusion mesurés sont plus faible dans des cellules HeLa que dans les neurones. *A priori*, on pourrait soupçonner une in-

fluence de la température utilisée lors de la prise d'image : à température ambiante pour les cellules HeLa et à 37°C pour les neurones. Or, dans des expériences précédentes similaires, menées sur des neurones adultes, successivement à température ambiante et à 37°C [34], aucune modification des coefficients de diffusion n'avait été observée. La température n'est donc pas responsable de cet effet. En revanche, il est clair que les compositions de la membrane et des milieux intra- et extra-cellulaires sont propres à chaque type de cellule. Ainsi, les molécules présentes autour et dans la membrane joueraient sur la viscosité apparente de la membrane dans laquelle diffuse le récepteur, et seraient alors à l'origine de l'écart entre les coefficients de diffusion dans les cellules HeLa et ceux dans les neurones.

Contrairement aux valeurs absolues des coefficients de diffusion qui sont différentes, les comparaisons relatives entre diverses distributions (RGly IAG et EAG par exemple) donnent des résultats similaires dans les cellules HeLa et les neurones. Ceci confirme que les résultats mesurés sont bien caractéristiques de l'interaction géphyrine-récepteur étudiée, indépendamment du type cellulaire.

5.3.2 Régulation de la dynamique du RGly par la géphyrine en dehors des agrégats de géphyrine

5.3.2.1 Diffusions des RGly $\alpha_1\beta$gb extra-agrégats de géphyrine et des RGly α_1

La comparaison des propriétés de diffusion du RGly $\alpha_1\beta$gb EAG avec celles du RGly α_1 permet de mesurer l'influence de l'interaction RGly-géphyrine à l'extérieur des agrégats de géphyrine. Dans les cellules HeLa et dans les neurones jeunes respectivement, des différences significatives sont quantifiées :

- la médiane des D_{2-5} des RGly α_1 est 4 et 10 fois plus grandes que celle des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG (voir fig. 5.4 et table 5.1),
- d_{conf} est environ 2 fois plus grand dans le cas des RGly α_1.

En résumé, RGly $\alpha_1\beta$gb EAG diffuse donc plus lentement et est plus confiné que RGly α_1. Toutes ces expériences sont menées dans des cellules cotransféctées avec du récepteur et VeGe. La seule différence entre les deux cas précités est la présence de la séquence βgb permettant l'interaction avec la géphyrine, dans les sous-unités $\alpha_1\beta$gb (voir 5.2.1.1). Or, comparativement à la taille totale (106 acides aminés) de la boucle intracellulaire portée par les sous-unités, cette séquence βgb est petite (18 acides aminés). Il est donc fort peu probable qu'elle soit à l'origine du ralentissement drastique de la diffusion du RGly $\alpha_1\beta$gb. L'origine de l'écart important entre les diffusions de RGly $\alpha_1\beta$gb et RGly α_1 provient plus certainement d'une interaction, directe ou indirecte, de la séquence βgb avec une molécule pouvant se lier à elle. C'est pourquoi nous proposons qu'une petite quantité de géphyrine soit liée au RGly $\alpha_1\beta$gb même en zone extra-agrégats de géphyrine (voir fig. 5.7). La géphyrine accrochée ainsi à la partie intracellulaire du récepteur pourrait alors :

- générer un effet d'encombrement stérique dans le cytoplasme, ralentissant ainsi la diffusion du RGly,
- engendrer des interactions indirectes entre le récepteur et des éléments de l'échafaudage sous membranaire, comme le cytosquelette, augmentant ainsi les sources de confinement.

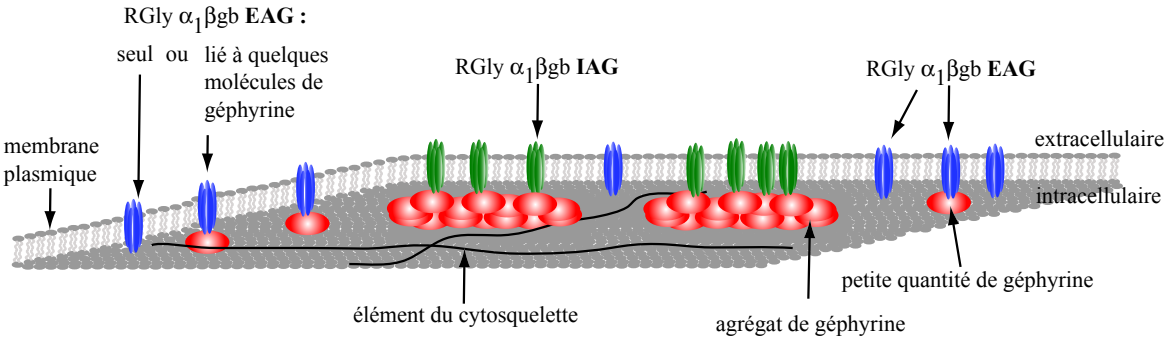

Figure 5.7 – *Vue schématique des différentes configurations vis à vis de la géphyrine dans lesquelles peut se trouver le RGly $\alpha_1\beta$gb. D'après nos résultats, il est vraisemblable que des RGly EAG (en bleu) soient liés à une petite quantité de géphyrine.*

5.3.2.2 Des complexes RGly $\alpha_1\beta$gb-gephyrine hors agrégats

Nous avons proposé précédemment que des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG interagissent avec un faible nombre de molécules de VeGe, assez petit pour qu'elles ne puissent pas être détectées avec notre montage. Cependant, il est *a priori* possible d'envisager deux autres explications : le récepteur pourrait en fait être lié à de la géphyrine endogène ; ou encore, l'effet mesuré serait fortement surestimé du fait de la présence de la Venus. En effet, la Venus est une molécule de 28-kDa (soit presque un tiers du poids moléculaire de la géphyrine) qui peut former facilement des dimères. Ceci pourrait engendrer la formation d'amas de VeGe non caractéristiques de la géphyrine.

L'éventuelle géphyrine endogène ne perturbe pas nos mesures

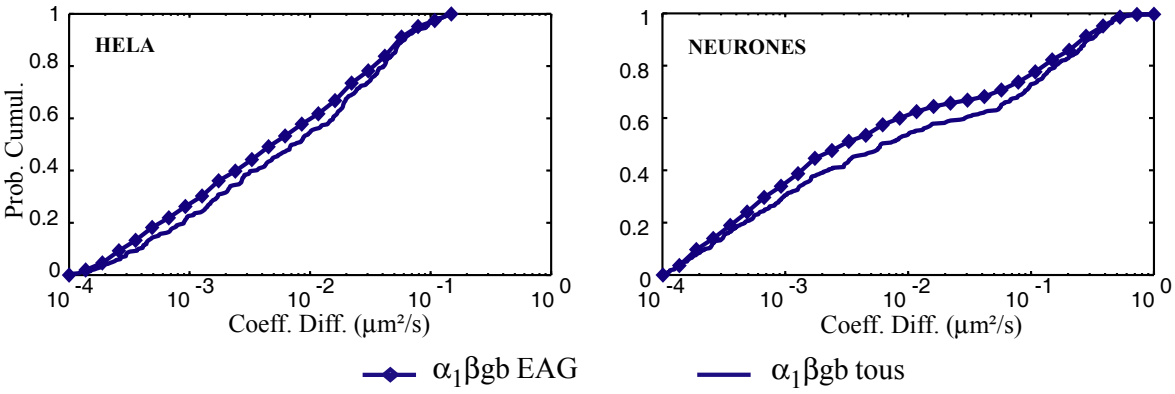

Figure 5.8 – *Probabilités cumulées des coefficients de diffusion, dans des cellules HeLa (sur la gauche) et dans des neurones (sur la droite). En présence de VeGe, RGly $\alpha_1\beta$gb tous confondus (ligne sans symbole, n_{HeLa}=330 et $n_{neurone}$=399) et EAG uniquement (triangle, n_{HeLa}=279 et $n_{neurone}$=332).*

Pour tester l'influence de la géphyrine endogène sur nos mesures, des RGly $\alpha_1\beta$gb sont transfectés seuls (i.e sans VeGe). On compare alors leurs coefficients de diffusion avec ceux des RGly α_1. Étant donné que la géphyrine endogène ne peut pas être visualisée, la cumulative des D_{2-5} pour les RGly $\alpha_1\beta$gb seuls prend en compte tous les récepteurs qu'ils soient en réalité à l'intérieur ou à

l'extérieur d'agrégats de géphyrine endogène. Toutefois, dans le cas des RGly $\alpha_1\beta$gb cotransfectés avec la VeGe, les distributions des D_{2-5} obtenues en considérant tous les récepteurs (IAG et EAG) ou uniquement ceux dans la zone EAG ne sont pas significativement différentes (voir fig. 5.8). Ceci vient du fait que la plupart des récepteurs marqués ($\simeq$80%) se trouve hors des agrégats de VeGe. Ainsi, il est possible de comparer directement les distributions des D_{2-5} pour tous les RGly $\alpha_1\beta$gb confondus avec celle des RGly α_1 pour conclure sur la différence de comportement entre RGly $\alpha_1\beta$gb EAG et RGly α_1.

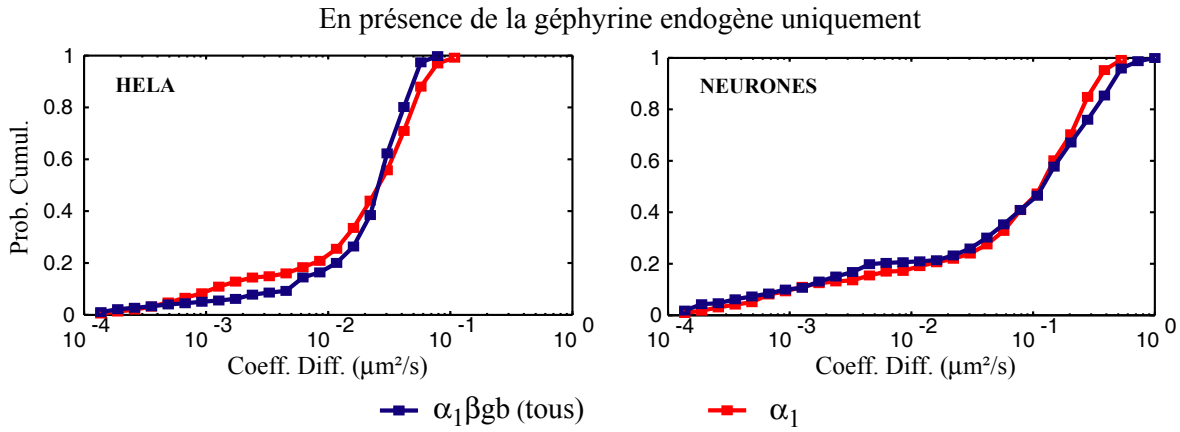

Figure 5.9 – *Probabilités cumulées des coefficients de diffusion, dans des cellules HeLa (sur la gauche) et dans des neurones (sur la droite). RGly $\alpha_1\beta$gb transfecté seul, (carré bleu, n_{HeLa}=98 et $n_{neurone}$=164) et RGly α_1 (carré rouge, n_{HeLa}=313 et $n_{neurone}$=213).*

Les distributions des D_{2-5} des RGly $\alpha_1\beta$gb transfectés seuls et des RGly α_1 sont comparables et bien différentes de celle des RGly $\alpha_1\beta$gb en présence de VeGe (voir fig. 5.9). Ainsi, quand bien même les RGly $\alpha_1\beta$gb interagiraient avec de la géphyrine endogène, cette interaction ne serait pas prédominante dans notre système. Finalement, l'éventuelle géphyrine endogène ne perturbe pas nos mesures et n'est donc pas responsable de l'effet observé en présence de VeGe.

La Venus ne rajoute pas d'artefact

En présence de géphyrine non marquée (sans Venus), les coefficients de diffusions des RGly $\alpha_1\beta$gb restent significativement plus faibles que ceux des RGly α_1 (voir fig. 5.10C), comme observé dans le cas des cellules transfectées avec VeGe. Ce ralentissement n'est donc pas imputable à la Venus.

Un effet observé indépendamment de la capacité à trimériser

Le variant VeGe(2,4,5) est dépourvu de la capacité à former des trimères que possède la forme standard VeGe. La figure 5.11 présente les résultats obtenus dans des cellules cotransfectés avec le récepteur et VeGe(2,4,5). Lorsque RGly $\alpha_1\beta$gb est cotransfecté avec VeGe(2,4,5), des agrégats de VeGe(2,4,5) existent, bien qu'ils soient plus petits que ceux de VeGe (voir section 5.2.3). Cela permet de définir des RGly IAG et EAG. D'après la similarité entre les distributions obtenues pour les RGly $\alpha_1\beta$gb transfectés seuls et pour les RGly α_1 en présence de VeGe (voir fig. 5.10B), les deux situations peuvent être utilisées indifféremment comme condition contrôle. La diffusion des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG en présence de VeGe(2,4,5) est alors comparée à celle des RGly α_1 en présence de VeGe(2,4,5) dans le

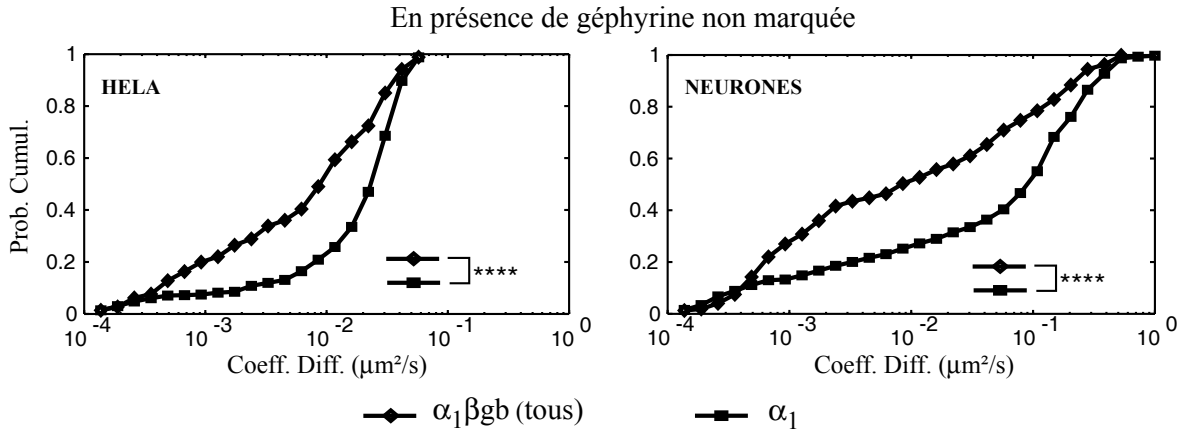

Figure 5.10 – *Probabilités cumulées des coefficients de diffusion, dans des cellules HeLa (sur la gauche) et dans des neurones (sur la droite). En présence de géphyrine non marquée, RGly $\alpha_1\beta gb$ tous confondus (triangle, n_{HeLa}=246 et $n_{neurone}$=101) et RGly α_1 (carré, n_{HeLa}= 198 et $n_{neurone}$=224), ks. test : **** $p<10^{-4}$.*

cas des neurones et avec celle des RGly $\alpha_1\beta$gb transfectés seuls dans le cas des HeLa. Dans les deux types cellulaires, les RGly $\alpha_1\beta$gb EAG ont des coefficients de diffusions largement plus faibles que les récepteurs ne pouvant se lier à VeGe(2,4,6) (voir 5.11).

Ainsi, une différence entre la diffusion aux temps courts des RGly $\alpha_1\beta$gb et celle des RGly α_1 est mesurées indépendamment de la capacité à trimériser de la géphyrine en présence. La formation d'agrégats de géphyrine est supposée dépendre de ses capacités de dimérisation et de trimérisation [143]. L'incapacité à former des trimères rajoute donc une limitation sur la taille de ses amas. La similarités des propriétés de diffusion mesurées avec les deux variants, VeGe et VeGe(2,4,5), suggère alors que l'amas de géphyrine accroché au RGly en zone extra-agrégats de géphyrine soit constitué d'un petit nombre de molécules. Ceci est cohérent avec la non détection, par notre montage, de la fluorescence associée.

5.3.2.3 Proportion des RGly associés à de la géphyrine hors agrégats

Il serait intéressant de quantifier la proportion des récepteurs qui diffusent dans la membrane EAG en étant liés à de la géphyrine. Cependant, notre montage ne nous permet pas de visualiser la petite quantité de VeGe éventuellement accrochée au récepteur. Toutefois, en se basant sur les cumulatives des coefficients de diffusion des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG et des RGly α_1, nous avons pu estimer un minorant de cette proportion.

Description et validation de la méthode

L'approche utilisée est la suivante :

1. On dispose d'une cumulative C_P(D) reflétant le comportement diffusif d'une population P de récepteurs. On suppose que cette population est composée de deux sous-populations P1 et P2 aux propriétés de diffusion différentes. D'après la définition de la probabilité cumulées, la

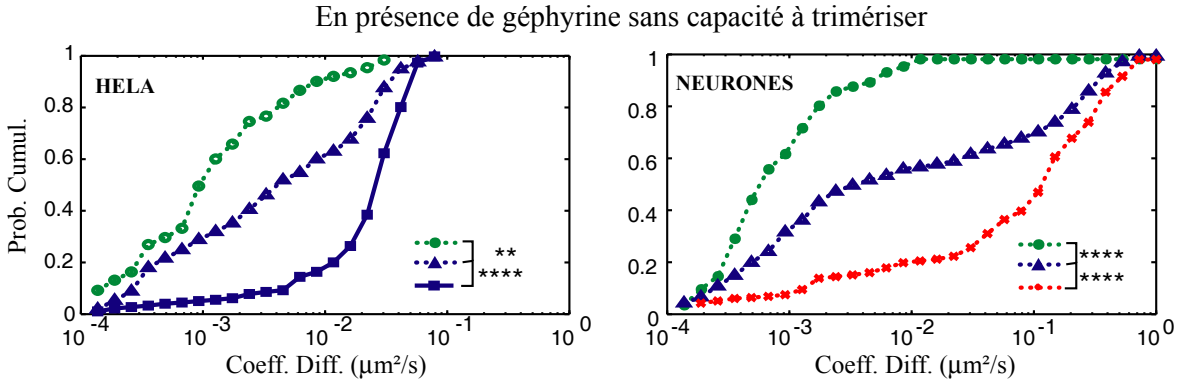

Figure 5.11 – *Probabilités cumulées des coefficients de diffusion, dans des cellules HeLa (sur la gauche) et dans des neurones (sur la droite). Données pour RGly $\alpha_1\beta$gb IAG (cercle vert) et EAG (triangle bleu) en présence de VeGe(2,4,5), comparaison avec RGly $\alpha_1\beta$gb transfecté seul (HeLa, carré bleu) ou avec RGly α_1 cotransféctés avec VeGe(2,4,5) (croix rouge). ks. test : ** $p<10^{-2}$, **** $p<10^{-4}$.*

cumulative de P peut être exprimée en fonction de celles de P1 et P2 comme suit :

$$C_P(D) = a.C_{P1}(D) + (1-a).C_{P2}(D) \;\; avec \;\; a = N1/N \tag{5.1}$$

N et N1 étant les effectifs des populations P et P1 respectivement. La relation 5.1 est valable pour chaque coefficient de diffusion D que peut avoir un récepteur de la population P.

2. C_{P2} est supposé connu. Après discrétisation des cumulatives sur n points, on dispose alors d'un système de n équations à n+1 inconnues que sont $C_{P1}(D_1)$, $C_{P1}(D_2)$,...,$C_{P1}(D_n)$ et a. Il n'est donc pas possible de résoudre entièrement ce système.
3. Pour différentes valeurs de a (avec $0 \leq a \leq 1$) fixées, on peut tout de même calculer $C_{P1}(D)^a$. Puis, étant donné qu'une probabilité cumulée est, par définition, bornée par 0 et 1, les $C_{P1}(D)^a$ ne remplissant pas cette condition sont éliminées. On peut ainsi estimer un minorant de la valeur a réelle.

Pour valider cette méthode, des simulations à partir de données expérimentales ont été effectuées, dont un exemple est donné sur la figure 5.12A. P1 et P2 correspondent aux récepteurs $\alpha_1\beta$gb IAG et $\alpha_1\beta$gb transfectés seuls respectivement. A partir de $C_{P1}(D)$ et $C_{P2}(D)$, on simule $C_P(D)$, la probabilité cumulée d'une population P constituée à 55% d'éléments issus de la population P1. A partir de $C_{P2}(D)$ et $C_P(D)$, on souhaite alors retrouver $C_{P1}(D)$ et la proportion a=N1/N. Les $C_{P1}(D)^a$ pour $a \leq 0.5$ (en gris) ne sont pas majorées par 1 tandis que les $C_{P1}(D)^a$ pour $a > 0.5$ (en noir) le sont. Ainsi, 0.5 est un minorant de a. Par ailleurs, on vérifie que $C_{P1}(D)^{0.55}$ et C_{P1} sont bien confondues.

Estimation de la proportion minimale des RGly liés à VeGe hors agrégats

La méthode décrite ci-dessus est alors employée pour estimer la proportion des RGly liés à de la VeGe en zone EAG dans des neurones jeunes. On suppose que la population P des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG peut être divisée en deux sous-populations :

- une population P1 de récepteurs liés à quelques molécules de géphyrine, lesquelles ralentissent sa diffusion
- une population P2 correspondant à des RGly n'interagissant pas avec de la géphyrine.

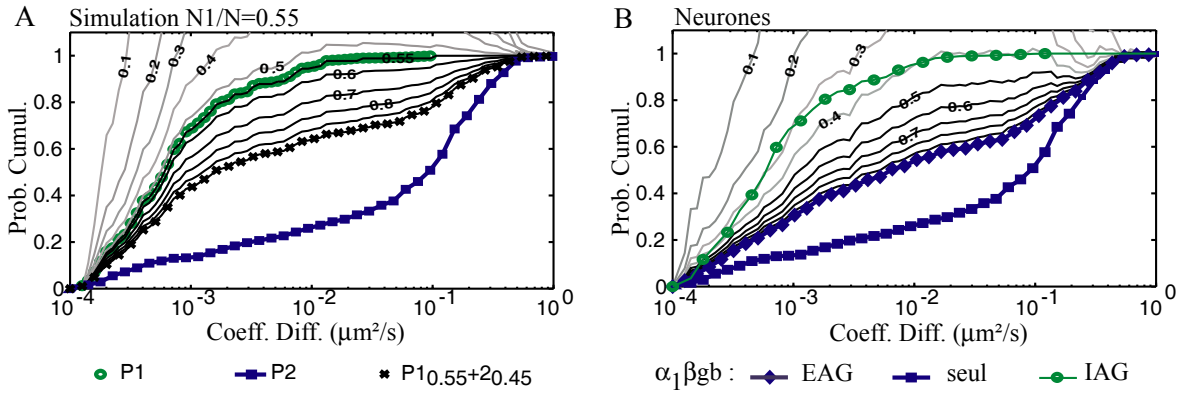

Figure 5.12 – *Estimation de la proportion minimale des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG étant liés à de la géphyrine. (A) Validation de la méthode employée. Les cumulatives des populations P1 et P2 étant connues, $C_{P1}(D)$ (cercle vert) et $C_{P2}(D)$ (carré bleu), on constitue une population P composée à 55% d'éléments de P1. A partir de C_{P2} et C_P (croix noir), $C_{P1}(D)^a$ est calculée pour a de 0.1 à 0.5 (gris), 0.55 et de 0.6 à 1 (noir). Les courbes obtenues sont majorées par 1 seulement pour a >0.5 (en noir). (B) Dans des neurones, à partir des cumulatives des coefficients de diffusion des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG (losange bleu) et des RGly $\alpha_1\beta$gb transfectés seul (carré bleu), on estime la sous-population des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG liés à de la géphyrine pour différentes valeurs de a : de 0.1 à 0.4 (gris) et de 0.5 à 0.9 (noir). Seules les courbes correspondant à a >0.4 sont majorée par 1.*

Une deuxième hypothèse, réaliste, consiste à considérer que les éléments de P2 ont les même propriétés de diffusion que des RGly $\alpha_1\beta$gb transfectés seul (sans VeGe) : $C_{P2}(D)=C_{\alpha_1\beta\text{gb seuls}}(D)$. $C_{P1}(D)^a$ est alors calculée pour a de 0.1 à 1 par pas de 0.1 (en gris et noir). On peut voir sur la figure 5.12 que seules les courbes pour $a > 0.4$ (en noir) sont majorées par 1.

Ainsi, au moins 40% des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG diffusent conjointement avec quelques molécules de VeGe. Bien que qualitative, cette estimation met en valeur l'importance de l'interaction récepteur-géphyrine dans la membrane EAG.

5.3.2.4 Généralisation au cas des RGly endogènes extrasynaptiques

Les probabilités cumulées des D_{2-5} des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG, dans des cellules transfectées avec la VeGe, et celle obtenue précédemment [25] pour les RGly endogènes extrasynaptiques sont similaires (voir fig. 5.13). Cette comparaison entre récepteurs exogènes dans des neurones jeunes et récepteurs endogènes dans des neurones adultes indique qu'il est probable qu'une fraction des RGly extrasynaptiques soit également liée à de la géphyrine. De plus, une analogie peut être faite entre :

- d'une part, la différence mesurée entre la diffusion des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG et des RGly α_1
- et d'autre part, l'écart obtenu entre les coefficients de diffusion des RGly extrasynaptiques et ceux correspondant à la protéine N-Cam, une protéine membranaire qui ne peut pas lier la géphyrine.

Cette dernière observation confirme le bienfondé de la généralisation du résultat obtenu sur des RGly transfectés au cas du récepteur endogène.

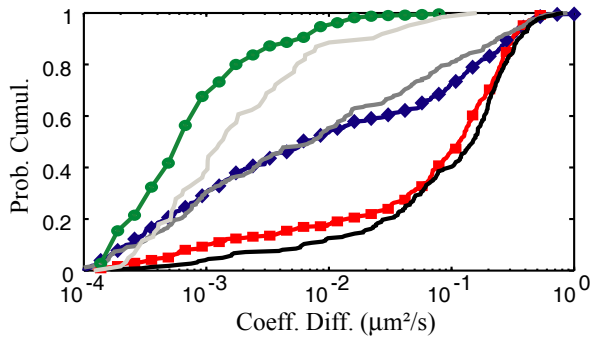

Figure 5.13 – *Cumulative des D_{2-5}. Dans des neurones jeunes transfectés : RGly $\alpha_1\beta$gb IAG (cercle), EAG (losange), RGly α_1 (carré). Dans des neurones adultes : RGly synaptique (gris clair), extrasynaptique (gris foncé) et protéine NCAM (noir) (S. Lévi, données non publiées)*

5.3.2.5 Conséquences et modèle supporté

En résumé, nous avons montré qu'une importante fraction (>40%) des RGly EAG est associée à des petits amas de géphyrine et qu'il en est très probablement de même pour les récepteurs extrasynaptiques. Par ailleurs, d'autres expériences ont permis de mettre en valeur le rôle de la géphyrine dans le transport intracellulaire des RGly vers la membrane plasmique : d'une part la géphyrine interagit avec des composants des complexes de protéines moteur [49], d'autre part des agrégats de RGly sont associée à de la géphyrine au cours de leur acheminement vers la membrane [59, 86]. Lors du transport des RGly le long des microtubules ou des microfilaments, la géphyrine fait ainsi le pont entre le RGly et des protéines moteurs. De plus, il a été démontré que les RGly sont insérés dans la membrane extra-synaptique [126] avant d'être progressivement redistribués dans la membrane et accumulés aux synapses [94]. Ainsi, nos résultats sont parfaitement compatibles et renforcent le modèle (voir fig. 5.14) dans lequel l'interaction RGly-géphyrine persiste durant le processus de délivrance des récepteurs à la membrane et au cours de leur diffusion latérale qui s'ensuit.

De plus, si les récepteurs diffusent conjointement avec leur protéine d'ancrage alors les interactions géphyrine-géphyrine prennent vraisemblablement part à l'insertion des RGly dans les domaines post-synaptiques. Ainsi, les deux types d'interaction, RGly-géphyrine et géphyrine-géphyrine, doivent être considérés concernant l'équilibre dynamique entre RGly intra- et RGly extra-agrégats de géphyrine. Deux scénarios sont envisageables. Le premier implique des interactions RGly-géphyrine : les RGly diffusent dans la membrane extrasynaptique et sont capturés au niveau d'agrégats de géphyrine contenant des sites d'interaction libres. Le deuxième est basé sur des interactions géphyrine-géphyrine : les RGly diffusent dans la membrane extrasynaptique en étant déjà associés à des molécules de géphyrine, lesquelles permettent ensuite la stabilisation des RGly aux synapses.

5.3.3 Effets liés au cytosquelette

D'après les résultats exposés dans la partie 4.2, les éléments du cytosquelette sont impliqués dans la régulation de la dynamique latérale du RGly dans des neurones de 10 DIV [25]. La comparaison entre l'influence du cytosquelette sur RGly $\alpha_1\beta$gb et celle sur RGly α_1 peut nous permettre d'identifier le rôle de la géphyrine dans cette régulation. En effet, on rappelle que la géphyrine peut se lier à la tubuline, élément constitutif des microtubules, et à des protéines régulatrice des filaments

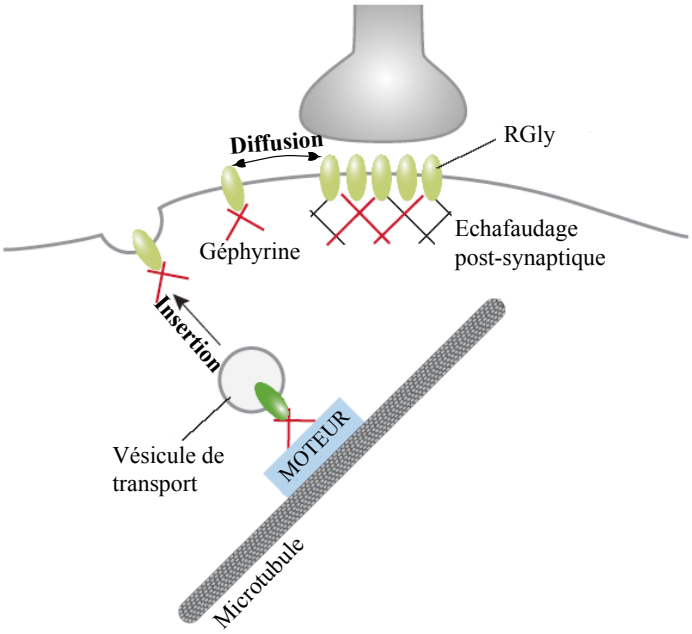

Figure 5.14 – *Modède supporté, dans lequel l'interaction RGly-géphyrine persiste durant la délivrance des récepteurs à la surface et au cours de la diffusion latérale extrasynaptique qui s'ensuit, pour permettre aux récepteurs de s'accumuler à la synapse. Adapté de [73].*

d'actine (voir 1.2.2.2). De plus, nous venons de montrer que des RGly $\alpha_1\beta$gb liés à des molécules de géphyrine diffusent dans la membrane EAG. Il est alors naturel d'envisager que la géphyrine soit un pont connectant les RGly au cytosquelette non seulement au niveau des agrégats de géphyrine mais aussi en dehors de ces derniers.

5.3.3.1 Traitements pharmacologiques

Les filaments d'actine et les microtubules sont dépolymérisés par des traitements pharmacologiques que sont des incubations en présence de latrunculine-A (3 μM) et de nocodazole (10 μM) respectivement. Ces drogues sont ajoutées au milieu de culture lors de la pré-incubation, dans le milieu de marquage des RGly et pendant la prise d'image. Les concentrations et les durées d'incubations ont été déterminées en analysant l'état du cytosquelette en immunocytochimie. Les temps d'incubation les plus courts possibles, provoquant une dépolymérisation visible et réversible du cytosquelette ont été choisis. La réversibilité de la dépolymérisation du cytosquelette permet de s'assurer que les traitements sont compatibles avec la survie des cellules. La figure 5.15 présente les résultats d'immunocytochimies types obtenus sur cellules HeLa et neurones jeunes (3-4DIV), sans traitement (condition dite contrôle), après dépolymérisation des filaments d'actine et après déstabilisation des microtubules.

5.3.3.2 Résultats obtenus dans des neurones jeunes

Influence prépondérante des microtubules

Dans des neurones de 3-4 DIV, cotransféctés avec la VeGe, la dépolymérisation des filaments

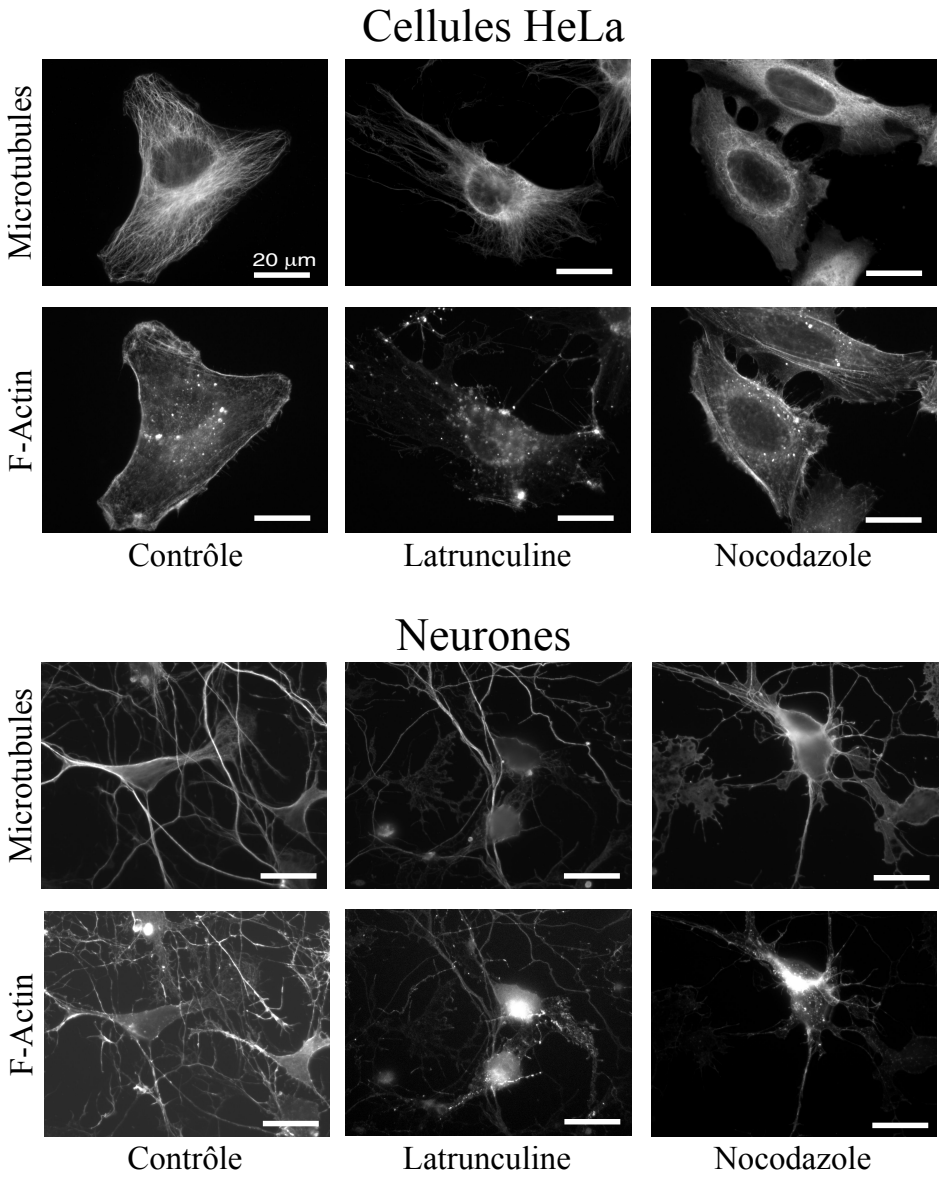

Figure 5.15 – *Immunofluorescence des microtubules et des filaments d'actine dans les cellules HeLa (panneau du haut) et les neurones de 3-4 DIV (panneau ddu bas). De gauche à droite : condition contrôle, après dépolymerisation des filaments d'actine (par la lactrunculine) et après déstabilisation des microtubules (par le nocodazole).*

d'actine, par la latrunculine, n'entraîne aucune modification des coefficients de diffusion, quel que soit le type de récepteur (voir fig. 5.16A). En revanche, les traitements au nocodazole accélèrent spécifiquement les RGly $\alpha_1\beta$gb en dehors des agrégats de géphyrine (voir fig. 5.16B). De plus, seule la diffusion des récepteurs ayant des coefficients de diffusion supérieur à 10^{-3} μm^2.s^{-1} est modifiée.

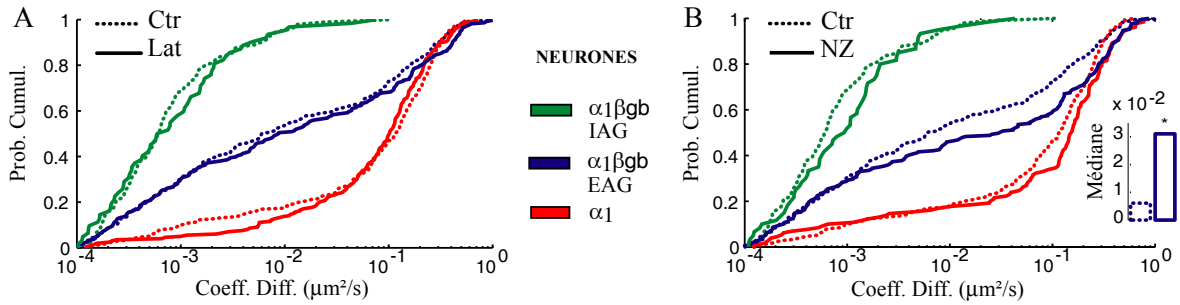

Figure 5.16 – *Comparaison des probabilités cumulées des coefficients de diffusion dans des neurones jeunes dans des conditions contrôle (Ctr) et après traitement : (A) à la latrunculine (Lat), (B) au nocodazole (NZ). Valeurs obtenues pour les RGly $\alpha_1\beta$gb IAG (vert, n_{Ctr}=91, n_{Lat}=62, n_{Nz}=60) et EAG (bleu, n_{Ctr}=332, n_{Lat}=218, n_{Nz}=209) et les RGly α_1 (rouge, n_{Ctr}=213, n_{Lat}=198, n_{Nz}=130). ks. test : seul les distributions des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG Ctr et NZ sont différentes (avec une p-value<0.01), (B, encart) Valeur médiane des D_{2-5} pour les RGly $\alpha_1\beta$gb EAG. Wilcoxon ranksum test pour l'égalité des médianes, * p-value<0.05*

Comparaison avec les neurones adultes

L'augmentation des coefficients de diffusion des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG lorsque les microtubules sont déstabilisés dans des neurones jeunes est parfaitement cohérente avec la stabilisation des récepteurs extrasynaptiques opérée principalement par les microtubules dans des neurones adultes [25]. De plus, étant donné que :

- d'une part les RGly α_1 (qui ne peuvent pas se lier à la géphyrine) ne sont pas affectés par la dépolymérisation des microtubules
- et que d'autre part nous avons montré précedemment qu'une grande portion des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG et des RGly extrasynaptiques sont liés à de la géphyrine,

alors nos résultats indiquent que le contrôle de la diffusion des RGly extrasynaptiques par les microtubules résulte d'interactions directes ou indirectes entre la géphyrine et les microtubules.

En revanche, contrairement aux RGly $\alpha_1\beta$gb IAG, la diffusion des récepteurs synaptiques est affectée par la dépolymerisation des filaments d'actine [25]. Cet effet a été observé dans des neurones de 10 DIV dans lesquels les filament d'actine appartiennent à un large réseau cortical particulièrement dense au niveau de la membrane post-synaptique [56]. Nos résultats suggèrent alors que, contrairement au cas des synapses inhibitrices, les microfilaments ne participe pas de manière prépondérante à la régulation de la taille et de la forme des agrégats de VeGe.

5.3.3.3 Résultats obtenus dans des cellules HeLa

Contrairement aux cas des neurones dans lesquels un seul traitement (celui au nocodazole) induit un changement de dynamique spécifique à un seul type de récepteur (les RGly $\alpha_1\beta$gb EAG), plusieurs modifications suite à l'application des drogues sont observées dans les cellules HeLa. Sur la figure 5.17, on peut voir que :

- les coefficients de diffusion des RGly α_1 sont significativement augmentés suite à l'application de latrunculine et de nocodazole,

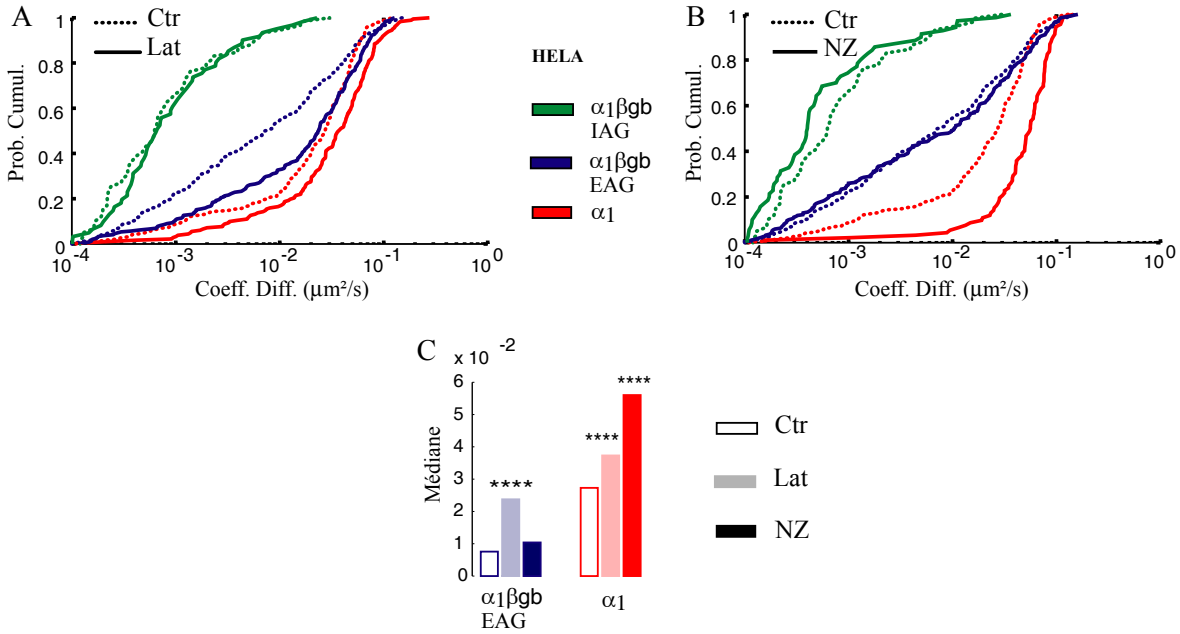

Figure 5.17 – *Comparaison des probabilités cumulées des coefficients de diffusion dans des cellules HeLa dans des conditions contrôle (Ctr) et après traitement : (A)à la latrunculine (Lat), (B) au nocodazole (NZ). Valeurs obtenues pour les RGly $\alpha_1\beta$gb IAG (vert, n_{Ctr}=59, n_{Lat}=61, n_{Nz}=70) et EAG (bleu, n_{Ctr}=279, n_{Lat}=245, n_{Nz}=269) et les RGly α_1 (rouge, n_{Ctr}=313, n_{Lat}=182, n_{Nz}=92). (C) Valeurs médianes des D_{2-5} pour les RGly $\alpha_1\beta$gb EAG et les RGly α_1. Wilcoxon ranksum test pour l'égalité des médianes par rapport au contrôle, **** p-value<10^{-4}*

– seule l'application de nocodazole modifie la distribution des coefficients de diffusion des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG.

L'absence d'effet spécifique rend l'interprétation de ces résultats difficile.

Toutefois, la comparaison relative des distributions obtenues pour les RGly α_1 et les RGly $\alpha_1\beta$gb EAG nous indique que le comportement du RGly $\alpha_1\beta$gb EAG se rapproche de celui du RGly α_1 après traitement à la latrunculine (voir fig. 5.17A). Cette observation suggère que, contrairement au cas des neurones, la diffusion latérale des RGly $\alpha_1\beta$gb EAG, dans les cellules HeLa, est principalement contrôlée par les filaments d'actine. Deux modes d'action peuvent être alors envisagés : soit via une interaction indirecte entre les filaments d'actine et la géphyrine, soit via une gène stérique engendrée par des molécules transmembranaires elles-mêmes stabilisées par les filaments d'actine. Ce résultat est en accord avec le modèle, proposé suite à des expériences de SPT dans des cellules non-neuronale, d'une membrane fluide divisée en plusieurs compartiments crées par le réseau sous-membranaire d'actine (voir section 1.1, [104,76]).

De manière plus générale, la divergence des résultats obtenus dans les cellules HeLa et les neurones montre que l'influence relative des éléments composant le cytosquelette dépend du type cellulaire et reflète vraisemblablement leurs différences d'organisation.

5.4 Quantification de l'équilibre dynamique entre les récepteurs intra- et extra-agrégats de géphyrine

Tous les résultats reportés dans cette section concernent les RGly $\alpha_1\beta$gb dans des cellules cotransfectées avec les sous-unités $\alpha_1\beta$gb et la VeGe.

5.4.1 Deux sous-populations de récepteurs intra-agrégats de géphyrine

Définissons et nommons désormais deux types de récepteurs (fig. 5.18A) en fonction de leur localisation sur toute la durée d'enregistrement (∼40s) :

- le GlyR "stable" qui reste au sein d'un même agrégat de géphyrine,
- le GlyR "voyageur" qui change de compartiment au cours de l'enregistrement, sa trajectoire étant composée de portions intra- et extra-agrégats de géphyrine.

Les récepteurs observés intra-agrégats de géphyrine sont à ≃60% des RGly "stables" (HeLa : 62%, neurones : 58%). Dans la section précédente (5.3), la trajectoire entière des RGly "stables" et une portion de trajectoire intra-agrégats de VeGe des RGly "voyageurs" avaient été utilisées conjointement pour caractériser la diffusion latérale globale du récepteur à l'intérieur des agrégats de VeGe. Jusqu'à présent, seules des raisons techniques, liées à la méthode d'analyse des trajectoires, nous avaient poussé à distinguer ces deux types de récepteurs. Or, ces deux types de récepteurs ne sont pas différents uniquement par définition mais correspondent à deux sous-populations de récepteurs aux propriétés de diffusion distinctes.

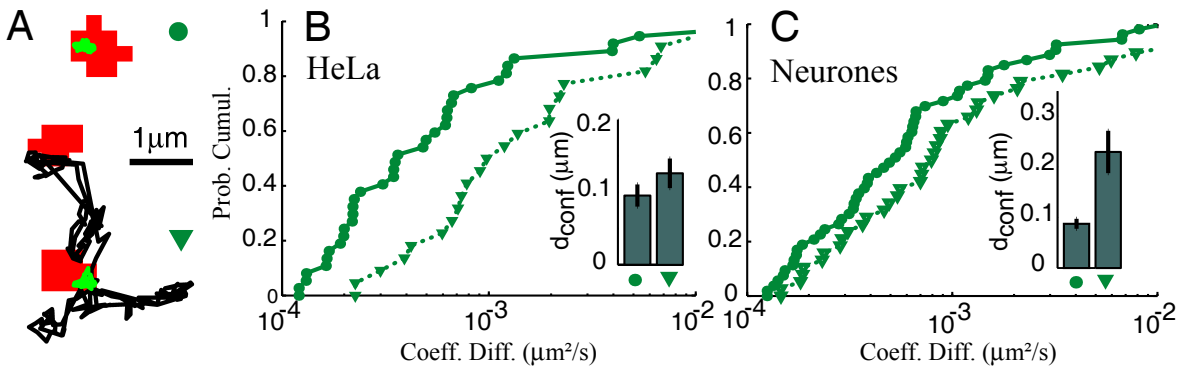

Figure 5.18 – *Identification de deux sous-populations de RGly intra-agrégats de géphyrine. (A) Exemples de trajectoires pour un RGly "stable" (en haut) et un "voyageur" (en bas). (B,C) Probabilités cumulées des coefficients de diffusion à l'intérieur des agrégats de VeGe pour les RGly "stables" (cercle) et "voyageurs" (triangle) dans des cellules HeLa (B) et dans des neurones jeunes (C). (Encarts) les barres verticales indiquent le diamètre de confinement (d_{conf}, moyenne±sem)*

Dans les cellules HeLa (fig. 5.18B) comme dans les neurones (fig. 5.18C), les RGly "stables" ont des coefficients de diffusion plus faibles et ils sont plus confinés que les RGly "voyageurs". En effet, si l'on compare les mesures effectuées sur ces deux types de trajectoires (en considérant leur(s) portion(s) à l'intérieur des agrégats de VeGe), on observe :

- des distributions de coefficients de diffusion significativement différentes (ks. test : cellules HeLa, p-value<0.01 ; neurones, p-value<0.05) avec des valeurs médianes plus faibles pour les RGly "stables"
- une plus grande proportion de récepteurs exhibant un mouvement confiné dans le cas des "stables" (cellules HeLa : 72% (n=37), neurones : 75% (n=53)) par rapport au cas des "voyageurs"(cellules HeLa : 27% (n=22), neurones : 39% (n=38))
- que les RGly "stables" confinés le sont, qui plus est, dans une zone plus petite

Au regard de ces résultats, ces deux sous-populations semblent refléter l'existence de plusieurs degrés de stabilisation, opérant sur des échelles de temps différentes (ici, supérieure et inférieure à 38.4s) et coexistant à l'intérieur des agrégats de géphyrine. Il est vraisemblable que ces divers degrés de stabilisation proviennent de différents états d'association avec la géphyrine.

L'existence de plusieurs types de récepteurs au sein d'un même compartiment de la membrane plasmique, et plus particulièrement au niveau des synapses, paraît être une caractéristique générale, commune aux récepteurs inhibiteur et excitateurs. D'autres études basées sur des expériences de suivi de particule unique avaient précédemment mené à faire une distinction entre récepteurs lents et rapides. Ainsi, $\simeq$80% des coefficients de diffusion mesurés pour des RGly synaptiques sont inférieurs à $0.01\mu m^2.s^{-1}$ [34] et la moitié des RGABA synaptiques diffusent plus lentement que $0.007\mu m^2.s^{-1}$ [147]. D'autres approches ont également permis d'établir l'existence de plusieurs sous-populations. Des expériences de FRAP indiquent ainsi qu'une grande proportion (>50%) des récepteurs du $GABA_A$ [65] et des RAMPA [4] sont immobiles à l'intérieur des synapses durant 15 minutes au moins. Des études, d'électrophysiologie combinée avec l'utilisation d'agents de blocage irréversible [150] ou avec de la photo-inactivation [1] des récepteurs, ont montré qu'une part significative des récepteurs NMDA (jusqu'à 35% sur 7 min) et des RAMPA sont stables aux synapses.

5.4.2 Propriétés cinétiques de l'équilibre IN⇌OUT

Toute cette section est basée sur l'étude de la localisation des récepteurs "voyageurs" au cours du temps. Chaque trajectoire (voir fig. 5.19) est considérée comme une succession d'états IN (i.e. IAG) et OUT (i.e. EAG) dont on peut extraire (voir partie 3.3) une séquence des temps de résidence correspondant : $\{t_{IN}{}^1, t_{OUT}{}^1, t_{IN}{}^2, t_{OUT}{}^2, ...\}$.

5.4.2.1 Temps de résidences t_{IN} et t_{OUT}

L'ensemble des séquences des temps t_{IN} et t_{OUT} obtenues à partir de toutes les trajectoires des RGly "voyageurs" donne les distributions des temps de résidences. L'ajustement de leurs probabilités cumulées nécessite d'utiliser des fonctions bi-exponentielles (voir fig. 5.20). La comparaison des deux courbes $C_{IN}(t)$ et $C_{OUT}(t)$, correspondant aux t_{IN} et t_{OUT}, donne : $C_{IN}(t) \geq C_{OUT}(t)$ pour tout temps t. Ainsi, la probabilité (donné par C_{IN}) pour un récepteur de sortir d'un agrégat de géphyrine dans lequel il se trouvait est plus grande que la probabilité (donné par C_{OUT}) pour un récepteur dans la membrane EAG de rentrer dans un agrégat.

Les résultats des calculs des valeurs moyennes, $\langle t_{IN} \rangle$ et $\langle t_{OUT} \rangle$, et de leurs écarts types sont donnés dans la table 5.2. Les valeurs moyennes permettent d'estimer la fraction du temps passée à l'intérieur des agrégats de géphyrine, F_{IN}, selon la relation 5.2. Les RGly "voyageurs" passent en moyenne 30% (HeLa), 35% (neurone) de leur temps dans l'état IN. Par ailleurs, les temps de résidences t_{IN} des RGly "stables", qui ne sont pas pris en compte ici, sont, par définition, supérieurs à la durée

d'enregistrement. Or cette durée, i.e 38.4s, vaut au moins 8 fois l'écart type mesuré sur les t_{IN} des RGly "voyageurs". Ceci indique que les distributions des temps de résidences IAG des deux types de récepteurs ne se recouvrent pas. Cette observation va dans le sens de l'existence de plusieurs comportements distincts en zone IAG et confirme l'existence des deux-sous populations précédemment décrites (voir 5.4.1).

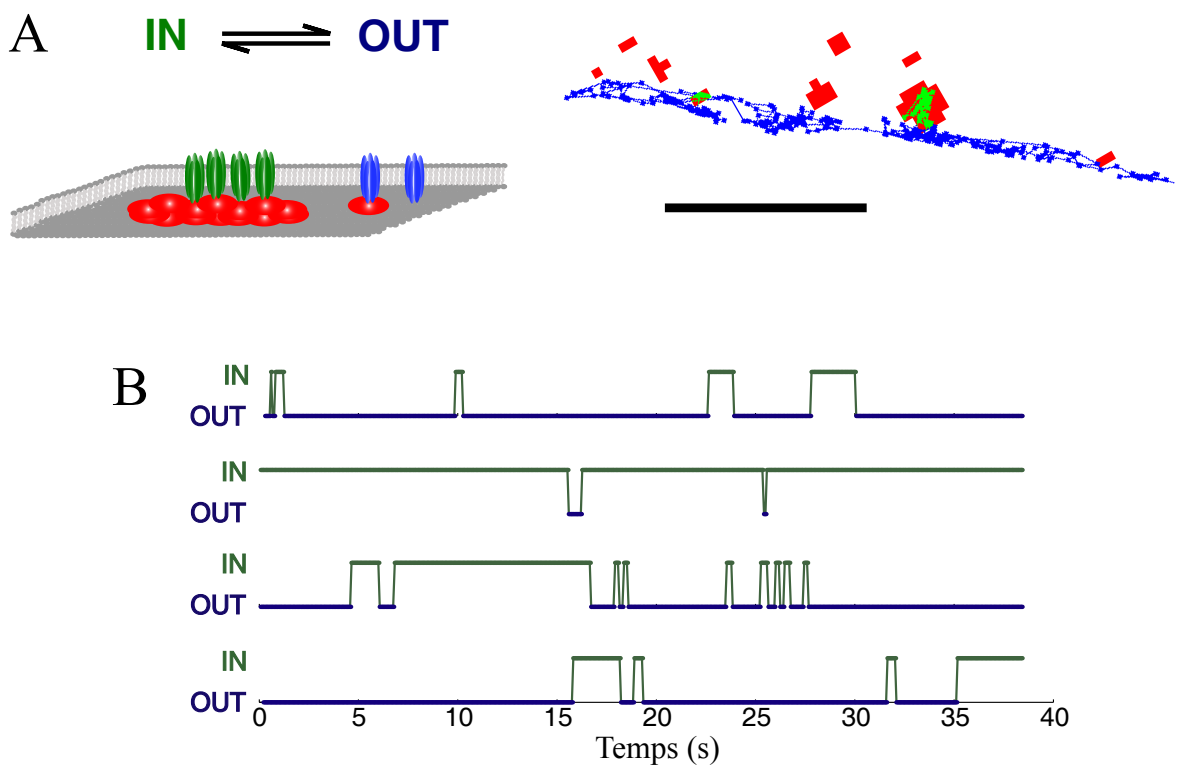

Figure 5.19 – *(A) Schéma de l'équilibre dynamique du RGly entre les zones IAG (RGly dans l'état IN) et EAG (dans l'état OUT) ; (à droite) exemple d'une trajectoire (dans la membrane neuronale) qui alterne entre les zones intra- (en vert) et extra-(en bleu) agrégats de géphyrine (en rouge). Barre=5µm. (B) Exemples de localisation (état IN ou OUT) en fonction du temps. Le premier tracé correspond à la trajectoire en (A).*

	t_{IN} (s)	t_{OUT} (s)	F_{IN}
Cellules HeLa	2.3±4.6	4.3±7.2	30%
Neurones	2.2±4.3	5.1±8.2	35%

Table 5.2 – *Moyenne±écart type des temps de résidence et fraction du temps passé dans l'état IN*

$$F_{IN} = \frac{\langle t_{IN} \rangle}{\langle t_{IN} \rangle + \langle t_{OUT} \rangle} \tag{5.2}$$

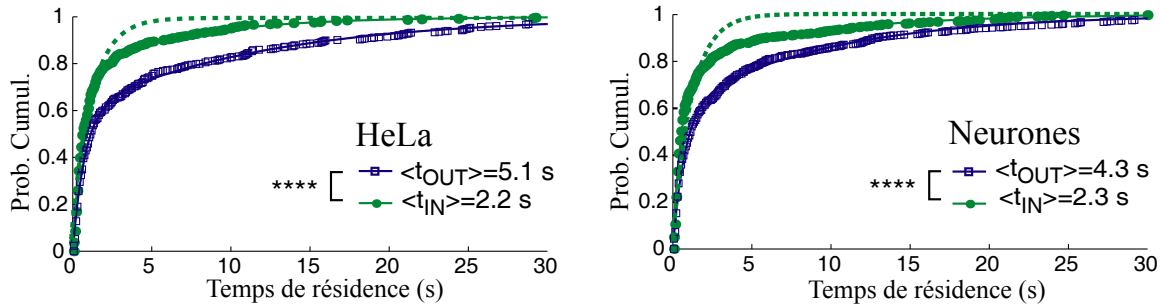

Figure 5.20 – *Comparaison des probabilités cumulées des temps t_{IN} (cercle vert) et t_{OUT} (carré bleu) dans des cellules HeLa (sur la gauche) et dans des neurones (sur la droite). Ces courbes sont bien ajustées par des fonctions bi-exponentielles (trait plein), non pas par une simple exponentielle (en pointillé, tracé pour t_{IN} uniquement).*

5.4.2.2 Proportion de récepteurs dans l'état IN

La proportion de récepteurs dans l'état IN ($P_{IN}(t)$) est calculée à chaque temps t sur l'ensemble des N films dont on dispose (N=39 et 45 dans les HeLa et neurones respectivement). C'est à dire que l'ensemble des enregistrements est considéré comme un seul film de même durée (38.4 s) mais de champs d'observation N fois plus grand. Sur la figure 5.21 sont représentées deux valeurs de $P_{IN}(t)$ selon les RGly pris en compte :

1. calculé uniquement sur les RGly "voyageur" i.e $\frac{\text{nombre de RGly "voyageurs" dans l'état IN}}{\text{nombre total de RGly "voyageurs"}}$
2. calculé sur l'ensemble des RGly i.e $\frac{\text{nombre de RGly dans l'état IN ("voyageurs"+"stables" IAG)}}{\text{nombre total de RGly ("voyageurs"+"stables" IAG et EAG)}}$

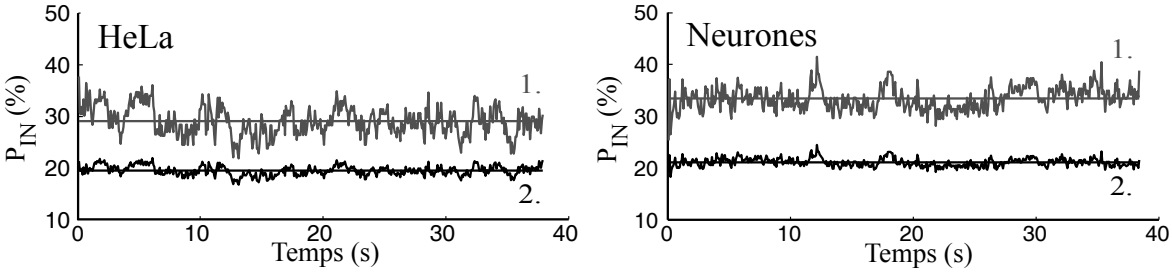

Figure 5.21 – *Proportion de RGly dans l'état IN au cours du temps, calculé uniquement sur les RGly "voyageurs" (1., gris), ou en prenant en compte tous les RGly (2., noir), dans des cellules HeLa (sur la gauche) et dans des neurones (sur la droite). (trait plein) valeur moyenne.*

Étant données ses faibles variations en fonction du temps (voir table 5.3), P_{IN} peut être considérée comme stationnaire. Ainsi, même si les récepteurs changent de localisation au cours du temps, les proportions de récepteurs dans chaque compartiment restent stables (au cours du temps) en moyenne (moyenne d'ensemble, on considère un ensemble de RGly). Il est alors fort probable que les échanges de récepteurs entre les compartiments IAG et EAG qui se produisent sur l'échelle de temps de nos expériences correspondent à un état stable de l'équilibre dynamique IN⇌OUT. Cette observation est en accord avec le modèle proposé dans [137]. Celui-ci est basé sur l'existence supposée d'un

quasi-équilibre thermodynamique au niveau de la membrane post-synaptique : une situation où des fluctuations microscopiques, i.e des échanges locaux, de molécules coexistent avec une stabilité synaptique au niveau mésoscopique. Des simulations numériques ont ensuite permis de montrer que, dans cet état de quasi-équilibre, une stabilisation réciproque des récepteurs et des protéines d'ancrage s'opère. Les valeurs de P_{IN} dans le cas 2. sont plus faibles que dans le cas 1. Cette différence provient du fait qu'il y a presque 6 fois plus de récepteurs observés tout le long de l'enregistrement dans la zone EAG que dans la zone IAG. Toutefois, on ne peut pas conclure sur la réalité biologique de cette répartition des RGly. En effet, la technique de marquage des RGly ne semble pas favoriser le marquage des RGly IAG : une fois qu'un RGly est marqué au sein d'un agrégat, il est peu probable qu'un deuxième RGly le soit dans le même agrégat pour des raisons d'encombrement stérique dans la partie extracellulaire, provenant de la présence des QDots. Étant donné que ce biais n'est pas quantifié, on se contente d'utiliser les valeurs de P_{IN} calculées sur un seul type de population que sont les RGly "voyageurs".

	HeLa	Neurone
P_{IN}(%), CV(%) 1.	29.1±2.8, 9.6	33.4±2.2, 6.6
P_{IN}(%), CV(%) 2.	19.6±0.9, 4.6	21.1±0.8, 3.8

Table 5.3 – *Proportions de RGly dans l'état IN : Moyenne±écart type, coefficient de variation (CV=écart type/moyenne)*

Pour estimer l'énergie d'association des RGly avec les agrégats de géphyrine, on réalise une modélisation simple du système, basée sur les hypothèses suivantes :

- un récepteur diffuse dans un potentiel U qui prend les valeurs 0 et U_0, à l'extérieur et à l'intérieur des agrégats de géphyrine respectivement (voir fig. 5.22),
- l'équilibre dynamique IN⇌OUT est dans un état d'équilibre thermodynamique.

P_{IN} peut alors être exprimée comme suit :

$$P_{\text{IN}} = \frac{\alpha.\exp(-U_0/k_BT)}{1-\alpha+\alpha.\exp(-U_0/k_BT)} \tag{5.3}$$

où α est la fraction de membrane occupée par des agrégats de géphyrine, T la température et k_B la constante de Boltzmann. Une mesure de α effectuée sur n=20 cellules donne en moyenne (±sem), α=5.6±0.6% et 7.9±0.5% dans les cellules HeLa et les neurones respectivement. En utilisant P_{IN} calculée dans le cas 2., U_0 estimé est de l'ordre de -2kT et -1.8kT dans les cellules HeLa et les neurones respectivement. Ainsi, la hauteur, vue par les RGly "voyageurs", des puits de potentiels formés par les agrégats de géphyrine est à peine plus grande que l'énergie thermique.

5.4.2.3 Comparaison des deux approches et discussion

L'approche utilisée pour obtenir la fraction du temps passée dans l'état IN est basée sur des moyennes temporelles tandis que la mesure de la proportion de récepteurs dans l'état IN repose sur des moyennes d'ensemble. En considérant dans les deux cas les RGly "voyageurs", les valeurs trouvées sont très proches : F_{IN}≃P_{IN}≃30% et 35% dans les cellules HeLa et les neurones respectivement. Ainsi, paradoxalement, les expériences de suivi de particules uniques et même le suivi d'une seule particule pendant un temps assez long peut permettre d'évaluer des propriétés caractéristiques

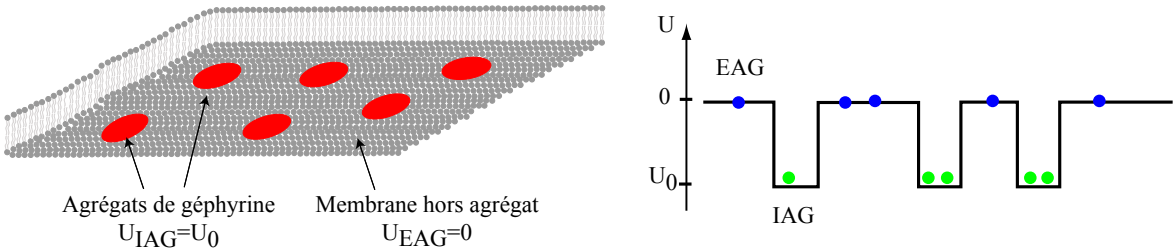

Figure 5.22 – *(à gauche) Modèle simplifié de la membrane, séparée en deux zones en fonction de la présence d'agrégats de géphyrine (en rouge). (à droite) Modèle du potentiel U de la membrane, traduisant les interactions du récepteur avec les agrégats de géphyrine. U vaut 0 et U_0 à l'intérieur et à l'extérieur des agrégats de géphyrine respectivement.*

d'une population entière. Par exemple, dans notre cas, l'estimation de F_{IN} aurait suffit à estimer le rapport des densités de récepteurs à l'intérieur (d_{IN}) et à l'extérieur (d_{OUT}) des agrégats de géphyrine. En effet,

$$P_{IN} \simeq F_{IN}, \qquad \frac{d_{IN}}{d_{OUT}} = \frac{P_{IN}.(1-\alpha)}{\alpha.(1-P_{IN})}.$$

La densité de RGly "voyageurs" à l'intérieur des agrégats de géphyrine est environ 7 et 6 fois plus importante que leur densité dans la membrane extra-agrégats, dans les cellules HeLa et les neurones respectivement. Les valeurs des densités et même du nombre de récepteurs dans les membranes synaptique et extrasynaptique sont couramment obtenues à partir de données électrophysiologiques (références dans [67]) ou encore de mesures de masse par microscopie électronique [27]. Toutefois, ces méthodes caractérisent l'ensemble des récepteurs situés dans la membrane post-synaptique ou extrasynaptique. La description quantitative et complète de la membrane post-synaptique se fera certainement grâce à la combinaison de ces techniques avec des expériences de suivi de particules uniques (pour étudier des sous-populations de récepteurs (comme, ici, les RGly "voyageurs")). Ainsi, les grandeurs totales et partielles seront accessibles.

Par ailleurs, les valeurs mesurées dans cellules HeLa et dans les neurones sont très proches. Ceci semble indiquer que les caractéristiques de l'équilibre IN⇌OUT ne dépendent pas du type de cellule dans lequel il se produit.

5.5 Conclusion

Le travail présenté dans cette partie, basé sur des techniques de suivi de particules uniques combinées avec des transfections de RGly aux propriétés distinctes, a permis de révéler l'existence de plusieurs états d'association entre le RGly et la géphyrine. Nous avons identifié deux sous-populations de récepteurs en zone EAG (voir 5.3.2) et deux autres en zones IAG (voir 5.4.1). Ces résultats indiquent que l'équilibre globale IN⇄OUT provient de la combinaison de plusieurs sous-équilibres. Une vue simple de son schéma cinétique est représentée sur la figure 5.23. L'association que nous avons observée du RGly avec la géphyrine hors agrégats de géphyrine peut avoir plusieurs origines. Le RGly et la géphyrine sont susceptibles :

– d'être pré-assemblés dès leur transport vers la membrane plasmique [59],

- d'atteindre la surface séparément et de s'associer une fois insérés dans la membrane extra-agrégats de géphyrine (réaction k_1),
- de sortir conjointement d'un agrégat de géphyrine (réaction k_2).

De plus, l'entrée et la sortie du RGly d'un agrégat de géphyrine peuvent se faire via des interactions réversibles de type récepteur-géphyrine (réaction k_3 et k_4) ou de type géphyrine-géphyrine (réaction k_{-2}). Finalement, une fois capturés dans un agrégat de géphyrine, les récepteurs peuvent atteindre un niveau de stabilisation plus élevé (réaction k_5) qui pourrait provenir, par exemple, d'une agrégation avec d'autres récepteurs déjà capturés.

De manière plus générale, aller sonder les interactions moléculaires directement dans des cellules vivantes est un challenge actuel important [166]. En effet, les études faites *in vitro* ne permettent pas de prendre en compte, entre autres : la nature bi-dimensionnelle des membranes et les propriétés biochimiques et biophysiques qui en découlent ; les inhomogénéités de concentration des protéines ; les interaction parasites avec d'autres molécules (comme les lipides). Compléter les mesures faites dans des tubes à essai par des mesures *in situ* apparaît être l'évolution logique de la chimie du vivant. Les avancés techniques, permettant des études au niveau de la molécule individuelle, rendent désormais possible l'analyse de réactions biochimiques dans les cellules vivantes. Nos expériences s'insèrent dans cette mouvance et dévoilent la puissance du suivi de particules uniques pour discriminer et quantifier des comportements biologiques complexes.

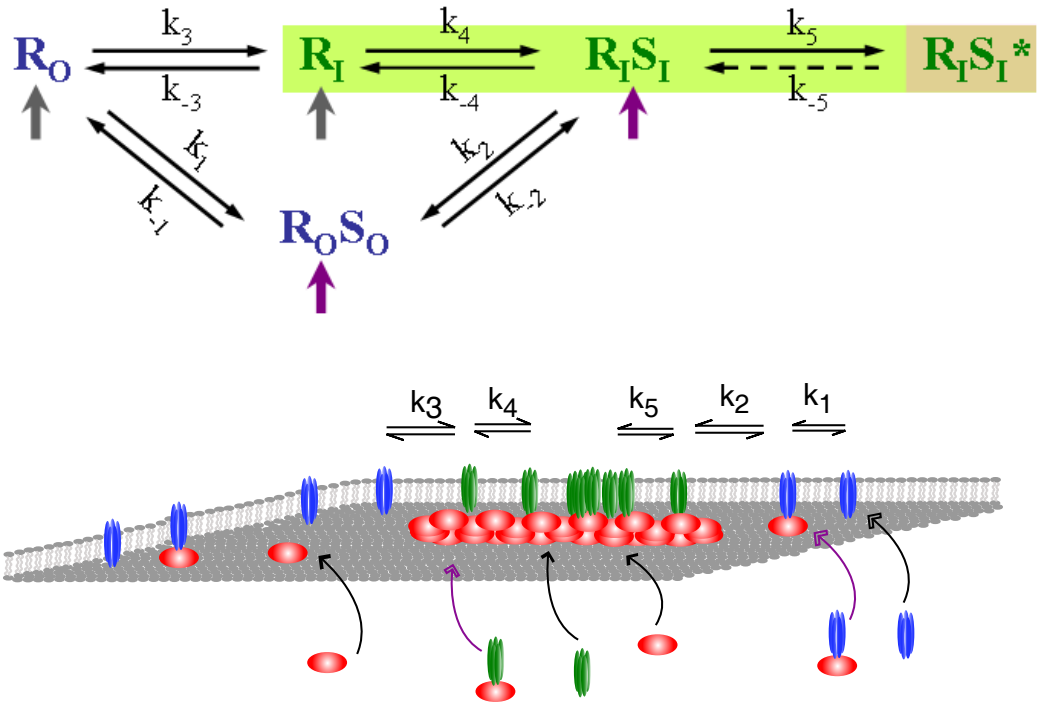

Figure 5.23 – *Vues schématiques des différents équilibres menant à la stabilisation des RGly par les agrégats de géphyrine. Le récepteur (R) et sa protéine d'ancrage (S) peuvent être pré-assemblés avant leur insertion dans la membrane (flèche violette) ou non (flèche grise). Les complexes RGly-géphyrine (RS) sont formés dans les zones EAG (équilibre 1) ou IAG (équilibre 4). Des échanges de récepteurs seuls (équilibre 3) ou de complexes RGly-géphyrine (équilibre 2) peuvent avoir lieu entre les zones IAG (suffixe I pour IN) et EAG (suffixe 0 pour OUT). Une fois à l'intérieur d'un agrégat de géphyrine, les complexes RGly-géphyrine peuvent atteindre une forme de stabilisation plus élevée (équilibre 5, *). Sur le schéma du bas, la géphyrine est représentée en rouge, les récepteurs IAG et EAG en vert et bleu respectivement. Les flèches courbes indiquent des transports du compartiment intracellulaire vers la membrane.*

Chapitre 6

Conclusion et perspectives

6.1 Conclusion

Nos expériences biologiques ont porté sur l'étude de la dynamique du récepteur de la glycine dans le plan de la membrane plasmique neuronale. Dans le chapitre 4, nous avons examiné le rôle du cytosquelette dans la diffusion membranaire du RGly au sein de neurones matures. Les résultats obtenus indiquent que le cytosquelette agit sur le nombre de récepteurs aux synapses en régulant leur diffusion latérale. De plus, cette étude a illustré le fait que de nombreux facteurs peuvent participer à la stabilité ou au déplacement de l'équilibre entre récepteurs synaptiques et extrasynaptiques. La géphyrine, protéine d'ancrage du RGly, est un des éléments clés de la stabilisation du RGly aux synapses. Nous avons alors examiné spécifiquement l'interaction entre le RGly et la géphyrine. Dans le chapitre 5, nous avons présenté une caractérisation de l'équilibre entre les RGly au sein d'agrégats de géphyrine et les RGly en dehors. Ceci a été possible grâce à l'utilisation de systèmes cellulaires plus simples que des neurones matures (des cellules non-neuronales et des neurones jeunes, avant la formation des synapses) et grâce au suivi de deux types de récepteurs exogènes dont les propriétés d'interaction avec la géphyrine sont connues (pourvus ou dépourvus du site de liaison). Ces systèmes d'étude modèles ont permis de s'affranchir de bon nombre d'éléments pouvant perturber notre caractérisation et de se concentrer spécifiquement sur l'influence de la géphyrine. Les données obtenues ont montré : (1) qu'une fraction importante des récepteurs hors agrégats est liée à de la géphyrine, (2) que l'influence du cytosquelette sur la dynamique des récepteurs extrasynaptiques est liée à l'association du RGly avec la géphyrine, (3) qu'au moins deux sous-populations de récepteurs, ayant différents états d'associations avec la géphyrine, coexistent au sein des agrégats de géphyrine. Ces résultats ont indiqué, qu'en plus des interactions de type récepteur-géphyrine, les interactions géphyrine-géphyrine doivent être considérées lors de la stabilisation du RGly aux synapses.

Ces travaux ont permis d'illustrer les capacités de l'imagerie de fluorescence à l'échelle de la molécule unique sur cellules vivantes. En effet, les quantifications de phénomènes dynamiques qui ont été obtenues nécessitaient une étude au niveau de la molécule unique. Des mesures d'ensemble ne sont pas appropriées pour différencier et caractériser plusieurs types de population et ne permettent qu'une étude globale de la localisation de molécules. Par ailleurs, du fait de la nature stochastique des processus biologiques, il convient non seulement de suivre les protéines membranaires au niveau individuel mais également de disposer de trajectoires longues et nombreuses. Pour mesurer précisément les propriétés de diffusion d'une protéine et/ou pour la voir changer de localisation, il faut la suivre sur des temps suffisamment longs. Pour faire la distinction entre différentes populations, dont les caractéristiques ne sont pas piquées, il faut disposer d'un grand nombre de trajectoires. Ainsi, c'est l'utilisation de nanocristaux semiconducteurs qui nous a permis d'obtenir les résultats biologiques que nous avons présentés.

Les propriétés des nanocristaux semiconducteurs ont été exposées dans le chapitre 2. Nous avons

montré qu'ils permettent de combiner les avantages des sondes fluorescentes (petite taille et bonne qualité des propriétés spectrales) avec une grande photostabilité et un très bon rapport signal à bruit. Mes contributions quant à l'utilisation de ces sondes ont concerné le calibrage de leurs propriétés d'émission dans nos conditions expérimentales et l'étude de l'unicité du marquage. Ainsi, nous avons montré que les nanocristaux sont détectés avec un rapport signal à bruit compris entre 10 et 20 et nous avons quantifié leur clignotement. De plus, nous avons souligné la difficulté à connaître la stoechiométrie des couplages réalisés et les efforts qui ont été fait pour favoriser un marquage de rapport 1 :1.

Les méthodes mises en place pour l'obtention des trajectoires et leur analyse ont été détaillées au chapitre 3. Nous avons montré que le grand nombre de photons émis par les nanocristaux permet de les détecter avec une précision spatiale de pointé inférieure au dixième de pixel. Nous avons exposé les difficultés engendrées par le clignotement des nanocristaux et les techniques développées pour les pallier. Tous les outils indiqués dans ce chapitre ont été regroupés au sein de logiciels pour une utilisation pratique par des biologistes. Le logiciel de suivi est particulièrement adapté au suivi de nanocristaux mais il convient également pour suivre tout objet qui peut être assimilé à un émetteur ponctuel. Le logiciel d'analyse est quant à lui spécifiquement destiné à l'étude de la dynamique du RGly dans la membrane neuronale. Toutefois, il pourrait être généralisé à toute étude du mouvement d'éléments qui diffusent dans une membrane (en 2D).

6.2 Perspectives

6.2.1 Travaux en cours

Optimisation des méthodes de marquage avec des nanocristaux

La stoechiométrie et l'encombrement stérique sont les deux aspects clés à optimiser lors du développement d'une stratégie de marquage de biomolécules à l'aide de nanocristaux. Une stoechiométrie 1 :1 avec une taille minimale de la sonde est l'idéal à atteindre. Pour ce faire, il faudrait disposer d'une part d'un épitope unique sur la biomolécule et d'autre part d'un seul site de reconnaissance présent sur le QDot, avec une taille de QDot fonctionnel la plus petite possible.

Concernant le suivi de molécules endogènes, nos méthodes de couplage sont basées sur l'utilisation d'anticorps, ceux-ci permettant d'obtenir une reconnaissance spécifique de la biomolécule. Pour améliorer la stoechiométrie de couplage entre les molécules sondées et les nanocristaux, il faudrait alors approfondir les stratégies que nous avons déjà employées (voir page 52) : (1) aller vers l'utilisation de fragment Fab uniquement, pour s'affranchir de la bivalence des anticorps complets, (2) effectuer des pré-couplages entre nanocristaux et anticorps en réduisant au maximum le nombre d'anticorps par nanocristal.

Pour l'étude de molécules exogènes, une autre stratégie est actuellement développée au sein de l'équipe Optique et Biologie, en collaboration avec le laboratoire Ciblage et Auto-Assemblages Fonctionnels à Rennes. Elle requiert d'une part l'insertion d'un épitope unique (tels un Myc-tag ou un His-tag) dans une biomolécule exogène, et d'autre part une fonctionnalisation spécifique des nanocristaux. Ceux-ci sont recouverts par des peptides qui disposent de groupements NTA (acide nitriloacétique) au niveau de leur extrémité. Ces derniers permettent ensuite de lier spécifiquement des molécules comprenant un épitope polyhistidine (His-tag) en présence de nickel. L'avantage de cette méthode est qu'elle devrait permettre de réduire la taille de la sonde (la taille du QDot ainsi fonc-

tionnalisé est plus petite qu'un ensemble QDot-anticorps). De plus, il est envisagé d'optimiser la stoechiométrie de ce type de couplage en réduisant au maximum le nombre de sites de reconnaissance présents sur un QDot.

Nouvelle méthode de suivi

L'algorithme de suivi présenté dans ce manuscrit permet de reconstruire des trajectoires malgré des disparitions des objets suivis, dues au clignotement des nanocristaux. Il permet d'obtenir des résultats très satisfaisants mais ceci au prix d'une étape de post-traitement manuel assez longue. Une nouvelle méthode a alors été développée. Contrairement à l'approche précédente qui procède à une analyse image par image, la séquence d'images de fluorescence est interprétée comme une image 3D dans un espace spatiotemporel. Or le système visuel humain, capable de repérer et de suivre des particules fluorescentes dans une régime pour lequel aucun algorithme de suivi n'est efficace (faible niveau de signal et grande densité d'objets en mouvement), procède également par intégration spatiotemporelle des stimuli visuels [97]. Ainsi, cette nouvelle technique est *a priori* plus robuste et plus efficace. Qui plus est, elle présente l'avantage de conduire aux mêmes trajectoires par inversion de l'échelle des temps.

Ce nouvel algorithme comporte trois étapes pour suivre automatiquement des objets ponctuels visibles par intermittence (voir [9, 11]) : (1) une étape de détection, identique à celle détaillée dans ce manuscrit ; (2) une étape d'association basée sur l'utilisation de chemins minimaux dans un espace spatiotemporel, ceux-ci permettent d'une part de déterminer quels spots doivent être reliés entre eux et d'autre part, d'estimer la trajectoire d'un objet non-détecté sur plusieurs images successives ; (3) une étape de post-traitement qui permet d'effectuer une correction automatique en rejetant d'éventuelles fausses détections et de localiser les spots réels avec une grande précision.

Cet algorithme a été développé dans un premier temps en langage Matlab puis en C^{++}. Les temps de calcul sont alors significativement réduits (de l'ordre de la minute pour un film de 512 images de 100*100 pixels). Par ailleurs, il est désormais en accès libre via internet[1].

Dynamique du récepteur de la glycine

De nombreux éléments peuvent être impliqués dans la régulation de la dynamique du récepteur de la glycine. Savoir vers quels éléments se tourner en premier peut être assimilé au fait de trouver le moyen le plus rapide d'assembler les différentes pièces d'un puzzle. Suite aux travaux menés sur l'influence du cytosquelette sur la dynamique du RGly, les prochaines études vont s'attacher à identifier le mode d'action des éléments du cytosquelette. Les expériences en cours[2] concernent l'identification du rôle tenu par les integrines. Ces protéines sont impliquées d'une part dans la jonction entre les éléments pré- et post-synaptique, et d'autre part dans la régulation des filaments d'actine.

Mesure de l'orientation de molécules uniques à l'aide de nanocristaux

Analyser la rotation de récepteurs uniques pourrait permettre d'obtenir des informations sur la nature des interactions se produisant au cours de leur déplacement dans les membranes. En particulier, l'analyse simultanée de la diffusion latérale et rotationnelle pourrait permettre de faire la distinction entre des interactions stériques et des interactions spécifiques : des effets de gène stérique n'affecteraient pas la rotation de la molécule mais ralentiraient sa diffusion latérale ; au contraire, des in-

[1] Sur le site http ://www.lkb.ens.fr/recherche/optetbio/tools/sinema/

[2] Menées par C. Charrier au Laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse

teractions spécifiques diminueraient voire bloqueraient sa rotation. Dans le cadre de l'étude de la dynamique du RGly, ce type d'approche pourrait, par exemple, donner accès à la nature des interactions entre les récepteurs et les éléments du cytosquelette, ou encore entre récepteurs et protéines d'ancrages.

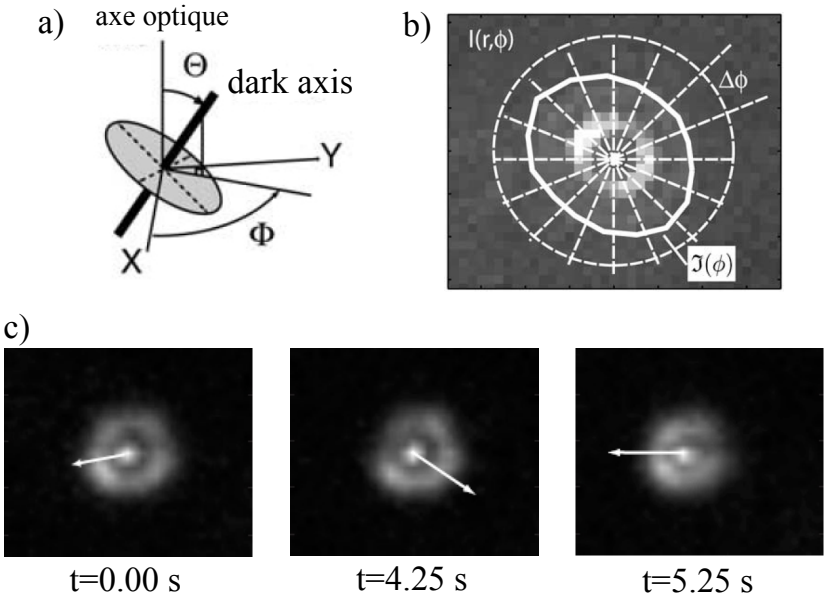

Figure 6.1 – *Microscopie défocalisée. (a) L'orientation d'un dipôle dégénéré est repérée par la normale au plan d'oscillation des charges, appelée "dark axis". (b) La distribution azimuthale d'intensité* $\gimel(\phi)$ *de la tache de diffraction donne la mesure de l'orientation* (Θ,Φ) *du nanocristal. (c) Exemple de la dynamique orientationelle d'un nanocristal couplé à un récepteur de la glycine. La flèche représente la direction de l'extrémité de l'axe du nanocristal. Images extraites de [19,16].*

La mesure de l'orientation 3D d'une molécule donne accès à sa dynamique rotationnelle. Les nanocristaux de CdSe possèdent un dipôle émetteur de type dégénéré [45,30]. Cette propriété a été exploitée et a conduit à concevoir deux méthodes pour mesurer l'orientation 3D des nanocristaux. La première méthode relève des techniques de microscopie de polarisation [30] tandis que la seconde procède par la mesure de la distribution d'intensité de l'image obtenue après défocalisation [19] (voir fig. 6.1). Signalons que la microscopie défocalisée a très récemment permis d'observer des changements d'orientation de nanocristaux couplés à de la myosin V (un moteur moléculaire), *in vitro* [19,149].

Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients. Principalement, la microscopie de polarisation nécessite un montage particulier, tandis que la seconde peut être appliquée directement sur un montage de microscopie classique. En revanche, la méthode par imagerie défocalisée demande un développement conséquent au niveau du traitement des images pour obtenir l'orientation à partir du profil d'intensité, alors que les seuls traitements dans le cas de la microscopie de polarisation consistent en des sommes et soustractions d'images. Dans un premier temps, il est envisagé de comparer les précisions que ces deux méthodes permettent d'obtenir quant à la mesure de la dynamique latérale et de rotation de molécules uniques.

6.2.2 Perspective à terme

Du fait de leurs propriétés spectrales remarquables , différents nanocristaux, émettant à des longueurs d'onde bien séparées, peuvent être excités simultanément. Ainsi, ce sont des sondes particulièrement adaptées à une imagerie multi-couleurs. Par ailleurs, grâce aux progrès réalisés dans les techniques de couplage et concernant la manipulation de cellules vivantes, il est possible d'utiliser les nanocristaux pour suivre le mouvement de protéines cytoplasmiques [31]. Pour ces raisons, il est envisageable d'observer simultanément plusieurs protéines membranaires et/ou cytoplasmiques.

De plus, la combinaison de plusieurs techniques d'imagerie, comme la microscopie de fluorescence simple ou avec une illumination structurée, la microscopie défocalisée et le FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), permettrait d'étudier le mouvement de toutes les molécules marquées et leurs interactions éventuelles.

Finalement, les améliorations des techniques de biochimie, d'instrumentation et d'informatique permettent d'envisager à terme la visualisation, en temps réel, de nombreux processus biologiques et/ou d'une multitude d'acteurs impliqués dans un même processus, au sein de cellules vivantes. Ceci pourrait alors constituer un pas décisif vers la compréhension globale du fonctionnement dynamique des cellules.

Annexes

Liste de publications

- M.-V. Ehrensperger, C. Hanus, C. Vannier, A. Triller and M. Dahan. Multiple association states between glycine receptors and gephyrin identified by SPT analysis. Accepté pour publication dans *Biophysical Journal*.

- C. Charrier, M.-V. Ehrensperger, M. Dahan, S. Lévi and A. Triller. Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane. *Journal of Neuroscience*, 26 :8502-8511, 2006.

- C. Hanus, M.-V. Ehrensperger and A. Triller. Activity-dependent movements of postsynaptic scaffolds at inhibitory synapses.*Journal of Neuroscience*, 26 :4586-4595, 2006.

- X. Brokmann, M.-V. Ehrensperger, J.-P. Hermier, A. Triller and M. Dahan. Orientation imaging and tracking of single CdSe nanocrystals by defocused microscopy. *Chemical Physics Letters*, 406 :210-214, 2005.

- S. Courty, C. Bouzigues, C. Luccardini, M.-V. Ehrensperger, S. Bonneau and Maxime Dahan. Tracking Individual Proteins in Living Cells Using Single Quantum Dot Imaging. *Methods in Enzymology*, 414 :211-228, 2006.

- S. Courty, M. Zevenbergen, C. Bouzigues, M.-V. Ehrensperger, C. Luccardini, A. Sittner, S. Bonneau and M. Dahan. Single quantum dot imaging in live cells :toward a cellular GPS. *Proceedings of SPIE "Colloidal Quantum Dots for Biomedical Applications"*, Editors : Marek Osinski, Kenji Yamamoto, Thomas M. Jovin, 6096 :147-153, 2006.

Quelques protocoles

Cellules HeLa : Entretien de la lignée et dépôt sur lamelle

Composition du milieu : DMEM High glucose 4,5g/L (Sigma D6429), glutamine 2mM, Pen/Strepto 1/200, SVF (PAA "Gold", décomplémenté) 10%.
Soit pour 50mL de milieu : (500 μL glutamine + 250 μL antibiotiques + 5mL SVF PAA) dans 44.25 mL DMEM High glucose (4.5g/L)

Repiquage des cellules tous les 2-3 jours avec une dilution de 1/3 à 1/5. Il ne faut pas laisser les cellules être à confluence. Ne jamais dépasser 20 à 30 repiquages. Protocole de repiquage :

1. rincer les cellules 1 ou 2 fois avec du PBS-1X (stérile)
2. mettre 1 ml de trypsine et mettre les cellules dans l'incubateur environ 2 minutes (jusqu'à ce qu'elles soient bien "rondes")
3. taper énergiquement sur les boites et vérifier que les cellules sont bien décollées
4. mettre 9 ml de milieu M2 pour arrêter l'action de la trypsine
5. faire la dilution et mettre dans des nouvelles boites

Pour faire un dépôt sur lamelle (dit *plating*) :

1. centrifuger les cellules en solution pendant 10 min à 1000t/min
2. resuspendre le culot dans 1ml de milieu
3. compter les cellules sur Malassez (1 carré= 10^5 cellules/ml)
4. faire les dilutions nécessaire
5. placer les cellules dans les boites où des lamelles ont été placées préalablement (sans coating)

Une boite de 60mm peut contenir 5 lamelles de 18mm de diamètre. Une boite de 35mm peut contenir 5 lamelles de 12 mm de diamètre. Il faut placer 2, 4 et 10 ml respectivement dans des boites de 35, 60 et 100 mm. Pour des expériences le lendemain et le surlendemain du *plating* respectivement, placer environ 2.5-3.10^5 et 1.0-1.5.10^5 cellules par boite de 60 mm.

Milieu pour la vidéomicroscopie = "MEM air" contenant 10% de SVF (PAA Gold). Composition du "MEM air" : pour 50 ml final, (1ml d'Hepes 1M (20mM final) + 500 μL glutamine (2mM final) + 2.5 mL de glucose 1x (6g/L)) dans 46 ml de MEM (Sigma).

Cellules HeLa : Transfection

Agent de trasfection : Fugene 6 (Roche Diagnostics)
Milieu de transfection (TM) : DMEM High glucose + Glutamine (2mM = 1/100)
L'ADN et le fugene sont dilués dans du PBS.

1. changer le milieu de culture par du milieu de transfection à 37°C, mettre 1.5ml de TM par boite de 60mm ou 0.75 ml de TM par boite de 35mm. Conserver le milieu d'origine dans l'incubateur
2. préparer les tubes de transfection (d'abord l'ADN puis le fugene) :
   - préparer 20μl (10μl pour 35mm) d'ADN par boite à 0.1 μg/μl total
   - préparer le fugene à 1/30 final (soit 6 μl de fugene dans 160 μl de PBS par boite)
   - mettre la solution de fugene dans la solution contenant l'ADN et mélanger 10 fois
3. attendre 20 min (pour que le fugène et l'ADN réagissent)
4. ajouter le mélange (ADN+fugène) dans les boites contenant les cellules
5. remettre les boites dans l'incubateur (37°C, 5% CO_2) pendant 3 à 5 heures
6. remettre le milieu d'origine

Résumé des proportions :
- par boite de 60 mm - 180 μl de (ADN+ fugene) dans 1.5 mL de TM,
- par boite de 35 mm - 90 μl de (ADN+fugene) dans 0.75 mL de TM.

Exemple pour une cotransfection de deux espèces A et B, dans une boite de 60mm : pour 180 μl d'(ADN+fugene), on prépare un tube contenant 20 μl d'ADN à 0.1 μg/μl soit 1μg d'ADN de l'espèce A et 1 μg d'ADN de l'espèce B, et un tube contenant 6 μl de fugene dans 154 μl de PBS.

Neurones : Transfection

Transfection sur neurones de 2 ou 3 DIV, expérience le lendemain.
Agent de transfection : Lipofectamine 2000 Invitrogen cat 11668-027 (Life Technologies)
Milieu de transfection (TM) : neurobasal + 2mM (1/100) glutamine + 1mM (1/100) NaPyruvate. L'ADN et la lipofectamine sont dilués dans le TM.

1. Mettre le milieu de transfection à 37°C
2. préparer les tubes de transfection (d'abord l'ADN puis la lipofectamine) :
   - rincer les tubes avec du TM
   - préparer 50μl d'ADN par puit à 2μg/puit
   - préparer la lipofectamine à 1/10 (soit 5 μl de lipofectamine dans 45 μl de TM par puit)
   - mettre la solution de lipofectamine dans la solution contenant l'ADN et mélanger 10 fois
3. attendre 20 min (pour que la lipofectamine et l'ADN réagissent)
4. à 37°C, transférer les lamelles dans des nouveaux puits contenant 500μl de TM par puit. Conserver les boites contenant le milieu d'origine dans l'incubateur
5. ajouter le mélange (ADN+fugène) dans les puits contenant les cellules (100μl par puit)
6. remettre les boites dans l'incubateur (37°C, 5% CO_2) pendant 45 min
7. à 37°C, rincer les puits avec 1ml de TM
8. remettre le milieu d'origine

Résumé des proportions : 100 μl par puit (boite de 12 puits), moitié ADN/ moitié Lipofectamine, 2 μg d'ADN par puit, lipofectamine diluée au 1/10.
Exemple pour une cotransfection de deux espèces A et B, dans un puit d'une boite de 12 puits : pour 100 μl d'(ADN+lipofectamine), on prépare un tube contenant 50 μl d'ADN à 2 μg/puit soit 1μg d'ADN de l'espèce A et 1 μg d'ADN de l'espèce B, et un tube contenant 50 μl de lipofectamine dans 45 μl de TM.

Immunnocytochimie

Concentration : de manière générale, on utilise les anticorps primaires et secondaires à une concentration de 1 ou 2 μg /ml avec une équivalence 1mg/mL $\Leftrightarrow$ 6M.

Immunocytochimie classique : fixation avant marquage
Toutes les incubations sont effectuées à température ambiante.

- 2 rinçages PBS
- fixation PAF 4% pendant 15 min
- 2 rinçages PBS (si on veut conserver les cellules à ce stade, faire 4 rinçages PBS et mettre à 4°C, éventuellement avec du PBS azide)
- NH_4Cl, 50mM, pendant 20 min
- 1 rinçage PBS
- saturation des sites dans PBS gélatine 0.25% pendant 30min
- mettre les lamelles sur une plaque dans 1 goutte de PBS gelatine 0.125%
- incubation de l'anticorps primaire (dilué dans PBS gélatine 0.125%) pendant 60 min
- 1 rinçage rapide puis 4 rinçages de 7 min PBS gélatine 0.125%
- incubation de l'anticorps secondaire (dilué dans PBS gélatine 0.125%) pendant 50 min
- 1 rinçage rapide puis 2 rinçage de 5 min dans PBS gélatine 0.125%
- 3 rinçages PBS
- Montage des lamelles sur des lames (rinçage dans de l'eau distillée, dépôt de la lamelle sur une goutte de vectashield, puis vernis pour sceller la lamelle)

Remarques : la fixation PAF perméabilise un peu la membrane, on marque alors une partie (de l'ordre de 5%) des éléments intracellulaires. Si l'on souhaite effectuer un marquage intracellulaire (comme les microtubules), faire une perméabilisation au Triton 0.1% pendant 5min, avant l'étape de saturation des sites (la solution de Triton 10 % correspond à 1.1g de triton dans 100ml d'eau distillée).

Marquage de surface
A 4°C l'endocytose et l'exocytose sont bloquées. Ainsi, le marquage à 4°C avant fixation permet de marquer uniquement les récepteurs en surface.

Pour se placer à 4°C, on peut soit aller dans la chambre froide, soit prendre un bac à glace, mettre une plaque en aluminium bien en contact avec la glace et mettre du parafilm dessus puis poser les lamelles sur le parafilm.
A 4°C :

- 2 rinçages PBS^{++} (PBS^{++}=PBS+$MgCl_2$ 0.5mM+ $CaCl_2$ 0.8mM)
- saturation des sites dans PBS gelBsa pendant 20 min (PBS gelBsa = PBS^{++} + gélatine 0.125% + BSA 1mg/ml)
- sans rinçage, incubation anticorps primaire (dilué dans PBS gelBsa) 45 min avec une concentration 2 fois plus élevée qu'en immuno à température ambiante
- 2 rinçages (PBS^{++}+ 0.125% gélatine)
- 2 rinçages 5 min dans PBS^{++}

Pour la suite, fixation et marquage avec l'anticorps secondaire, se placer à température ambiante et reprendre le protocole d'immunocytochimie classique.

Bibliographie

[1] H. ADESNIK, R. A. NICOLL et P. ENGLAND : Photoinactivation of native ampa receptors reveals their real-time trafficking. *Neuron*, 48, 2005.

[2] A. P. ALIVISATOS : Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, 271, 1996.

[3] A. P. ALIVISATOS, W. GU et C. LARABELL : Quantum dots as cellular probes. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 7, 2005.

[4] M. C. ASHBY, S. R. MAIER, A. NISHIMUNE et J. HENLEY : Lateral diffusion drives constitutive exchange of ampa receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *Journal of Neuroscience*, 26, 2006.

[5] D. AXELROD, D. E. KOPPEL, J. SCHLESSINGER, E. ELSON et W. W. WEBB : Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, 16, 1976.

[6] D. AXELROD, P. RAVDIN, D. E. KOPPEL, J. SCHLESSINGER, W. W. WEBB, E. ELSON et T. R. PODLESKI : Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73, 1976.

[7] C. M. BECKER, W. HOCH et H. BETZ : Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *EMBO Journal*, 7(12):3717–3726, 1988.

[8] C. BEDET, J. C. BRUUSGAARD, S. VERGO, L. GROTH-PEDERSEN, S. EIMER, A. TRILLER et C. VANNIER : Regulation of gephyrin assembly and glycine receptor synaptic stability. *Journal of Biological Chemistry*, 2006.

[9] S. BONNEAU : *Chemins Minimaux en Analyse d'Images : Nouvelles Contributions et Applications à l'Imagerie Biologique*. Thèse de doctorat, Université Paris Dauphine, France, 2006.

[10] S. BONNEAU, L. COHEN et M. DAHAN : A multiple target approach for single quantum dot tracking. *In IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI'04)*, p. 664–667, 2004.

[11] S. BONNEAU, M. DAHAN et L. COHEN : Single quantum dot tracking based on perceptual grouping using minimal paths in a spatiotemporal volume. *IEEE Transactions on Image Processing*, 14:1384–1395, 2005.

[12] A. J. BORGDORFF et D. CHOQUET : Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature*, 417:649–653, 2002.

[13] C. BOUZIGUES : *Dynamique de récepteurs uniques du $GABA_A$ dans le cône de croissance : rôle dans la détection de signaux de guidage*. Thèse de doctorat, Université Paris VII, France, 2006.

[14] C. BOUZIGUES et M. DAHAN : Transient directed motions of $gaba_A$ receptors in growth cones detected by a speed correlation index. *Accepté pour publication dans Biophysical Journal*, 2006.

[15] D. S. BREDT et R. A. NICOLL : AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron*, 40:361–379, 2003.

[16] X. BROKMANN : *Propriétés de fluorescence de nanocristaux de CdSe individuels*. Thèse de doctorat, Université Paris VI, France, 2004.

[17] X. BROKMANN, L. COOLEN, M. DAHAN et J.-P. HERMIER : Measurement of the radiative and nonradiative decay rates of single CdSe nanocrystals through a controlled modification of their spontaneous emission. *Physical Review Letters*, 93:107403–1, 2004.

[18] X. BROKMANN, L. COOLEN, J. P. HERMIER et M. DAHAN : Emission properties of individual CdSe/ZnS quantum dots close to a dielectric interface. *Chemical Physics*, 318:91–98, 2005.

[19] X. BROKMANN, M.-V. EHRENSPERGER, J.-P. HERMIER, A. TRILLER et M. DAHAN : Orientation imaging and tracking of single CdSe nanocrystals by defocused microscopy. *Chemical Physics Letters*, 406:210–214, 2005.

[20] X. BROKMANN, J. P. HERMIER, G.MESSIN, P.DESBIOLLES, J. P. BOUCHAUD et M.DAHAN : Statistical aging and nonergodicity in the fluorescence of single nanocristals. *Physical Review Letters*, 90:120601, 2003.

[21] M. BRUCHEZ, M. MORONNE, P. GIN, S. WEISS et A. P. ALIVISATOS : Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 281:2013–2016, 1998.

[22] B. C. CARTER, G. T. SHUBEITA et S. P. GROSS : Tracking single particles : a user-friendly quantitative evaluation. *Physical Biology*, 2:60–72, 2005.

[23] W. C. W. CHAN, D. J. MAXWELL, X. GAO, R. E. BAILEY, M. HAN et S. NIE : Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:40–46, 2002.

[24] W. C. W. CHAN et S. M. NIE : Quantum do bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281:2016–2018, 1998.

[25] C. CHARRIER, M.-V. EHRENSPERGER, M. DAHAN, S. LÉVI et A. TRILLER : Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane. *Journal of Neuroscience*, 26:8502–8511, 2006.

[26] M. CHEEZUM, W. WALKER et W. GUILFORD : Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophysical Journal*, 81:2378–2388, 2001.

[27] X. CHEN, L. VINADE, R. D. LEAPMAN, J. PETERSEN, T. NAKAGAWA, T. M. PHILIPS, M. SHANG et T. S. REESE : Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32):11551–11556, 2005.

[28] D. CHOQUET et A. TRILLER : The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nature Reviews Neuroscience*, 4:251–265, 2003.

[29] D. CHOQUET et A. TRILLER : The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nature Reviews Neuroscience*, 4:251–265, 2003.

[30] I. CHUNG, K. T. SHIMIZU et M. G. BAWENDI : Room temperature measurements of the 3d orientation of single CdSe quantum dots using polarization microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2):405–408, 2003.

[31] S. COURTY, C. LUCCARDINI, Y. BELLAICHE, G. CAPELLO et M. DAHAN : Tracking individual proteins in living cells using single quantum dot imaging. *Nanoletters*, 6:1491–1495, 2006.

[32] J. C. CROCKER et D. C. GRIER : Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179:208–310, 1995.

[33] M. DAHAN : From analog to digital : exploring cell dynamics with single quantum dots. *Histochemistry and Cell Biology*, 125:451–456, 2006.

[34] M. DAHAN, S. LÉVI, C. LUCCARDINI, P. ROSTAING, B. RIVEAU et A. TRILLER : Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single quantum dot tracking. *Science*, 302:442–445, 2003.

[35] F. DAUMAS, N. DESTAINVILLE, C. MILLOT, A. LOPEZ, D. DEAN et L. SALOME : Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. *Biophysical Journal*, 84:356–366, 2003.

[36] A. M. DERFUS, W. C. W. CHAN et S. N. BHATIA : Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters*, 4:11–18, 2004.

[37] N. DESTAINVILLE et L. SALOMÉ : Quantification and correction of systematic errors due to detector time-averaging in single molecule tracking experiments. *Biophysical Journal*, 90(2):L17–9, 2005.

[38] C. DIETRICH, B. YANG, T. FUJIWARA, A. KUSUMI et K. JACOBSON : Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophysical Journal*, 82:274–284, 2002.

[39] C. DILLON et Y. GODA : The actin cytosqueleton : integrating form and function at the synapse. *Annual Review of Neuroscience*, 28:25–55, 2005.

[40] B. DUBERTRET, P. SKOURIDES, D. J. NORRIS, V. NOIREAUX, A. H. BRIVANLOU et A. LIBCHABER : In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, 298:1759–62, 2002.

[41] A. DUMOULIN, S. LÉVI, B. RIVEAU, B. GASNIER et A. TRILLER : Formation of mixed glycine and gabaergic synapses in cultured spinal cord neurons. *European Journal of Neuroscience*, 12:3883–3892, 2000.

[42] B. DUPLANTIER : Le mouvement brownien, "divers et ondoyant". *In Séminaire Poincaré Einstein, 1905-2005*, p. 155–212, 2005.

[43] Y. EBENSTEIN, T. MOKARI et U. BANIN : Fluorescence quantum yield of CdSe/ZnS nanocrystals investigated by correlated atomic-force and single-particule fluorescence microscopy. *Applied Physics Letters*, 80:4033–4035, 2002.

[44] M. EDIDIN : *The Structure of Biological Membranes*, chap. Translational diffusion of membrane proteins, p. 539–572. Boca Raton : CRC, 1992.

[45] S. A. EMPEDOCLES, R. NEUHASSER et M. G. BAWENDI : Three-dimensional orientation measurements of symmetric single chromophores using polarization microscopy. *Nature*, 399:126–130, 1999.

[46] S. A. EMPEDOCLES, D. J. NORRIS et M. G. BAWENDI : Photoluminescence spectroscopy of single CdSe nanocrystallite quantum dots. *Physics Review Letters*, 77:3873–3976, 1996.

[47] T. J. FEDER, I. BRUST-MASCHER, J. P. DLATTERY, B. BAIRD et W. W. WEBB : Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces : a new interpretation. *Biophysical Journal*, 70:2767–2773, 1996.

[48] G. FENG, H. TINTRUP, J. KIRSCH, M. C. NICHOL, J. KUHSE, H. BETZ et J. R. SANES : Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science*, 282:1321–1324, 1998.

[49] J. C. FUHRMANN, S. KINS, P. ROSTAING, O. E. FAR, J. KIRSH, M. SHANG, A. TRILLER, H. BETZ et M. KNEUSSEL : Gephyrin interacts with dynein ligth chains 1 and 2, components of motor protein complexes. *Journal of Neuroscience*, 22:5393–5402, 2002.

[50] T. FUJIJWARA, K. RITCHIE, K. MURAKOSCHI, K. JACOBSON et A. KUSUMI : Phospholipids undergo hop diffusion in compartimentalized cell membrane. *Journal of Cell Biology*, 157:1071–1081, 2002.

[51] D. GERION, F. PINAUD, S. C. WILLIAMS, W. J. PARAK, D. ZANCHET, S. WEISS et A. P. ALIVISATOS : Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated CdSe/ZnS semiconductor quantum dots. *Journal of Physical Cemistry B*, 105:8861–8871, 2001.

[52] T. GIESEMANN, G. SCHWARZ, R. NAWROTZKI, K. BERHORSTER, M. ROTHKEGEL, K. SCHLUTER, N. SCHRADER, H. SCHINDELIN, R. R. MENDEL, J. KIRSCH et B. M. JOCKUSCH : Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and mena : a possible link to the microfilament system. *Journal of Neuroscience*, 23:8330–8339, 2003.

[53] M. GOULIAN et S. M. SIMON : Tracking single proteins within cells. *Biophysical Journal*, 79:2188–2198, 2000.

[54] L. GROC, M. HEINE, L. COGNET, K. BRICKLEY, F. A. STEPHENSON, B. LOUNIS et D. CHOQUET : Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nature Neuroscience*, 7:695–696, 2004.

[55] J. GRUDZINSKA, R. SCHEMM, S. HAEGER, A. NICKE, G. SCHMALZING, H. BETZ et B. LAUBE : The α subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron*, 45(5):727–739, 2005.

[56] R. L. GULLEY et T. S. REESE : Cytoskeletal organization at the postsynaptic complex. *Journal of Cell Biology*, 91:298–302, 1981.

[57] M. HAN, X. GAO, J. Z. SU et S. NIE : Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nature Biotechnology*, 19:631–635, 2001.

[58] C. HANUS, M.-V. EHRENSPERGER et A. TRILLER : Activity-dependent movements of postsynaptic scaffolds at inhibitory synapses. *Journal of Neuroscience*, 26(17):4586–4595, 2006.

[59] C. HANUS, C. VANNIER et A. TRILLER : Intracellular association of glycine receptor with gephyrin increases its plasma membrane accumulation rate. *Journal of Neuroscience*, 24:1119 –1128, 2004.

[60] M. D. HAW : Colloidal suspensions, brownian motion, molecular reality : a short history. *Journal of Physics : Condensed Matter*, 14:7769–7779, 2002.

[61] O. HEGENER, L. PRENNER, F. RUNKEL, S. L. BAADER, J. KAPPLER et H. HABERLEIN : Dynamics of beta2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells. *Biochemistry*, 43:6190–6199, 2004.

[62] M. HINES et P. GUYOT-SIONNEST : Shyntesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals. *Journal of Physical Chemistry*, 100:468–471, 1996.

[63] S. HOHNG et T. HA : Near-complete suppression of quantum dot blinking in ambient conditions. *Journal of the American Chemical Society*, 126:1324–1325, 2004.

[64] S. HUET, E. KARATEKIN, V. S. TRAN, I. FANGET et S. CRIBIER : Analysis of transient behavior in complex trajectories : application to secretory vesicle dynamics. *Biophysical Journal*, 91:3542–3559, 2006.

[65] T. C. JACOB, Y. D. BOGDANOV, C. MAGNUS, R. S. SALIBA, J. T. KITTLER, P. G. HAYDON et S. J. MOSS : Gephyrin regulates the cell dynamics of synaptic gabaa receptors. *Journal of Neuroscience*, 25(45):10469–10478, 2005.

[66] J. K. JAISWAL, H. MATTOUSSI, J. M. MAURO et S. M. SIMON : Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nature Biotechnology*, 21:47–51, 2003.

[67] M. B. KENNEDY : Signal-processing machines at postsynaptic density. *Science*, 290:750–754, 2000.

[68] S. KINS, H. BETZ et J. KIRSCH : Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nature Neuroscience*, 3:22–29, 2000.

[69] C. KIRCHNER, T. LIEDL, S. KUDERA, T. PELLEGRINO, A. M. JAVIER, H. E. GAUB, S. STOLZLE, N. FERTIG et W. J. PARAK : Cytotoxicity of colloidal CdSe/ZnS nanoparticules. *Nanoletters*, 5:331–338, 2005.

[70] J. KIRSCH et H. BETZ : The postsynaptic localization of the glycine receptorassociated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *Journal of Neuroscience*, 15:4148–4156, 1995.

[71] J. KIRSCH, D. LANGOSCH, P. PRIOR, U. Z. LITTAUER, B. SCHMITT et H. BETZ : The 93-kda glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *Journal of Biological Chemistry*, 266:22242–22245, 1991.

[72] J. KIRSCH, I. WOLTERS, A. TRILLER et H. BETZ : Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Neuron*, 366:745–748, 1993.

[73] M. KNEUSSEL : Postsynaptic scaffold proteins at non-synaptic sites. *EMBO Reports*, 6(1), 2005.

[74] M. KNEUSSEL et H. BETZ : Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins : novel insigths into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *Trends in Neuroscience*, 23(429-435), 2000.

[75] M. KNEUSSEL, A. HERMANN, J. KIRSCH et H. BETZ : Hydrophobic interactions mediate binding of the glycine receptor beta-subunit to gephyrin. *Journal of Neurochemistry*, 72:1323–1326, 1999.

[76] A. KUSUMI, C. NAKADA, K. RITCHIE, K. MURASE, K. SUZUKI, H. MURAKOSHI, R. S. KASAI, J. KONDO et 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.

[77] A. KUSUMI et Y. SAKO : Cell surface organization by the membrane skeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 8:566–574, 1996.

[78] A. KUSUMI, Y. SAKO et 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.

[79] A. KUSUMI et K. SUZUKI : Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1746:234–251, 2005.

[80] R. LAMPRECHT et J. L. DOUX : Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 5:46–54, 2004.

[81] J. LANGEVIN, M. J. MORGAN, C. ROSSÉ, V. RACINE, J. B. SIBARITA, S. ARESTA, M. MURTHY, T. SCHWARZ, J. CAMONIS et Y. BALLAÏCHE : Drosophila exocyst components sec5 and sec6 regulate de-cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane. *Developmental Cell*, 3:355–376, 2005.

[82] D. LARSON, W. R. ZIPFEL, R. M. WILLIAMS, S. CLARK, M. BRUCHEZ, F. WISE et W. W. WEBB : Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science*, 300:1434–1436, 2003.

[83] M. J. LEVENE, D. A. DOMBECK, K. A. KASISCHKE, R. P. MOLLOY et W. W. WEBB : In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *Journal of Neurophysiology*, 91:1908–1912, 2004.

[84] S. LEVI, D. CHESNOY-MARCHAIS, W. SIEGHART et A. TRILLER : Synaptic control of glycine and gaba(a) receptors and gephyrin expression in cultured motoneurons. *Journal of Neuroscience*, 19:7434–7449, 1999.

[85] S. LÉVI, C. VANNIER et A. TRILLER : Strychnine-sensitive stabilization of postsynaptic glycine receptor clusters. *Journal of Cell Science*, 111(3):335–345, 1998.

[86] C. MAAS, N. TAGNAOUTI, S. LOEBRICH, B. BEHREND, C. LAPPE-SIEFKE et M. KNEUSSEL : Neuronal cotransport of glycine receptor and the scaffold protein gephyrin. *Journal of Cell Biology*, 172(3):441–451, 2006.

[87] R. MAHTAB, H. H. HARDEN et C. J. MURPHY : Temperature- and salt-dependent binding of long dna to protein sized quantum dots : thermodynamics of "inorganic protein"-dna interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 122:14–17, 2000.

[88] R. MALINOW et R. C. MALENKA : AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 25:103–126, 2002.

[89] A. MAMMOTO, T. SASAKI, T. A. T, I. HOTTA, H. IMAMURA, K. TAKAHASHI, Y. MATSUURA, T. SHIRAO et Y. TAKAI : Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243:86–89, 1998.

[90] D. MARTIN, M. FORSTNER et J. KAS : Apparent subdiffusion inherent to single particle tracking. *Biophysical Journal*, 83:2109–2117, 2002.

[91] G. G. MATTHEWS : *Cellular Physiology of Nerve and Muscle*. Blackwell Publishing, fourth édn, 2003.

[92] H. MATTOUSSI, J. M. MAURO, E. R. GOLDMAN, G. P. ANDERSON, V. C. SUNDAR, F. V. MIKULEC et M. G. BAWENDI : Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. *Journal of the American Chemical Society*, 122:12142–12150, 200O.

[93] I. L. MEDINTZ, A. R. CLAPP, H. MATTOUSSI, E. R. GOLDMAN, B. FISHER et J. M. MAURO : Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot fret donors. *Nature Materials*, 2:630–638, 2003.

[94] J. MEIER, C. MEUNIER-DURMORT, C. FOREST, A. TRILLER et C. VANNIER : Formation of glycine receptor clusters and their accumulation at synapses. *Journal of Cell Science*, 113:2783–2795, 2000.

[95] J. MEIER, D. M. D. C. A. TRILLER et C. VANNIER : Functional heterogeneity of gephyrins. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 16:566–577, 2000.

[96] J. MEIER, C. VANNIER, A. SERGE, A. TRILLER et D. CHOQUET : Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nature Neuroscience*, 4:253–260, 2001.

[97] E. MEIJERING, I. SMAL et G. DANUSER : Tracking in molecular bioimaging. *IEEE Signal Processing Magazine*, 23:46–53, 2006.

[98] M. MEILHAC, L. L. GUYADER, L. SALOME et N. DESTAINVILLE : Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Physical Review E*, 73:011915, 2006.

[99] G. MEYER, J. KIRSCH, H. BETZ et D. LANGOSCH : Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron*, 15:563–572, 1995.

[100] X. MICHALET, F. F. PINAUD, L. A. BENTOLILA, J. M. TSAY, S. DOOSE, J. J. LI, G. SUNDARESAN, A. M. WU, S. S. GAMBHIR et S. WEISS : Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 307:538–544, 2005.

[101] S. MISEREY-LENKEI, A. COUEDEL-COURTEILLE, E. D. NERY, S. BARDIN, M. PIEL, V. RACINE, J. B. SIBARITA, F. PEREZ, M. BORNENS et B. GOUD : A role for the rab6a'gtpase in the inactivation of the mad2-spindle checkpoint. *The EMBO Journal*, 25:278–289, 2006.

[102] N. MORONE, T. FUJIWARA, K. MURASE, R. S. KASAI, H. IKE, S. YUASA, J. USUKURA et A. KUSUMI : Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *The Journal of Cell Biology*, 174:851–862, 2006.

[103] S. J. MOSS et T. G. SMART : Constructing inhibitory synapses. *Nature Review Neuroscience*, 2:240–250, 2001.

[104] K. MURASE, T. FUJIWARA, Y. UMEMURA, K. SUZUKI, R. IINO, H. YAMASHITA, M. SAITO, H. MURAKOSHI, K. RITCHIE et A. KUSUMI : Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophysical Journal*, 86:4075–93, 2004.

[105] C. B. MURRAY, D. J. NORRIS et M. G. BAWENDI : Shynthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=S,Se,Te) semiconductor nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society*, 115:8706–8715, 1993.

[106] T. NAGAI, K. IBATA, E. S. PARK, M. KUBOTA, K. MIKOSHIBA et A. MIYAWAKI : A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*, 20:87–90, 2002.

[107] C. NAKADA, K. RITCHIE, Y. OBA, M. NAKAMURA, Y. HOTTA, R. IINO, R. KASAI, K. YAMAGUCHI, T. FUJIWARA et A. KUSUMI : Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nature CellBiology*, 5(7):626–632, 2003.

[108] S. NELSON, R. D. HORVAT, J. MALVEY, D. A. ROESS, B. G. BARISAS et C. M. CLAY : Characterization of an intrinsically fluorescent gonadotropin-releasing hormone receptor and effects of ligand binding on receptor lateral diffusion. *Endocrinology*, 140:950–957, 1999.

[109] M. NIRMAL, B. O. DABBOUSI, M. G. B. J. J. MACKLIN, J. K. TRAUTMAN, T. D. HARRIS et L. E. BRUS : Fluorescent intermittency in single cadmium selenide nanocrystals. *Nature*, 383:802–804, 1996.

[110] A. PAHLERA, W. HENDRICKSON, M. A. G. KOLKS, C. E. ARGARANA et C. R. CANTOR : Characterization and crystallization of core streptavidine. *Journal of Biological Chemistry*, 262:13933–13937, 1987.

[111] T. PELLEGRINO, L. MANNA, S. K. T. LIEDL et D. KOKTYSH : Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell : a general route to water soluble nanocrystals. *Nano Letters*, 4:703–707, 2004.

[112] R. PETERS et R. J. CHERRY : Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers : experimental test of the saffman-delbrück equations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79:4317–4321, 1982.

[113] F. PFEIFFER, D. GRAHAM et H. BETZ : Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *Journal of Biological Chemistry*, 257:9389–9393, 1982.

[114] A. PONTI, P. VALLOTON, W. SALMON, C. M. WATERMAN-STORER et G. DANUSER : Computational analysis of f-actin turnover in cortical actin meshworks using fluorescent speckle microscopy. *Biophysical Journal*, 84:3336–3352, 2003.

[115] P. PRIOR, B. SCHMITT, G. GRENNINGLOH, I. PRIBILLA, G. MULTHAUP, K. BEYREUTHER, Y. MAULET, P. WERNER, D. LANGOSCH et J. KIRSCH : Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron*, 8:1161–1170, 1992.

[116] H. QIAN, M. P. SHEETZ et E. L. ELSON : Single particle tracking : analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. 60:910–921, 1991.

[117] V. RACINE : *Quantification des dynamiques cellulaires par analyse de données de vidéo-microscopie 3D+t*. Thèse de doctorat, Université Paris VI, France, 2006.

[118] M. RAMMING, S. KINS, N. WERNER, A. HERMANN, H. BETZ et J. KIRSCH : Diversity and phylogeny of gephyrin : tissue-specific splice variants, gene structue, and sequence similatrities to molybednum cofactor-synthesizing and cytoskeleton-associated proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97:10266–10271, 2000.

[119] B. R. RANSOM, C. N. CHRISTIAN, P. N. BULLOCK et P. G. NELSON : Mouse spinal cord in cell culture. i. synaptic activity and circuit behavior. *Journal of Neurophysiology*, 40:1151–1162, 1977.

[120] R.-T. T. A. V. C. RASMUSSEN, H. : Strychnine-blocked glycine receptor is removed from synapses by a shift in insertion/degradation equilibrium. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 19:201–215, 2002.

[121] F. REIF : *Statistical and thermal Physics*. McGraw-Hill International Editions, 1985.

[122] P. REISS, J. BLEUSE et A. PRON : Higly luminescent monodisperse CdSe and CdSe/ZnSe Core/Shell nanocrystals of low size dispersion. *Nano Letters*, p. 10266–10271, 2002.

[123] C. REVENU, R. ATHMAN, S. ROBINE et D. LOUVARD : The co-workers of actin filaments : from cell structures to signal. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(8):635–46, 2004.

[124] R. RITCHIE, X.-Y. SHAN, J. KONDO, K. IWASAWA, T. FUJIWARA et A. KUSUMI : Detection of non-brownian diffusion in the cell membrane in single molecule tracking. *Biophysical Journal*, 88:2266–2277, 2005.

[125] D. A. ROESS, R. D. HORVAT, H. MUNNELLY et B. G. BARISAS : Luteinizing hormone receptors are self-associated in the plasma membrane. *Endocrinology*, 141:4518–4523, 2000.

[126] M. ROSENBERG, J. MEIER, A. TRILLER et C. VANNIER : Dynamics of glycine receptor insertion in the neuronal plasma membrane. *Journal of Neuroscience*, 21:5036–5044, 2001.

[127] P. G. SAFFMAN et M. DELBRÜCK : Brownian motion in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72:3111–3113, 1975.

[128] D. SAGE, F. R. NEUMANMM, F. HEDIGER, Q. M. GASSER et M. UNSER : Automatic tracking of individual fluorescence particles : application to the study of chromosome dynamics. *IEEE Transactions on Image Processing*, 14:1372–1383, 2005.

[129] M. J. SAXTON : Lateral diffusion in an archipelago : single particle diffusion. *Biophysical Journal*, 64:1766–1780, 1993.

[130] M. J. SAXTON : Anomalous diffusion due to obstacles : a monte-carlo study. *Biophysical Journal*, 66:394–401, 1994.

[131] M. J. SAXTON : Anomalous diffusion due to binding : a monte-carlo study. *Biophysical Journal*, 706:1250–1262, 1996.

[132] M. J. SAXTON : Single particle tracking : the distribution of diffusion coefficients. *Biophysical Journal*, 72:1744–1753, 1997.

[133] M. J. SAXTON et K. JACOBSON : Single particle tracking : applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 26:373–399, 1997.

[134] B. SCHMITT, P. KNAUS, C. M. BECKER et H. BETZ : The mr 93,000 polypeptyde of the postsynaptic glycine receptor complex is a peripheral membrane protein. *Biochemistry*, 26(3):805–811, 1987.

[135] N. SCHRADER, E. Y. KIM, J. WINKING, J. PAULUKAT, H. SCHINDELIN et G. SCHWARTZ : Biochemical characterization of the high affinity binding between the glycine receptor and gephyrin. *Journal of Biological Chemistry*, 279:18733–18741, 2004.

[136] G. J. SCHÜTZ, H. SCHINDLER et T. SCHMIDT : Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophysical Journal*, 73:1073–1080, 1997.

[137] K. SEKIMOTO et A. TRILLER : Stability and mobility of neuroreceptors. Submitted.

[138] M. SHENG et M. J. KIM : Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science*, 298:776–780, 2002.

[139] K. SIMONS et D. TOOMRE : Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews*, 1:31–39, 2000.

[140] R. SIMSON, E. D. SHEETS et K. JACOBSON : Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophysical Journal*, 69:989–993, 1995.

[141] S. G. SINGER et G. L. NICOLSON : The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720–731, 1972.

[142] P. R. SMITH, I. E. G. MORRISON, K. M. WILSON, N. FERNANDEZ et R. J. CHERRY : Anomalous diffusion of major hstocompatibility complex class i molecules on hela cells determined by single particle tracking. *Biophysical Journal*, 76:3331–3344, 1999.

[143] M. SOLA, V. N. BRAVO, J. TIMMINS, T. FRANZ, S. RICARD-BLUM, G. SCHOEHN, R. W. RUIGROK, I. PAARMANN, T. SAIYED, G. A. O'SULLIVAN, B. SCHMITT, H. BETZ et W. WEISSENHORN : Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *The EMBO Journal*, 23: 2510–2519, 2004.

[144] D. J. STEPHENS et V. J. ALLAN : Ligth microscopy techniques for live cell imaging. *Science*, 300(5616):82–86, 2003.

[145] M. TAKEUSHI, H. MIYAMOTO, Y. SAKO, H. KOMIZI et A. KUSUMI : Structure of the erythrocyte membrane skeleton as observed by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 74:2171, 1998.

[146] D. TALAPIN, A. ROGACH, A. KORNOWSKI, M. HAASE et H. WELLER : Higly luminescent monodisperse CdSe and CdSe/ZnS nanocrystals synthesized in a haxadecylaminetrioctylphoshine oxide-tricotylphospine mixture. *Nano Letters*, 1:207–211, 2001.

[147] C. TARDIN, L. COGNET, C. BATS, B. LOUNIS et D. CHOQUET : Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *The EMBO Journal*, 22:4656–4665, 2003.

[148] R. E. THOMSON, D. R. LARSON et W. WEBB : Precize nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical Journal*, 82(2775-2783), 2002.

[149] E. TOPRAK, J. ENDERLEIN, S. SYED, S. A. MCKINNEY, R. G. PETSCHEK, T. HA, Y. E. GOLDMAN et P. R. SELVIN : Defocused orientation and position imaging (DOPI) of myosin v. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17):6495–99, 2006.

[150] K. R. TOVAR et G. L. WESTBROOK : Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron*, 34:255–264, 2002.

[151] A. TRILLER et D. CHOQUET : Synaptic structure and diffusion dynamics of synaptic receptors. *Biology of the Cell*, 95:465–476, 2003.

[152] A. TRILLER et D. CHOQUET : Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes : and yet they do move ! *Trends in Neurosciences*, 28(3):133–139, 2005. Review.

[153] A. TRILLER, F. CLUZEAUD, F. PFEIFFER, H. BETZ et H. KORN : Distribution of glycine receptors at central synapses : an immunoelectron microscopy study. *Journal of Cell Biology*, 101:683–688, 1985.

[154] T. TSUTSUI : Applied physics : A light-emitting sandwich filling. *Nature*, 420:752–755, 2002.

[155] W. TVARUSKO, M. BENTELE, T. MISTELI, R. RUDOLF, C. KAETHER, D. SPECTORE, H. GERDES et R. EILS : Time-resolved analysis and visualization of dynamics processes in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:7950–7955, 1999.

[156] N. UCHIDA, Y. HONJO, K. R. JOHNSON, M. WHEELOCK et M. TAKEICJI : The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *Journal of Cell Biology*, 135:767–779, 1996.

[157] P. VALLOTON, A.PONTI, C. M. WATERMAN-STORER, E. D. SALMON et G. DANUSER : Recovery, visualization, and analysis of actin and tubulin polymer flow in live cells : A fluorescent speckle microscopy study. *Biophysical Journal*, 85:1289–1306, 2003.

[158] C. VANNIER et A. TRILLER : Construction, stability and dynamics of the inhibitory postsynaptic membrane. *In* T. HESNCH, éd. : *Excitatory-inhibitory balance : synapses, circuits and systems plasticity*. Kluwer Academic/Plenum, 2003.

[159] C. VEENMAN, M. J. T. REINDERS et E. BACKER : Resolving motion correspondance for densely moving points. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 23:54–72, 2001.

[160] J. VERESTOY et D. CHETVERIKOV : Experimental comparative evaluation of feature point tracking algorithms. *In* M. V. K. V. R. KLETTE, H. Stiehl, éd. : *Performance Characterization in Computer Vision*. Kluwer, 2000.

[161] L. WAWREZINIECK, H. RIGNEAULT, D. MARGUET et P. F. LENNE : Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophysical Journal*, 89:4029–4042, 2005.

[162] W. W. WEBB, L. S. BARAK, D. W. TANK et E. S. WU : Molecular mobility on the cell surface. *Biochemical Society Symposia*, 46:191–205, 1981.

[163] K. M. WILSON, I. E. G. MORRISON, P. R. SMITH, N. FERNANDEZ et R. J. CHERRY : Single particule traching of cell-surface hla-dr molecules using r-phycoerythrin labeled monoclonal anditbodies and fluorescence digital imaging. *Journal of Cell Science*, 109:2101–2109, 1996.

[164] X. WU, H. LIU, J. LIU, K. N. HAKEY, J. A. TREADWAY, J. P. LARSON, N. GE, F. PEALE et M. P. BRUCHEZ : Immunofluorescent labeling of cancer marker her2 and other targets with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology*, 21:41–46, 2003.

[165] S. XIANG, J. NICHOLS, K. V. RAJAGOPALAN et H. SCHINDELIN : The crystal structure of escherichia coli moea and its relationship to the multifunctional protein gephyrin. *Structure*, 9:299–310, 2001.

[166] X. S. XIE, J. YU et W. Y. YANG : Living cells as test tubes. *Science*, 312:228–230, 2006.

[167] Y. G. Y, R. LOPEZ-ESPARZA, M. REFFAY, E. S. E, N. S. GOV, M. GENEST, R. S. HODGES et W. URBACH : Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7):2098–102, 2006.

[168] J. YAO, D. R. LARSON, H. D. VISHWASRAO, W. R. ZIPFEL et W. W. WEBB : Blinking and non-radiant dark fraction of water-soluble quantum dots in aqueous solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102:14284–14289, 2005.

[169] B. V. ZUNDERT, F. J. ALVAREZ, J. C. TAPIA, H. H. YEH, E. DIAZ et L. G. AGUAYO : Developmental-dependent action of microtubule depolymerization on the function and structure of synaptic glycine receptor clusters in spinal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 91:1036–1049, 2004.

Suivi de molécules uniques à l'aide de nanocristaux semiconducteurs : méthodes et application à l'étude de la dynamique du récepteur de la glycine

Résumé

Le suivi de molécules uniques est utile pour comprendre le déroulement d'un processus biologique. Il permet de sonder des propriétés dynamiques inaccessibles pas des mesures d'ensemble.

Nous présentons les nanocristaux semiconducteurs et montrons qu'ils permettent de combiner les avantages des autres marqueurs fluorescents avec une grande photostabilité et un très bon rapport signal à bruit.

Nous exposons une approche de suivi automatique dédiée à ces nano-objets scintillants. Nous discutons les méthodes spécifiquement adaptées à l'analyse des trajectoires ainsi obtenues.

Nous appliquons ces techniques d'imagerie ultrasensible à l'étude de la dynamique membranaire du récepteur de la glycine (RGly) dans les milieux vivants. Nous présentons une étude sur l'implication du cytosquelette dans la régulation du nombre de RGly aux synapses. Nous examinons les interactions entre le RGly et la géphyrine (sa protéine d'ancrage) dans des systèmes cellulaires modèles et caractérisons l'équilibre correspondant.

Mots clés : nanocristaux semiconducteurs, suivi de molécules uniques, diffusion latérale, récepteur de la glycine, géphyrine, neurones

Tracking of single molecules labeled with quantum dots : methods and application to the study of glycine receptors dynamics

Abstract

Single molecule tracking experiments are useful to understand biological processes since they give access to dynamic properties which are inaccessible with ensemble measurements. We present the properties of semiconductor quantum dots (QDs) and show how their superior brightness and photostability enable ultrasensitive biological imaging.

Next, we introduce a new approach for automatically tracking QD-labeled membrane molecules which accounts for the blinking of the fluorescent probes and we discuss methods specifically adapted to analyse the obtained trajectories.

Finally, we apply these sensitive imaging techniques to study glycine receptors (GlyR) lateral dynamics in live cells. We discuss a study on the regulation of GlyR number at synapses by the cytoskeleton. We also investigate the interactions between GlyR and gephyrin (its scaffolding protein) in model cellular systems and we characterize the corresponding equilibrium.

Keywords : quantum dots, single particle tracking, lateral diffusion, glycine receptor, gephyrin, neurons