



HAL
open science

DYNAMIQUE DE L'ASSEMBLAGE MOLÉCULAIRE SYNAPTIQUE : ÉTUDE DE LA DIFFUSION LATÉRALE DE LA SYNTAXIN 1A

Claire Ribault

► **To cite this version:**

Claire Ribault. DYNAMIQUE DE L'ASSEMBLAGE MOLÉCULAIRE SYNAPTIQUE : ÉTUDE DE LA DIFFUSION LATÉRALE DE LA SYNTAXIN 1A. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français. NNT: . tel-00608130

HAL Id: tel-00608130

<https://theses.hal.science/tel-00608130>

Submitted on 12 Jul 2011

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.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

École Doctorale Cerveau-Cognition-Comportement

Présentée par

CLAIRE RIBRAULT

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'université Pierre et Marie Curie

DYNAMIQUE DE L'ASSEMBLAGE MOLÉCULAIRE SYNAPTIQUE :
ÉTUDE DE LA DIFFUSION LATÉRALE DE LA SYNTAXIN 1A

Soutenue le 31 mai 2010 devant le jury composé de :

Président	JEAN MARIANI Professeur, Université Pierre et Marie Curie
Rapporteur	PATRICIA BASSEREAU Directeur de recherche CNRS, Institut Curie
Rapporteur	THIERRY GALLI Directeur de recherche INSERM, Institut Jacques Monod
Examineur	DANIEL CHOQUET Directeur de recherche CNRS, Institut des Neurosciences de Bordeaux
Directeur de thèse	ANTOINE TRILLER Directeur de recherche INSERM, Ecole Normale Supérieure

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

École Doctorale Cerveau-Cognition-Comportement

Présentée par

CLAIRE RIBRAULT

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'université Pierre et Marie Curie

DYNAMIQUE DE L'ASSEMBLAGE MOLÉCULAIRE SYNAPTIQUE :
ÉTUDE DE LA DIFFUSION LATÉRALE DE LA SYNTAXIN 1A

Soutenue le 31 mai 2010 devant le jury composé de :

Président JEAN MARIANI
Professeur, Université Pierre et Marie Curie

Rapporteur PATRICIA BASSEREAU
Directeur de recherche CNRS, Institut Curie

Rapporteur THIERRY GALLI
Directeur de recherche INSERM, Institut Jacques Monod

Examineur DANIEL CHOQUET
Directeur de recherche CNRS, Institut des Neurosciences de Bordeaux

Directeur de thèse ANTOINE TRILLER
Directeur de recherche INSERM, Ecole Normale Supérieure

Laboratoire Biologie de la Synapse et Régulation Neuronale
Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure
46, rue d'Ulm - 75 005 PARIS

REMERCIEMENTS

Je remercie d'abord Patricia Bassereau, Thierry Galli, Daniel Choquet et Jean Mariani de me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Ensuite, je remercie vivement tous ceux qui m'ont soutenue et accompagnée dans ce projet. En particulier, je remercie Antoine Triller pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et avoir encadré cette thèse, pour sa contribution à ce projet et la formation qu'il m'a apportée. Je le remercie également pour les discussions scientifiques que nous avons eues, ses encouragements et la compréhension dont il a fait preuve.

Au sein du laboratoire de Biologie de la Synapse, je remercie les membres du groupe de recherche sur la diffusion latérale des protéines synaptiques, pour leur compagnie, leur soutien, leur aide et leurs conseils, en particulier Cécile Charrier, Géraldine Gouzer, Laëtitia Hennekine, Patricia Machado, Marianne Renner, Christian Specht, Damien Alcor, et Kim Gerrow. Serge Marty et Léa Siksou qui travaillent sur l'organisation du compartiment présynaptique sont également deux précieux collègues que je remercie pour les discussions et pour leur ouverture. Naturellement, je remercie aussi l'ensemble des membres du laboratoire pour l'atmosphère chaleureuse et paisible à laquelle ils contribuent.

Je remercie également les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer pendant cette thèse, notamment Noam Ziv et Thierry Galli sur le plan de la biologie du compartiment présynaptique, et Jurgen Reingruber et David Holcman pour les aspects de modélisation mathématique. Je remercie particulièrement Ken Sekimoto, avec qui nous avons développé un modèle analytique de la diffusion d'une particule anisotrope, pour son écoute attentive à mes questions et les riches échanges qu'il m'a offerts avec son point de vue de physicien.

Je souhaite également remercier les membres du Centre de Recherches Interdisciplinaires pour les rencontres, les discussions multiples et l'enthousiasme que j'ai pu trouver en ce lieu. Je remercie vivement mes amis, pour leurs éclats de rire, leurs interrogations et leur écoute. En particulier, je remercie ceux avec qui j'ai partagé diverses activités scientifiques plus ou moins utopiques, comme l'organisation d'un symposium de doctorants, l'écriture d'un spectacle sur les addictions, et la fondation d'une association pour promouvoir l'intégrité scientifique.

Je remercie ma famille, mes parents et mes frères, pour leur confiance. Enfin, je remercie Thomas pour son exigence d'idéal.

Merci également à vous, lecteur ou lectrice de ce manuscrit, j'espère que vous n'hésitez pas à partager les questions qu'il soulèvera. Bonne lecture.

MOTIVATIONS

Au moment de commencer cette thèse, une des directions que je souhaitais explorer concernait les assemblages multimoléculaires dynamiques : comment les propriétés de l'assemblage dépendent-elles des propriétés de ses constituants ? Quelles relations y a-t-il entre la dynamique des composants et celle de l'assemblage ? Comment réconcilier des descriptions à deux échelles différentes, celle de la molécule, celle de l'assemblage ? Et peut-être naïvement, en quoi les assemblages biologiques diffèrent-ils des assemblages "chimiques" étudiés *in vitro* ?

Ces questionnements m'ont portée à l'interface de plusieurs disciplines : j'ai choisi d'étudier le mouvement diffusif d'une des protéines qui constituent la synapse neuronale, dans son environnement cellulaire. J'ai donc développé mon projet de thèse en utilisant des outils associés à la physique et à la biologie. Le risque de cette approche est de ne maîtriser aucun des outils, et de ne rien proposer de pertinent pour aucune des disciplines. J'ai donc le souci que ce manuscrit soit lisible par le biologiste et le physicien, pour que chacun puisse critiquer les approches qui le concernent.

La protéine dont j'ai choisi de caractériser le mouvement diffusif se nomme la syntaxin. Dans l'introduction de ce manuscrit, je présente d'abord l'environnement dans lequel le mouvement de cette protéine sera étudié (la synapse et son organisation), puis les caractéristiques de la syntaxin, et enfin les propriétés dynamiques des éléments qui constituent l'assemblage synaptique. Dans la seconde partie, je présente les méthodes que nous avons utilisées pour étudier le mouvement diffusif de la syntaxin et je rappelle brièvement les résultats de ma thèse qui sont détaillés dans l'article joint. Enfin, je propose de discuter ces résultats, ainsi que l'approche que nous avons choisie pour mener ce projet. Une courte conclusion et quelques perspectives closent cette dernière section, et l'annexe contient les articles et la revue qui résultent de ce travail de thèse.

RÉSUMÉ

La synapse est un assemblage macromoléculaire dynamique : les protéines synaptiques sont constamment et rapidement échangées par un mouvement diffusif entre l'assemblage synaptique et la région extrasynaptique, alors que l'assemblage reste stable. Par ailleurs, dans le compartiment présynaptique, les cycles d'endo- et d'exocytose des vésicules synaptiques imposent une réorganisation dynamique de la membrane plasmique. La syntaxin1A est une protéine membranaire impliquée dans l'exocytose. Quelles sont les caractéristiques de la diffusion latérale de la syntaxin et ses implications pour la transmission synaptique ?

Nous avons étudié la diffusion latérale de la syntaxin à l'échelle de la population (méthode de retour de fluorescence après photoblanchiment, FRAP) et à l'échelle de la molécule individuelle (suivi de particule unique, SPT). Nous avons montré que la syntaxin diffuse rapidement dans la membrane plasmique et présente des périodes d'immobilisation transitoire, qui reflètent des interactions moléculaires impliquées dans la formation du complexe exocytotique. Enfin, nous avons construit un modèle computationnel qui réconcilie les descriptions de la diffusion latérale de la syntaxin à l'échelle de la population et de la molécule individuelle. Ce modèle a permis de caractériser les cinétiques des interactions entre la syntaxin et ses partenaires, qui conduisent à sa stabilisation à la synapse.

Mots clés : syntaxin, diffusion latérale, synapse, neurones, suivi de particule unique (SPT), retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), complexe exocytotique, SNARE

ABSTRACT

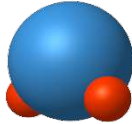
The synapse is a dynamic molecular assembly : synaptic proteins are rapidly exchanged by diffusion between the synaptic assembly and the extrasynaptic region, while the assembly remains stable. In addition, in the presynaptic compartment, cycles of endo- and exocytosis of synaptic vesicles impose a dynamic remodeling of the plasma membrane. Syntaxin 1A is a presynaptic membrane protein involved in exocytosis. What are the characteristics of the lateral diffusion of syntaxin and its implications for synaptic transmission ?

We have characterized the lateral diffusion both at the population level (by fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) and the molecular level (by single particle tracking, SPT). We have shown that syntaxin rapidly diffuses within the plasma membrane and exhibits periods of transient immobilisation, which reflect molecular interactions related to the formation of the exocytotic complex. Finally, we have built a computational model which reconciles the descriptions of the lateral diffusion of syntaxin at the population and molecular levels. This model allowed to characterize the kinetics of the interactions between syntaxin and its partners that lead to its stabilisation at the synapse.

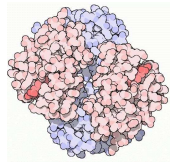
keywords : syntaxin, lateral diffusion, synapse, neurons, single particle tracking (SPT), fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), exocytotic complex, SNARE

POUR QUE TOUT LE MONDE AIT UNE PETITE IDÉE...

Mon projet de thèse a consisté à étudier le mouvement d'une des protéines qui constituent la synapse. Pour commencer, quelques repères :



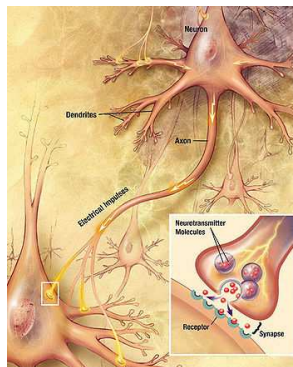
UNE MOLÉCULE D'EAU. Une molécule est constituée d'atomes. Par exemple, la molécule d'eau ci-contre est constituée d'un atome d'oxygène (bleu) et de deux atomes d'hydrogène (rouge). La taille d'une molécule d'eau est d'environ 0.1 nm (nanomètre).



UNE PROTÉINE. Les êtres vivants sont constitués de différents types de molécules, entre autres les protéines, les lipides et les glucides. Ces molécules sont constituées de nombreux atomes, parfois plusieurs milliers. Ci-contre, une représentation de l'hémoglobine (une protéine présente dans les globules rouges du sang), qui mesure environ 6 nm.



UNE CELLULE. Une cellule est comme une bulle, un sac, constitué de molécules. Les molécules se lient les unes aux autres pour former différentes structures. Une cellule peut mesurer d'un micromètre à quelques dizaines de micromètres.



Les **NEURONES** sont les cellules qui constituent le système nerveux. Ils sont caractérisés par des prolongements très longs, qui les connectent entre eux et avec d'autres cellules. Les neurones propagent et transmettent des informations.

Les **SYNAPSES** sont les zones de contact entre les neurones (zone encadrée ci-contre). Elles assurent la transmission de l'information d'un neurone à l'autre. Elles ont une taille d'environ 200 nm de diamètre.

Dans les neurones, l'information est propagée sous forme de signal électrique. Pour être transmis d'un neurone à l'autre, ce signal est d'abord converti en signal chimique, puis à nouveau en signal électrique qui se

propage dans le neurone suivant. La synapse permet cette conversion, et elle permet également de moduler l'efficacité de la transmission du signal d'un neurone à l'autre.

Les synapses sont impliquées dans les phénomènes de mémorisation. Par exemple, l'apprentissage d'un nouveau geste se traduit par la formation de nouvelles synapses, ou par la modification de la composition de synapses existantes.

Une synapse est constituée de protéines, qui interagissent les unes avec les autres et forment un assemblage moléculaire. Cependant, ces interactions entre les protéines sont transitoires : les protéines se lient, se dissocient, et sont constamment en mouvement. Décrire le mouvement des protéines de l'assemblage synaptique peut aider à comprendre comment une synapse peut rester stable ou être modifiée.

Pendant ma thèse, j'ai étudié le mouvement d'une des protéines synaptiques, la syntaxin (prononcez "syntaxine"). En particulier, j'ai étudié comment le mouvement de la syntaxin reflète certaines interactions moléculaires qui sont impliquées dans la transmission du signal entre deux neurones. Une petite contribution à un vaste projet !

TABLE DES MATIÈRES

1	CONSTITUTION DE L'ASSEMBLAGE PRÉSYPNAPTIQUE ET DYNAMIQUE DES ÉLÉMENTS SYNAPTIQUES	3
1.1	De la synapse au compartiment présynaptique	3
1.1.1	La synapse	3
1.1.2	La transmission synaptique	6
1.1.3	Organisation du compartiment présynaptique	8
1.2	L'exocytose des vésicules synaptiques	12
1.2.1	Le complexe SNARE	13
1.2.2	Le complexe exocytotique	16
1.2.3	La fusion des membranes	21
1.3	Syntaxin 1A	25
1.3.1	Isoformes	25
1.3.2	Structure et conformations	25
1.3.3	Localisation cellulaire	27
1.3.4	Interactions	28
1.4	Diffusion latérale des protéines membranaires	30
1.4.1	Le mouvement brownien	30
1.4.2	La diffusion latérale dans les membranes cellulaires	31
1.5	Mouvement diffusif des éléments de l'assemblage synaptique	32
1.5.1	Les vésicules synaptiques	33
1.5.2	Les protéines cytoplasmiques	34
1.5.3	Les protéines membranaires	36
1.5.4	Mouvement diffusif et fonction synaptique	38
2	ÉTUDE DE LA DIFFUSION LATÉRALE DE LA SYNTAXIN 1A-PHGFP	43
2.1	Choix de l'approche et expression de la syntaxin 1A-pHGFP	43
2.1.1	Choix de l'approche et du système d'étude	43
2.1.2	Expression de la syntaxin 1A-pHGFP	45
2.2	Méthodes de description de la diffusion latérale	47
2.2.1	Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)	47
2.2.2	Single Particle Tracking (SPT) : introduction	50
2.2.3	SPT : reconstitution et analyse des trajectoires	52
2.3	Diffusion latérale de la syntaxin 1A-pHGFP - conditions basales	58

2.3.1	Comportement diffusif de la population : FRAP	58
2.3.2	Trajectoires individuelles : SPT	59
2.4	Rôle des interactions moléculaires dans la diffusion latérale	62
2.4.1	Interactions via le domaine Habc	63
2.4.2	Interactions via le domaine SNARE	64
2.4.3	Interactions via le domaine transmembranaire	67
2.4.4	Interactions avec SNAP25	67
2.5	Modèle de la diffusion latérale de la syntaxin	68
2.5.1	Description du modèle	71
2.5.2	Obtention des paramètres cinétiques	73
2.6	Diffusion latérale et activité synaptique	76
2.6.1	La diffusion latérale de la syntaxin 1A-pHGFP dépend-elle de l'activité synaptique ?	76
2.6.2	L'activité synaptique dépend-elle de la diffusion latérale de la syntaxin 1A-pHGFP ?	77
3	DISCUSSION	81
3.1	La diffusion latérale de la syntaxin 1A-pHGFP et la formation du complexe exocytotique	81
3.1.1	Pertinence et limites de l'approche expérimentale	81
3.1.2	Un mouvement ralenti, confiné et irrégulier aux synapses : encombrement moléculaire et interactions spécifiques	83
3.1.3	Interactions avec les éléments du complexe exocytotique	85
3.1.4	Cinétiques d'interactions : modèle de la diffusion latérale de la syntaxin 1A-pHGFP	88
3.1.5	Diffusion latérale de la syntaxin 1A-pHGFP et activité synaptique	90
3.2	De la diffusion latérale aux processus moléculaires	93
3.2.1	Redéfinition des termes de la problématique	93
3.2.2	Quels paramètres pour décrire la diffusion latérale ?	95
3.2.3	Comment les paramètres descriptifs du mouvement résultent-ils des processus moléculaires ?	98
3.2.4	Diffusion libre, obstacles, liaisons : quelles relations avec la fonction synaptique ?	105
3.3	Conclusion et perspectives	111
3.3.1	Diffusion latérale de la syntaxin	111
3.3.2	Implications de l'étude du mouvement diffusif	112

3.3.3	Questions ouvertes	112
BIBLIOGRAPHIE		115
A	ANNEXES	131
A.1	Article 1 : Diffusion trajectory of an asymmetric object	133
A.2	Article 2 : Syntaxin1A diffusion reveals local and transient SNARE interactions	143
A.3	Revue en préparation : From the stochasticity of molecular processes to the variability of synaptic transmission	175

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1	Un neurone	4
FIGURE 2	La synapse neuronale	5
FIGURE 3	La transmission synaptique	8
FIGURE 4	Organisation de la terminaison présynaptique	9
FIGURE 5	Composition moléculaire du compartiment présynaptique	12
FIGURE 6	Structure du complexe SNARE	14
FIGURE 7	Le complexe exocytotique	16
FIGURE 8	Oligomérisation du complexe SNARE	20
FIGURE 9	Fusion des membranes	23
FIGURE 10	Observation des modes d'exocytose, par Zhang <i>et al.</i>	24
FIGURE 11	La syntaxin 1	26
FIGURE 12	Le mouvement brownien	31
FIGURE 13	Une membrane cellulaire fluide et encombrée	33
FIGURE 14	Mouvement diffusif des éléments présynaptiques	37
FIGURE 15	La syntaxin1A fusionnée à la GFP super-écliptique	44
FIGURE 16	Expression de la syntaxin1A-pHGFP	46
FIGURE 17	Principe de la méthode de FRAP	48
FIGURE 18	Principe de la méthode de SPT	52
FIGURE 19	Mouvement non brownien et coefficient de diffusion instantané	56
FIGURE 20	Un retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) plus lent dans les régions synaptiques qu'extrasynaptiques.	60
FIGURE 21	Diffusion latérale de la syntaxin1A-pHGFP couplée à des quantum dots - Trajectoires individuelles	61
FIGURE 22	Temps de résidence aux synapses	63
FIGURE 23	Effets des délétions des domaines Habc et SNARE sur les trajectoires de la syntaxin1A-pHGFP	65
FIGURE 24	Effets des délétions des domaines Habc et SNARE sur le retour de fluorescence après photoblanchiment de la syntaxin1A-pHGFP	66
FIGURE 25	Effets du clivage de SNAP25 sur les trajectoires de la syntaxin1A-pHGFP	69

FIGURE 26	Effets du clivage de SNAP25 sur le retour de fluorescence après photoblanchiment de la syntaxin1A-pHGFP	70
FIGURE 27	Modèle du comportement diffusif de la syntaxin1A-pHGFP	72
FIGURE 28	Simulations des courbes de FRAP	74
FIGURE 29	Perturbation de la distribution de la syntaxin après exocytose d'une vésicule	77
FIGURE 30	Exemple de scénario moléculaire de la diffusion latérale de la syntaxin	90
FIGURE 31	Type de mouvement et analyse des moments.	96

LISTE DES TABLEAUX

TABLE 1	Paramètres cinétiques des réactions de liaison dans les régions synaptiques obtenus avec le modèle de diffusion de la stxGFP	75
TABLE 2	Relations entre les paramètres descriptifs du mouvement diffusif et les processus moléculaires qui sous-tendent le mouvement	104

ABRÉVIATIONS

aa	acide aminé
BoNT/E	botulinum neurotoxin E (toxine botulique E)
DIV	days <i>in vitro</i>
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
GFP	green fluorescent protein
KI	knock-in
KO	knock-out
KS	Kolmogorov-Smirnov
mRFP	monomeric red fluorescent protein
MSD	mean square displacement
QD	quantum dot
SPT	single particle tracking

Chapitre 1

CONSTITUTION DE L'ASSEMBLAGE PRÉSYNAPTIQUE ET DYNAMIQUE DES ÉLÉMENTS SYNAPTIQUES

CONSTITUTION DE L'ASSEMBLAGE PRÉSYNAPTIQUE ET DYNAMIQUE DES ÉLÉMENTS SYNAPTIQUES

Dans cette introduction nous décrivons le contexte dans lequel a lieu la diffusion latérale de la syntaxin : quelles sont l'organisation et la composition de l'assemblage moléculaire présynaptique, et en particulier, en quoi consiste l'exocytose des vésicules synaptiques ? Quelles sont les propriétés de la syntaxin ? Quelles sont les caractéristiques du mouvement diffusif des autres éléments synaptiques déjà étudiés, et quelles sont les spécificités et les implications de la diffusion latérale de la syntaxin ?

1.1 DE LA SYNAPSE AU COMPARTIMENT PRÉSYNAPTIQUE

Nous commençons par une présentation succincte de la synapse, et plus particulièrement de l'organisation spatiale du compartiment présynaptique dans le modèle d'étude que nous avons choisi, la synapse dans le système nerveux central des murins. Nous décrirons ensuite brièvement comment l'assemblage synaptique permet d'assurer la transmission d'un signal électrique d'un neurone à l'autre.

1.1.1 *La synapse*

Avant de présenter la structure de la synapse, voici quelques étapes de l'histoire de la description de la synapse (Bennett 1999).

1.1.1.1 *Une brève histoire de la synapse*

Au quatrième siècle avant J.-C., Aristote s'interrogeait sur la communication ou la conduction d'une "information" entre les différents organes. Pour Aristote, l'organe central était le coeur : le coeur serait capable de transmettre des informations et des ordres aux autres organes par le sang, qui transporterait une substance particulière, "vitale".

Aux deuxième et troisième siècles après J.-C., Galien et ses étudiants ont observé que les nerfs étaient essentiels pour les fonctions sensorielles et motrices, et que ces nerfs provenaient du cerveau et de la moelle épinière. Pour réconcilier cette observation avec la théorie d'Aristote (selon laquelle une substance vitale est transmise du coeur aux organes par le sang), ils ont suggéré que cette substance vitale passerait du coeur vers le cerveau, où elle serait transformée en une autre substance, "psychique" qui serait elle-même transmise aux organes par les nerfs.

Ce n'est qu'au dix-huitième siècle que la nature de la "substance" conduite par les nerfs fut découverte : Galvani découvrit par accident

que les nerfs conduisent l'électricité. Ensuite, au début du dix-neuvième siècle, les progrès de la microscopie et des méthodes de marquage des cellules ont permis les premières descriptions des cellules dont les prolongements se regroupent en faisceau et forment les nerfs, c'est-à-dire les neurones (voir figure 1). Ces marquages ne permettaient pas de distinguer si les neurones étaient des entités distinctes, en contact étroit les unes avec les autres mais séparées, ou s'ils n'étaient qu'un réseau continu (figure 1 - A). Cette question fut l'occasion d'un long débat, dont deux figures furent Golgi, défendant la continuité des neurones, et Ramon y Cajal, convaincu que chaque neurone constituait une cellule indépendante. Ramon y Cajal eut finalement raison (Ramón y Cajal 1906). En particulier, une de ses expériences montra que lorsque deux populations de neurones sont connectées, la dégénération d'une des deux populations n'affecte pas l'autre, indiquant que les neurones étaient des entités distinctes mais connectées.

La zone de contact entre les neurones fut ensuite identifiée par Sherrington comme le lieu de la transmission unidirectionnelle d'un signal électrique, à la fin du dix-neuvième siècle. Sherrington baptisa cette jonction "synapse" (du grec "syn" - ensemble et "haptein" - toucher, saisir).

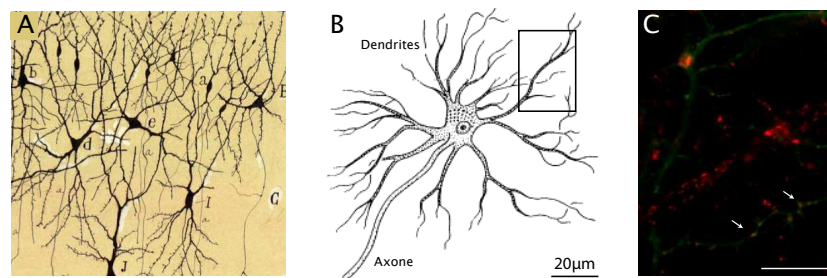


FIGURE 1.: Un neurone. A. Dessin de neurones dans l'hippocampe, après marquage par un colorant, par Ramon y Cajal (1901). B. Dessin d'un motoneurone, d'après une planche de Deiters et Ramon y Cajal, dix-neuvième siècle. C. Image d'un fragment de neurone de moelle épinière en culture (vert). Les synapses sont marquées en rouge (et certaines par des flèches). La taille de l'image correspond approximativement à l'encadré sur la figure B.

1.1.1.2 Les synapses dans le système nerveux des vertébrés — modèle d'étude

Chez les vertébrés, on distingue classiquement le système nerveux central et le système nerveux périphérique : le système nerveux central comprend le cerveau et la moelle épinière ; le système nerveux périphérique est constitué d'une part des nerfs sensoriels et moteurs, et d'autre part des nerfs et ganglions nerveux qui gèrent les fonctions automatiques de régulation (par opposition aux fonctions "conscientes").

Le système nerveux est constitué de différents types de cellules spécialisées. Les neurones sont impliqués dans la conduction d' "information"

entre différentes parties du système nerveux, ou entre le système nerveux et d'autres organes comme des muscles. Le neurone est composé d'un corps cellulaire prolongé de deux types de *neurites* : l'*axone*, qui conduit le signal électrique depuis le corps cellulaire vers les points de contact entre l'axone et les neurones voisins, et les *dendrites*, qui conduisent le signal électrique vers le corps cellulaire. Comme décrit ci-dessus, la zone de contact établie entre deux neurones (ou entre un neurone et un autre type de cellule) qui assure la transmission d'un signal d'une cellule à l'autre est la synapse (voir figures 1 et 2). On distingue classiquement la synapse chimique et la synapse électrique : dans la synapse chimique, le signal électrique est converti en signal chimique, alors que dans la synapse électrique, le signal est transmis de manière électrique par l'intermédiaire des jonctions communicantes (*gap junctions*). Par la suite, nous nous intéresserons uniquement à la synapse chimique, qui est majoritaire dans le système nerveux des vertébrés.

Nous avons choisi d'étudier la synapse dans les neurones du système nerveux central du rat ou de la souris. En effet, les murins constituent un modèle d'étude classique chez les vertébrés en raison notamment d'une manipulation aisée (taille, coût, taux de reproduction...) et des nombreuses techniques développées sur ce modèle, comme la culture cellulaire de neurones que nous utilisons. Les descriptions de la synapse qui suivent dans cette introduction concernent donc les synapses du système nerveux central, en particulier chez les murins.

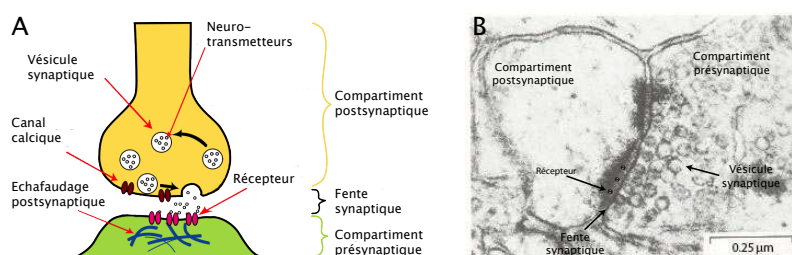


FIGURE 2.: La synapse neuronale. A. Schéma d'une synapse neuronale. La synapse est constituée par l'apposition d'un compartiment présynaptique et d'un compartiment postsynaptique, séparés par la fente synaptique. Le compartiment présynaptique contient des vésicules synaptiques remplies de neurotransmetteurs. Ces vésicules peuvent fusionner avec la membrane plasmique (exocytose) puis être recyclées (endocytose). Ce schéma ne respecte pas les échelles des différents éléments. B. Cliché de microscopie électronique, montrant la morphologie d'une terminaison présynaptique dans des neurones du système nerveux central de rat. Les différents compartiments sont indiqués, et les récepteurs sont dessinés pour représenter leur taille. On note également une densité électronique importante sous la membrane postsynaptique. Un cliché utilisant une méthode plus récente est présenté sur la figure 4.

1.1.1.3 *La synapse : organisation et ordres de grandeurs*

La synapse est caractérisée par une organisation moléculaire spécifique et localisée. Le contact synaptique entre deux neurones s'étend sur une région de l'ordre de 200 à 300 nm de diamètre. La synapse est classiquement divisée en trois régions : le *compartiment pré-synaptique* (environ 1 μm), la *fente synaptique* (l'espace entre les deux neurones, de l'ordre de 20 nm) et le *compartiment post-synaptique* (qui s'étend également sur quelques centaines de nanomètres). Le compartiment présynaptique contient des *vésicules synaptiques*, d'environ 50 nm de diamètre, remplies de molécules appelées neurotransmetteurs. Certaines de ces vésicules sont ancrées à la membrane plasmique, d'autres constituent un "réservoir" situé dans le bouton présynaptique (figure 2).

La taille des protéines est de l'ordre de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres. Le nombre de protéines présentes à la synapse varie entre moins de dix et plus de cent, suivant le type de protéines. La densité de protéines dans la synapse est donc élevée, on parle d'*encombrement moléculaire*. Cet encombrement moléculaire a des conséquences sur le mouvement diffusif des protéines dans la région synaptique. De manière générale, les membranes cellulaires comme le cytoplasme des cellules ont une concentration élevée en protéines, ce qui modifie les processus diffusifs et biochimiques (en comparaison à leurs propriétés mesurées *in vitro*, Ellis 2001).

1.1.2 *La transmission synaptique*

1.1.2.1 *Conduction électrique dans les neurones*

Dans un neurone, l'information est transmise d'une région à une autre sous forme de signal électrique, plus précisément de dépolarisation de la membrane du neurone. En effet, au repos, la membrane d'un neurone est polarisée, la différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur du neurone est de l'ordre de -60 mV. Cette différence de potentiel est due à des différences de concentration d'anions et de cations dans et hors de la cellule. En particulier, les ions K^+ et les molécules organiques phosphorylées (chargées négativement) sont présents dans le milieu intracellulaire, et les ions Ca^{++} , Na^+ et Cl^- sont dans le milieu extracellulaire. Les différences de concentration de ces ions (et donc le potentiel de membrane) sont maintenues par des pompes ioniques.

Lorsqu'un point de la membrane, une stimulation provoque une dépolarisation membranaire suffisante, supérieure à une valeur seuil, un *potentiel d'action* est déclenché : un potentiel d'action correspond à une dépolarisation brutale et transitoire de la membrane qui se propage le long de la membrane à partir du point excité. La propagation de cette dépolarisation implique des canaux ioniques sensibles au voltage (*i.e.* au potentiel de membrane), qui sont les canaux sodiques et potassiques.

Au point de contact entre deux neurones, *ie* à la synapse, le signal ne peut être transmis de manière électrique. La synapse permet la conver-

sion d'un signal électrique en un signal chimique qui traverse la fente synaptique et est ensuite converti à nouveau en signal électrique qui pourra se propager le long du neurone postsynaptique.

1.1.2.2 *Transmission synaptique*

Il est désormais communément accepté que la transmission synaptique suit les étapes suivantes (voir figure 3 et Lisman et al. 2007) :

1. À l'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison présynaptique, la membrane se dépolarise. Des canaux calciques présents dans la membrane plasmique et sensibles au voltage s'ouvrent, et un flux d'ions Ca^{++} pénètre dans la terminaison présynaptique (Meir et al. 1999). La conversion du signal électrique en signal "chimique" est ainsi initiée puisque le calcium va ensuite être impliqué dans des processus de liaison / changements de conformation des protéines, qui vont aboutir à la transmission d'un signal chimique vers le compartiment postsynaptique.
2. Dans la terminaison présynaptique, les ions calcium se lient à la synaptotagmin, une protéine présente dans la membrane des vésicules synaptiques (Chapman 2008). Cette protéine "détecte" le calcium (et détecte ainsi l'arrivée du potentiel d'action). Comme décrit plus bas, quelques vésicules synaptiques sont ancrées à la membrane plasmique. Les protéines de synaptotagmin présentes dans les vésicules qui sont ancrées à proximité des sites d'entrée du calcium vont donc se trouver exposées à une concentration en calcium élevée.
3. La synaptotagmin interagit avec certaines protéines qui participent à l'ancrage des vésicules à la membrane (par exemple des protéines SNARE, voir section 1.2.1). La liaison du calcium à la synaptotagmin provoque vraisemblablement un changement de conformation de certaines protéines impliquées dans cet ancrage, ce qui va mener à la fusion de la vésicule avec la membrane plasmique (voir section 1.2.2, Jackson and Chapman 2006).
4. La fusion de la vésicule synaptique avec la membrane plasmique s'accompagne de la libération des neurotransmetteurs qu'elle contient dans la fente synaptique.
5. Ces neurotransmetteurs diffusent dans la fente synaptique, et se lient à des protéines postsynaptiques, appelés récepteurs des neurotransmetteurs. Ces récepteurs sont — pour la plupart — des canaux ioniques, dont l'ouverture dépend de leur liaison aux neurotransmetteurs. La liaison des neurotransmetteurs à ces récepteurs provoque donc l'ouverture de ces canaux ioniques.
6. Le flux d'ions à travers ces canaux ioniques (récepteurs) provoque un changement de potentiel de la membrane plasmique, et l'initiation d'un signal électrique qui peut être propagé dans le neurone postsynaptique.

La transmission synaptique est très rapide : 1 ms sépare l'arrivée du potentiel d'action dans le terminal présynaptique du changement de potentiel de la membrane postsynaptique. L'état de l'assemblage synaptique est cependant modifié sur une durée un peu plus longue : dans le compartiment présynaptique, l'organisation et la composition de la membrane présynaptique est modifiée suite à la fusion de la vésicule synaptique, et dans le compartiment postsynaptique, certains récepteurs vont se trouver un moment "désensibilisés". Ces phénomènes seront décrits plus loin (voir sections 1.2 et 1.5.4).

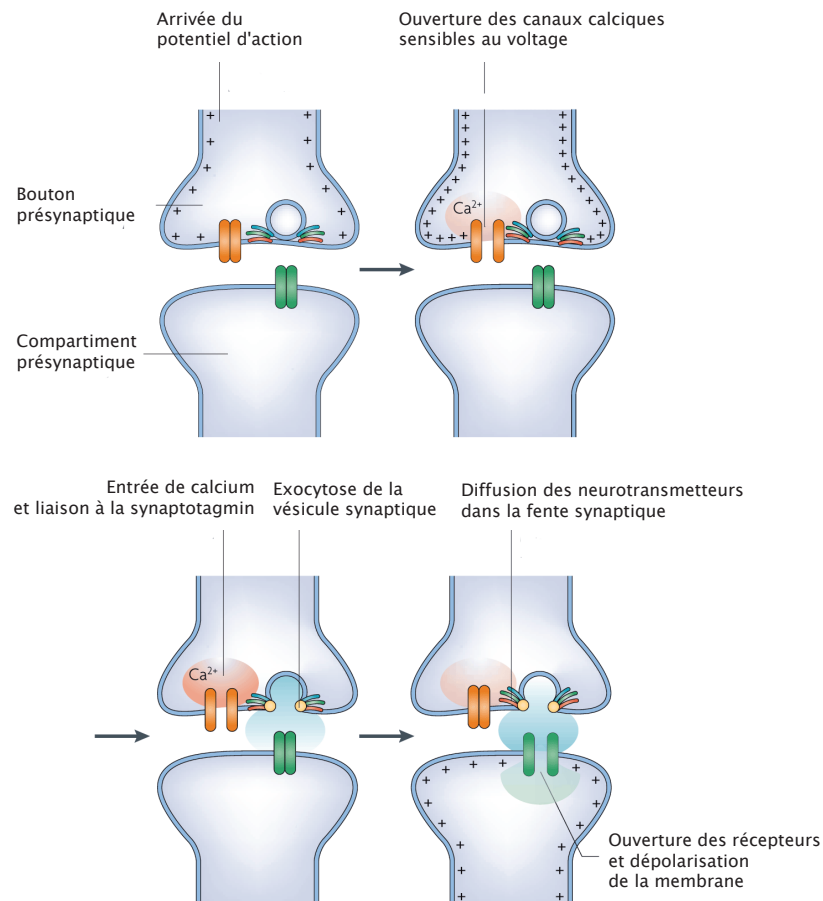


FIGURE 3.: La transmission synaptique. Sont illustrées les différentes étapes décrites dans le texte. D'après Lisman *et al* (Lisman et al. 2007).

1.1.3 Organisation du compartiment présynaptique

Plusieurs régions ou éléments fonctionnels peuvent être distingués dans le compartiment présynaptique (figure 4) : la zone active où a lieu la libération de neurotransmetteurs, la réserve des vésicules synaptiques, et la cytomatrice présynaptique, qui désigne l'assemblage moléculaire qui fait office d'échafaudage et "structure" la terminaison présynaptique. Une

région pérисynaptique et un domaine mitochondrial sont parfois aussi mentionnés (Dresbach et al. 2001).

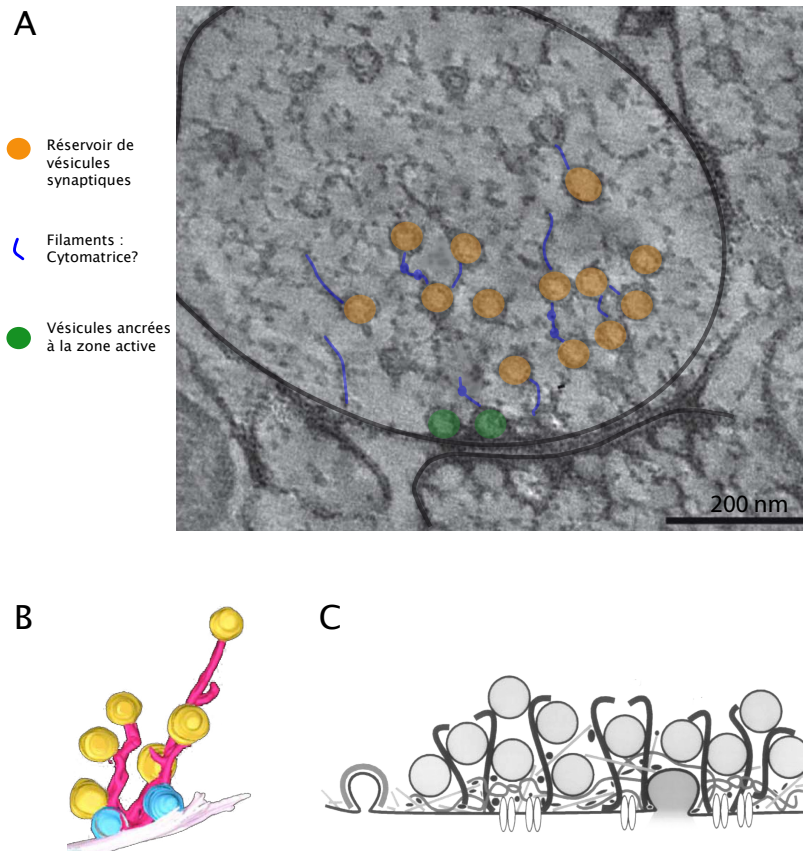


FIGURE 4.: Organisation de la terminaison présynaptique. A. Cliché de microscopie électronique d'une terminaison présynaptique dans des neurones de l'hippocampe, sur lequel sont indiqués les différents éléments de la terminaison présynaptique. D'après Siksou *et al* (Siksou et al. 2007). B. Reconstitution de l'organisation des vésicules synaptiques dans la terminaison présynaptique à partir de clichés de microscopie électronique. Les vésicules bleues sont ancrées à la membrane, les vésicules jaunes appartiennent au réservoir, et des filaments (roses) relie ces vésicules entre elles et à la membrane. D'après Siksou *et al* (Siksou et al. 2007). C. Représentation de la zone active par Dresbach *et al*, qui suggère l'encombrement moléculaire dans cette région (Dresbach et al. 2001).

1.1.3.1 La zone active

La zone active est définie comme la région où les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique. Elle est particulièrement reconnaissable sur des clichés de microscopie électronique, puisque des vésicules synaptiques y sont ancrées à la membrane. Environ une dizaine de vésicules sont ancrées à chaque synapse (Rizzoli and Betz 2005; Schikorski and

Stevens 1997). Ces vésicules sont en contact avec du matériel “électron-dense” observé sur la face intérieure de la membrane (Siksou et al. 2007). De nombreuses vésicules sont également présentes dans le bouton présynaptique sans être en contact avec la membrane plasmique : elles constituent le “réservoir” décrit dans le paragraphe suivant.

Ce matériel électron-dense observé à proximité de la membrane peut correspondre à plusieurs types de protéines présentes à la zone active. On y trouve notamment des protéines d’adhésion, des canaux ioniques qui régulent le potentiel de membrane et l’entrée de calcium dans le bouton présynaptique qui précède l’exocytose, et des protéines impliquées dans l’ancrage des vésicules synaptiques (appelées protéines SNARE, voir section 1.2.1).

Les protéines d’adhésion interagissent avec des protéines membranaires postsynaptiques, participant ainsi au contact entre les neurones pré- et post-synaptiques. Ces protéines sont engagées dans des interactions homophiliques (avec des protéines identiques mais du côté postsynaptique) ou hétérophiliques (avec des protéines postsynaptiques différentes). Elles incluent notamment les neurexins (qui interagissent avec les neuroligins), les cadherins et synCAM (Dean and Dresbach 2006; Washbourne et al. 2004). Des protéines d’adhésion telles que les catenins et cadherins, ont également été observées à la périphérie de la zone active (Uchida et al. 1996).

Selon une revue publiée en 1999, quarante types de canaux ioniques auraient été identifiés dans différentes terminaisons nerveuses (Meir et al. 1999). Parmi les canaux sensibles au voltage, les canaux calciques de type N, P/Q et R sont directement impliqués dans l’exocytose (Ertel et al. 2000). Par exemple, les canaux de type P/Q sont accumulés dans les régions synaptiques de l’hippocampe (Bucurenciu et al. 2008). D’autres canaux ioniques sensibles au voltage régulent le potentiel de membrane dans la terminaison présynaptique, notamment les canaux sodiques, potassiques et chloriques (Meir et al. 1999).

Enfin, deux protéines particulières associées à la membrane plasmique sont impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques : syntaxin 1 et SNAP 25. Ces protéines interagissent avec une troisième protéine présente dans la membrane des vésicules synaptiques pour former un complexe appelé complexe SNARE, qui est au cœur du processus d’exocytose. Les protéines de ce complexe sont détaillées dans la section 1.2.1.2.

1.1.3.2 *Le réservoir de vésicules synaptiques*

Le compartiment présynaptique contient une centaine de vésicules synaptiques (entre 50 et 200), qui ne sont pas ancrées à la membrane plasmique et constituent un réservoir (Rizzoli and Betz 2005; Schikorski and Stevens 1997; Siksou et al. 2007). Les vésicules sont reliées entre elles par des filaments observés en microscopie électronique (Siksou et al. 2007, et voir figure 4). Ces filaments pourraient en partie être constitués de synapsin. La synapsin est une protéine qui peut s’associer à la membrane des

vésicules synaptiques et au cytosquelette d'actine (Bähler and Greengard 1987). Lorsque la synapsin est phosphorylée, elle se dissocie du cytosquelette, les vésicules synaptiques se trouvent ainsi "relâchées" et disponibles pour devenir compétentes pour la fusion (Chi et al. 2001). La synapsin peut donc participer à la régulation de la répartition spatiale des vésicules dans le bouton synaptique.

La composition protéique de la membrane des vésicules synaptiques est très différente de celle de la membrane plasmique. Lors de l'exocytose, la composition de la membrane plasmique se trouve donc modifiée, et au site d'endocytose, la membrane plasmique doit avoir une composition locale qui correspond à celle d'une vésicule synaptique. La composition moléculaire des vésicules synaptiques a récemment été analysée et quantifiée, environ 80 protéines membranaires ont été identifiées (Takamori et al. 2006). La protéine la plus abondante est VAMP2/synaptobrevin 2 (70 par vésicule), la protéine SNARE, qui interagit avec les deux autres protéines SNARE de la membrane plasmique syntaxin 1 et SNAP 25 pour former un complexe impliqué dans l'exocytose (voir section 1.2.1.2). Une autre protéine des vésicules synaptiques impliquée dans l'exocytose est la synaptotagmin, qui a un rôle de détecteur du calcium (voir section 1.2.2 et Chapman 2008). De nombreuses autres protéines sont présentes, impliquées dans la régulation de l'exocytose, de l'endocytose, du remplissage des vésicules avec les neurotransmetteurs, et de l'acidification des vésicules par exemple.

1.1.3.3 *La cytomatrice*

Le terme cytomatrice est défini de manière assez floue. Il désigne les molécules qui vraisemblablement ont un rôle structural, mais ces molécules restent parfois peu caractérisées.

L'organisation en 3D de la terminaison présynaptique dans les neurones de l'hippocampe chez la souris a été observée en microscopie électronique avec une technique de congélation à haute pression qui évite les artefacts dus à l'utilisation de fixateurs chimiques (Siksou et al. 2007). D'après ces données, le bouton présynaptique contient un réseau de filaments qui relient les vésicules du réservoir entre elles, relient les vésicules localisées à la périphérie de ce réseau à la membrane plasmique par des filaments plus longs, et relient les vésicules ancrées à la membrane plasmique. La zone active est plus dense en filaments que le reste de la terminaison. La nature de ces filaments n'a pas encore été identifiée, mais ils pourraient être composés de protéines de la cytomatrice.

Parmi les molécules identifiées de la cytomatrice, on trouve des protéines de la famille MAGUK (membrane-associated guanylate kinase), Munc13, Rim (Garner et al. 2000), et les protéines Bassoon, Piccolo, CAST et liprine (Dresbach et al. 2001; Fenster et al. 2000; Takao-Rikitsu et al. 2004). Toutes ces protéines sont des protéines multidomaines qui se lient à plusieurs partenaires. Les protéines MAGUKs (comme CASK, SAP90, SAP97) ne sont pas spécifiquement localisées à la zone active, contrairement à Munc13, Rim, Bassoon et Piccolo.

Le cytosquelette d'actine est également présent dans la terminaison présynaptique. Il semble qu'il ait un rôle dans l'organisation des vésicules du réservoir (Sankaranarayanan et al. 2003). En particulier, le cytosquelette d'actine interagit avec la syntaxin qui est associée à la membrane des vésicules synaptiques, comme indiqué dans le paragraphe précédent.

N.B. : La zone active, le réservoir de vésicules et la cytomatrice ne sont pas trois "éléments" séparés : des interactions moléculaires ont lieu entre ces éléments, et les vésicules ainsi que les protéines sont en mouvement (voir section 1.5). Par exemple, les vésicules synaptiques du réservoir peuvent être amenées à être ancrées à la zone active. À titre indicatif, vous trouverez sur la figure 5 une représentation de l'organisation moléculaire du compartiment présynaptique selon Ziv et Garner (Ziv and Garner 2004) — toutes les molécules présentes sur cette illustration ne sont pas décrites dans ce manuscrit. Dans la section suivante, nous décrirons le processus d'exocytose des vésicules synaptiques, qui constitue un processus dynamique particulier dans lequel est impliquée la syntaxin.

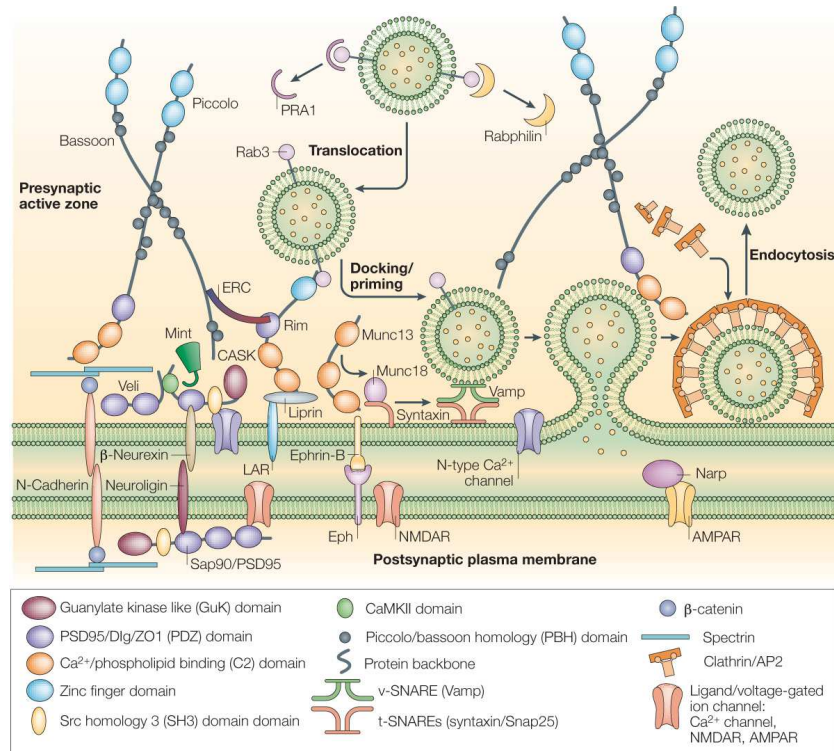


FIGURE 5.: Composition moléculaire du compartiment présynaptique. D'après Ziv et Garner (Ziv and Garner 2004).

1.2 L'EXOCYTOSE DES VÉSICULES SYNAPTIQUES

La transmission du signal présynaptique au neurone postsynaptique est assurée par l'exocytose des vésicules synaptiques qui libèrent les neu-

rotransmetteurs dans la fente synaptique. La fusion d'une vésicule avec la membrane plasmique est un événement régulé : la fusion est très rapide, et répond à l'entrée de calcium dans le bouton présynaptique. Au cœur de ce processus d'exocytose se trouve le *complexe SNARE*. D'autres protéines interagissent ensuite avec ces protéines SNARE, pour former le *complexe exocytotique*. Ci-dessous nous décrivons le complexe SNARE puis les protéines qui participent au complexe exocytotique, et enfin le processus de fusion de la membrane de la vésicule avec la membrane plasmique.

1.2.1 *Le complexe SNARE*

La fusion de deux membranes opposées n'est pas un processus spontané. Elle nécessite le franchissement d'une importante barrière énergétique, en particulier parce qu'elle requiert la déshydratation des têtes polaires des lipides pour qu'elles entrent en contact les unes avec les autres, puis un changement de courbure important des membranes. *In vitro*, la fusion de liposomes peut prendre des heures (Weber et al. 1998). Dans les synapses, la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane a lieu en moins d'une milliseconde. Elle repose d'abord sur trois protéines, les protéines SNARE.

1.2.1.1 *Identification des protéines SNARE*

Plusieurs approches indépendantes ont mené à l'identification des trois protéines SNARE. D'une part, le groupe de Rothman a étudié le transport dans l'appareil de Golgi : ils ont d'abord identifié des facteurs solubles essentiels pour le transport (NSF - *N-ethylmaleimide sensitive factor*), puis les protéines adaptatrices de ces facteurs (SNAP - *soluble NSF attachment proteins*), et enfin les "récepteurs" de ces SNAPs, les SNAREs (*SNAP REceptors*, Söllner et al. 1993). Ces protéines SNARE correspondaient en fait à trois protéines déjà identifiées : VAMP 2/synaptobrevin 2 (Südhof et al. 1989), SNAP 25 (Synaptosome-associated protein, Oyster et al. 1989), et syntaxin 1 (Bennett et al. 1992).

Simultanément, les protéines SNARE ont été identifiées comme cibles de la toxine tétanique et des toxines botuliques qui bloquent la neurotransmission : la libération de neurotransmetteurs est fortement inhibée par la toxine botulique A qui clive sélectivement SNAP 25 (Blasi et al. 1993a), la toxine botulique C1 qui clive syntaxin 1 (Blasi et al. 1993b), et la toxine botulique B qui clive synaptobrevin 2 (Blasi et al. 1993b). Ces observations ont attribué à ces trois protéines un rôle clé dans l'exocytose (Schiavo et al. 2000).

En 1994, Rothman et Warren postulent la "SNARE hypothesis", selon laquelle le mécanisme de fusion vésiculaire serait commun pour les différents types de membrane et de cellules et impliquerait une même famille de protéines, chaque protéine de cette famille étant associée spécifiquement à un type de fusion (Rothman and Warren 1994). Par exemple, le transport vésiculaire au sein de l'appareil de Golgi tout comme la fusion

des vésicules synaptiques impliqueraient des protéines de la même famille. Il s'avère effectivement que les processus de fusion des vésicules chez les eucaryotes reposent tous sur des protéines SNARE (Bock et al. 2001).

L'hypothèse selon laquelle ces trois protéines sont au cœur de l'exocytose est en effet séduisante : la syntaxin 1 et SNAP 25 sont associés à la membrane plasmique, et la synaptobrevin 2 est présente dans la membrane des vésicules. Ces protéines interagissent pour former un complexe qui permettrait d'ancrer les vésicules synaptiques à la membrane plasmique pour les mener à la fusion (voir section suivante, Sutton et al. 1998). La confirmation de leur implication directe dans la fusion des vésicules a été obtenue par des expériences *in vitro* : la présence de protéines SNARE dans les protéoliposomes accélère la vitesse de fusion de ces vésicules (Weber et al. 1998). Le complexe SNARE est maintenant considéré comme la machinerie minimale pour la fusion des vésicules.

1.2.1.2 Le complexe SNARE

Dans les neurones, les trois protéines syntaxin 1, SNAP 25 et synaptobrevin 2 interagissent pour former un complexe trimérique, le complexe SNARE voir figure 6 (Brunger et al. 2009; Jahn and Scheller 2006; Südhof and Rothman 2009). Ce complexe (décrit ci-dessous), est constitué d'un domaine de la syntaxin 1, d'un domaine de la synaptobrevin 2 et de deux domaines de SNAP 25. Ces domaines sont tous appelés "domaines SNARE". Voici d'abord quelques caractéristiques structurales de ces protéines :

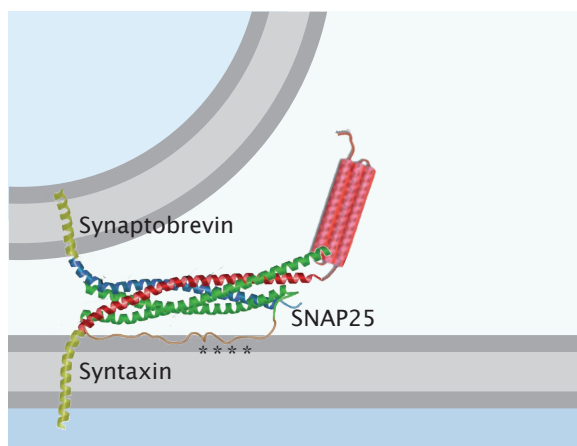


FIGURE 6.: Structure du complexe SNARE. D'après Sutton *et al* (Sutton et al. 1998). Les domaines SNARE de la syntaxin (rouge), de synaptobrevin (bleu), et de SNAP 25 (vert) forment un faisceau de quatre hélices. Quatre étoiles indiquent les résidus palmitoylés de SNAP 25.

SYNTAXIN 1 est une protéine de 35 kDa, constituée d'un domaine transmembranaire C-terminal, du domaine SNARE, et d'un domaine N-terminal, organisé en un faisceau de trois hélices antiparallèles (voir section 1.3 pour une description plus détaillée).

SNAP 25 est constitué de deux domaines SNARE reliés par un “lien” qui comprend quatre résidus palmitoylés, qui s’insèrent dans la membrane plasmique (Fasshauer et al. 1997; Veit et al. 1996).

SYNAPTOBREVIN 2 est une protéine de la famille VAMP (*vesicle associated membrane protein*); les protéines VAMP sont impliquées dans différents processus de fusion des vésicules. En particulier, VAMP 1 et VAMP 2, également appelées synaptobrevins, sont impliquées dans l'exocytose des vésicules synaptiques. Synaptobrevin 2 est une petite protéine membranaire des vésicules synaptiques (18 kDa), constituée d'un domaine transmembranaire C-terminal (dans la membrane des vésicules synaptiques) suivi du domaine SNARE et d'un court domaine N-terminal.

Par la suite, nous noterons syntaxin 1 seulement syntaxin et synaptobrevin 2 synaptobrevin.

Ces trois protéines interagissent pour former le complexe SNARE (trimérique), ainsi que d'autres complexes dimériques (Brunger et al. 2009).

SYNTAXIN-SNAP 25 La syntaxin et SNAP 25 forment un complexe binaire, qui constitue vraisemblablement un complexe “accepteur” pour synaptobrevin 2 (Fasshauer and Margittai 2004; Weninger et al. 2008). La formation de ce complexe binaire serait ainsi une étape dans la formation du complexe SNARE. Des expériences de FRET menées *in vitro* à l'échelle de la molécule unique ont révélé que la conformation de ce complexe est variable : soit les trois domaines SNARE des molécules interagissent ensemble et forment une triple hélice, soit un seul des deux domaines SNARE de SNAP 25 interagit avec le domaine SNARE de la syntaxin, le deuxième domaine de SNAP 25 restant dissocié (Weninger et al. 2008). La présence de la synaptobrevin stabilise la conformation en triple hélice du complexe binaire (et abolit l'alternance entre les différentes conformations), et permet la formation du complexe SNARE. Il est à noter que la conformation en triple hélice est également stabilisée par des protéines comme la synaptotagmin, Munc 13, ou Munc 18 (de Wit et al. 2009; Weninger et al. 2008; Zilly et al. 2006).

SYNTAXIN-SYNAPTOBREVIN Une interaction existe également entre la synaptobrevin et la syntaxin, en l'absence de SNAP 25. Cette interaction reste faible, et le complexe formé est bien moins stable que le complexe SNARE (Liu et al. 2006). Cependant, on notera que la fusion de protéoliposomes est possible en présence de la syntaxin et de la synaptobrevin uniquement, sans SNAP 25 (Liu et al. 2005), et que dans les souris *knock-out* pour SNAP 25, la fusion spontanée des vésicules synaptiques n'est pas abolie (Schoch et al. 2001; Washbourne et al. 2002).

LE COMPLEXE SNARE Dans ce complexe, les domaines SNARE de la syntaxin, de la synaptobrevin 2 et de SNAP 25 forment un faisceau

de quatre hélices parallèles (figure 6, Sutton et al. 1998). Le complexe SNARE est particulièrement stable *in vitro* (Hayashi et al. 1994). La formation de ce complexe entre deux membranes est associée à une énergie de 21 kcal/mol (la fusion des membranes requiert une énergie de l'ordre de 24 kcal/mol, voir section 1.2.2.7).

1.2.2 Le complexe exocytotique

La fusion des vésicules synaptiques présente des propriétés spécifiques. Elle est particulièrement rapide : *in vitro* la fusion de protéoliposomes contenant uniquement des protéines SNARE reste plus lente que la fusion des vésicules synaptiques (5 à 10 ms au plus rapide, alors que la fusion des vésicules synaptiques a lieu en moins d'1 ms, Wang et al. 2009).

De plus, la fusion est précisément contrôlée : les vésicules sont ancrées à la membrane sans pour autant fusionner spontanément avec celle-ci. La fréquence d'exocytose spontanée est de l'ordre de 1 à 2 vésicules par minute (Fredj and Burrone 2009). En revanche, à la suite d'une stimulation, la probabilité qu'une vésicule fusionne avec la membrane est de l'ordre de 0.5, alors même qu'environ une dizaine de vésicules sont ancrées à la membrane (Verhage and Toonen 2007 ; la probabilité de fusionner par vésicule est donc de l'ordre de 0.05).

Ces propriétés sont obtenues avec la participation d'autres protéines au complexe exocytotique (voir figure 7 et Brunger et al. 2009; Jackson and Chapman 2006, 2008; Jahn and Scheller 2006; Rizo and Rosenmund 2008).

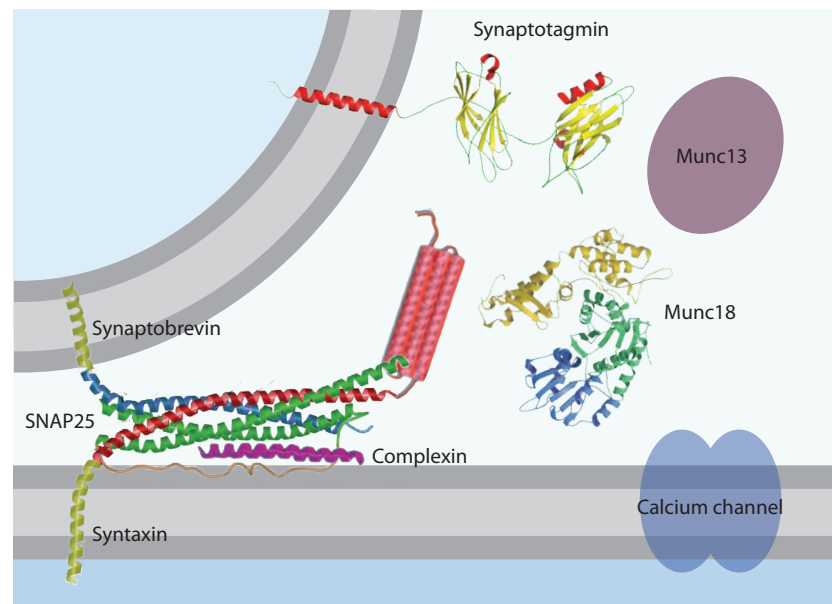


FIGURE 7: Le complexe exocytotique. Différentes protéines participent à l'exocytose des vésicules synaptiques dont les suivantes : les protéines du complexe SNARE (syntaxin, synaptobrevin, SNAP25), Munc13, Munc18, synaptotagmin, canaux calciques, complexin.

1.2.2.1 *Munc 18*

Le rôle de Munc 18 dans l'exocytose n'est pas encore totalement élucidé, mais son caractère essentiel pour la fusion et ses interactions avec la syntaxin et le complexe SNARE indiquent qu'il joue un rôle important dans l'organisation spatiale et temporelle du complexe exocytotique (Deak et al. 2009; Rizo and Südhof 2002; Südhof and Rothman 2009).

D'après des expériences *in vitro*, Munc 18 a d'abord été considéré comme ayant un rôle inhibiteur dans la transmission synaptique : Munc 18 se lie à la syntaxin lorsque la syntaxin adopte une conformation particulière, dans laquelle elle ne peut s'engager dans la formation du complexe SNARE (Dulubova et al. 1999; Misura et al. 2000). En effet, le domaine N-terminal de la syntaxin peut se replier sur son domaine SNARE, formant ainsi un faisceau de quatre hélices, ce qui correspond à la conformation *fermée* de la syntaxin. Dans cette conformation, le domaine SNARE ne peut interagir avec les autres protéines SNARE, la synaptobrevin et SNAP 25. En revanche, lorsque la syntaxin est engagée dans le complexe SNARE, son domaine N-terminal n'interagit pas avec son domaine SNARE, il s'agit alors de la conformation *ouverte* (voir section 1.3.2). Munc 18 interagit avec la conformation fermée de la syntaxin, englobant le faisceau de quatre hélices, empêchant ainsi la formation du complexe SNARE (Dulubova et al. 1999).

Cependant, Munc 18 est une protéine essentielle pour la fusion des vésicules synaptiques : dans les souris *knock out* (KO) pour Munc 18, toute fusion évoquée ou spontanée est abolie (Verhage et al. 2000). De plus, dans des protéoliposomes contenant les protéines SNARE, la présence de Munc 18 favorise la fusion des vésicules les unes avec les autres (Tarestre et al. 2008). En effet, il existe une interaction directe entre Munc 18 et le complexe SNARE *in vitro* : Munc 18 englobe également un faisceau de quatre hélices, mais cette fois il s'agit du complexe SNARE (Dulubova et al. 2007). Munc 18 semble être particulièrement adapté pour envelopper des faisceaux de quatre hélices. Les auteurs de ces résultats suggèrent que l'interaction entre Munc 18 et le complexe SNARE est un mode d'interaction assez général dans le processus de fusion de vésicules, mais que sa liaison à la syntaxin est particulière à l'exocytose neuronale.

1.2.2.2 *Munc 13*

Munc 13 est également fortement impliqué dans le complexe exocytotique, comme en témoigne l'abolition de toute fusion en son absence, et son interaction avec la syntaxin. En effet, comme pour Munc 18, l'absence de Munc 13 (de ses deux isoformes Munc 13-1 et Munc 13-2) dans les neurones abolit toute fusion, évoquée ou spontanée (Varoqueaux et al. 2002). Par ailleurs, chez *C. elegans*, le blocage de l'interaction entre Unc 13 (homologue de Munc 13) et la syntaxin provoque une perturbation de la transmission synaptique (Madison et al. 2005). Unc 13 pourrait stabiliser la conformation ouverte de la syntaxin, lui permettant ainsi de s'engager dans le complexe SNARE (Hammarlund et al. 2007; Richmond et al.

2001). En accord avec cette hypothèse, des expériences *in vitro* montrent que Munc 13 pourrait stabiliser le complexe accepteur SNAP 25-syntaxin. De plus, chez *C. elegans* ainsi que chez les murins, le nombre de vésicules ancrées à la membrane est très réduit en absence de Unc 13 / Munc 13 (Siksou et al. 2009; Weimer et al. 2006). Enfin, dans les cellules neuroendocrines, Munc 13 semble également favoriser le passage des vésicules synaptiques d'un état ancré à un état capable de fusionner avec la membrane plasmique (Ashery et al. 2000; Nofal et al. 2007).

1.2.2.3 *Complexin*

Selon l'hypothèse actuelle, la complexin se lie au complexe SNARE d'une manière qui le met dans un état "métastable", qui peut rapidement basculer vers la fusion des vésicules lorsque le calcium entre dans la terminaison synaptique (Giraud et al. 2006; Südhof and Rothman 2009; Tang et al. 2006).

En effet, chez la souris, l'exocytose évoquée est sévèrement diminuée en l'absence de complexin (Xue et al. 2008), mais également si sa concentration locale est trop élevée (Tokumaru et al. 2001). D'après des expériences menées *in vitro*, la présence de complexin dans un système de fusion de protéoliposomes inhibe la fusion, et cette inhibition est levée par l'ajout de synaptotagmin (Schaub et al. 2006). Du point de vue structural, la complexin se lie au complexe SNARE, en prenant une conformation hélicoïdale et en particulier semble stabiliser l'interaction entre les domaines SNARE de la syntaxin et de la synaptobrevin (Chen et al. 2002). Le fait que la complexin interagisse avec le complexe SNARE déjà formé suggère qu'elle intervient immédiatement avant la fusion, et pourrait par exemple réguler l'ouverture du pore de fusion entre la vésicule et la membrane (dans les cellules neuroendocrines, An et al. 2010). Le mécanisme d'action de la complexin reste controversé. Son étude est d'autant plus difficile que son rôle varie d'un organisme à l'autre comme le montre une étude récente menée chez la souris et la drosophile (Xue et al. 2009).

Enfin, un rôle de la complexin dans l'oligomérisation du complexe SNARE en "super-complexes" (Tokumaru et al. 2001) a été proposé (voir section 1.2.2.7 pour l'oligomérisation du complexe SNARE), mais cette observation n'a pu être confirmée et semble être due à un artefact (Pabst et al. 2002).

1.2.2.4 *Synaptotagmin*

La synaptotagmin est désormais considérée comme le détecteur de calcium du complexe exocytotique (Chapman 2008). Différentes mutations de la synaptotagmin affectent son affinité pour le calcium, et modifient la probabilité de libération dans l'exocytose évoquée (Fernandez-Chacon et al. 2001), ou la fréquence de libération spontanée (Xu et al. 2009). De plus, la liaison entre la synaptotagmin et le complexe SNARE est critique pour la transmission synaptique (Pang et al. 2006).

Le mécanisme d'action de la synaptotagmin n'est cependant pas encore élucidé (Brunger et al. 2009; Jackson and Chapman 2006). La synaptotagmin comprend notamment deux domaines C2 qui lient les ions calcium. La liaison aux ions calcium pourrait par exemple provoquer un changement de conformation de la protéine et une insertion partielle de ces domaines C2 dans la membrane, et pourrait ainsi contribuer à l'exocytose (Bai et al. 2004). Mais la dépendance au calcium de l'exocytose telle qu'elle est observée *in vivo* n'a pas encore été reconstituée dans des protéoliposomes. Par ailleurs, la synaptotagmin interagit avec les protéines SNARE : SNAP 25 (dans les cellules neuroendocrines, de Wit et al. 2009), la syntaxin (*in vitro*, Kee and Scheller 1996), le complexe binaire syntaxin - SNAP 25 (dans des protéoliposomes, Weninger et al. 2008) et le complexe SNARE déjà formé (*in vitro*, Bowen et al. 2005). Toutes ces interactions pourraient également contribuer à la sensibilité au calcium de l'exocytose.

1.2.2.5 Canaux calciques

Les canaux calciques permettent l'entrée des ions calcium dans la terminaison présynaptique à l'arrivée du potentiel d'action. Ces protéines interagissent notamment avec la syntaxin, via son domaine SNARE (Sheng et al. 1994) et quelques résidus transmembranaires (Bezprozvanny et al. 2000). Cette interaction pourrait permettre aux canaux calciques d'être placés près des vésicules et donc de la synaptotagmin. La synaptotagmin serait alors exposée à une concentration élevée d'ions calcium et détecterait ainsi rapidement l'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison synaptique (Shahrezaei and Delaney 2004).

1.2.2.6 Autres protéines

D'autres protéines sont impliquées dans la régulation de l'exocytose, comme par exemple la tomosyn, un partenaire de la syntaxin. Le rôle de la tomosyn n'est pas clairement élucidé. Une revue récente présente les différents arguments pour un rôle facilitateur ou inhibiteur de la tomosyn dans la transmission synaptique (Ashery et al. 2009).

Rab3, une GTPase, semble également réguler la probabilité de libération : les souris KO pour Rab 3 meurent rapidement après la naissance, et l'exocytose évoquée est diminuée de 30% (ni la structure des synapses ni l'exocytose spontanée ne sont modifiées, Schluter et al. 2004).

1.2.2.7 Oligomérisation du complexe SNARE

Du point de vue énergétique, un seul complexe SNARE ne semble pas suffisant pour conduire à la fusion d'une vésicule avec la membrane plasmique : la fusion des membranes requiert une énergie de l'ordre de 24 kcal, et selon les techniques de mesure, l'assemblage du complexe SNARE libère une énergie de l'ordre de 6.6 à 21 kcal (Fasshauer et al.

2002; Wiederhold and Fasshauer 2009). Par ailleurs, plusieurs types d'arguments suggèrent que les complexes SNARE s'organisent en un super-complexe entre la vésicule et la membrane plasmique (figure 8, Lu et al. 2008; Tokumaru et al. 2001). En particulier, en microscopie à force atomique, une structure en anneau a été observée sur des protéoliposomes en contact, d'un diamètre de 20 nm (pour des vésicules de 50 nm) à 300 nm (pour des vésicules de 800 nm) (Cho et al. 2005). Le nombre de complexes SNARE qui constituent cette structure varie de 3 à 15 selon les études (Montecucco et al. 2005).

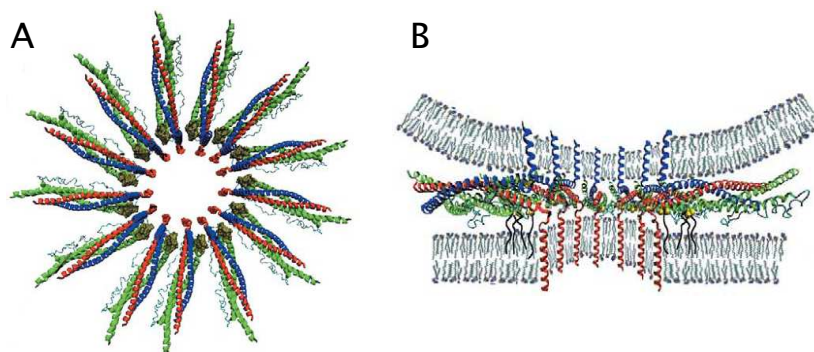


FIGURE 8.: Oligomérisation du complexe SNARE. Les complexes SNARE sont vraisemblablement impliqués dans l'exocytose sous la forme d'un super-complexe en forme d'anneau. Le nombre de complexe impliqués varie de 3 à 15 selon les études. Vues de "profil" (A) et de "dessus" (B) d'un super-complexe, proposées par Montecucco *et al* (Montecucco et al. 2005).

1.2.2.8 Un scénario séquentiel ?

Il est difficile d'intégrer toutes ces informations pour proposer une description de la régulation de la fusion des vésicules synaptiques. Ci-dessus, nous avons décrit la formation du complexe exocytotique comme si elle procédait selon une séquence d'étapes, de manière linéaire : Munc 18 interagit avec la conformation fermée de la syntaxin, Munc 13 permet son ouverture, le complexe SNARE se forme, est stabilisé par Munc 18 et la complexin, puis la fusion est déclenchée par la liaison de la synaptotagmin au calcium entrant dans la terminaison synaptique. Alternativement, on peut proposer que le complexe exocytotique puisse se trouver dans des états différents (suivant les protéines présentes, leur conformation, phosphorylation, etc.), qui correspondent à des probabilités de libération différentes.

En effet, il semble que la fusion peut avoir lieu dans différentes conditions avec des cinétiques différentes. Comme mentionné précédemment, la fusion de protéoliposomes est possible sans SNAP 25, avec seulement la syntaxin et la synaptobrevin 2 (Liu et al. 2005). De même, dans les souris KO pour SNAP 25 ou pour synaptobrevin 2, la fusion évoquée est abolie, mais la fusion spontanée des vésicules est encore possible (Schoch

et al. 2001; Washbourne et al. 2002). Ainsi, Schoch *et al* ont proposé que les protéines SNARE ne sont pas absolument requises pour la fusion, mais sont essentielles dans la mesure où elles sont cinétiquement limitantes pour la fusion, et/ou impliquées dans la détection de la stimulation (Schoch et al. 2001).

1.2.2.9 Différences entre les systèmes d'étude

Le mécanisme de fusion d'une vésicule avec une membrane peut être étudié dans différents systèmes, qui vont des vésicules reconstituées *in vitro*, aux cellules sécrétrices comme les cellules neuroendocrines et aux neurones de différents organismes. Les mécanismes de fusion dans ces différents systèmes peuvent partager des points communs, mais aussi présenter des différences. Il est donc important de spécifier dans quelles conditions les résultats sont obtenus et les modèles sont développés. On observe effectivement quelques contradictions entre les observations faites dans différents systèmes.

Chez la drosophile, à la jonction neuromusculaire, l'absence de syntaxin1A ne perturbe pas l'ancrage des vésicules, ni la fusion spontanée, mais aucune fusion n'est observée en réponse à un stimulus (Broadie et al. 1995). Contrairement à la drosophile, dans les cellules neuroendocrines, l'ancrage des vésicules est très réduit après clivage de la syntaxin 1 (de Wit et al. 2006).

De même, alors que dans les souris KO pour Munc 18-1, l'ancrage des vésicules à la membrane plasmique n'est pas perturbé (Verhage et al. 2000), chez *C. elegans* et dans les cellules neuroendocrines, le nombre de vésicules ancrées est fortement diminué en l'absence de Munc 18-1 (ou de son homologue chez *C. elegans*, Gulyas-Kovacs et al. 2007; Toonen et al. 2006; Weimer et al. 2003). Cependant, les cellules chromaffines n'expriment qu'un isoforme, Munc 18-1, alors que les souris expriment Munc 18-1 et Munc 18-2. Or, il semble que Munc 18-2 peut avoir la même fonction d'ancrage que Munc 18-1, mais pas le même rôle dans l'amorçage des vésicules (Gulyas-Kovacs et al. 2007). Cela pourrait expliquer que l'ancrage est préservé dans les neurones de souris KO pour Munc 18-1, malgré l'absence d'exocytose. Enfin, il ne faut pas oublier que dans les organismes KO, des mécanismes de compensation peuvent se mettre en place, par exemple par des protéines impliquées dans d'autres processus de fusion membranaire.

Une fois que le complexe exocytotique est formé et que les ions calcium pénètrent dans la terminaison synaptique, la fusion de la vésicule peut se poursuivre selon différents modes. Nous décrivons le processus de fusion dans la section suivante.

1.2.3 La fusion des membranes

À l'initiation de l'exocytose d'une vésicule, un "pore de fusion" se forme entre la vésicule et la membrane plasmique, libérant les neurotransmet-

teurs dans la fente synaptique. Ensuite, la fusion peut se poursuivre selon différents modes, qui auront notamment des conséquences différentes sur la diffusion des lipides et des protéines de la vésicule synaptique dans la membrane plasmique. La fusion des membranes et la diffusion de leurs constituants ne sont pas très bien caractérisées, voici cependant quelques éléments de description de ces phénomènes.

1.2.3.1 *Formation du pore de fusion*

Lorsque la membrane plasmique et la membrane de la vésicule sont en contact, les deux feuillettes de chaque membrane peuvent fusionner en même temps ou successivement. Dans les vésicules lipidiques reconstituées, les feuillettes “extérieurs” fusionnent avant les feuillettes intérieurs. Cet état intermédiaire, dans lequel les feuillettes intérieurs n’ont pas encore fusionné, est appelé hémifusion (figure 9). La fusion de protéoliposomes contenant les protéines SNAREs semble également passer par cet état d’hémifusion (Jackson and Chapman 2006; Reese et al. 2005).

Lorsque les feuillettes intérieurs sont en contact, un pore de fusion se forme, initiant la fusion des deux membranes. Dans le cas de la fusion régulée par des protéines, deux modèles existent pour décrire le pore de fusion. Dans le premier, des protéines permettent de “rapprocher” les membranes. Les lipides entrent alors en contact et un pore lipidique se forme (figure 9-A). Selon le deuxième modèle, les protéines permettent non seulement de rapprocher les membranes mais elles constituent également le pore de fusion (figure 9-B). À la synapse, différentes expériences suggèrent que des protéines membranaires pourraient constituer ce pore de fusion : par exemple, des mutations ponctuelles du domaine transmembranaire de la syntaxin modifient le flux de neurotransmetteurs (Han et al. 2004; Jackson and Chapman 2006).

1.2.3.2 *Différents modes d'exocytose*

Une fois qu’un pore de fusion s’est formé, la fusion peut se poursuivre de deux manières : ou bien le pore se referme, ou bien la membrane de la vésicule est entièrement intégrée à la membrane plasmique. Le premier mode d’exocytose est appelé *kiss-and-run* (KR), le second *full-collapse-fusion* (FCF) (He et al. 2006). La question du mode prédominant selon les circonstances est aujourd’hui ouverte (Balaji and Ryan 2007; Harata et al. 2006).

Je mentionnerai en particulier le travail de l’équipe de R. Tsien, qui permet de suivre le mode de fusion et sa dynamique à l’échelle de la vésicule unique (Zhang et al. 2009). Des *quantum dots* (des particules fluorescentes d’environ 15 nm de diamètre, voir section 2.2.2), dont la fluorescence est sensible au pH, sont internalisés dans les vésicules synaptiques. Le pH de l’intérieur des vésicules est acide. En mode KR, lorsqu’un pore de fusion s’ouvre entre la vésicule et la membrane plasmique, le pH augmente, ce qui se traduit par une augmentation transitoire de la fluorescence du quantum dot, suivie par un retour au niveau de fluorescence

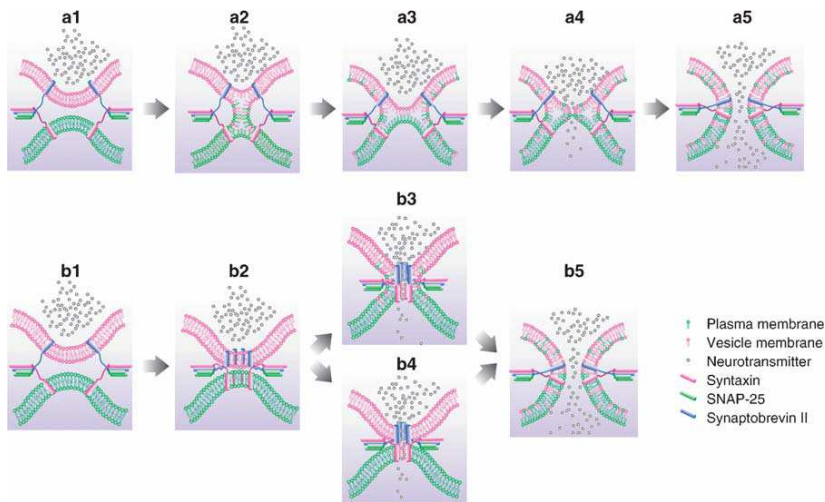


FIGURE 9.: Deux modèles de la fusion des membranes. A. Modèle du pore lipidique. Les protéines SNARE permettent le rapprochement des membranes qui vont ensuite fusionner lorsqu'elles seront suffisamment proches, sans autre intervention des protéines SNARE. B. Modèle du pore de protéines. Le pore de fusion est constitué des domaines transmembranaires des protéines. Quand le pore se dilate, les lipides envahissent le pore et les deux membranes fusionnent. L'hémifusion peut avoir lieu, mais ce n'est pas nécessaire (b3-4). D'après Jackson et Chapman (Jackson and Chapman 2006).

initiale, sans changement de position (figure 10). En revanche, en mode FCF, la fluorescence augmente également au moment de la fusion, mais le quantum dot disparaît ensuite quand la membrane de la vésicule est entièrement intégrée dans la membrane plasmique. Cette approche a permis de suivre les modes de fusion des vésicules dans différentes conditions, et de mesurer leur cinétique.

Les différences entre ces deux modes de fusion ont plusieurs implications, notamment pour la cinétique de libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (He et al. 2006), la cinétique de réorganisation de vésicules "fonctionnelles" après l'exocytose (Kavalali 2007), et le mélange des membranes vésiculaires et plasmiques et le tri moléculaire qui doit s'opérer par la suite (Aravanis et al. 2003; Fernández-Alfonso et al. 2006).

1.2.3.3 Diffusion latérale des lipides et des protéines après la fusion

Quelques études ont décrit la diffusion des lipides d'une vésicule dans la membrane plasmique après fusion. Par exemple, dans les cellules bipolaires de la rétine, lorsque une vésicule individuelle est marquée avec le lipide fluorescent FM 1-43, la diffusion des lipides de la vésicule après sa fusion peut être suivie par fluorescence avec une résolution temporelle de 15 ms (Zenisek et al. 2002). Le coefficient de diffusion calculé est de $1.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

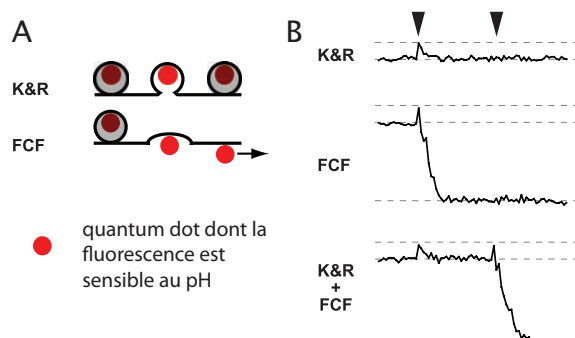


FIGURE 10.: Observation des modes d'exocytose, par Zhang *et al.* A. Deux modes de fusion sont présentés : kiss-and-run (K&R) et full-collapse-fusion (FCF). Les vésicules synaptiques contiennent des quantum dots (rouge) dont la fluorescence est sensible au pH. L'environnement acide de la lumière des vésicules diminue l'intensité de la fluorescence. Quand le quantum dot est exposé au milieu extracellulaire, sa fluorescence augmente. B. Exemples de traces de l'intensité du quantum dot en fonction du temps. Les flèches indiquent des stimulations électriques. Une augmentation de fluorescence indique l'ouverture de la vésicule. Si celle-ci se referme (K&R) la fluorescence revient à son niveau initial, si la vésicule fusionne complètement avec la membrane, la fluorescence "disparaît", indiquant la libération du quantum dot. Zhang *et al* (Zhang *et al.* 2009).

Récemment, la fusion de vésicules lipidiques contenant les protéines SNARE a été suivie avec une résolution temporelle d'une milliseconde (Wang *et al.* 2009). Trois types de fusion sont distingués : (i) une fusion rapide dans laquelle les lipides et le contenu des vésicules sont libérés simultanément en 5 à 10 ms, (ii) une hémifusion "productive", où les feuillettes extérieures des membranes fusionnent (environ 8 ms), puis le contenu est libéré (100 ms), et (iii) une hémifusion non productive, où les feuillettes extérieures fusionnent sans libération du contenu.

Dans les synapses, la question de la diffusion latérale des protéines après l'exocytose a un enjeu particulier : la composition de la membrane des vésicules synaptiques est différente de celle de la membrane plasmique. La reconstitution de la composition locale de la membrane plasmique implique donc vraisemblablement la diffusion latérale des protéines membranaires. Comme indiqué dans l'introduction, nous avons choisi d'étudier la diffusion latérale de la protéine SNARE syntaxin1A, protéine membranaire présynaptique, impliquée dans l'exocytose des vésicules synaptiques.

1.3 SYNTAXIN 1A

1.3.1 *Isoformes*

Aujourd'hui, une quinzaine de gènes codant pour des protéines de la famille des syntaxin ont été identifiés chez les mammifères (Teng et al. 2001). Plus généralement, des séquences proches de celle de la syntaxin sont présentes chez tous les eucaryotes qui ont été examinés.

Les syntaxin 1A et 1B sont exprimées dans les neurones et les cellules sécrétrices. Les autres syntaxin (à l'exception de syntaxin 17 et 18) sont présentes dans tous les tissus, mais impliquées dans différents processus, comme le transport entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, le transport au sein du réseau trans-golgi, ou l'exocytose.

Ci-dessous, lorsque ce n'est pas précisé, le terme *syntaxin* fera référence à la syntaxin1A .

1.3.2 *Structure et conformations*

La syntaxin1A compte 288 acides aminés (aa). Elle est constituée des domaines suivants (figure 11 et Misura et al. 2000) :

- le domaine N-terminal Habc : aa 31-154 (Ha 31-60, Hb 70-104, Hc 111-154)
- un "lien" : aa 162-169
- un domaine H₃ : aa 186-248, aussi appelé domaine SNARE car il est impliqué dans les interactions avec les protéines synaptobrevin 2 et SNAP 25
- un domaine transmembranaire simple : aa 266-283

Les structures tridimensionnelles des différents domaines de la syntaxin ont été obtenues par différentes méthodes : résonance magnétique nucléaire (RMN) ou résonance paramagnétique électronique (RPE) pour la protéine en solution, ou diffusion des rayons X (DRX) sur un cristal. Tout d'abord, le domaine transmembranaire de la syntaxin est structuré selon une hélice α (RPE, Zhang and Shin 2006). Ensuite, la structure des domaines intracellulaires dépend des partenaires avec lesquels la syntaxin est en interaction. En particulier, comme décrit précédemment, la syntaxin peut se trouver dans deux conformations particulières, *ouverte* et *fermée* (voir figure 11). Dans la conformation ouverte, le domaine Habc n'interagit pas avec le domaine H₃ ; dans la conformation fermée, le domaine Habc se replie sur le domaine H₃ (figure 11 A-B).

En l'absence de partenaires, le domaine Habc est constitué de trois hélices α , qui sont repliées les unes sur les autres en un faisceau torsadé dans le sens anti-horaire (RMN, Fernandez et al. 1998). La syntaxin peut se trouver dans les deux conformations mentionnées ci-dessus, ouverte et fermée. Dans la conformation ouverte, le domaine Habc n'interagit pas avec le domaine H₃, et le domaine C-terminal du domaine H₃ est non structuré (RMN, Fiebig et al. 1999) ; dans la conformation fermée, le domaine Habc se replie sur le domaine H₃, pour former un faisceau de

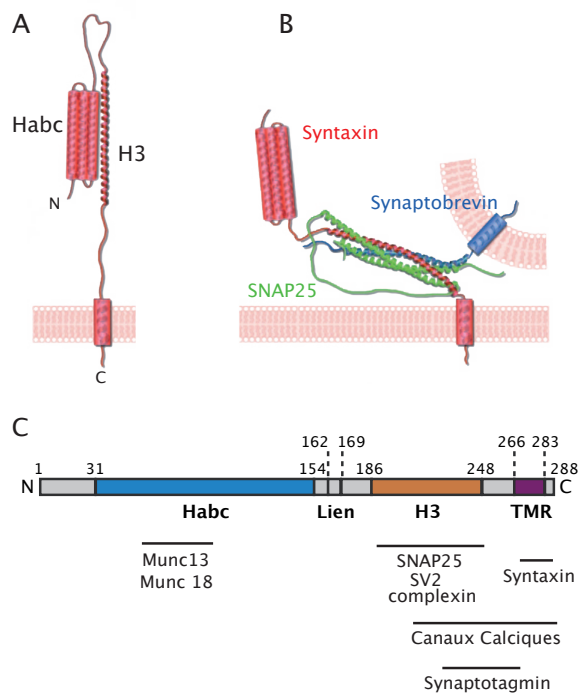


FIGURE 11.: La syntaxin 1. A-B. Représentations de la structure tridimensionnelle de la syntaxin dans sa conformation fermée (A) et ouverte, dans le complexe SNARE (B), d'après Toonen et Verhage (Toonen and Verhage 2003). C. Localisation des différents domaines sur la séquence de la syntaxin, et des différents sites d'interaction avec ses partenaires. H3 est aussi appelé domaine SNARE, impliqué dans la formation du complexe du même nom. TMR indique la région transmembranaire.

quatre hélices antiparallèles (Fernandez et al. 1998, RMN, Dulubova et al. 1999). Le lien entre les domaines Habc et H3 présente une structure de tours et petites hélices α (EPR, Margittai et al. 2003a). La syntaxin change de conformation (entre ouverte et fermée) avec une vitesse de transition de l'ordre de 0.8 ms (Margittai et al. 2003b).

Lorsque SNAP 25 et la synaptobrevin sont présents, la syntaxin adopte la conformation ouverte. Le domaine H3 prend une structure d'hélice α . Il constitue, avec deux domaines de SNAP 25 et un domaine de la synaptobrevin, le cœur du complexe SNARE : un faisceau de quatre hélices α parallèles, fortement torsadé dans le sens horaire (voir section 1.2.1.2, et Sutton et al. 1998). Le domaine N-terminal forme toujours un faisceau de trois hélices α , libre et sans interaction avec le domaine H3. Dans ce cas, le lien entre les domaines Habc et H3 n'est pas structuré (Margittai et al. 2003a).

Enfin, en présence de Munc 18, la conformation de la syntaxin est très proche de la conformation fermée observée pour la syntaxin isolée (DRX, Misura et al. 2000, RMN, Dulubova et al. 1999). Le domaine H3 contient

des hélices interrompues par des courbures moins régulières, et les 15 premiers acides aminés de H3 forment une hélice α qui interagit avec le domaine Habc pour former le faisceau de quatre hélices antiparallèles.

N.B. : Dans sa conformation fermée, la syntaxin ne peut former le complexe SNARE et ne peut donc participer à la fusion des vésicules. Cependant, bloquer la syntaxin dans sa conformation ouverte provoque également un dysfonctionnement de la synapse : des souris *knock-in* exprimant la syntaxin dans sa conformation ouverte (par une double mutation ponctuelle) ne survivent que deux semaines, et montrent une vitesse de fusion des vésicules très élevée (Gerber et al. 2008). Il semble donc que les deux conformations de la syntaxin sont importantes d'un point de vue fonctionnel, et peuvent être régulées par les interactions avec d'autres partenaires comme Munc 18 ou Munc 13 (Dulubova et al. 1999; Hammarlund et al. 2007; Richmond et al. 2001).

1.3.3 Localisation cellulaire

Syntaxin présente seulement cinq acides aminés à l'extérieur de la cellule, et aucun anticorps capable de reconnaître ces acides aminés n'est disponible. Le marquage de syntaxin par des anticorps nécessite donc l'accès à son domaine intracellulaire (et implique des méthodes de perméabilisation des cellules). La localisation de syntaxin a été observée par marquage immunocytochimique sur des cellules fixées (Garcia et al. 1995), marquage sur une réplique obtenue par cryofracture (*freeze-fracture replica labelling*, Hagiwara et al. 2005), ou en utilisant des cellules transfectées avec une construction de la syntaxin fusionnée à la GFP (*Green Fluorescence Protein*) (Mitchell and Ryan 2004, Sieber et al. 2007). Le consensus semble s'établir autour de l'idée que la syntaxin est distribuée de manière homogène dans la membrane plasmique, aussi bien dans les axones que dans les dendrites (Galli et al. 1995; Sakisaka et al. 2004).

La proportion de syntaxin présente dans les vésicules synaptiques est faible. Elle est estimée à environ 13 % par des expériences dans lesquelles la syntaxin est fusionnée à une GFP sensible au pH (Mitchell and Ryan 2004). Une analyse quantitative de la composition des vésicules synaptiques a évalué leur nombre à 6 par vésicule synaptique (*vs* environ 70 pour la synaptobrevin, Takamori et al. 2006) La densité de molécules de syntaxin a été estimée dans les neurones à environ $100/\mu\text{m}^2$ (Hagiwara et al. 2005), et dans les cellules neuroendocrines à environ $2000/\mu\text{m}^2$ (Sieber et al. 2007). Sachant que la surface d'une synapse est de l'ordre de $0.1\mu\text{m}^2$, une densité de $100/\mu\text{m}^2$ correspondrait à 10 molécules de syntaxin dans la synapse, ce qui est peu vraisemblable, et une densité de $2000/\mu\text{m}^2$ correspondrait à 200 molécules de syntaxin, ce qui paraît élevé.

L'organisation spatiale de la syntaxin à une échelle plus fine reste une question ouverte. Dans les cellules PC12 (des cellules neuroendocrines),

des clusters de syntaxin ont été observés dans les membranes cellulaires fixées par une technique superrésolutive (50 nm), la microscopie de fluorescence STED (*stimulated emission depleted fluorescence microscopy*, Sieber et al. 2007). Cependant, la fixation utilisée, par le paraformaldéhyde, est connue pour induire des clusters artefactuels. En effet, le paraformaldéhyde agit par “réticulation”, il lie entre elles les macromolécules de manière permanente. Le fait que les molécules diffusent lorsque le fixateur est appliqué peut induire la formation de clusters.

En microscopie électronique, de tels clusters n'ont pas été observés dans les neurones (Hagiwara et al. 2005). Cependant, il reste possible que la syntaxin soit impliquée dans des clusters qui contiennent d'autres protéines du complexe exocytotique comme SNAP 25 et les canaux calciques (voir ci-dessous section 1.3.4), et qui seraient donc plus difficiles à détecter en observant uniquement la syntaxin.

1.3.4 Interactions

La syntaxin interagit avec de nombreuses protéines dans le compartiment présynaptique, notamment des protéines qui participent au complexe exocytotique. La syntaxin est donc au cœur de ce complexe. La plupart des sites d'interaction sont précisément identifiés (figure 11 et références ci-dessous).

SNAP 25 La syntaxin forme un hétérodimère avec SNAP 25. Cette interaction implique les domaines SNARE de la syntaxin et de SNAP 25 comme décrit plus haut. Ce dimère peut se trouver dans plusieurs conformations : un faisceau de trois hélices parallèles, ou d'autres conformations dans lesquelles une des hélices de SNAP 25 est dissociée (Weninger et al. 2008). La présence d'autres protéines comme la complexin, Munc 13, Munc 18 ou la synaptotagmin stabilise la conformation en faisceau de trois hélices (Brunger et al. 2009, et voir section 1.2.2).

SYNAPTOBREVIN 2 Jusqu'à récemment, l'interaction entre la syntaxin et la synaptobrevin via leurs domaines SNARE était considérée possible uniquement dans le complexe SNARE, c'est-à-dire seulement quand la syntaxin est déjà associée à SNAP 25 (Weninger et al. 2008). Cependant, quelques études suggèrent que l'interaction entre la syntaxin et la synaptobrevin est possible indépendamment de SNAP 25. (Brunger et al. 2009; Woodbury and Rognlien 2000). Le fait que l'exocytose spontanée persiste dans les souris KO pour SNAP-25 est cohérent avec ces observations (Sørensen et al. 2003; Washbourne et al. 2002).

CANAUX CALCIQUES VOLTAGE-DÉPENDANTS La syntaxin interagit avec les canaux calciques voltage-dépendants de type N et P/Q. Cette interaction a lieu au niveau du tiers C-terminal de la syntaxin, aa 181-288 (Sheng et al. 1994). Cette interaction module la cinétique d'ouverture des canaux calciques et l'amplitude des

courants calciques. Elle implique aussi le domaine transmembranaire et deux résidus Ala 240 et Val 244, qui ne sont pas nécessaires pour l'interaction entre les deux protéines (Arien et al. 2003; Bezprozvanny et al. 2000; Trus et al. 2001).

MUNC 18 Comme mentionné en section 1.2.2, Munc 18 se lie à la syntaxin dans sa conformation fermée (Dulubova et al. 1999). Munc 18 peut également se lier au complexe SNARE dans son ensemble (Dulubova et al. 2007). Le domaine Habc de la syntaxin est requis pour l'interaction avec Munc 18.

MUNC 13 Le domaine requis sur la syntaxin pour l'interaction avec Munc 13 comprend les aa 53-79, situés dans le domaine Habc (Betz et al. 1997). Munc 13 semble stabiliser la conformation ouverte de la syntaxin (Hammarlund et al. 2007; Richmond et al. 2001).

SYNAPTOTAGMIN La syntaxin interagit avec la synaptotagmin selon deux modes, l'un dépendant et l'autre indépendant du calcium (Kee and Scheller 1996). L'interaction indépendante du calcium requiert le domaine délimité par les résidus 241 et 266 de la syntaxin, alors que l'interaction dépendante du calcium nécessite un domaine plus grand, aa 220-266. Ces domaines de liaison à la synaptotagmin recouvrent donc partiellement le domaine H3, impliqué dans le complexe SNARE.

COMPLEXIN La syntaxin interagit avec la complexin via son domaine SNARE, uniquement dans le complexe SNARE, c'est-à-dire seulement quand la syntaxin est déjà associée à SNAP 25 et à la synaptobrevin (Bowen et al. 2005; Chen et al. 2002; Giraudo et al. 2009; Maximov et al. 2009).

CANAUX POTASSIQUES Quelques études suggèrent que la syntaxin interagit également avec les canaux potassiques (Ahmed et al. 2007; Cibulsky et al. 2005; Singer-Lahat et al. 2007). Cependant, cette interaction n'a pas été montrée spécifiquement dans les synapses, et les techniques utilisées sont parfois mises en doute (Fletcher et al. 2003).

SYNTAXIN La syntaxin est aussi capable de former des homodimères de syntaxin, via son domaine transmembranaire (Laage et al. 2000; Lewis et al. 2001).

La représentation de l'assemblage synaptique est souvent statique, décrivant une organisation et une composition particulières. Cependant, les molécules qui constituent cet assemblage sont en mouvement. Le cytoplasme est effectivement un milieu liquide, mais la membrane plasmique est également fluide, et les protéines membranaires peuvent s'y déplacer. La diffusion latérale des protéines membranaires fait l'objet du paragraphe suivant.

1.4 DIFFUSION LATÉRALE DES PROTÉINES MEMBRANAIRES

Une membrane lipidique est fluide. Avant de décrire la diffusion latérale des protéines dans une membrane cellulaire, je propose de présenter le mouvement brownien, le mouvement aléatoire d'une particule dans un fluide homogène.

1.4.1 *Le mouvement brownien*

En 50 avant J.-C., dans son poème *De la nature des choses*, le philosophe Lucrèce écrit :

“Il convient d'observer avec plus d'attention ces corpuscules que l'on voit s'agiter en désordre dans les rayons du soleil : c'est que de tels mouvements désordonnés témoignent des mouvements sous-jacents de la matière, dissimulés et imperceptibles. Tu verras, en effet, nombre de ces corpuscules secoués par des chocs invisibles, changer de route, et repoussés, revenir en arrière, tantôt ici, tantôt là, partout, dans toutes les directions. Or, il est clair que ce va-et-vient a tout entier pour origine les atomes. Tout d'abord, en effet, les atomes se meuvent d'eux-mêmes, ensuite les plus petits des corps composés, et qui sont pour ainsi dire encore à la portée de la force des atomes, heurtés par les chocs invisibles de ces derniers, se mettent en mouvement ; puis eux-mêmes, à leur tour, ébranlent des corps un peu plus grands. C'est ainsi que, à partir des atomes, le mouvement s'élève et parvient peu à peu à nos sens, en sorte qu'il se communique notamment à ces particules que nous pouvons distinguer dans un rayon de soleil, sans que nous devenions manifestes les chocs qui se produisent.”

Ce n'est ensuite qu'en 1827 que le botaniste écossais Robert Brown observa le mouvement désordonné de particules dans des grains de pollen ainsi que de particules inorganiques immergées dans une goutte d'eau (Brown 1828) — d'autres observateurs avaient décrit ce mouvement avant lui, mais c'est son nom qu'on donnera au mouvement. La description de ce mouvement fut ensuite reprise par des physiciens comme A. Einstein et J. Perrin (Einstein 1905; Frey and Kroy 2005; Perrin 1909).

Le mouvement brownien correspond au mouvement d'une particule immergée dans un fluide, qui résulte des chocs aléatoires des molécules (plus petites que la particule) constituant le fluide (figure 12). Les particules en question, de la taille du micron, sont assez grosses pour être vues (au microscope), et suffisamment petites pour que le mouvement dû aux chocs des molécules soit substantiel. Une importante caractéristique du mouvement brownien est que chaque déplacement est aléatoire, mais la taille de ce déplacement suit une distribution de probabilité particulière

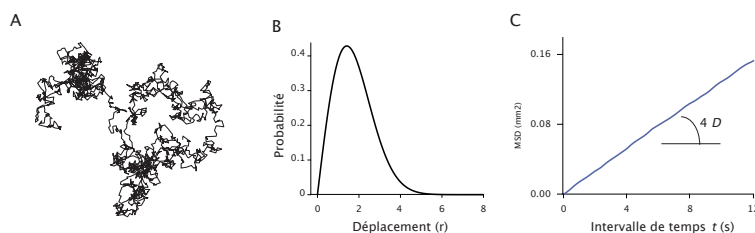


FIGURE 12.: Le mouvement brownien. A. Exemple de trajectoire d'une particule se déplaçant en deux dimensions avec un mouvement brownien. B. Fonction densité de probabilité du déplacement d'un mouvement brownien (unités arbitraires). L'expression de cette fonction est donnée dans la section 2.2.3.3. C. Déplacement quadratique moyen (mean square displacement, MSD) en fonction du temps calculé pour des trajectoires ayant un mouvement brownien en deux dimensions : soit un intervalle de temps t_i , l'ensemble des distances parcourues pendant un intervalle de temps t_i le long de la trajectoire sont moyennées, donnant ainsi le point $\text{MSD}(t_i)$. Le MSD est linéaire en fonction du temps, la pente de la droite est égale à $4 D$ où D est le coefficient de diffusion.

(voir figure 12-B). Les propriétés du mouvement brownien ont été précisément caractérisées et seront présentées plus loin (section 2.2.3.3). En particulier, on notera la propriété suivante, pour un mouvement en n dimensions ($n=1, 2$ ou 3), le déplacement quadratique moyen est linéaire en fonction du temps (figure 12-C) :

Soit $d(t)$ la distance parcourue par une particule en un temps t ,

$$\langle d^2(t) \rangle = 4Dt \quad (1.1)$$

où D est appelé le coefficient de diffusion¹. Le coefficient de diffusion D dépend notamment de la taille de la particule et de la viscosité de l'environnement.

1.4.2 La diffusion latérale dans les membranes cellulaires

Les membranes cellulaires sont constituées de lipides et de protéines. Les lipides sont beaucoup plus petits (1 nm) que les protéines (de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres). Par agitation thermique, les lipides et les protéines s'entrechoquent. En 1972, Singer et Nicolson ont proposé de décrire la membrane comme une mosaïque fluide dans lequel les protéines et les lipides sont en mouvement (Singer and Nicolson 1972; Veréb et al. 2003, figure 13) . De la même manière qu'une particule immergée dans un fluide a un mouvement brownien dû aux chocs aléatoires des molécules du fluide, les protéines dans une membrane lipidique présentent un mouvement brownien (Saffman and Delbrück 1975).

1. Le symbole $\langle \rangle$ correspond à la moyenne (sur les déplacements d'un ensemble de particules pendant une durée t , ou sur les différents intervalles de temps de durée t de la trajectoire d'une particule).

Dans une première approximation, une membrane peut être considérée comme un plan, un espace en deux dimensions. Lorsqu'une protéine membranaire se déplace dans une membrane lipidique, elle ne peut pas se déplacer dans la direction orthogonale à la membrane, seulement dans le plan de la membrane. Le terme *diffusion latérale* est utilisé pour décrire le mouvement diffusif de protéines dans une membrane, en opposition à la diffusion de protéines dans le cytoplasme par exemple, qui a lieu en trois dimensions.

Le mouvement diffusif de protéines dans une membrane cellulaire a commencé à être étudié dans les années 1970 (Singer and Nicolson 1972, Edidin et al. 1976). Le mouvement des protéines dans les membranes a d'abord été observé à l'échelle de la population, notamment par la mesure du retour de fluorescence après photoblanchiment (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP ; voir section 2.2.1). Brièvement, dans ces expériences, les protéines sont marquées par des fluorophores, qui sont irréversiblement inactivés dans une certaine région de la membrane ; le retour de fluorescence dans cette région peut alors être attribué à l'arrivée de nouvelles protéines marquées par des fluorophores intacts, par diffusion latérale. Ces expériences ont permis d'estimer les temps caractéristiques de la diffusion latérale de différentes protéines membranaires. Néanmoins, elles ne permettaient pas de caractériser le mouvement diffusif de protéines individuelles.

La première expérience de suivi de protéine individuelle a été réalisée en 1982 (Barak and Webb 1982). Ensuite, le développement de marqueurs (particules d'or, billes de latex, fluorophores) et de techniques de microscopie adaptées a permis de caractériser plus finement les processus en jeu dans la diffusion latérale des protéines (Saxton and Jacobson 1997). En particulier, le mouvement diffusif des protéines n'est pas toujours brownien comme si elles se déplaçaient dans une membrane homogène constituée uniquement de lipides. Par exemple, le mouvement est parfois entravé par la présence d'autres protéines, qui constituent des obstacles et selon leur organisation peuvent former des barrières. Kusumi a ainsi proposé le modèle *picket-fence* (piquet-barrière, voir figure 13-B) pour expliquer des trajectoires pendant lesquelles une protéine semblait diffuser dans un espace compartimenté (Kusumi et al. 2005). Les protéines peuvent également rencontrer des sites de liaison (des protéines auxquelles elles se lient), ce qui va les immobiliser transitoirement, et donc perturber leur diffusion libre (Saxton and Jacobson 1997). Les études plus récentes du mouvement diffusif des protéines dans les membranes sont présentées dans les sections suivantes.

1.5 MOUVEMENT DIFFUSIF DES ÉLÉMENTS DE L'ASSEMBLAGE SYNAPTIQUE

Dans la membrane plasmique des neurones, les protéines membranaires peuvent diffuser latéralement (section 1.4.2) et les protéines cytoplasmiques peuvent également diffuser dans le milieu intracellulaire.

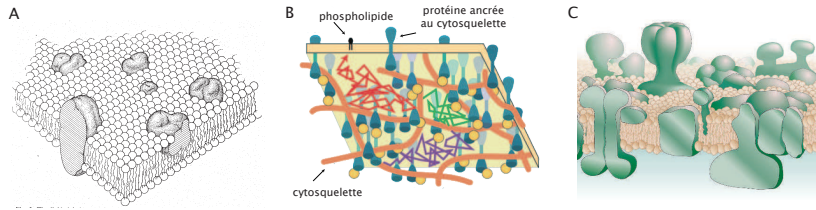


FIGURE 13.: Une membrane cellulaire fluide et encombrée. A. Le modèle de mosaïque fluide, d'après Singer et Nicolson *et al* (Singer and Nicolson 1972). Une membrane cellulaire est représentée comme une bicouche lipidique fluide dans laquelle peuvent diffuser les protéines. Si la membrane est "homogène", le mouvement diffusif des protéines est brownien. B. Représentation de la membrane plasmique : des protéines membranaires dont certaines sont ancrées au cytosquelette, ainsi que le cytosquelette lui-même constituent des obstacles à la diffusion d'une protéine dans la membrane fluide. Kusumi a ainsi proposé le modèle "picket-fence", piquet-barrière. D'après Kusumi *et al* (Kusumi *et al.* 2005). C. Une version actualisée du modèle de Singer et Nicolson. Les régions lipidiques varient en composition et en épaisseur, les protéines membranaires sont nombreuses et diverses et s'associent en complexes membranaires, la membrane est ainsi organisée en sous-régions ayant des structures et des fonctions spécifiques. D'après Engelman (Engelman 2005).

Le mouvement diffusif de plusieurs constituants de l'assemblage synaptique a été caractérisé, ce qui a conduit à décrire l'assemblage synaptique comme un assemblage dynamique dans un état stationnaire (Choquet and Triller 2003; Triller and Choquet 2008). Les différents temps caractéristiques du mouvement diffusif des éléments synaptiques sont indiqués sur la figure 14.

1.5.1 Les vésicules synaptiques

Les vésicules synaptiques présentent plusieurs types de mouvement : elles sont échangées entre les synapses voisines, ont un mouvement lent et restreint au sein du bouton et peuvent être "capturées" au niveau de la membrane plasmique.

1.5.1.1 Mouvement diffusif des vésicules synaptiques d'un bouton à l'autre

Des expériences de FRAP ont montré que les vésicules synaptiques sont échangées entre des synapses voisines (Darcy *et al.* 2006) : lorsque la fluorescence de vésicules marquées est irréversiblement inactivée, le retour de fluorescence résulte de l'arrivée de vésicules marquées provenant de synapses voisines. Ce retour est relativement lent : 22 % de la fluorescence initiale est récupérée après 560 s.

1.5.1.2 *Mouvement diffusif des vésicules synaptiques au sein d'un bouton*

La mobilité des vésicules au sein du bouton a été estimée à 10^{-3} à $10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ selon les méthodes (Jordan et al. 2005; Lemke and Klingauf 2005; Shtrahman et al. 2005). De plus, les vésicules ont été décrites comme diffusant dans un espace limité, d'un diamètre de 50 à 100 nm selon les études (Jordan et al. 2005; Lemke and Klingauf 2005).

1.5.1.3 *Mouvement à proximité de la membrane*

La dynamique de "transport - capture - exocytose" des vésicules à proximité de la membrane a également été étudiée, dans les synapses à rubans (Zenisek et al. 2000). Les vésicules sont marquées par le fluorophore FM1-43, et seules les vésicules à moins de 100 nm de la membrane sont observées, grâce à la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (*total internal reflection microscopy* - TIRF microscopy). Trois types de vésicules sont distinguées, selon leur mobilité : (i) des vésicules stables localisées à la membrane (ii) des vésicules qui arrivent vers la membrane et s'y stabilisent (iii) des vésicules qui se détachent de la membrane. Dans les conditions de stimulation étudiées, les ordres de grandeur des processus dynamiques observés sont les suivants : les vésicules arrivent à la membrane avec une vitesse de l'ordre de $0.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Elles deviennent compétentes pour la fusion après un temps caractéristique de 0.25 s. Les vésicules qui se détachent ont un temps caractéristique de 4 s.

1.5.1.4 *Mouvement des vésicules dans les cellules neuroendocrines*

Dans les cellules neuroendocrines, la mobilité des vésicules est de l'ordre de $0.3 \mu\text{m}/\text{s}$. Le diamètre de confinement ("*caging diameter*", qui correspond à la distance maximum parcourue pendant une fenêtre glissante de 6 s) est de 100 nm pour les vésicules "amorçées" (capables de fusionner avec la membrane), et de 220 nm pour les vésicules ancrées (et non amorçées).

Ce lien entre la mobilité des vésicules et l'ancrage ou l'amorçage des vésicules dans les cellules neuroendocrines a également été étudié en observant le mouvement des vésicules dans la direction orthogonale à la membrane : un coefficient d'autocorrélation du mouvement des vésicules dans cette direction est introduit, de manière à ce qu'un coefficient d'autocorrélation négatif soit interprété comme l'existence d'une force (Toonen et al. 2006). Cette force, qui requiert la présence de Munc18-1, pourrait correspondre à l'attachement des vésicules à la membrane ("*tethering*").

1.5.2 *Les protéines cytoplasmiques*

Les protéines cytoplasmiques diffusent en trois dimensions dans le cytoplasme, et leur mouvement diffusif a été observé notamment par la technique de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), décrite brièvement précédemment (section 1.4.2). Classiquement, le re-

tour de fluorescence est analysé de deux manières : (i) il est caractérisé par le temps de demi-retour, *i.e.* le temps nécessaire pour que la moitié du niveau de fluorescence initial soit atteint, ou (ii) il est ajusté avec une somme de deux fonctions exponentielles, qui permet d'obtenir deux temps caractéristiques et une fraction qui représente la proportion de la population des molécules associée à un des deux temps caractéristiques. Cette méthode est détaillée dans la section 2.2.1.

1.5.2.1 *Protéines d'échafaudage et actine*

La dynamique d'échange des protéines d'échafaudage est généralement caractérisée par un temps de demi-retour de quelques heures (Specht and Triller 2008).

Par exemple, dans le compartiment postsynaptique, la protéine d'échafaudage ProSAP2 est échangée entre la région synaptique et la région extrasynaptique, avec deux temps caractéristiques, dont un temps court, de l'ordre de quelques secondes, et un temps long, de l'ordre de 5 à 6 h (Tsurriel et al. 2006). Le comportement diffusif de la gephyrin, est également caractérisé par deux temps caractéristiques, de 1 min et 2 h respectivement (Calamai et al. 2009), tout comme α SAP 97, de l'ordre de 3 min et 1 h (Waites et al. 2009).

Dans le compartiment présynaptique, la protéine Bassoon, considérée comme une protéine d'échafaudage, est également échangée entre la région synaptique et la région extrasynaptique avec un temps caractéristique lent, et un temps de demi-retour de l'ordre de plus de 2 h (Tsurriel et al. 2009).

Les échanges d'actine postsynaptique sont plus rapides, avec un temps caractéristique de l'ordre de 40 s (Star et al. 2002).

1.5.2.2 *Protéines associées aux vésicules synaptiques*

Le cas de la synapsin est particulier dans la mesure où la synapsin peut s'associer aux vésicules synaptiques. Lorsque les neurones sont stimulés (10 Hz pendant 90 s), la synapsin se dissocie des vésicules synaptiques et se disperse dans le bouton et dans l'axone, puis s'accumule à nouveau dans la terminaison présynaptique lorsque la stimulation cesse (en 200 s environ) (Chi et al. 2001). La cinétique de dispersion dépend de l'état de phosphorylation de la synapsin, et affecte la cinétique de libération des neurotransmetteurs (Chi et al. 2003).

La dynamique de la synapsin a ensuite été étudiée par des expériences de FRAP (Leal-Ortiz et al. 2008; Tsurriel et al. 2006). Les temps caractéristiques du mouvement (obtenus par ajustement d'une somme de fonctions exponentielles sur les courbes expérimentales) sont de l'ordre de 2 min et 88 min ou 2 min et 34 min selon les études. Il est à noter que cette dynamique résulte à la fois de la diffusion des protéines dans le cytoplasme et de la diffusion des protéines liées aux vésicules synaptiques. En utilisant une construction de GFP photoactivable, Tsurriel *et al* ont

également montré que la synapsin est redistribuée dans les synapses voisines.

Le temps caractéristique de FRAP mesuré pour la synaptobrevin est de l'ordre de quelques dizaines de minutes (Leal-Ortiz et al. 2008). Cette mesure est difficile à réconcilier avec les études sur la mobilité des vésicules synaptiques mentionnées ci-dessus.

1.5.2.3 *Munc 13-1*

Dans des neurones d'hippocampe de souris KI avec *Munc 13-1-EYFP*, des expériences de FRAP ont montré que *Munc 13-1* est échangé entre les régions synaptique et extrasynaptique avec des temps caractéristiques de 3 et 80 min, comparables à ceux de la synapsin (Kalla et al. 2006).

1.5.3 *Les protéines membranaires*

1.5.3.1 *Récepteurs des neurotransmetteurs*

La diffusion latérale de protéines membranaires synaptiques a pour la première fois été observée à la jonction neuromusculaire en 1976 (Axelrod et al. 1976), par des expériences de FRAP.

Vingt-cinq ans plus tard, la diffusion latérale des récepteurs de la glycine a ensuite été étudiée par une méthode de suivi de particule unique (Meier et al. 2001). Ces expériences montraient que le récepteur alternait entre des périodes de diffusion libre et des périodes de diffusion confinée. Les périodes de diffusion confinée étaient colocalisées avec des agrégats de gephyrin, la protéine d'échafaudage postsynaptique qui interagit avec le récepteur de la glycine. La taille des billes de latex utilisées pour marquer les récepteurs (500 nm) ne permettait cependant pas d'observer le mouvement du récepteur aux synapses dans des neurones. Des observations similaires ont été faites pour le récepteur AMPA (Borgdorff and Choquet 2002) et le récepteur métabotrope du glutamate (Serge et al. 2002).

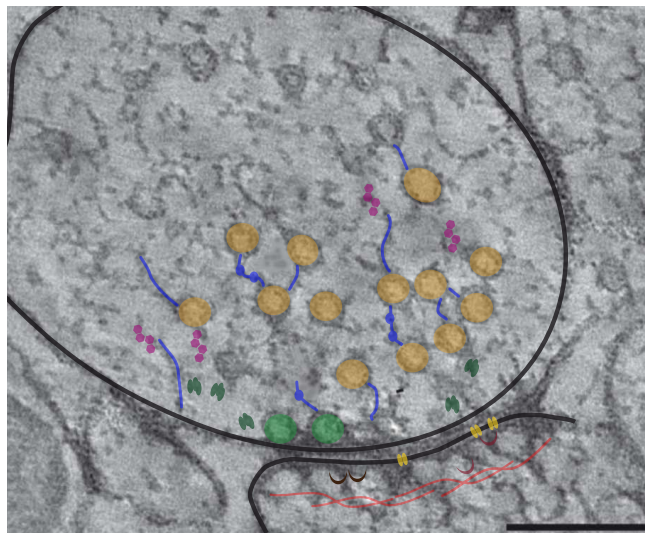
En 2003, le développement de marqueurs de taille nanométrique a permis l'observation du mouvement de récepteurs aux neurotransmetteurs dans les neurones, en particulier aux synapses (Dahan et al. 2003). Ces marqueurs sont des quantum dots, des particules semi-conductrices fluorescentes, très stables (Michalet et al. 2005 et voir section 2.2.2). Le coefficient de diffusion de ces récepteurs était de l'ordre de $10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$, et la diffusion latérale était plus lente et plus confinée dans les régions synaptiques qu'extrasynaptiques (voir section 2.2.3 pour une définition précise de ces termes). Depuis, la diffusion latérale des récepteurs des neurotransmetteurs a largement été étudiée, notamment en fonction de l'activité synaptique et des interactions moléculaires comme détaillé dans la section suivante (Choquet and Triller 2003; Triller and Choquet 2008, 2005).

1.5.3.2 Canaux calciques

Dans des cellules HEK (*Human Embryonic Kidney*, une lignée cellulaire dérivée des cellules embryonnaires de rein), la mobilité des canaux calciques de type L (fusionnés à une protéine fluorescente) a été étudiée à l'échelle de la molécule unique par la méthode de spectroscopie de corrélation de fluorescence, (Harms et al. 2001a). Le coefficient de diffusion estimé dans ces conditions était de l'ordre de $0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

1.5.3.3 Syntaxin 1A

Dans des cellules neuroendocrines PC12, le temps caractéristique de retour de fluorescence (pour du FRAP) est de l'ordre de 40 à 60 s (Sieber et al. 2007). Cependant, les observations faites dans cette étude sont difficilement transposables dans le cadre de la synapse neuronale : le système d'exocytose des cellules neuroendocrines est relativement différent de celui des neurones, et les expériences de cet article sont réalisées sur des membranes "détachées" des cellules.



- | | |
|--|--|
| ● vésicule (réservoir), >h (Darcy, 2006) | ● Récepteurs, $10\text{-}2\mu\text{m}^2/\text{s}$ (~10s) (Dahan et al, 2003, Charrier et al, 2006) |
| ● Bassoon, 2h (Tsurriel et al, 2009) | ● Gephyryn (syn. inhibitrices), ~1h (Calamai et al, 2009) |
| ● Synapsin, 20min (Tsurriel et al, 2006; Leal-Ortiz et al, 2008) | ● SAP97 (syn. excitatrices), ~30 min (Waites et al, 2009) |
| ● Munc13-1, 20min (Kalla et al, 2006) | ● Actine, 40s (Star et al, 2002) |
| ● vésicule ancrée, 4s (Zenisek et al, 2000) | |

FIGURE 14.: Mouvement diffusif des éléments présynaptiques. Sont indiqués les temps caractéristiques (temps de demi-retour) du mouvement diffusif de quelques protéines cytoplasmiques et des vésicules synaptiques, ainsi que le coefficient de diffusion des protéines membranaires comme les récepteurs des neurotransmetteurs. Image de microscopie électronique, d'après Siksou et al (Siksou et al. 2007).

1.5.4 *Mouvement diffusif et fonction synaptique*

Dans de nombreuses études, le mouvement diffusif des protéines de l'assemblage synaptique est corrélé avec les propriétés de la fonction synaptique. Il peut refléter des modifications de ces propriétés, ou inversement modifier ces propriétés.

1.5.4.1 *Régulation du mouvement diffusif par les interactions*

Le mouvement diffusif des protéines dépend des interactions moléculaires auxquelles elles participent, ou, autrement dit, les interactions moléculaires régulent la mobilité des protéines. En particulier, les caractéristiques du mouvement des récepteurs (coefficient de diffusion, taille de la zone de confinement) dépendent des interactions avec des protéines submembranaires comme la gephyrin (Ehrensperger et al. 2007; Jacob et al. 2005), ou de l'état du cytosquelette (Charrier et al. 2006). Cette dépendance est différente dans les régions synaptiques et extrasynaptiques. De même, comme indiqué ci-dessus, la diffusion de la syntaxin dépend de son état de phosphorylation, qui modifie son interaction avec le cytosquelette (Chi et al. 2003), et dépend également de la présence de la protéine Piccolo (Leal-Ortiz et al. 2008). La diffusion de la syntaxin dans des cellules neuroendocrines est également ralentie par des interactions via son domaine SNARE (Sieber et al. 2007). En ce qui concerne les vésicules synaptiques, la perturbation des interactions entre la syntaxin et le cytosquelette résulte en une augmentation de la mobilité des vésicules (Jordan et al. 2005; Shtrahman et al. 2005).

1.5.4.2 *Régulation du mouvement diffusif par l'activité synaptique*

Dans le compartiment postsynaptique, les propriétés diffusives des protéines ont été étudiées en fonction du niveau d'activité synaptique. Par exemple, lorsque les récepteurs NMDA² sont "activés", la mobilité des récepteurs de la glycine est réduite. En revanche, une augmentation de l'activité neuronale (par application de 4-aminopyridine, antagoniste des canaux potassiques, qui prolonge les potentiels d'action) résulte en une accélération de la diffusion latérale des récepteurs du GABA³ (Bannai et al. 2009; Lévi et al. 2008). La mobilité d'autres protéines comme les récepteurs excitateurs (Groc et al. 2004; Sharma et al. 2006), la gephyrin (Hanus et al. 2006) et l'actine (Star et al. 2002) est également sensible au niveau d'activité synaptique.

Dans le compartiment présynaptique, le mouvement diffusif de la syntaxin observé en FRAP est plus rapide lorsque la mesure fait suite à une stimulation électrique (Tsuriel et al. 2006), tout comme le mouvement diffusif de Bassoon (Tsuriel et al. 2009). La mobilité des vésicules dépend également de l'activité synaptique : alors qu'au repos la mobilité

2. Les récepteurs NMDA, sont des récepteurs du glutamate, dont l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) est un antagoniste.

3. Acide γ - aminobutyrique (un neurotransmetteur)

des vésicules est de $4.3 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, dans des conditions de stimulation (3 Hz), la mobilité augmente, deux populations sont identifiées avec des coefficients de diffusion de $4.3 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $12 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Lemke and Klingauf 2005).

1.5.4.3 *Corrélation entre le nombre de protéines à la synapse et le mouvement diffusif de ces protéines*

Lorsque l'activité synaptique est modifiée, ou quand les interactions au sein de l'assemblage synaptique sont perturbées, les changements de comportement diffusif des récepteurs observés peuvent s'accompagner d'un changement de la quantité de récepteurs présents à la synapse (Bannai et al. 2009; Charrier et al. 2006; Lévi et al. 2008). Par exemple, l'accélération de la diffusion latérale des récepteurs du GABA lorsque l'activité excitatrice est augmentée est corrélée avec une diminution de la taille des clusters de récepteurs du GABA aux synapses (Bannai et al. 2009).

1.5.4.4 *Rôle du mouvement diffusif dans la transmission synaptique*

Enfin, certaines propriétés de la transmission synaptique dépendent directement de la diffusion latérale des protéines. Par exemple, dans des protocoles de "dépression synaptique" (où la transmission synaptique est atténuée suite à une séquence particulière de stimulations), la cinétique de resensibilisation des synapses dépend de la diffusion latérale des récepteurs. Un ralentissement "direct" de la diffusion latérale des récepteurs ralentit cette resensibilisation (Heine et al. 2008). La resensibilisation des synapses après dépression implique donc le renouvellement des récepteurs désensibilisés par des récepteurs neufs extrasynaptiques, par diffusion latérale.

PROBLÉMATIQUE : QUELLES SONT LES SPÉCIFICITÉS ET IMPLICATIONS DE LA DIFFUSION LATÉRALE DE LA SYNTAXIN POUR LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE ?

L'étude de la diffusion latérale de la syntaxin1A présente plusieurs intérêts :

Contrairement à la membrane postsynaptique, la membrane présynaptique fait l'objet de cycles de désorganisation-réorganisation spatiales lors des événements d'exocytose et endocytose. À notre connaissance, la diffusion latérale de protéines membranaires impliquées dans l'exocytose n'a pas été étudiée dans les neurones.

La diffusion latérale de la syntaxin doit répondre à deux critères apparemment contradictoires : d'une part, la syntaxin est impliquée dans l'ancrage des vésicules synaptiques, ce qui suggère une certaine stabilité de sa position ; d'autre part, l'exocytose d'une vésicule crée une région dans la membrane plasmique dépourvue de vésicules, où la concentration en

syntaxin doit être récupérée rapidement pour l'ancrage de vésicules à venir.

Dans ce contexte, quelles sont les caractéristiques de la diffusion latérale de la syntaxin ? Quelles relations y a-t-il entre la diffusion latérale de la syntaxin1A , sa participation à l'ancrage des vésicules, et la réorganisation de la membrane qui suit l'exocytose ?

En particulier, voici les points que nous allons développer dans la section suivante :

- Quelles sont les caractéristiques de la diffusion latérale de la syntaxin dans les régions synaptiques et extrasynaptiques ?
- Comment les interactions entre la syntaxin et ses partenaires modifient-elles ce mouvement ? Quelles sont les cinétiques de ces interactions ?
- Comment réconcilier les descriptions de la diffusion latérale de la syntaxin à l'échelle de la molécule unique et de la population ?
- La diffusion latérale dépend-elle de l'activité synaptique ?
- Les propriétés de la transmission synaptique dépendent-elles des caractéristiques de la diffusion latérale de la syntaxin ?

Chapitre 2

ÉTUDE DE LA DIFFUSION LATÉRALE DE LA SYNTAXIN₁A-PHGFP

ÉTUDE DE LA DIFFUSION LATÉRALE DE LA SYNTAXIN 1A-PHGFP

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article intitulé *Syntaxin1A diffusion reveals local and transient SNARE interactions*, présenté en annexe A.2 de ce manuscrit. La plupart des figures de cette section sont également présentées dans l'article avec des légendes plus détaillées. Dans ce chapitre, je précise certains aspects méthodologiques et décris brièvement les résultats obtenus.

2.1 CHOIX DE L'APPROCHE ET EXPRESSION DE LA SYNTAXIN 1A-PHGFP

2.1.1 *Choix de l'approche et du système d'étude*

Nous avons choisi d'étudier la diffusion latérale de la syntaxin fusionnée à la GFP superécliptique dans les neurones. Pour cela, nous avons utilisé deux méthodes complémentaires qui permettent d'observer le mouvement diffusif à l'échelle de la population et à l'échelle de la molécule individuelle.

2.1.1.1 *Le système d'étude : la syntaxin 1A-pHGFP dans les neurones de moelle épinière en culture primaire*

Nous avons choisi de caractériser la diffusion latérale de la syntaxin dans les neurones de moelle épinière en culture primaire. Le domaine C-terminal extracellulaire de la syntaxin ne comporte que cinq acides aminés, ce qui ne permet pas d'y fixer un marqueur (fluorescent par exemple) par l'intermédiaire d'un anticorps. Nous avons donc utilisé une construction de la syntaxin1A fusionnée à une protéine fluorescente.

Cette construction nous a été généreusement transmise par Timothy Ryan (Weill Cornell Medical College, New York). Il s'agit de la séquence de la syntaxin1A de souris, fusionnée à la GFP superécliptique à l'extrémité C-terminale de la syntaxin, via un lien de 10 acides aminés (voir figure 15). La GFP superécliptique est sensible au pH : sa fluorescence est fortement diminuée lorsque le pH est inférieur à 4.5 (Miesenbock et al. 1998). Cette construction a été utilisée et caractérisée dans les publications de T. Ryan (Mitchell and Ryan 2005, 2004). Dans la suite, nous notons la GFP superécliptique *pHGFP*, et la construction de la syntaxin1A fusionnée à pHGFP *stxGFP*.

Le protocole utilisé pour les cultures primaires de neurones de moelle épinière de rat ou de souris est décrit dans l'article ci-après. Dans les neurones de moelle épinière en culture primaire, le pic de synaptogénèse

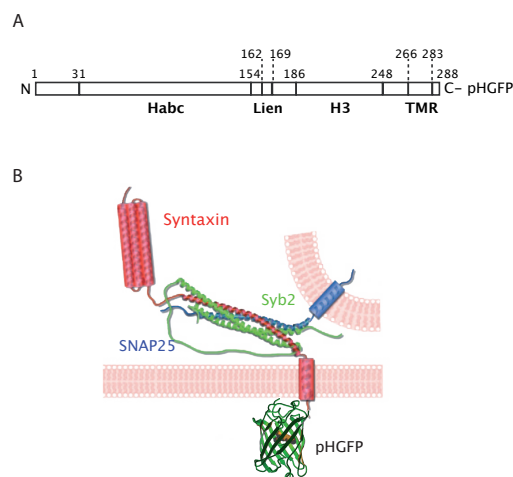


FIGURE 15.: La syntaxin1A fusionnée à la GFP super-écliptique. A. Représentation schématique de la construction avec les différents domaines de la syntaxin1A. La pHGFP est constituée de 238 acides aminés. B. Représentation de la construction stxGFP en 3D, impliquée dans le complexe SNARE.

a lieu autour de 8 à 9 jours de culture (*days in vitro*, DIV) (Dumoulin et al. 2000). Nous avons étudié la diffusion latérale de la stxGFP dans des neurones de 9 DIV. Pour distinguer les axones des dendrites, nous nous sommes basés d'une part sur les différences de morphologie entre les axones et les dendrites, d'autre part sur un marquage fluorescent pré-synaptique (et donc présent dans les axones).

Dans les cultures cellulaires de neurones de moelle épinière, les axones ont un diamètre d'environ 500 nm à 1 μm , et tracent des lignes légèrement anguleuses. En revanche, les dendrites sont souvent plus larges (1 à quelques μm) et suivent des lignes souples et sinueuses. Axones et dendrites peuvent être distingués de manière non ambiguë en immunocytochimie par les marqueurs Tau et MAP2 respectivement, deux protéines associées aux microtubules mais spécifiques de chaque compartiment.

Pour localiser les boutons présynaptiques dans les cellules vivantes, nous avons utilisé le marqueur fluorescent FM 4-64. Ce marqueur est amphiphile, et peut s'insérer dans la membrane plasmique. Lorsque des cycles d'exo-endocytose des vésicules synaptiques sont déclenchés par dépolarisation des neurones (au chlorure de potassium), le marqueur est internalisé, et marque ainsi les régions présynaptiques (Gaffield and Betz 2007). Les boutons présynaptiques correspondent parfois à un renflement de l'axone, mais contrairement aux neurones d'hippocampe, les dendrites des neurones de moelle épinière ne présentent pas d'épines. On peut noter que lorsque le compartiment présynaptique est ainsi marqué, il est plus aisé de distinguer axones et dendrites, puisque ce marquage se trouve dans les axones (voir figure 16).

2.1.1.2 Echelles et méthodes d'observation de la diffusion latérale

Nous avons choisi de décrire le mouvement diffusif de la stxGFP à l'échelle de la molécule individuelle et à l'échelle d'une population en utilisant deux méthodes : le retour de fluorescence après photoblanchiment (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP) et le suivi de particule unique (*Single Particle Tracking*, SPT).

La méthode de suivi de particule unique que nous avons choisie repose sur l'utilisation des particules fluorescentes appelées quantum dots pour marquer la stxGFP (Michalet et al. 2005; Saxton and Jacobson 1997). Nous avons utilisé cette méthode pour suivre les trajectoires de particules individuelles pendant 30 s à 13 Hz. Nous avons ainsi observé le mouvement des molécules individuelles de stxGFP sur des portions d'axones de quelques dizaines de microns avec une résolution spatiale de la position de la molécule de 5 à 10 nm (Courty et al. 2006).

Alors que la méthode de SPT ne garantit pas un échantillonnage de la population de molécules exactement représentatif, la méthode de FRAP permet de caractériser le mouvement diffusif des protéines à l'échelle d'une population. Avec cette méthode, nous avons observé le retour de fluorescence (voir section 2.2.1) pendant 3 min (avec une résolution de 2 s), sur des régions d'environ 1 µm de diamètre.

Le FRAP et le SPT sont donc deux méthodes complémentaires. Ces deux méthodes sont décrites ci-dessous dans la section 2.2.

2.1.2 Expression de la syntaxin 1A-pHGFP

Nous avons commencé par comparer l'expression de la stxGFP à celle de la syntaxin endogène, dans des neurones à 9 DIV.

2.1.2.1 Expression de la syntaxin 1A endogène

Pour visualiser la localisation de la syntaxin1A, nous avons réalisé un marquage immunocytochimique. Comme aucun anticorps n'est dirigé contre les cinq acides aminés extracellulaires de la syntaxin1A, nous avons préalablement fixé (avec du paraformaldéhyde) et perméabilisé les cellules (avec un détergent, le triton), puis utilisé un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope intracellulaire. Nous avons observé que la syntaxin1A était localisée le long des neurites, mais le marquage était assez faible et présentait de petits agrégats (figure 16). Ces petits agrégats pouvaient être des artefacts dûs à la fixation, comme suggéré dans la section 1.3.3. L'expression de la syntaxin1A endogène était ainsi difficile à quantifier.

2.1.2.2 Expression de la syntaxin 1A-pHGFP

Dans notre protocole de transfection, nous avons utilisé la lipofectamine (voir article). Les cellules étaient transfectées à 8 DIV. L'expression de la stxGFP était visible dès 6 h après transfection. Pour avoir un niveau

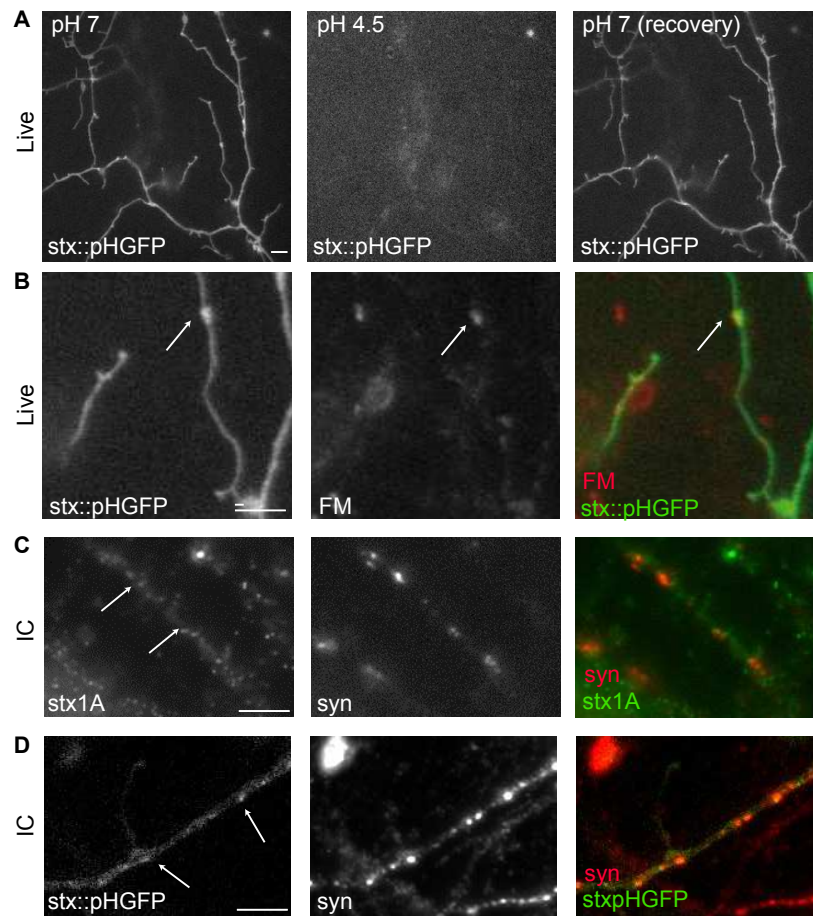


FIGURE 16.: Expression de la syntaxin 1A-pHGFP. La stxGFP est distribuée de manière homogène dans la membrane des neurones de moelle épinière. A-B. Neurones de moelle épinière “vivants” transfectés avec stxGFP (9 DIV). A. La fluorescence de la GFP superécliptique présente à la surface des neurones était “inactivée” par l’application d’une solution extracellulaire acide (pH 4.5), indiquant que la stxGFP était présente dans la membrane plasmique. B. Les synapses actives étaient marquées avec le fluorophore FM4-64 (FM4-64 : rouge ; stxGFP : vert). C. Marquage immunocytochimique de la syntaxin1A (stx1A ; vert) et de la synapsin (syn ; rouge). D. Marquage immunocytochimique de la synapsin (syn ; rouge) sur des neurones transfectés avec stxGFP. (stx : :pHGFP, vert). Échelle : 10 μ m.

d'intensité suffisant pour les expériences de FRAP, les expériences étaient réalisées 24 h après transfection. Pour limiter la surexpression, les expériences n'étaient pas faites après plus de 24 h, même si l'expression était encore présente au moins 48 h plus tard.

La stxGFP était distribuée régulièrement le long des axones et des dendrites, de manière comparable à la syntaxin1A endogène (figure 16). Comme l'expression de la syntaxin1A endogène était difficilement quantifiable, il en fut de même pour le niveau de surexpression de la stxGFP.

Pour vérifier que le signal fluorescent correspondait à des molécules présentes dans la membrane plasmique, nous avons utilisé la sensibilité au pH de la pHGFP. L'application d'une solution acide (pH 4.5) dans le milieu extracellulaire a provoqué la disparition de la totalité du signal, indiquant que la majorité des molécules de pHGFP étaient situées à l'extérieur des neurones, et donc que les molécules stxGFP étaient présentes dans la membrane plasmique (figure 16).

Enfin, nous nous sommes assurés que la fonction exocytotique était préservée dans les cellules transfectées en mesurant la cinétique de libération du marqueur FM 4-64 (voir figure supplémentaire de l'article). La vitesse de libération était seulement légèrement inférieure à celle mesurée dans les cellules non transfectées (l'intensité de la fluorescence de FM 4-64 était de 43 % de l'intensité initiale après 70 s de stimulation dans les cellules transfectées contre 38 % dans les cellules contrôle).

Dans la suite, nous étudierons uniquement le comportement de la stxGFP présente dans la membrane plasmique des axones.

La stxGFP est distribuée de manière homogène dans la membrane plasmique des neurones. La fonction exocytotique est préservée en sa présence.

2.2 MÉTHODES DE DESCRIPTION DE LA DIFFUSION LATÉRALE

Avant de présenter les résultats obtenus sur le mouvement de la stxGFP, cette section décrit les méthodes de FRAP et SPT que nous avons utilisées.

2.2.1 *Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)*

La mise en oeuvre de la méthode de FRAP est relativement simple, mais l'interprétation des données peut s'avérer plus délicate. Voici l'approche que nous avons choisie.

PRINCIPE Le principe de la méthode de FRAP est le suivant : les fluorophores associés à des protéines d'intérêt sont inactivés irréversiblement dans une région donnée de la cellule par illumination avec un laser ; le retour de fluorescence dans cette région qui est observé peut alors être attribué à un processus de transport, par exemple la diffusion latérale (voir figure 17, et Lippincott-Schwartz et al. 2003;

Sprague and McNally 2005). Le signal obtenu résulte du mouvement de chacune des molécules marquées, il caractérise donc le comportement de l'ensemble de la population, par opposition aux méthodes de suivi de particule unique (voir section 2.2.2).

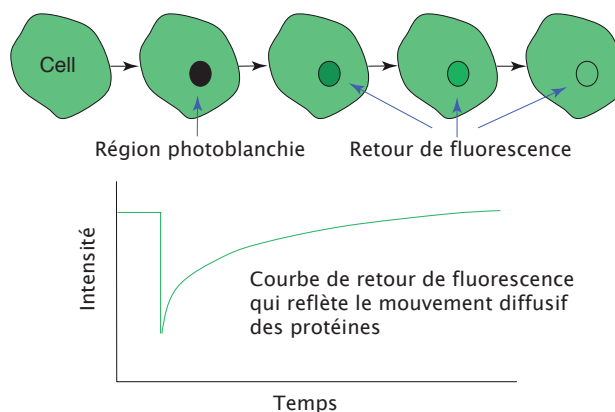


FIGURE 17.: Principe de la méthode de *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP). La fluorescence est inactivée dans une région de la cellule par une illumination intense et brève avec un laser, et le retour de fluorescence dans cette région est suivi au cours du temps. Lorsque le retour de fluorescence est dû à un processus diffusif, l'étude de la courbe de FRAP permet de caractériser le comportement diffusif des molécules fluorescentes à l'échelle de la population. D'après Sprague and McNally (Sprague and McNally 2005).

Pour des expériences sur des cellules, il est possible de s'assurer que le processus de transport en jeu relève seulement de la diffusion latérale et non du recyclage de protéines (insertion de protéines nouvellement synthétisées dans la membrane plasmique) par exemple en inhibant la synthèse protéique (Tsurriel et al. 2006). Le temps caractéristique de recyclage est de l'ordre de quelques heures, plus grand que celui du retour de fluorescence observé dans notre étude (quelques secondes). Dans nos expériences, nous interprétons donc le retour de fluorescence comme résultant de la diffusion latérale des protéines et non de l'insertion de protéines nouvellement synthétisées.

MESURE Avant d'être analysé et interprété, le signal de fluorescence doit être corrigé pour les artefacts de photoblanchiment "naturel" et normalisé. Prenons une région i qui a été photoblanchie par le laser à $t = 0$.

1. L'intensité du bruit de fond (moyennée sur trois régions de même taille que i) est d'abord soustraite à l'intensité de fluorescence de la région i . Le signal obtenu est noté $I(t)$.
2. Ensuite, ce signal est normalisé par rapport à l'intensité initiale avant le photoblanchiment. Le signal devient $I(t)/I(0)$.

3. Ce signal est alors corrigé pour le léger photoblanchiment “naturel” qui a lieu à chaque acquisition. Ce photoblanchiment est moyenné sur trois régions “contrôle” non photoblanchies par le laser. Le signal associé à la région i devient alors :

$$I_{corr}(t) = \frac{I(t)/I(0)}{I_{cont}(t)/I_{cont}(0)} \quad (2.1)$$

4. Le signal corrigé est enfin normalisé de manière à ce que l'intensité immédiatement après le photoblanchiment (à t_{bleach}) soit égale à zéro. On obtient alors I_{norm} :

$$I_{norm}(t) = \frac{I_{corr}(t) - I_{corr}(t_{bleach})}{I_{corr}(0) - I_{corr}(t_{bleach})} \quad (2.2)$$

ANALYSE Pour analyser les courbes de FRAP, on peut envisager plusieurs approches (McNally and Sullivan 2008) : (i) extraire des paramètres qui décrivent les courbes sans faire aucune hypothèse sur le type de mouvement, (ii) faire des hypothèses sur le processus de diffusion de manière à obtenir une équation de la courbe de FRAP pour ajuster la courbe expérimentale, ou (iii) faire des hypothèses sur le processus de diffusion, simuler le retour de FRAP et ajuster ces simulations sur la courbe expérimentale.

Dans certains cas bien définis, une équation de la courbe peut être obtenue. Par exemple, dans le cas où les molécules sont impliquées dans une réaction de liaison, trois cas peuvent être distingués (Sprague et al. 2004). Considérons la réaction suivante :



où M est la protéine d'intérêt marquée par un fluorophore, P son partenaire qui est immobile et MP le complexe formé (qui est donc également marqué par le fluorophore et immobile).

1. Si la plupart des molécules sont libres, le retour est dominé par la diffusion. Le retour de fluorescence normalisé f suit :

$$f(t) = e^{-\frac{\tau_D}{2t}} \left(I_0\left(\frac{\tau_D}{2t}\right) + I_1\left(\frac{\tau_D}{2t}\right) \right) \quad (2.4)$$

où $\tau_D = w^2/D_f$ avec w le diamètre de la zone où la fluorescence est inactivée et D_f le coefficient de diffusion des molécules libres ; I_0 et I_1 sont les fonctions de Bessel modifiées.

2. Si la réaction de liaison est très rapide devant la diffusion, un coefficient de diffusion effectif est défini :

$$D_{eff} = \frac{D_f}{1 + k_{on}^*/k_{off}} \quad (2.5)$$

où k_{on}^* , k_{off} sont les paramètres de la réaction de liaison (k_{on}^* est une constante d'association effective).

3. Si la diffusion est rapide devant la réaction de liaison et devant le temps d'acquisition du FRAP, le signal suit :

$$f(t) = 1 - C_{eq} e^{-k_{off}/t} \quad (2.6)$$

où C_{eq} dépend de k_{on} et de k_{off} .

Lorsque les processus moléculaires qui sous-tendent le mouvement ne sont pas identifiés, une méthode classique consiste à utiliser des sommes de fonctions exponentielles pour ajuster les courbes expérimentales (Star et al. 2002; Tsurriel et al. 2006) :

$$I_{norm}(t) \sim P_f(1 - e^{-\tau_f}) + (1 - P_f)(1 - e^{-\tau_s}) \quad (2.7)$$

où τ_s et τ_f sont respectivement les temps caractéristiques lent (*slow*) et rapide (*fast*), et P_f correspond à la fraction de la population ayant un temps caractéristique rapide. Les hypothèses sur lesquelles repose l'utilisation de cette somme de fonctions exponentielles ne sont jamais explicitées ni vérifiées, il est donc difficile d'interpréter les paramètres obtenus.

Une autre approche consiste simplement à comparer le retour de fluorescence à un instant donné pour deux courbes différentes. Cependant, cette description ne prend en compte que des instants donnés et non l'évolution de la courbe (*i.e.* la corrélation temporelle des données). Elle est donc peu puissante pour comparer des différences entre des courbes.

NOTRE APPROCHE Dans notre étude, les processus moléculaires qui sous-tendent le mouvement sont vraisemblablement complexes. Il est donc difficile d'envisager d'utiliser une expression analytique du retour de fluorescence qui soit adaptée. Dans un premier temps, nous avons donc choisi de comparer les courbes sans faire d'hypothèses, sans interpréter les paramètres utilisés. Nous avons d'une part comparé le retour de fluorescence à des instants donnés, et d'autre part utilisé une somme de deux fonctions exponentielles (équation 2.7) pour ajuster les courbes expérimentales. Dans un deuxième temps, nous nous sommes basés sur les données de suivi de particule unique pour émettre des hypothèses sur certains des processus moléculaires qui sous-tendent le mouvement. Nous avons alors construit un modèle computationnel pour ajuster les courbes de FRAP.

2.2.2 *Single Particle Tracking (SPT) : introduction*

Le suivi de particule unique comprend quatre étapes (voir figure 18) : (i) marquage des protéines (avec un fluorophore, une particule), (ii) acquisition des données par vidéo-microscopie, (iii) reconstitution des trajectoires, (iv) analyse des trajectoires (Saxton and Jacobson 1997).

Le marqueur doit notamment avoir une grande photostabilité (pour augmenter la durée de l'enregistrement) et une petite taille (pour que la protéine puisse avoir accès à des espaces étroits, comme la fente synaptique). Les premières expériences de SPT ont été réalisées en 1987 (Geerts et al. 1987) en utilisant comme marqueurs des particules d'or colloïdal. Ces particules ont un diamètre de l'ordre de 20 à 40 nm et peuvent être observées en microscopie avec des techniques de contraste particulières. Des billes de latex (0.5 μm de diamètre) ont également été utilisées (Meier et al. 2001). Les fluorophores ont l'avantage d'être plus petits, mais se désactivent au bout de quelques millisecondes (Harms et al. 2001b; Ueda et al. 2001).

Les quantum dots (QDs) sont des nanocristaux particulièrement adaptés pour le suivi de particule unique. Depuis 1998, ils sont largement utilisés comme marqueurs dans les systèmes biologiques (Alivisatos 2004; Bruchez et al. 1998; Chan and Nie 1998; Jaiswal and Simon 2004; Michallet et al. 2005). Une description détaillée de la méthode de SPT utilisant les QDs est présentée dans le manuscrit de thèse de Marie-Virginie Ehrensperger (Ehrensperger 2007). Voici quelques-unes de leurs caractéristiques :

COMPOSITION Les QDs sont composés d'un coeur de seleniure de cadmium (CdSe), un matériau semi-conducteur. Ils sont ensuite couverts de sulfure de zinc (ZnS) qui augmente le rendement quantique mais est hydrophobe. Ils sont ensuite stabilisés (par exemple avec des polymères) pour être solubles et biocompatibles, puis fonctionnalisés pour se lier spécifiquement à certaines protéines (par exemple avec des anticorps). Il est nécessaire de s'assurer que les QDs ne se lient pas à plusieurs protéines à la fois, et pour cela de contrôler le nombre de sites de liaison par QD (la stoechiométrie, Dif et al. 2009). La taille des QDs ainsi obtenus est d'environ 15 à 20 nm de diamètre (voir figure 18 A).

SPECTRE D'ÉMISSION Le spectre d'émission des QDs est assez étroit (20 à 40 nm de largeur à la moitié de l'intensité maximale) et varie en fonction de leur taille (Gerion et al. 2001). Le spectre d'excitation est plus large, ce qui offre un grand choix dans les longueurs d'onde d'excitation pour combiner l'imagerie des QD avec d'autres fluorophores. Les QDs sont particulièrement photostables : leur émission se maintient pendant des heures avec une excitation de 50 mW (Jaiswal and Simon 2004). Le rapport signal / bruit est élevé et peut atteindre 50 (Dahan et al. 2003).

CLIGNOTEMENT Les QDs présentent également une propriété particulière : le clignotement (*blinking*). Ils ne sont pas fluorescents de manière continue, mais alternent entre un état "allumé" et un état "éteint". La fréquence du clignotement est de l'ordre du hertz. Ce clignotement devra être pris en compte par la suite pour la reconstitution et l'analyse des trajectoires.

RÉSOLUTION SPATIALE La taille d'un QD étant largement inférieure à la longueur d'onde de la lumière émise, un QD peut être considéré

comme une source ponctuelle. L'image d'une source ponctuelle, après passage dans le système optique, correspond à la réponse impulsionnelle du système optique (*point spread function*, PSF). Un ajustement de cette fonction (PSF) sur le signal du QD peut donc permettre une localisation précise du QD. Pour simplifier cet ajustement, la PSF peut être modélisée par une gaussienne. La position d'un QD est donc identifiée en ajustant une gaussienne sur le signal de fluorescence (voir figure 18). La résolution spatiale de la technique de SPT est de l'ordre de 5 à 10 nm (Courty et al. 2006).

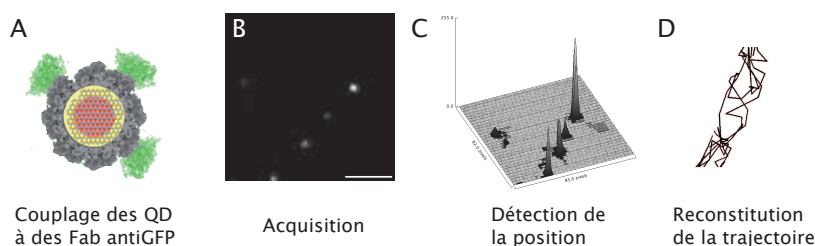


FIGURE 18.: Principe de la méthode de Single Particle Tracking (SPT). A. Représentation d'un quantum dot (structure cristalline au centre - rouge et jaune), recouvert de polymères pour le rendre soluble et biocompatible (gris), puis de fragments d'anticorps (Fab, vert) dirigés contre la GFP par exemple. B. Image de la fluorescence de quantum dots (QDs) qui marquent la stxGFP sur des neurones transfectés. Échelle : 5 μm . C. Intensité détectée sur l'image (B) en fonction de la position. Lorsque le signal peut être ajusté par une fonction gaussienne (en deux dimensions), le signal est interprété comme correspondant à un QD. D. Exemple de trajectoire obtenue après reconnection des positions de QD détectées sur une séquence d'images.

2.2.3 SPT : reconstitution et analyse des trajectoires

Le programme de détection des positions des molécules et de reconstitution des trajectoires a été développé dans l'équipe de Daniel Choquet à Bordeaux puis adapté au laboratoire par Marianne Renner. Par ailleurs, l'automatisation de l'analyse des trajectoires a également été développée au laboratoire par Marie-Virginie Ehrensperger (Ehrensperger 2007). Cette analyse repose sur le calcul du déplacement quadratique moyen sur l'ensemble de chaque trajectoire, qui permet de calculer le coefficient de diffusion et de déterminer le type de mouvement, brownien ou confiné (voir ci-dessous). Ces deux programmes ont été écrits avec le logiciel Matlab.

2.2.3.1 Reconstitution des trajectoires

Comme décrit ci-dessus, la position des quantum dots sur une image donnée est obtenue après avoir réalisé un ajustement gaussien sur le signal de fluorescence. Prenons une molécule m , sur l'image i . Pour recons-

tituer la trajectoire de cette molécule, il faut ensuite identifier parmi les positions détectées sur l'image $i + 1$ quelle position est la plus susceptible de correspondre à la position de la molécule m une image plus tard. Le critère choisi pour effectuer cette association est celui de la distance minimum : la position sur l'image $i + 1$ qui est la plus près de la position de la molécule m sur l'image i est considérée comme correspondant à la molécule m .

Il arrive cependant que le quantum dot disparaisse d'une image, à cause de son clignotement, ou parce qu'il sort du plan focal. Afin d'éviter qu'une position soit reconnectée à une lointaine position par erreur, deux critères sont également pris en compte :

- une distance maximum est définie : dans l'hypothèse où la trajectoire suit un mouvement brownien avec un coefficient de diffusion connu, il est possible d'estimer la probabilité de parcourir une distance donnée en un temps donné (voir section suivante 2.2.3.3). Pour calculer cette distance maximum, on choisit donc d'abord un coefficient de diffusion D_{max} légèrement plus élevé que celui attendu dans les expériences. Une reconnexion entre deux points séparés d'un intervalle de temps t et d'une distance d est alors acceptée seulement si la probabilité de parcourir d en t avec un coefficient de diffusion D_{max} n'est pas trop faible (supérieure à un seuil choisi). Dans notre étude, ce coefficient de diffusion était surestimé à $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$, sachant que les coefficients de diffusion mesurés étaient au maximum de $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.
- une durée maximum de clignotement est également définie. Si deux positions sont proches dans l'espace, mais séparées dans le temps par un nombre d'images trop important, les deux positions ne sont pas connectées.

Les trajectoires peuvent ensuite être visualisées et les reconnexions peuvent être ajustées manuellement si nécessaire.

2.2.3.2 Localisation des trajectoires

Pour comparer les comportements diffusifs des protéines dans les régions synaptiques et extrasynaptiques, une étape de localisation des trajectoires (ou plutôt des positions) est nécessaire.

IMAGE DU MARQUAGE SYNAPTIQUE Dans nos expériences, les synapses sont marquées par un élément fluorescent, le marqueur. Avant de réaliser un enregistrement du mouvement des quantum dots, une image de ce marquage est prise. Pour délimiter les deux régions synaptiques et extrasynaptiques, cette image doit ensuite être filtrée.

Nous avons utilisé une interface d'analyse d'image multidimensionnelle (MIA - *Multidimensional Image Analysis*), développée par V. Racine, à l'institut Curie, intégrée dans le logiciel MetaMorph. Ce seuillage permet d'obtenir une image binaire du marquage synaptique. De plus, comme décrit plus loin, le mouvement

de la syntaxin est rapide. Si la région définie comme synaptique est petite, la portion de la trajectoire localisée sur cette région synaptique sera courte, et ne permettra pas d'estimer correctement le coefficient de diffusion. Pour obtenir des trajectoires suffisamment longues, nous avons élargi de deux pixels les régions synaptiques obtenues après le seuillage. Cette espace additionnel est parfois appelé région péri-synaptique.

LOCALISATION DES TRAJECTOIRES Deux points doivent être pris en compte pour localiser les trajectoires : le clignotement des quantum dots, et l'imprécision de la localisation synaptique (qui est définie par des pixels).

(i) Par rapport aux régions définies ci-dessus, un quantum dot peut être considéré dans trois états : synaptique (S), extrasynaptique (E), et clignotement. Le clignotement est traité comme suit : si le QD est situé dans la même région (S ou E) avant et après le clignotement, on suppose qu'il est resté dans la même région pendant le clignotement ; si le QD est situé dans des régions différentes avant et après le clignotement, on suppose que le QD a changé de localisation à la moitié de son temps de clignotement. Après ce traitement, on obtient une séquence d'états (S) ou (E).

(ii) Comme les régions synaptiques sont définies par des pixels, cette localisation est imprécise. Par exemple, un QD peut se trouver dans un pixel adjacent à la région synaptique pendant une image seulement, mais cela ne reflète peut-être pas vraiment un changement de localisation. Un lissage est donc appliqué à la séquence d'états (S) ou (E) obtenue précédemment. Les paramètres de la fonction de lissage ont été ajustés expérimentalement par M.-V. Ehrensperger (Ehrensperger 2007).

Après ces différents traitements, les trajectoires sont découpées selon leur localisation synaptique ou extrasynaptique. Seules les trajectoires constituées d'au moins 15 points sont ensuite analysées.

2.2.3.3 *Mouvement brownien et coefficient de diffusion*

Le mouvement brownien est caractérisé par un coefficient de diffusion. Ce coefficient de diffusion apparaît dans la densité de probabilité des déplacements et dans le déplacement quadratique moyen.

DENSITÉ DE PROBABILITÉ La fonction densité de probabilité f d'une loi de probabilité est définie de telle manière à ce que la probabilité de la variable x de se trouver dans l'intervalle $[a, b]$ est donnée par :

$$P(a \leq x \leq b) = \int_a^b f(x) dx \quad (2.8)$$

Dans le cas du mouvement brownien à deux dimensions avec un coefficient de diffusion D , cette densité de probabilité de la posi-

tion (x, y) à un instant t s'écrit (si la position initiale à $t = 0$ est en $(0, 0)$) :

$$f(x, y, t) = \frac{1}{4\pi Dt} \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{4Dt}\right) \quad (2.9)$$

Autrement dit, la densité de probabilité de la distance r parcourue en un temps t s'écrit :

$$f(r, t) = \frac{1}{4\pi Dt} \exp\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right) 2\pi r \quad (2.10)$$

MOMENTS DU DÉPLACEMENT Il découle de l'expression de ces densités de probabilité que les moments du déplacement ont des expressions connues. Pour la fonction densité de probabilité f , si x représente le vecteur position (x, y) le moment d'ordre p s'écrit :¹

$$\langle \|x(t)\|^p \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} \|x(t)\|^p f(x, t) dx \quad (2.11)$$

DÉPLACEMENT QUADRATIQUE MOYEN ET COEFFICIENT DE DIFFUSION

En particulier, le moment d'ordre 2, appelé déplacement quadratique moyen (*mean square displacement*, MSD) est linéaire en fonction du temps :

$$MSD(t) = \langle |x(t)|^2 \rangle = 4Dt \quad (2.12)$$

Une régression linéaire sur le déplacement quadratique moyen (expérimental) en fonction du temps permet donc de calculer le coefficient de diffusion.

2.2.3.4 *Mouvement non brownien et confinement*

Le déplacement quadratique moyen n'est pas toujours linéaire. Lorsque la MSD est sublinéaire, nous considérons le mouvement comme *confiné* (voir figure 19 A). Ce confinement peut être dû à la présence d'obstacles, de barrières de diffusion qui délimitent un espace par exemple (Kusumi et al. 2005; Qian et al. 1991; Saxton and Jacobson 1997).

Pour identifier si une MSD est sublinéaire, Kusumi *et al* ont introduit le paramètre de *déviaton relative*, RD (Kusumi et al. 1993) :

À t donné,

$$RD(t) = \frac{MSD_{mes}(t)}{MSD_{libre}(t)} \quad (2.13)$$

où MSD_{mes} est le MSD mesuré et MSD_{libre} est calculé en faisant l'hypothèse d'un mouvement brownien avec le coefficient de diffusion D_0 mesuré sur la portion initiale de la courbe : $MSD_{libre} = 4D_0t$. Cette

1. l'expression $\|x\|$ correspond à la norme du vecteur x , c'est-à-dire ici, la taille du déplacement.

méthode évalue l'écart du MSD mesuré expérimentalement au MSD attendu pour un mouvement brownien avec le même coefficient de diffusion. Pour un mouvement brownien, ce paramètre est égal à 1. Par des simulations, Kusumi *et al* ont estimé les valeurs seuil de RD (minimum et maximum) indiquant une probabilité de 0.025 pour que la trajectoire soit brownienne. Un RD faible correspond à un mouvement confiné.

De plus, dans le cas où le mouvement est confiné dans une région rectangulaire de dimensions connues, une expression analytique du MSD a été calculée (Kusumi *et al.* 1993). Une expression du MSD a ensuite été dérivée pour une région circulaire de diamètre L (Ehrensperger 2007) :

$$MSD(t) = \frac{L^2}{3} \left(1 - \exp\left(-\frac{12D_0t}{L^2}\right) \right) \quad (2.14)$$

où D_0 est le coefficient de diffusion mesuré sur la pente initiale du MSD. Dans nos expériences, lorsque les trajectoires étaient détectées comme confinées, le MSD était ajusté avec cette équation pour obtenir la longueur caractéristique L de confinement.

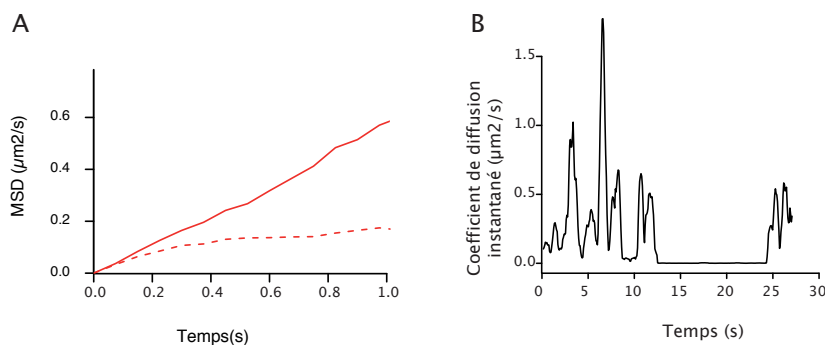


FIGURE 19.: Mouvement non brownien et coefficient de diffusion instantané. **A.** Un déplacement quadratique moyen (MSD) est interprété comme un mouvement brownien (ligne continue), un MSD sublinéaire comme un mouvement confiné (pointillés). **B.** Le coefficient de diffusion instantané était calculé sur une fenêtre glissante de 15 images. Le coefficient de diffusion instantané peut présenter de grandes variations en fonction du temps, qui peuvent permettre d'identifier des changements de mobilité d'une protéine. Cette courbe est obtenue à partir de la trajectoire d'une protéine marquant une *pause*, comme décrit plus loin (2.3.2.3).

2.2.3.5 Coefficient de diffusion instantané

Lorsqu'une protéine membranaire diffuse dans la membrane plasmique, elle peut traverser des environnements ayant des viscosités différentes (des microdomaines lipidiques par exemple) ou se lier à des partenaires qui vont modifier sa mobilité. Le coefficient de diffusion peut donc varier le long d'une trajectoire. Pour étudier ces variations, nous avons utilisé une fenêtre glissante de 15 images. Le long des trajectoires,

nous avons alors mesuré le déplacement quadratique moyen sur des fenêtres centrées sur chaque date t de l'enregistrement, et calculé le coefficient de diffusion sur les 5 premiers points de ces courbes. Nous avons ainsi obtenu un coefficient de diffusion instantané en fonction du temps, le long de la trajectoire (voir figure 19 B). Cette méthode a notamment permis d'observer des changements brutaux de la mobilité des protéines, qui peuvent refléter des événements de liaison entre molécules.

2.2.3.6 *Temps de résidence*

Nous avons également mesuré le temps de résidence dans les régions synaptiques ou extrasynaptiques. La durée des intervalles de temps passés dans ces régions était obtenue après traitement du clignotement et lissage de la séquence des différents états synaptiques (comme décrit plus haut pour la localisation des trajectoires).

Par ailleurs, pour comparer les temps de résidence dans les régions synaptiques ou extrasynaptiques, il est nécessaire de pondérer les temps mesurés par les surfaces de ces régions. Ces surfaces peuvent difficilement être estimées. Nous avons donc proposé de comparer le temps de résidence par pixel, dans chacune de ces régions : pour chaque pixel où est passé au moins une fois un QD, nous avons calculé le nombre d'images pendant lesquelles un QD était présent. Cependant, cette méthode ne permet pas de tenir compte du fait que les QD appartiennent ou non à la même trajectoire, elle ne permet qu'une comparaison d'ensemble peu précise (voir section 2.3.2.4).

2.2.3.7 *Diffusion d'une particule anisotrope*

Enfin, tous les cas décrits ci-dessus caractérisent la diffusion de particules isotropes. Si une particule est anisotrope, par exemple en forme de bâtonnet, elle présente des coefficients de diffusion différents dans l'axe du bâtonnet et dans l'axe orthogonal. Les méthodes décrites ci-dessus ne permettent pas de distinguer ces deux coefficients de diffusion. Dans le cas des protéines membranaires, la symétrie à prendre en compte est celle de l'ancrage dans la membrane, car la membrane est plus visqueuse que le cytoplasme ou le milieu extracellulaire environnant et impose donc la mobilité de la protéine (voir section 3.1.1.3). La syntaxin est ancrée en un point de la membrane, par son domaine transmembranaire. Elle peut donc être considérée comme isotrope. En revanche, elle interagit avec d'autres protéines membranaires, comme SNAP 25 par exemple. Dans ce cas, le complexe qui diffuse est ancré en deux points de la membrane, et il est possible que sa diffusion ne soit pas isotrope.

Nous avons proposé une méthode pour estimer les coefficients de diffusion pour un bâtonnet à partir des trajectoires (Ribault et al. 2007). L'article correspondant est présenté en annexe A.1. Nous n'avons pas utilisé cette méthode dans notre étude, notamment parce qu'elle nécessite une résolution spatiale supérieure à celle de notre méthode de SPT.

2.3 DIFFUSION LATÉRALE DE LA SYNTAXIN 1A-PHGFP - CONDITIONS BASALES

Voici maintenant les résultats que nous avons obtenus avec les méthodes que nous venons de décrire.

2.3.1 Comportement diffusif de la population : FRAP

Le retour de fluorescence après photoblanchiment en fonction du temps, observé dans les expériences de FRAP, renseigne sur la diffusion de l'ensemble des molécules de stxGFP dans la membrane. Cependant, comme expliqué dans le paragraphe 2.2.1, pour interpréter ce retour en termes de propriétés diffusives des molécules, il est nécessaire de faire des hypothèses sur ce comportement diffusif. Dans un premier temps, nous décrivons donc les résultats obtenus dans les expériences de FRAP sans faire aucune hypothèse. Nous proposerons ensuite un modèle basé sur les résultats de SPT (section 2.5).

Dans les régions synaptiques ou extrasynaptiques, le retour de fluorescence observé commençait par une phase rapide, puis ralentissait et finissait par atteindre un plateau à environ 90 % après 3 min (figure 20). Deux temps caractéristiques semblaient se dégager : le premier de l'ordre de quelques secondes correspondant à une phase rapide, le second de l'ordre de quelques minutes avant d'atteindre le plateau.

Le retour était plus lent dans les régions synaptiques que dans les régions extrasynaptiques : à trois temps donnés, 6 s, 28 s et 150 s, la proportion de fluorescence "récupérée" dans les régions synaptiques était inférieure à celle récupérée dans les régions extrasynaptiques (51 % vs 66 %, puis 68 % vs 83 % et 84 % vs 94 %).

La plupart des courbes pouvaient être ajustées avec l'équation biexponentielle suivante :

$$I_{norm}(t) \sim P_f(1 - e^{-t/\tau_f}) + (1 - P_f)(1 - e^{-t/\tau_s}) \quad (2.15)$$

Les deux temps caractéristiques obtenus étaient respectivement de l'ordre de quelques secondes et quelques minutes. Ces temps caractéristiques étaient plus élevés dans les régions synaptiques que dans les régions extrasynaptiques (4.2 s contre 2.3 s et 187 s contre 126 s), et la fraction rapide de la population totale y était plus faible (55 % contre 66 %, voir figure 20). Cependant, ces ajustements restaient de mauvaise qualité, d'une part car les fluctuations d'intensité de fluorescence étaient importantes, d'autre part car le comportement diffusif de la stxGFP ne pouvait vraisemblablement pas être correctement représenté par cette équation biexponentielle.

Le retour de fluorescence de stxGFP dans les expériences de FRAP était plus lent dans les régions synaptiques que dans les régions extrasynaptiques. Dans une première approximation, ce retour pouvait être caractérisé par deux temps caractéristiques, de l'ordre de quelques secondes et quelques minutes.

2.3.2 Trajectoires individuelles : SPT

Les trajectoires des molécules de stxGFP ont également révélé des comportements diffusifs différents dans les régions synaptiques et extrasynaptiques (figure 21). Nous avons caractérisé les trajectoires obtenues dans les expériences de SPT principalement par le type de mouvement (brownien ou confiné) et leur coefficient de diffusion. Nous avons également observé des événements particuliers que nous avons appelés *pauses*, et que nous avons quantifiés (durée, fréquence).

2.3.2.1 Type de mouvement : brownien ou confiné

Les trajectoires étaient d'abord distinguées selon leur caractère brownien ou confiné (figure 21 A). Aux synapses, environ 70 % des trajectoires étaient détectées comme ayant un mouvement subdiffusif (confiné) contre 50 % dans les régions extrasynaptiques. La taille caractéristique de ce confinement, qui décrit l'échelle à laquelle le mouvement est confiné, était de l'ordre de 330 nm dans les régions synaptiques, et de 600 nm dans les régions extrasynaptiques.

2.3.2.2 Coefficient de diffusion

Le coefficient de diffusion était mesuré sur la totalité de chaque trajectoire. Il était donc "moyenné" sur l'enregistrement pour chaque molécule, en opposition au coefficient de diffusion instantané, mais permettait néanmoins de rendre compte de la diversité des comportements entre les molécules. Les coefficients de diffusion mesurés dans les régions synaptiques et extrasynaptiques étaient distribués sur quatre ordres de grandeur, de $10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ à $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, selon des distributions qui n'étaient pas gaussiennes (figure 21 B-C). Les coefficients de diffusion dans les régions synaptiques étaient plus faibles que dans les régions extrasynaptiques (les médianes des distributions étaient respectivement $0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$).

2.3.2.3 Pauses

Les trajectoires des molécules présentaient parfois un changement brutal de mobilité, correspondant à une période pendant laquelle la molécule restait presque immobile : son coefficient de diffusion instantané devenait très faible ($< 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$). Nous avons appelé ce comportement *pause* (voir exemple présenté sur la figure 19). Le coefficient de diffusion pendant ces périodes était de l'ordre de $2.3 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, et la taille de la

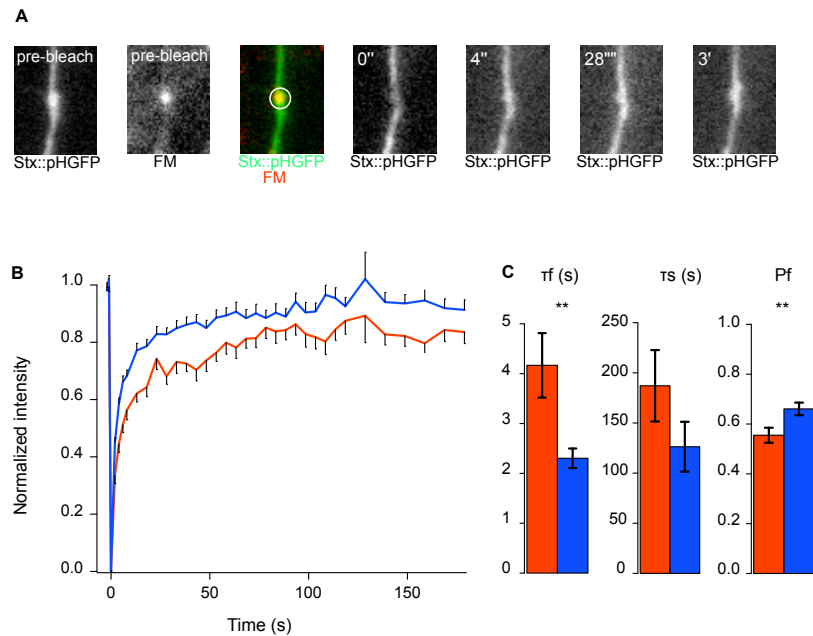


FIGURE 20.: Un retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) plus lent dans les régions synaptiques qu'extrasynaptiques. A. Exemples d'images acquises pendant une expérience de FRAP. Une image de la fluorescence de stxGFP et du marquage synaptique (FM 4-64) sont prises avant le photoblanchiment (pre-bleach). La région dans laquelle la fluorescence est inactivée est indiquée par un cercle blanc sur la superposition de ces deux images. Les images d'une acquisition séquentielle (*time lapse*) suivant le photoblanchiment sont présentées aux instants $t = 0$ s, 4 s, 28 s et 3 min. B. Retour de fluorescence normalisé en fonction du temps, moyenné sur l'ensemble des expériences, dans les régions synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (bleu). C. Valeurs moyennes des paramètres de l'ajustement biexponentiel de courbes expérimentales : temps caractéristique court τ_f , temps caractéristique long τ_s , et fraction de la population "rapide" P_f pour les régions synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (bleu). Test de Student, ** $p < 0.01$

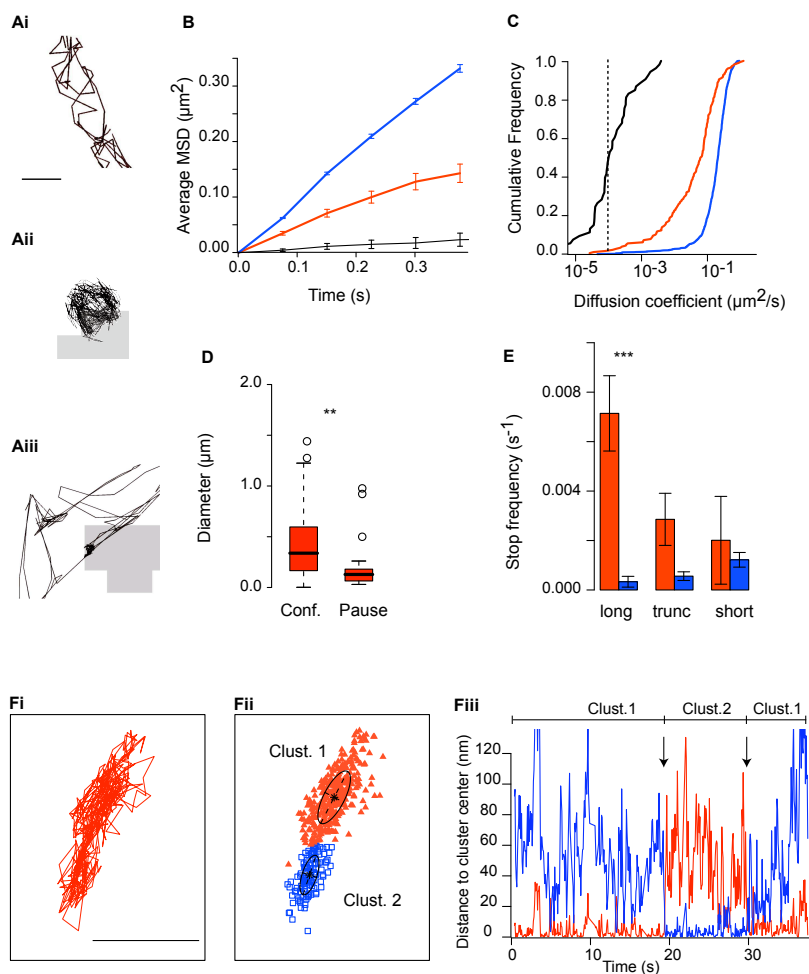


FIGURE 21.: Diffusion latérale de la stxGFP couplée à des quantum dots. A. Exemples de trajectoires : mouvement brownien (Ai), mouvement confiné (Aii) ou pause (Aiii). Les régions synaptiques sont indiquées en gris. Échelle : 300 nm. B. Moyenne du déplacement quadratique moyen (MSD) pour les trajectoires dans les régions synaptiques (rouge) ou extrasynaptiques (bleu), et pour les pauses (noir). C. Distribution des probabilités cumulées des coefficients de diffusion. Même code couleur qu'en (B). La ligne pointillée verticale correspond au coefficient de diffusion des QDs observés sur des lamelles sans neurones. D. Distribution du diamètre de la région de confinement dans les synapses (conf) ou de la région explorée pendant les pauses (pause). Le segment épais horizontal correspond à la médiane de la distribution. Test de KS, ** $p < 0.01$. E Fréquence des différents types de pauses : pauses longues (long), tronquées (trunc), et courtes (short), dans les régions synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (bleu). Test de Student *** $p < 0.001$. F. Exemple d'une pause "compartimentée". Fi. Trajectoire d'une pause synaptique. Échelle : 100 nm. Fii. Deux ensembles de positions gaussiens (clusters) étaient détectés par une "analyse de mélange de gaussiennes", et sont indiqués ici en rouge et bleu. Fiii. Distance du QD au centre de chaque cluster identifié sur (Fii) en fonction du temps (cluster 1 : rouge, cluster 2 : bleu). Le QD passe du cluster 1 au cluster 2, puis revient au cluster 2 (flèches).

région explorée de l'ordre de 120 nm. La durée de ces pauses variait de quelques secondes à quelques minutes (nous avons réalisé quelques enregistrements de quelques minutes pour observer ces longues pauses). Nous avons distingué trois catégories : les pauses *longues*, dont la durée était supérieure à 37.5 s (la durée de l'enregistrement), les pauses *tronquées* dont la durée ne pouvait être déterminée car elles étaient "coupées" par le début ou la fin de l'enregistrement, et les pauses *courtes*, dont la durée totale était observée. Les pauses courtes duraient en moyenne 4 s, ce qui indique qu'elle correspondaient à un phénomène distinct des pauses longues (la distribution de la durée des pauses courtes ne peut correspondre à la queue de la distribution de la durée des pauses longues). Nous avons calculé la fréquence de ces pauses en divisant le nombre d'événements observés dans les régions synaptiques ou extrasynaptiques par le temps passé dans les régions correspondantes. Cette fréquence était plus élevée dans les régions synaptiques qu'extrasynaptiques (environ 0.01 s^{-1} pour la totalité des pauses aux synapses contre 0.002 s^{-1} dans les régions extrasynaptiques, figure 21 E).

2.3.2.4 Temps de résidence

Le temps de résidence de la stxGFP dans les régions synaptiques était de l'ordre d'une seconde (figure 22 A). Cette durée est relativement faible en comparaison avec le temps de résidence des récepteurs de neurotransmetteurs qui est de l'ordre d'une dizaine de secondes (Charrier et al. 2006). Pour comparer le temps que les molécules passaient dans les synapses par rapport à celui passé dans les régions extrasynaptiques, nous avons mesuré le temps par pixel dans chacune de ces régions (comme décrit dans la section 2.2.3.6). Ce paramètre n'est pas décrit dans l'article, mais le temps par pixel synaptique était légèrement supérieur au temps par pixel extrasynaptique (figure 22 B).

Par ailleurs, nous avons également mesuré la durée des périodes passées aux synapses, et comparé celle des trajectoires confinées (avec un coefficient de diffusion donné) à celle des trajectoires browniennes (avec le même coefficient de diffusion). Nous n'avons noté aucune différence significative (figure 22 C).

D'après les trajectoires des molécules individuelles de stxGFP (SPT), le coefficient de diffusion est plus faible, la diffusion latérale est plus confinée, et les pauses sont plus fréquentes dans les régions synaptiques que dans les régions extrasynaptiques.

2.4 RÔLE DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES DANS LA DIFFUSION LATÉRALE

La syntaxin interagit avec de nombreuses protéines, notamment via ses domaines SNARE et Habc. Pour étudier la contribution de ces interactions aux propriétés du mouvement, nous avons d'abord privé la

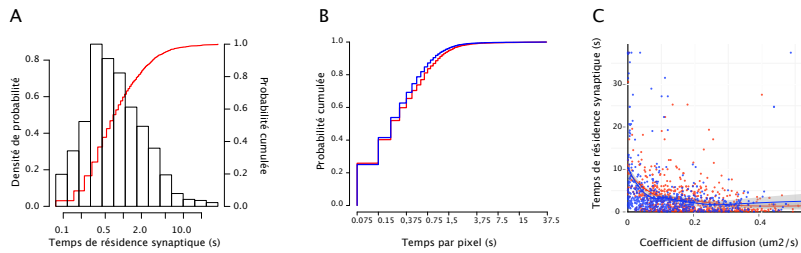


FIGURE 22.: Temps de résidence aux synapses. A. Histogramme et probabilité cumulée du temps de résidence dans les régions synaptiques. B. Probabilité cumulée du temps de résidence par pixel dans les régions synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (bleu). C. Temps de résidence dans une région synaptique en fonction du coefficient de diffusion et du type de mouvement (rouge : brownien, bleu : confiné). Les courbes tracées sont obtenues par lissage des points.

stxGFP de son domaine Habc, puis nous avons ôté son domaine SNARE (figure 23), en s'inspirant d'une étude de la diffusion de la syntaxin dans les cellules neuroendocrines publiée récemment (Sieber et al. 2007). Enfin, nous avons également clivé spécifiquement son partenaire SNAP 25 en utilisant une toxine botulique.

2.4.1 Interactions via le domaine Habc

La construction de la stxGFP privée de son domaine Habc est constituée principalement du domaine transmembranaire et du domaine SNARE, et est donc appelée *snareGFP*. Cette construction comprend la séquence de la syntaxin1A selon les aa 1 – 28 et aa 183 – 288 (figure 23 A). L'expression de *snareGFP* était qualitativement comparable à celle de stxGFP. Sa localisation était identique, son niveau d'expression vraisemblablement légèrement inférieur. Aucune mesure de la vitesse d'exocytose n'a été faite pour cette construction, mais le marquage des synapses par le FM 4-64 (qui implique des cycles d'exo et d'endocytose) dans les cellules transfectées par *snareGFP* était comparable à celui des cellules exprimant stxGFP.

FRAP Aux synapses, le retour de fluorescence de *snareGFP* était plus lent que celui de stxGFP. En particulier, parmi les paramètres de l'ajustement biexponentiel obtenus, la fraction associée au temps caractéristique court était plus faible pour *snareGFP* que pour stxGFP (45 % contre 55 %, figure 24).

SPT La différence la plus marquante entre les trajectoires synaptiques de *snareGFP* et stxGFP était la fréquence des pauses : la fréquence des pauses courtes aux synapses était plus élevée pour *snareGFP*, dépourvue de domaine Habc, que pour stxGFP (0.007 s^{-1} contre 0.002 s^{-1} voir figure 23 C). La distribution des coefficients de diffusion de *snareGFP* n'était pas significativement différente de celle de stxGFP, aux régions synaptiques comme extrasynaptiques. La

proportion de trajectoires confinées et la taille de confinement n'étaient pas différentes entre les deux constructions.

Dans les régions synaptiques, la suppression du domaine Habc de la syntaxin ralentit le retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) et augmente la fréquence des pauses (SPT).

2.4.2 Interactions via le domaine SNARE

Pour étudier le rôle des interactions via le domaine SNARE dans la diffusion latérale de la syntaxin, nous avons comparé le comportement diffusif de snareGFP à la celui de la même construction sans le domaine SNARE. Cette construction était donc constituée principalement du domaine transmembranaire, et est appelée *tmrGFP*. La construction *tmrGFP* comprend la séquence de la syntaxin1A selon les aa 1 – 28 et 259 – 288 (figure 23 A). L'expression de la *tmrGFP*, sa localisation et son niveau d'expression étaient qualitativement comparables à ceux de la *stxGFP*. Comme pour la construction *snareGFP*, aucune mesure de la vitesse d'exocytose n'a été faite mais le marquage des synapses par le FM 4-64 dans les cellules transfectées avec *tmrGFP* était comparable à celui des cellules exprimant *stxGFP*.

FRAP Contrairement au ralentissement observé après la suppression du domaine Habc, la suppression du domaine SNARE s'est traduite par une accélération du retour de fluorescence : le retour de fluorescence de *tmrGFP* aux synapses était plus rapide que ceux de *snareGFP* et *stxGFP* (figure 24). En particulier, parmi les paramètres de l'ajustement biexponentiel obtenus, la fraction associée au temps caractéristique court était plus élevée pour *tmrGFP* que pour *snareGFP* (60 % contre 45 %), et le temps caractéristique long était plus petit pour *tmrGFP* que pour *snareGFP* (143 s contre 261 s).

SPT En accord avec les résultats des expériences de FRAP, le coefficient de diffusion synaptique de *tmrGFP* était plus élevé que celui de *snareGFP* (0.13 contre 0.06 $\mu\text{m}^2/\text{s}$). De plus, la fréquence des pauses synaptiques de *tmrGFP*, qui n'avait plus de domaine SNARE était plus faible que celle de *snareGFP* (0.001 contre 0.007 s^{-1} , voir figure 23). La proportion de trajectoires confinées et la taille caractéristique de confinement n'étaient pas modifiées.

La suppression du domaine SNARE de la syntaxin accélère le retour de fluorescence après photoblanchiment aux synapses, augmente le coefficient de diffusion et diminue la fréquence des pauses synaptiques.

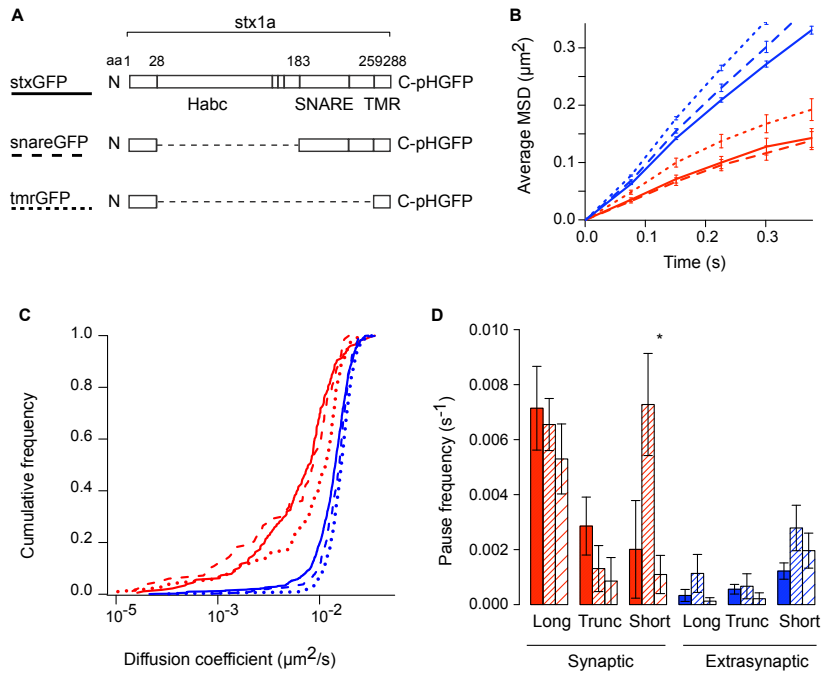


FIGURE 23.: Effets des délétions des domaines Habc et SNARE sur la diffusion latérale de stxGFP. A. Constructions tronquées de stxGFP. La construction snareGFP ne contient pas le domaine Habc de la syntaxin1A, et la construction tmrGFP ne contient ni le domaine Habc, ni le domaine SNARE. B. Moyenne du déplacement quadratique moyen pour stxGFP (lignes continues), snareGFP (tirets), et tmrGFP (pointillés) dans les régions synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (bleu). C. Distribution des probabilités cumulées des coefficients de diffusion. Même code de ligne et de couleur qu'en (B). D. Fréquences des différents événements de pause : pauses longues (long), tronquées (trunc) et courtes (short), dans les régions synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (bleu), pour chaque construction (stxGFP : plein, snareGFP : hachures serrées; tmrGFP : hachures aérées). Test de Student, * $p < 0.05$.

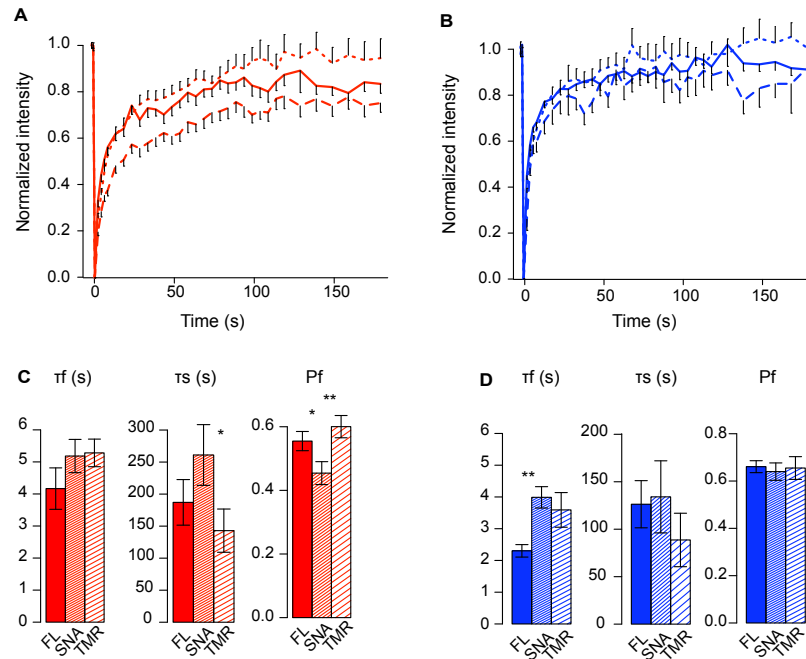


FIGURE 24.: Effets des délétions des domaines Habc et SNARE sur le retour de fluorescence après photoblanchiment. A. Moyenne du retour de fluorescence de stxGFP (ligne continue), de snareGFP (tirets) et de tmrGFP (pointillés) en fonction du temps, dans les régions synaptiques. B. Moyenne du retour de fluorescence des trois constructions en fonction du temps, dans les régions extrasynaptiques. Même code de ligne qu'en (A). C. Moyenne des paramètres obtenus par l'ajustement biexponentiel des courbes expérimentales synaptiques : temps caractéristique court τ_f , temps caractéristique long τ_s , et fraction de la population "rapide" P_f pour les trois constructions (stxGFP, plein; snareGFP, hachures serrées; tmrGFP, hachures aérées). Test de Student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. D. Moyenne des paramètres obtenus par l'ajustement biexponentiel des courbes expérimentales extrasynaptiques. Mêmes codes qu'en (C).

2.4.3 Interactions via le domaine transmembranaire

Le comportement diffusif de tmrGFP restait différent dans les régions synaptiques et extrasynaptiques : un coefficient de diffusion plus faible et une fréquence de pauses plus élevée (voir figure 23). La construction tmrGFP ne comprend guère que le domaine transmembranaire de la syntaxin1A . La différence de comportement entre les régions synaptiques et extrasynaptiques suggère que le domaine transmembranaire est impliqué dans des interactions spécifiquement dans les régions synaptiques.

La construction qui ne contient que le domaine transmembranaire reste ralentie aux synapses par rapport aux régions extrasynaptiques et présente encore quelques pauses.

2.4.4 Interactions avec SNAP25

Les résultats obtenus avec les constructions ci-dessus ont suggéré que les interactions via le domaine SNARE affectaient le mouvement de stxGFP (voir discussion 3.1.3). SNAP 25 est une des protéines qui interagissent avec le domaine SNARE de la syntaxin1A . Nous avons clivé SNAP 25 en utilisant la neurotoxine botulique E (*Botulinum Neurotoxin E*, BoNT/E) pour empêcher son interaction avec la syntaxin1A et étudier l'effet de l'interaction syntaxin1A -SNAP 25 sur la diffusion latérale de stxGFP.

2.4.4.1 Conditions expérimentales

La toxine botulique est un polypeptide à deux chaînes : la chaîne lourde de BoNT/E se fixe sur le récepteur neuronal de la toxine et permet la translocation dans le cytoplasme de la chaîne légère, qui porte l'activité enzymatique. Cette chaîne légère protéolyse les 26 acides aminés C-terminaux de SNAP 25, et empêche ainsi son interaction avec la syntaxin (Rickman et al. 2004), et consécutivement la fusion des vésicules.

Pour cliver sélectivement SNAP 25 sans utiliser la toxine botulique dans son intégralité (dont l'usage est dangereux), nous avons utilisé un plasmide contenant la séquence de la chaîne légère de la toxine, qui nous a généreusement été transmis par Thierry Galli (Institut Jacques Monod, Paris). Nous avons alors étudié la diffusion latérale de la syntaxin dans des neurones co-transfectés avec les plasmides de stxGFP et de la chaîne légère de la toxine.

Comme la toxine botulique empêche l'exocytose, les synapses des neurones transfectés ne pouvaient être marquées par le FM 4-64. Nous avons donc mené les expériences dans des neurones de souris *knock-in* (KI) avec la protéine de fusion gephyrin-mRFP (mRFP : *monomeric Red Fluorescent Protein*). La protéine gephyrin est une protéine d'échafaudage post-synaptique des synapses inhibitrices, elle est donc présente dans

65 % des synapses de la moelle épinière (Dumoulin et al. 1999; Fritschy et al. 2008). L'expression de la stxGFP dans les neurones de souris KI gephyrin-mRFP, en présence ou en absence de BoNT/E, était comparable à celle observée dans les neurones de rat.

2.4.4.2 Diffusion latérale de stxGFP

Le comportement diffusif de stxGFP en condition contrôle, c'est-à-dire dans les neurones de souris KI sans BoNT/E, était comparable à celui de stxGFP dans les neurones de rat : un coefficient de diffusion plus faible, une proportion de trajectoires confinées plus élevée (avec une taille de confinement plus petite) et une fréquence de pauses plus élevée dans les régions synaptiques que dans les régions extrasynaptiques, ainsi qu'un retour de fluorescence en FRAP plus lent dans les régions synaptiques que dans les régions extrasynaptiques. En présence de la toxine, le comportement diffusif de stxGFP s'est ensuite trouvé modifié.

FRAP L'expression de BoNT/E s'est traduite aux synapses par un retour de fluorescence plus rapide que dans la condition contrôle. La différence entre les deux courbes était faible aux temps courts (44 vs 39 % après 6 s), mais plus importante aux temps longs (69 vs 59 % après 28 s et 87 vs 80 % après 150 s, figure 26). Aucune différence n'a été observée entre les deux courbes extrasynaptiques.

SPT En présence de la toxine, le coefficient de diffusion synaptique était légèrement plus élevé que dans la condition contrôle (0.13 vs 0.12 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, et la durée des pauses courtes aux synapses était également légèrement diminuée (1.65 s vs 3.75 s). La fréquence des pauses n'était pas significativement différente, mais elle était diminuée en présence de la toxine (figure 25). Dans les régions extrasynaptiques, la présence de la toxine a également provoqué une légère augmentation du coefficient de diffusion de stxGFP.

Le clivage de SNAP 25 accélère le retour de fluorescence de la stxGFP et diminue la fréquence et la durée des pauses aux synapses.

2.5 MODÈLE DE LA DIFFUSION LATÉRALE DE LA SYNTAXIN

Comme expliqué précédemment, les expériences de FRAP donnent accès au comportement diffusif de l'ensemble de la population de molécules, mais ne peuvent être interprétées qu'avec des hypothèses concernant le comportement des molécules individuelles. Pour définir des hypothèses adaptées au cas de la syntaxin, nous nous sommes basés sur les caractéristiques de la diffusion latérale des molécules individuelles de syntaxin obtenues en SPT. En collaboration avec Jurgen Reingruber et David Holcman (École Normale Supérieure, Paris), nous avons construit un modèle computationnel qui décrit la diffusion latérale de stxGFP comme résultant d'une diffusion libre et des interactions avec des constituants

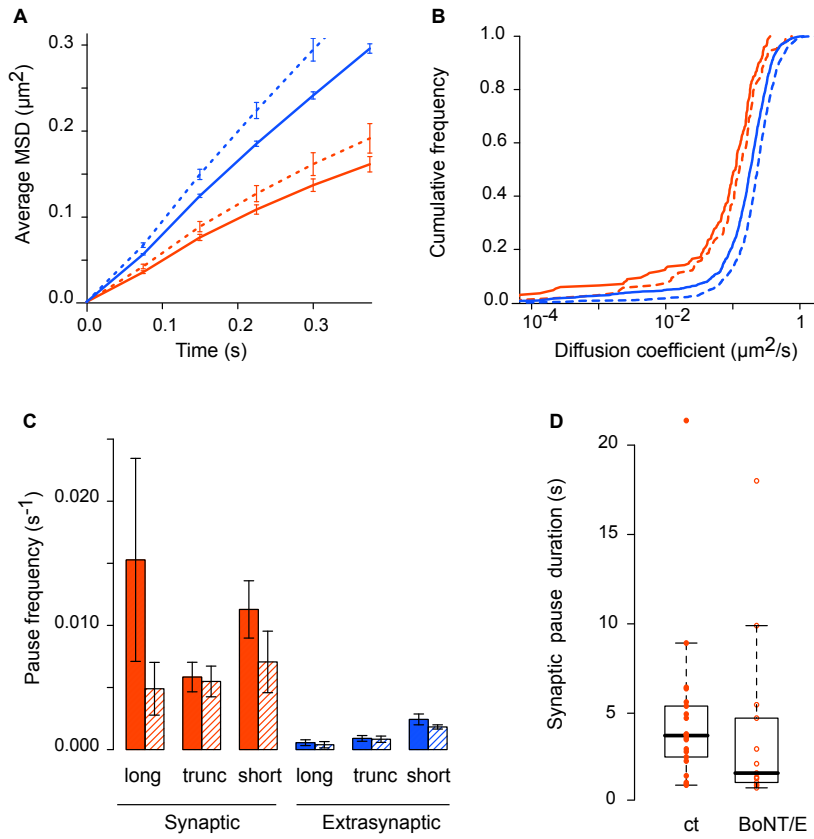


FIGURE 25.: Effets du clivage de SNAP 25 sur la diffusion latérale de stxGFP-QD. Les neurones étaient transfectées avec stxGFP seulement (contrôle) ou avec la stxGFP et la chaîne légère de la toxine botulique E (BoNT/E). A. Moyenne du déplacement quadratique moyen des trajectoires de stxGFP-QD dans les cellules contrôle (ligne continue) et dans les cellules transfectées avec BoNT/E (pointillés), dans les régions synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (bleu). B. Distribution des probabilités cumulées des coefficients de diffusion. Même code qu'en (A). C. Fréquences des différents types de pause : pauses longues (long), tronquées (trunc), et courtes (short), dans les régions synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (bleu), dans les conditions contrôle (plein) ou en présence de BoNT/E (hachures). D. Distribution de la durée des pauses courtes pour les conditions contrôle (ct) ou en présence de BoNT/E (la ligne horizontale indique la médiane). Chaque point représente une pause.

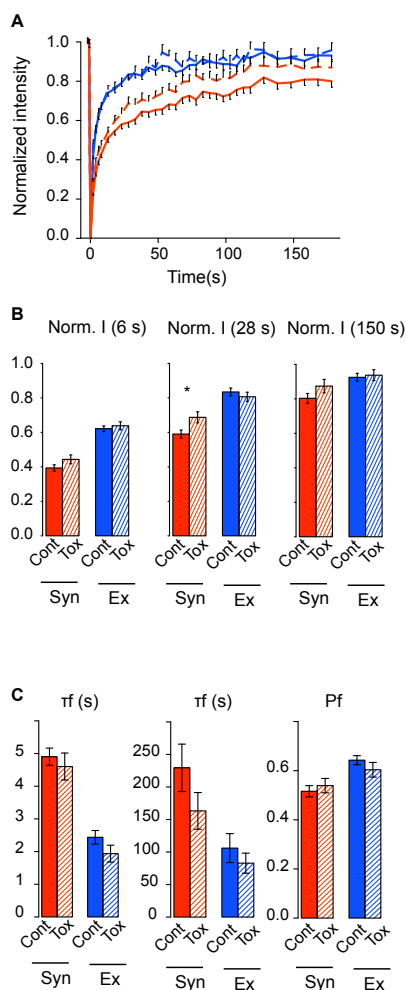


FIGURE 26.: Effets du clivage de SNAP 25 sur le retour de fluorescence après photoblanchiment de stxGFP. A. Moyenne du retour de fluorescence de stxGFP dans les conditions contrôle (ligne continue) et en présence de BoNT/E, en fonction du temps, dans les régions synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (bleu). B. Moyenne du retour de fluorescence de stxGFP après 6 s, 28 s et 150 s, dans les conditions contrôle (plein) ou en présence de BoNT/E (hachures), dans les régions synaptiques (rouge) et extrasynaptiques (bleu). Test de Student * $p < 0.05$. C. Valeurs moyennes des paramètres de l'ajustement biexponentiel des courbes expérimentales : temps caractéristique court τ_f , temps caractéristique long τ_s , et fraction de la population "rapide" P_f . Même code qu'en (B).

du complexe exocytotique. Avec ces hypothèses, nous avons simulé le retour de fluorescence après blanchiment et ajusté celui-ci sur les courbes de FRAP expérimentales.

2.5.1 Description du modèle

2.5.1.1 Diffusion latérale et interactions

Comme nous le développerons dans la discussion 3.1.3, les données expérimentales présentées ci-dessus suggèrent que la stxGFP est engagée dans deux types de liaisons impliquant des molécules du complexe exocytotique. En particulier, nous pensons que les pauses courtes et les pauses longues reflètent ces deux types de liaisons. Des travaux ont suggéré que la formation de ce complexe passait par une étape intermédiaire, la formation d'un complexe accepteur, comprenant notamment la syntaxin (de Wit et al. 2009, et voir section 1.2.1.2). Nous avons donc proposé que ces deux types de liaison correspondent, pour la première (courte) à la formation du complexe accepteur, puis pour la seconde (longue) à la formation du complexe exocytotique. Dans ce cadre de description, les deux réactions d'interactions sont couplées : la première réaction permet la formation d'un premier complexe entre la stxGFP et un premier partenaire, la seconde correspond à une liaison entre ce complexe et un deuxième partenaire.

Par ailleurs, nous avons choisi de décrire la diffusion libre de la stxGFP uniquement comme brownienne, c'est-à-dire de ne pas prendre en compte le caractère confiné des trajectoires aux synapses : le fait que les trajectoires confinées n'avaient pas un temps de résidence synaptique significativement plus long que celui des trajectoires browniennes suggère que le confinement ne contribue pas au retour observé en FRAP de manière significative.

Le modèle est donc le suivant (figure 27) :

- stxGFP libre est notée S_0 , elle se déplace avec un mouvement brownien, avec les coefficients de diffusion D_s et D_e dans les régions synaptiques et extrasynaptiques respectivement.
- S_0 peut se lier à un premier partenaire, M_1 , pour former le complexe S_1 . Les constantes d'association et de dissociation sont respectivement k_{01} et k_{10} . Cette réaction a un temps caractéristique court (s). Ces constantes de réaction diffèrent dans les régions synaptiques et extrasynaptiques. Cette liaison provoque l'immobilisation de la stxGFP.
- S_1 peut se lier à un deuxième partenaire, M_2 , pour former S_2 . Les constantes d'association et de dissociation sont k_{12} et k_{21} . Cette réaction a un temps caractéristique long (min). Ces constantes de réaction diffèrent dans les régions synaptiques et extrasynaptiques, et le complexe S_2 est également immobile.

Les équations de ces réactions s'écrivent donc :



2.5.1.2 Environnement

Dans le modèle, la stxGFP se déplace en deux dimensions. La région synaptique est définie comme un disque de rayon 500 nm (de l'ordre de la taille du marquage synaptique expérimental), au-delà de laquelle se trouve la région extrasynaptique. Le rayon de la région extrasynaptique est 3 μm .

Le profil d'intensité de fluorescence après photoblanchiment utilisé dans le modèle est un profil gaussien ajusté sur le profil mesuré expérimentalement. La région photoblanchie a un rayon d'environ 1 μm de rayon est affectée et la fraction des molécules photoblanchies est de 65 %. Le retour de fluorescence est calculé dans une région de 500 nm de diamètre.

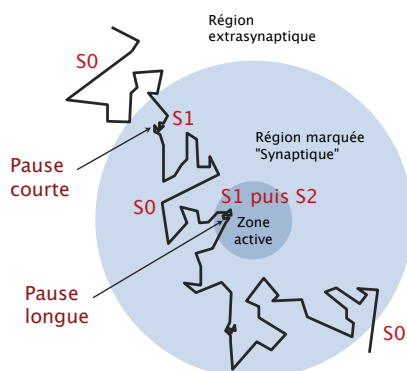


FIGURE 27.: Modèle du comportement diffusif de stxGFP — Exemple de la région synaptique. La région considérée comme synaptique est un disque de 500 nm de diamètre, correspondant à la région marquée comme synaptique dans les mesures expérimentales. La syntaxin se déplace avec un mouvement brownien lorsqu'elle est libre (S_0), marque une pause courte lorsqu'elle se trouve liée à un premier partenaire (S_1), et une pause longue lorsqu'elle se lie ensuite à un deuxième partenaire (S_2). Ces réactions de liaison peuvent avoir lieu dans les régions synaptiques comme extrasynaptiques mais avec des constantes de réaction différentes.

2.5.1.3 Paramètres dynamiques

Les paramètres dynamiques du modèle incluent les constantes d'association et de dissociation des réactions de liaison, et les coefficients de diffusion. Certains de ces paramètres étaient mesurés expérimentalement,

les autres étaient obtenus par ajustement des courbes de FRAP expérimentales :

- Le coefficient de diffusion était mesuré dans les expériences de SPT comme décrit ci-dessus.
- La constante de dissociation d'une réaction de liaison correspond à l'inverse du temps caractéristique de liaison (Schuss 1980). Pour la première réaction, k_{10} a donc pu être estimé à partir de la durée des pauses courtes. La durée des pauses longues n'a pu être estimée car leur durée était supérieure à celle de l'enregistrement. Ce paramètre k_{21} est donc estimé en ajustant les courbes de FRAP expérimentales.
- Enfin, la constante d'association correspond à la fréquence des événements de liaison. Elle correspond donc à la fréquence des pauses observées. Cependant, cette estimation peut être difficile car les pauses très courtes (< 1 s) n'ont pas pu être détectées, et l'échantillonnage peut ne pas être représentatif. Nous avons donc choisi d'estimer les constantes d'association des deux réactions k_{01} et k_{12} en ajustant les courbes de FRAP expérimentales.

De plus, les valeurs des paramètres cinétiques des réactions et des coefficients de diffusion diffèrent selon les régions synaptiques et extrasynaptiques. Dans le modèle, ils varient de manière continue dans une région comprise entre ces deux régions, plus précisément entre 300 nm et 500 nm (rayon).

2.5.2 *Obtention des paramètres cinétiques*

Nous avons estimé les paramètres k_{01} , k_{12} et k_{21} en ajustant les courbes de FRAP obtenues dans les conditions décrites dans la section précédente (différentes constructions et toxine botulique). Comme le retour de fluorescence dans les régions synaptiques dépend des comportements diffusifs de la stxGFP dans les régions synaptiques et extrasynaptiques, nous avons d'abord ajusté les courbes extrasynaptiques pour obtenir les paramètres extrasynaptiques, puis utilisé ces paramètres pour ajuster les courbes synaptiques (figure 28 et table 1).

2.5.2.1 *Constantes d'affinité*

La constante d'affinité K est définie comme le ratio k_{on}/k_{off} : à l'équilibre, cette constante est égale au ratio de la concentration de protéines dans l'état lié et de la concentration de protéines libres. Pour les deux réactions, et dans toutes les conditions étudiées, les constantes d'affinité étaient plus élevées dans les régions synaptiques que dans les régions extrasynaptiques.

Comme les courbes extrasynaptiques n'étaient pas significativement différentes dans les conditions étudiées, nous nous focalisons ensuite sur les paramètres synaptiques (table 1). Dans les régions synaptiques, on obtient les résultats suivants :

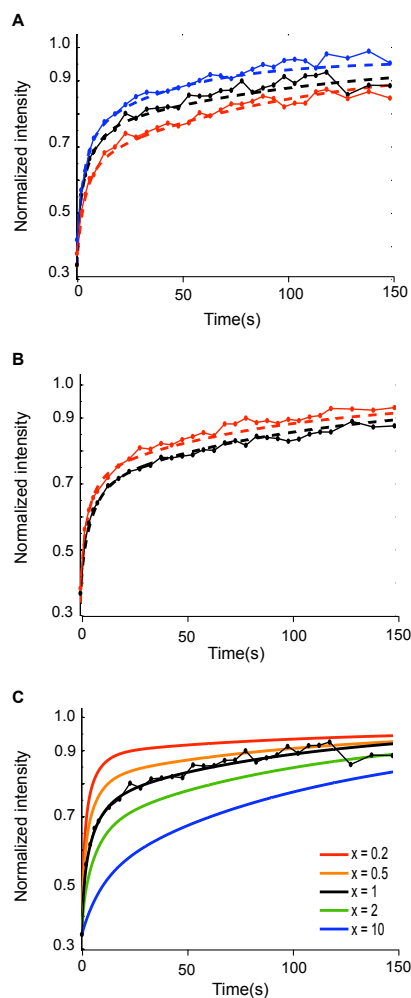


FIGURE 28.: Simulations des courbes de FRAP avec le modèle de deux réactions couplées, basé sur les données de SPT. A. Simulation du retour de fluorescence pour les trois constructions (stxGFP, noir ; snareGFP, rouge ; tmrGFP, bleu), dans les régions synaptiques. Lignes continues : données expérimentales ; lignes pointillées : données simulées. B. Simulation du retour de fluorescence dans les conditions avec et sans BoNT/E (contrôle, noir ; BoNT/E, rouge), dans les régions synaptiques. Même code de lignes qu'en (A). C. Sensibilité du retour de fluorescence à la cinétique de la première réaction (rapide). Le retour de fluorescence est simulé pour différentes valeurs de k_{01} . Les valeurs de k_{10} , k_{12} , et k_{21} sont celles obtenues par l'ajustement de la courbe synaptique de stxGFP (courbe noire sur (A)). Les différentes valeurs de k_{01} sont égales à x fois la valeur de k_{01} ajustée sur la courbe synaptique de stxGFP (rouge, $x=0.2$; orange, 0.5 ; noir, 1 ; vert, 2 ; bleu, 10). Les points représentent les données expérimentales.

- Lorsque le domaine Habc a été supprimé, la constante d'affinité K_1 de la première réaction a été augmentée d'un facteur 3, celle de la deuxième réaction n'était pas changée.
- Au contraire, lorsque le domaine SNARE a été supprimé, les constantes d'affinité des deux réactions K_1 et K_2 ont été diminuées (1.75 et 1.6 pour snareGFP contre 1.4 et 0.8 pour tmrGFP).
- Enfin, la présence de la toxine botulique a provoqué une diminution de la constante d'affinité K_2 de la deuxième réaction, sans changer celle de la première.

	stxGFP	snareGFP	tmrGFP	“contrôle”	BoNT/E
k_{01} (s^{-1})	0.120	1.400	1.200	0.250	0.550
k_{10} (s^{-1})	0.222	0.800	0.833	0.267	0.606
$K_1 = k_{01}/k_{10}$	0.540	1.750	1.440	0.938	0.908
k_{12} (s^{-1})	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017
k_{21} (s^{-1})	0.010	0.010	0.020	0.008	0.012
$K_2 = k_{12}/k_{21}$	1.600	1.600	0.800	2.125	1.417

TABLE 1.: Paramètres cinétiques des réactions de liaison dans les régions synaptiques obtenus avec le modèle de diffusion de la stxGFP. Chaque colonne correspond à une condition expérimentale. Les valeurs du paramètre k_{10} ont été mesurées expérimentalement, les autres paramètres ont été estimés par ajustement des courbes de FRAP expérimentales.

2.5.2.2 Constantes d'association et de dissociation

Nous avons choisi d'estimer les valeurs des constantes d'association, alors que celles-ci pouvaient en principe être mesurées expérimentalement. Il s'est avéré que les constantes d'association obtenues avec le modèle étaient plus élevées que celles mesurées expérimentalement, d'environ un facteur 10 (table 1 et figure 21). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer une sous-estimation de la fréquence des pauses mesurée en SPT : (i) les pauses d'une durée inférieure à 1 s n'étaient pas détectées ; (ii) le temps de résidence dans les synapses a peut-être été surestimé ; (iii) l'échantillonnage des molécules a pu être biaisé. Ce point est précisé dans la discussion 3.1.4.3.

Les temps caractéristiques de dissociation (inverses des constantes de dissociation) estimés pour la deuxième réaction vont de 50 s à 2 min pour les constructions tmrGFP et stxGFP respectivement.

2.5.2.3 Couplage entre les deux réactions

On peut noter que, du fait du couplage entre les deux réactions, une modification de la constante d'affinité de la première réaction (rapide) a des répercussions sur la deuxième réaction (lente), et donc sur le comportement diffusif de la stxGFP aux temps longs (figure 28 C). Cet effet est notamment observé lors de la suppression du domaine Habc.

En accord avec les données de SPT et avec la littérature, nous avons modélisé la diffusion latérale de la syntaxin comme résultant de diffusion libre et de deux réactions couplées, ayant des temps caractéristiques de quelques secondes et quelques minutes. L'ajustement des courbes de FRAP avec ces hypothèses a permis de caractériser les cinétiques de ces réactions.

2.6 DIFFUSION LATÉRALE ET ACTIVITÉ SYNAPTIQUE

La syntaxin étant impliquée dans l'exocytose, on peut se demander si, d'une part, l'activité synaptique influe sur son comportement diffusif, et d'autre part, si son comportement diffusif a une incidence sur les propriétés de la transmission synaptique.

2.6.1 *La diffusion latérale de la syntaxin 1A-pHGFP dépend-elle de l'activité synaptique ?*

Pour étudier l'influence de l'activité synaptique sur la diffusion latérale de la syntaxin, nous avons utilisé deux types d'agents pharmacologiques, appliqués à l'ensemble du réseau de neurones présent sur la lamelle : (i) des antagonistes des canaux sodiques et potassiques, dont l'ouverture modifie le potentiel de membrane et donc le niveau d'activité de la culture, et (ii) un chélateur des ions calcium capable de pénétrer dans le milieu intracellulaire, qui perturbe donc la transmission synaptique.

2.6.1.1 *Modification du niveau d'activité électrique de la culture par des agents pharmacologiques*

La tetrodotoxine (TTX) est un antagoniste des canaux sodiques qui empêche la propagation des potentiels d'action. Son application diminue fortement l'activité des neurones. La 4-aminopyridine (4-AP) est un antagoniste des canaux potassiques qui prolonge les potentiels d'action, et son application augmente l'activité des neurones. Les effets de ces substances sur l'activité de la culture sont immédiats. Nous avons réalisé des expériences de SPT en présence de chacun de ces agents. Nous n'avons observé aucune modification de la diffusion latérale de stxGFP.

2.6.1.2 *Chélation du calcium intracellulaire*

Le BAPTA-AM est un chélateur des ions calcium, capable de pénétrer à l'intérieur des cellules. Comme la transmission synaptique est déclenchée par une augmentation locale de la concentration intracellulaire des ions calcium, la chélation de ces ions calcium perturbe l'activité synaptique. Les expériences de FRAP n'ont montré aucune modification de la diffusion latérale de stxGFP lorsque les neurones étaient mis en présence de BAPTA-AM, après 30 min d'incubation (voir figure supplémentaire de l'article).

La diffusion latérale de la syntaxin ne dépend pas de la présence du calcium intracellulaire, à l'échelle de temps de nos expériences.

2.6.2 L'activité synaptique dépend-elle de la diffusion latérale de la syntaxin 1A-pHGFP ?

Lors de l'exocytose, la membrane de la vésicule synaptique est intégrée à la membrane plasmique. Cependant, la composition de la membrane vésiculaire est différente de celle de la membrane plasmique. En particulier, la membrane de la vésicule est dépourvue de syntaxin (Mitchell and Ryan 2004; Takamori et al. 2006). La composition de la membrane plasmique est donc modifiée suite à l'exocytose.

La reconstitution de la composition et de l'organisation de la membrane plasmique pourrait impliquer la diffusion latérale des protéines membranaires telles que la syntaxin (figure 29). Nous avons donc voulu observer si une perturbation de la diffusion latérale de la stxGFP perturbait la réorganisation de la membrane qui suit l'exocytose et donc modifiait la cinétique de libération de FM 4-64 en réponse à une stimulation.

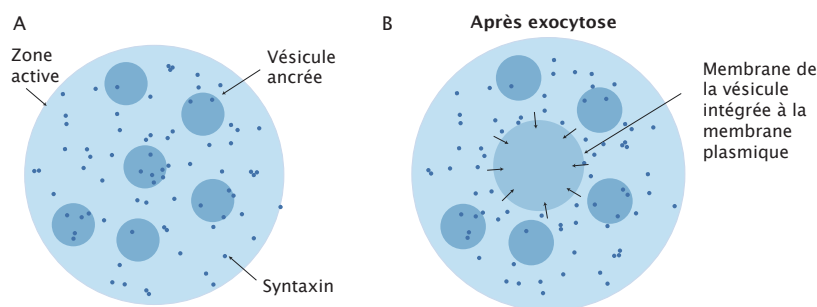


FIGURE 29.: Perturbation de la distribution de la syntaxin après exocytose d'une vésicule. A. Représentation de la distribution des molécules de syntaxin dans la zone active avant l'exocytose. 6 vésicules sont ancrées à la zone active, et près d'une centaine de molécules de syntaxin sont représentées. B. Représentation hypothétique de la distribution des molécules de syntaxin dans la zone active immédiatement après l'exocytose. Le disque bleu de taille intermédiaire correspond à la membrane de la vésicule qui vient de fusionner avec la membrane plasmique. La membrane d'une vésicule synaptique ne contient pas (ou peu) de syntaxin. On s'attend donc à ce qu'après une exocytose, la distribution de la syntaxin à la zone active se trouve modifiée. La diffusion latérale de la syntaxin pourrait être impliquée dans la reorganisation moléculaire de la membrane plasmique (flèches).

Pour limiter la diffusion de stxGFP, nous avons appliqué une solution d'anticorps polyclonaux anti-GFP sur les neurones, pour lier les molécules de stxGFP les unes avec les autres (méthode de *cross-linking*). Nous avons ensuite appliqué une solution dépolarisante de chlorure de potassium pour déclencher des cycles d'exo-endocytose, et mesurer la vitesse de libération du marqueur synaptique FM 4-64. Malheureusement, les

données obtenues n'étaient pas reproductibles, aucun résultat cohérent n'a donc pu être tiré de ces expériences.

VERS LE CHAPITRE SUIVANT

Dans le chapitre suivant, nous proposerons des interprétations à l'ensemble des observations que nous venons de décrire. Nous présenterons les arguments pour un scénario selon lequel la diffusion latérale de la syntaxin (notamment les pauses observées en SPT) reflète des interactions moléculaires qui correspondent à la formation du complexe exocytotique. Nous discuterons également l'approche que nous avons choisie pour cette étude.

Chapitre 3

DISCUSSION

DISCUSSION

Dans un premier temps, je propose de discuter les résultats obtenus et leurs interprétations possibles dans le cadre de la littérature. Ensuite, je m'interrogerai plus généralement sur la possibilité de décrire les processus moléculaires impliqués dans l'assemblage synaptique à partir de l'étude du mouvement diffusif des constituants de l'assemblage.

3.1 LA DIFFUSION LATÉRALE DE LA SYNTAXIN 1A-PHGFP ET LA FORMATION DU COMPLEXE EXOCYTOTIQUE

3.1.1 *Pertinence et limites de l'approche expérimentale*

L'approche expérimentale choisie pour étudier la diffusion latérale de la syntaxin a permis d'obtenir des résultats fiables et cohérents les uns avec les autres, malgré les limites de chaque technique.

3.1.1.1 *Expression de la construction syntaxin 1A-pHGFP*

Dans nos expériences, la stxGFP était distribuée de manière homogène le long de l'axone. Cette distribution était comparable à celle de la syntaxin endogène observée dans nos expériences et à celle décrite dans la littérature (voir section 1.3.3 et Garcia et al. 1995; Hagiwara et al. 2005). La stxGFP était très majoritairement présente dans la membrane plasmique, en accord avec les travaux de Mitchell et Ryan qui avaient estimé la proportion de stxGFP intracellulaire à 13% (Mitchell and Ryan 2004). La transmission synaptique était préservée, et la légère diminution de la vitesse d'exocytose que nous avons observée avait déjà été caractérisée pour cette construction (Mitchell and Ryan 2005).

3.1.1.2 *Analyse du FRAP*

Les limites de l'analyse de FRAP ont déjà été discutées plus haut (section 2.2.1). Dans un premier temps, nous avons analysé les courbes de FRAP de manière qualitative et relative (c'est-à-dire en comparant les différentes conditions). Ensuite, nous avons proposé un modèle computationnel basé sur les données expérimentales de SPT qui nous a permis d'ajuster les courbes expérimentales de FRAP avec des courbes théoriques. Nous pouvons ainsi proposer des interprétations des données observées.

3.1.1.3 *Analyse du SPT*

Dans les expériences de SPT, la présence du marqueur GFP-QD sur l'extrémité extracellulaire de la syntaxin ne devrait en principe pas affecter le mouvement : la viscosité du milieu extracellulaire étant inférieure à la viscosité de la membrane, les caractéristiques du mouvement sont imposées principalement par l'environnement membranaire. En effet, la viscosité de la membrane est 100 à 1000 fois plus élevée que celle du milieu extracellulaire. Le coefficient de diffusion est fonction de l'inverse de la viscosité, et diminue avec le rayon de la particule R selon $1/R$ ou $-\log(R)$ selon les études (Gambin et al. 2006; Saffman and Delbrück 1975, voir section 3.2.3.1). Même si le marqueur avait une taille de 50 nm et que D variait en $1/R$, la mobilité du récepteur ne serait réduite que de 10 % (Triller and Choquet 2008). Dans nos expériences, la mobilité de la stxGFP n'était vraisemblablement pas limitée par la présence du QD dans la mesure ou cette mobilité pouvait être augmentée dans certaines conditions expérimentales (par exemple lorsque SNAP 25 était clivé).

Par ailleurs, contrairement à la méthode de FRAP, la méthode de SPT ne permet de suivre qu'un nombre restreint de protéines. Se pose alors la question de l'échantillonnage : les molécules suivies sont-elles représentatives de la population ? Y a-t-il un biais de marquage des molécules ? Comment quantifier des événements rares comme les pauses ? Bien que nous n'ayons pas de réponse rigoureuse à ces questions, les résultats que nous avons obtenus en SPT étaient qualitativement cohérents avec ceux des expériences de FRAP, et le modèle que nous avons proposé a permis de réconcilier quantitativement les deux approches.

3.1.1.4 *Localisation des synapses*

Le marquage synaptique (FM 4-64 ou gephyrin-mRFP) est potentiellement à l'origine d'une sous-estimation des différences de comportement diffusif entre les régions synaptiques et extrasynaptiques :

- Le fluorophore FM 4-64 marque les vésicules dans la terminaison synaptique, et la gephyrin est une protéine d'échafaudage postsynaptique. Ces deux marqueurs correspondent donc à des régions plus grandes que la zone active.
- En raison de la diffraction, la taille de la région détectée après passage du signal fluorescent dans le système optique est plus large que celle de la région effectivement marquée (la région détectée comme synaptique après traitement de l'image avait finalement un diamètre d'environ 1 μm).
- Dans les expériences de SPT, après filtrage de l'image du marquage synaptique, la taille de la région considérée comme synaptique était élargie de deux pixels.
- Dans les expériences de FRAP, le retour de fluorescence était suivi dans une région d'environ 1 μm .

En résumé, nous pensons que les méthodes que nous avons choisies étaient adaptées pour l'étude de la diffusion latérale de la stxGFP,

même si elles nous conduisent peut-être à sous-estimer les différences de comportement diffusif entre les régions synaptiques et extrasynaptiques. Dans les sections suivantes, nous proposons des interprétations des observations décrites dans le chapitre précédent. En particulier, quelles interactions moléculaires sont impliquées dans la diffusion latérale de la stxGFP ?

3.1.2 *Un mouvement ralenti, confiné et irrégulier aux synapses : encombrement moléculaire et interactions spécifiques*

Ci-dessous nous discutons le contexte moléculaire qui peut sous-tendre les différences de comportement diffusif entre les régions synaptiques et extrasynaptiques. En particulier, nous insisterons sur une des spécificités de la diffusion latérale de la stxGFP, à savoir le contraste entre sa grande mobilité (par rapport à d'autres protéines) et les ralentissements brutaux que constituent les pauses.

3.1.2.1 *Ralentissement et confinement dans les régions synaptiques*

Dans toutes les conditions observées, le retour de fluorescence des expériences de FRAP était plus lent dans les régions synaptiques que dans les régions extrasynaptiques, et les trajectoires synaptiques montraient un mouvement plus lent et plus fréquemment confiné que les trajectoires extrasynaptiques. Ce résultat est comparable au comportement d'autres protéines membranaires synaptiques comme les récepteurs des neurotransmetteurs (Triller and Choquet 2005). De plus, le diamètre de confinement était de l'ordre de 330 nm, un diamètre comparable à celui de la zone active (Siksou et al. 2007).

De manière générale, le ralentissement et le confinement de la diffusion latérale peuvent être dus à un encombrement moléculaire, c'est-à-dire la présence d'obstacles, mobiles ou immobiles, membranaires ou submembranaires (Deverall et al. 2005; Kusumi et al. 1993; Saxton 1994, 1996). La zone active est en effet encombrée, comme en témoignent les densités observées en microscopie électronique (Siksou et al. 2007). Les canaux calciques, les protéines d'adhésion, SNAP 25 et des protéines submembranaires comme Bassoon et Cast/Erc pourraient contribuer à cet encombrement (Dresbach et al. 2001). En particulier, les protéines d'adhésions catenins et cadherins ont été observées à la périphérie de la synapse (Uchida et al. 1996). Une structure comparable a également été observée à la jonction neuromusculaire chez la drosophile (Kittel et al. 2006).

Dans les régions extrasynaptiques, le mouvement diffusif était également plus lent que dans des membranes lipidiques reconstituées (d'un facteur 10, Gambin et al. 2006), et environ 50 % des trajectoires étaient caractérisées comme confinées. La membrane extrasynaptique contient vraisemblablement des protéines à l'origine d'un encombrement moléculaire qui ralentit et confine la syntaxin. La densité d'obstacles est peut-être

moins importante dans la région extrasynaptique que dans la région synaptique, ce qui expliquerait la fraction plus faible de trajectoires confinées.

Selon une autre hypothèse, la structure tubulaire de l'axone d'un diamètre d'environ 1 μm pourrait aussi être à l'origine de ce confinement : dans la direction orthogonale à l'axone, l'espace dans lequel peut diffuser la protéine est limité au diamètre de l'axone, ce qui pourrait résulter en un confinement des trajectoires en 2D (les trajectoires sont en réalité une projection en deux dimensions du mouvement diffusif en trois dimensions sur un tube). La taille de confinement (660 nm) est d'ailleurs de l'ordre de grandeur du diamètre de l'axone (0.5 - 1 μm).

Enfin, si certains de ces obstacles sont des partenaires immobilisés de la syntaxin, la liaison de la syntaxin à ces partenaires devrait réduire encore davantage sa mobilité (Saxton 1996).

3.1.2.2 *Pauses et sites d'interaction*

Les expériences de FRAP ont montré que la stxGFP est échangée entre les régions synaptiques et extrasynaptiques, avec un temps caractéristique particulièrement rapide : quelques secondes, contre quelques minutes pour Munc 13, une protéine cytoplasmique accumulée dans le bouton présynaptique, Kalla et al. 2006. En revanche, à l'échelle de la molécule individuelle, le mouvement de la stxGFP présente des événements où la stxGFP est brutalement et fortement ralenti : les pauses.

FRÉQUENCE ET LOCALISATION Ces pauses étaient plus fréquemment observées aux synapses que dans les régions extrasynaptiques. Se pose alors la question de savoir si les pauses extrasynaptiques sont artefactuelles, ou si elles portent une information concernant les régions extrasynaptiques. En effet, les pauses détectées comme extrasynaptiques pourraient avoir lieu à des sites synaptiques non marqués : (i) dans les neurones de rat, le marquage FM 4-64 ne marque que les synapses actives, ignorant ainsi les synapses silencieuses (Voronin and Cherubini 2003) ou à peine matures ; (ii) dans les neurones de souris KI gephyrin-mRFP, les synapses excitatrices ne sont pas marquées (la gephyrin n'est présente qu'aux synapses inhibitrices, qui représentent 65 % des synapses dans les neurones de moelle épinière en culture, Dumoulin et al. 1999) ; (iii) le traitement de l'image des régions synaptiques (filtrage puis binarisation) peut empêcher la détection de certaines synapses avec un faible signal.

AIRE EXPLORÉE Le diamètre de l'aire explorée par la stxGFP pendant une pause (120 nm) était inférieur à celui de la région synaptique, et comparable à la taille de l'aire explorée par des vésicules ancrées, de l'ordre de 100 nm (Nofal et al. 2007; Westphal et al. 2008). À cette échelle, le bruit de la mesure et les fluctuations de position dues à l'attache du quantum dot à la protéine contribuent probablement à une surestimation du diamètre mesuré.

DURÉE La distribution de la durée des pauses a révélé deux populations, des pauses courtes de l'ordre de quelques secondes, et des pauses longues, de quelques minutes. Ces durées sont cohérentes avec les durées d'ancrage des vésicules mesurées (quelques secondes à quelques minutes, Zenisek et al. 2000; Zhang et al. 2009). Par ailleurs, si une pause reflète une interaction de liaison, la distribution de la durée des pauses pourrait informer sur le type d'interaction en jeu : pour une réaction de liaison simple, la distribution devrait être exponentielle. La durée des pauses courtes ne semble pas suivre une telle distribution suggérant un scénario plus complexe, où plusieurs types d'interaction seraient impliqués. Cependant, le nombre d'événements observé n'était pas suffisant pour distinguer différents scénarios possibles.

Ces observations suggèrent que ces pauses reflètent la participation de la stxGFP à l'ancrage des vésicules, *i.e.* son engagement dans le complexe exocytotique. Comme la syntaxin interagit avec de nombreux constituants du complexe exocytotique, ces pauses pourraient correspondre à différentes étapes de la formation de ce complexe. De plus, si on suppose que les pauses sont liées aux processus d'exocytose, les pauses extrasynaptiques pourraient correspondre à des événements d'exocytose hors des synapses, comme cela a été observé dans d'autres types de neurones (Coggan et al. 2005).

3.1.3 Interactions avec les éléments du complexe exocytotique

L'étude du comportement diffusif des constructions tronquées de la stxGFP, ainsi que de la stxGFP lorsque SNAP 25 est clivé, nous a permis d'émettre certaines hypothèses sur les interactions qui affectent le mouvement de la stxGFP. En particulier, ces interactions sont vraisemblablement liées à la formation du complexe exocytotique.

3.1.3.1 Interactions via le domaine Habc : rôle de Munc 18

Lorsque le domaine Habc de la stxGFP est supprimé (construction snareGFP), le retour de fluorescence aux synapses (en FRAP) est ralenti, et la fréquence des pauses courtes augmentée. Ces données suggèrent que la suppression du domaine Habc permet à la stxGFP de s'engager "plus facilement" dans certaines interactions.

Les protéines Munc 13 et Munc 18 se lient à la syntaxin par son domaine Habc. En particulier, Munc 18 se lie à la syntaxin dans sa conformation fermée (section 1.3.2), conformation dans laquelle le domaine Habc est replié sur le domaine SNARE. La liaison entre la syntaxin et Munc 18 est donc incompatible avec les interactions entre la syntaxin et d'autres molécules via le domaine SNARE (Dulubova et al. 1999; Gerber et al. 2008).

L'augmentation de la fréquence des pauses observée lorsque le domaine Habc est supprimé suggère donc que ces pauses sont dues à des événements de liaisons impliquant le domaine SNARE de la stxGFP.

3.1.3.2 *Interactions via le domaine SNARE*

Lorsque le domaine SNARE est supprimé sur la construction snareGFP (construction tmrGFP), le retour de fluorescence (en FRAP) est plus rapide, le coefficient de diffusion est augmenté et la fréquence des pauses diminuée.

Ces données confirment que les pauses et le ralentissement de la diffusion de la stxGFP aux synapses sont en partie dus à des liaisons de la stxGFP à des partenaires via son domaine SNARE. La plupart des interactions de la syntaxin par le domaine SNARE sont impliquées dans la formation du complexe exocytotique (voir section 1.2.2). En particulier, elles incluent la formation du complexe SNARE avec SNAP 25 et la synaptobrevin (Jahn and Scheller 2006), des interactions avec la synaptotagmin et la complexin (Bowen et al. 2005), ou encore la tomosyn (Ashery et al. 2009).

3.1.3.3 *Interactions via le domaine transmembranaire*

Des pauses ont également été observées pour la construction ne comportant ni le domaine Habc, ni le domaine SNARE, c'est-à-dire constituée presque exclusivement du domaine transmembranaire (construction tmrGFP). Ces pauses étaient cependant moins fréquentes que pour les autres constructions. Si certaines des pauses de la stxGFP correspondent à des événements de liaison qui impliquent le domaine SNARE comme évoqué ci-dessus, d'autres peuvent inclure des événements de liaison qui impliquent uniquement le domaine transmembranaire de la syntaxin. En effet, le domaine transmembranaire de la syntaxin peut se lier avec le domaine transmembranaire d'autres molécules de syntaxin (Laage et al. 2000, Lewis et al. 2001), ou avec le canal calcium (Arien et al. 2003; Bezprozvanny et al. 2000; Trus et al. 2001). Le domaine transmembranaire de la tmrGFP pourrait ainsi par exemple se lier à des molécules de syntaxin endogènes, déjà immobilisées par des interactions via leur domaine SNARE, dans le complexe exocytotique.

3.1.3.4 *Interactions avec SNAP 25*

Le clivage de SNAP 25, partenaire de la syntaxin, a provoqué une légère augmentation du coefficient de diffusion de la stxGFP, une diminution de la durée des pauses courtes et une légère diminution de leur fréquence, ainsi qu'un retour de fluorescence plus rapide en FRAP. Ces résultats indiquent que SNAP 25 est une des molécules qui participent aux pauses de la stxGFP et ralentissent sa diffusion. Ces résultats confortent donc l'hypothèse selon laquelle ces pauses sont en relation avec la formation du complexe exocytotique.

3.1.3.5 *Pauses et formation du complexe exocytotique*

Pour résumer, bien qu'il n'y ait pas de preuve directe et définitive que les pauses correspondent à des événements de liaisons impliqués dans la formation du complexe exocytotique, une série d'arguments abondent dans cette direction.

- Ces pauses ont lieu principalement aux synapses.
- La fréquence des pauses est diminuée en présence du domaine Habc (qui peut "inhiber" la formation du complexe SNARE, Rizo and Südhof 2002; Südhof and Rothman 2009).
- La fréquence des pauses est plus élevée en présence du domaine SNARE.
- La durée des pauses courtes diminue si les interactions avec SNAP 25 sont inhibées.
- La taille de la région explorée par la stxGFP pendant ces pauses est comparable à celle de la région explorée par une vésicule synaptique ancrée à la membrane (Nofal et al. 2007; Westphal et al. 2008).
- Le coefficient de diffusion mesuré est comparable à celui des vésicules ancrées à la membrane (voir paragraphe 1.5.1, Lemke and Klingauf 2005).

Comme suggéré ci-dessus, les pauses de la construction tmrGFP, dépourvue de domaine SNARE, ne sont pas incompatibles avec ce scénario. L'oligomérisation des complexes SNARE (section 1.2.2.7; Lu et al. 2008; Montecucco et al. 2005) et la formation du complexe exocytotique impliquent vraisemblablement des interactions par les domaines transmembranaires des protéines, notamment de la syntaxin et des canaux calciques.

Nous pensons donc que les pauses correspondent à différentes étapes de la formation du complexe exocytotique, incluant des interactions transmembranaires (figure 30).

3.1.3.6 *Organisation de la syntaxin en clusters*

Comme mentionné dans la section 1.3.3, il est possible que la syntaxin s'organise en clusters (Sieber et al. 2007). Une autre interprétation des pauses serait alors qu'elles correspondent à l'engagement de la syntaxin dans ces clusters. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de clusters, mais la résolution de la microscopie de fluorescence est limitée par la diffraction. De plus, ces clusters pourraient inclure non seulement des protéines de syntaxin, mais également les protéines membranaires SNAP 25 et les canaux calciques, qui sont des constituants du complexe exocytotique. Le scénario que nous avons proposé ci-dessus n'est donc pas incompatible avec l'existence de clusters de syntaxin.

3.1.4 Cinétiques d'interactions : modèle de la diffusion latérale de la syntaxin 1A-pHGFP

Le modèle computationnel que nous avons proposé pour décrire la diffusion de la stxGFP est basé sur les données de SPT et de la littérature. En ajustant le retour de fluorescence simulé à partir de ce modèle sur les courbes de FRAP expérimentales, nous avons pu obtenir des paramètres cinétiques décrivant les interactions dans lesquelles la stxGFP est engagée. Ces paramètres ne pouvaient être obtenus uniquement à partir des méthodes de SPT ou de FRAP prises indépendamment.

3.1.4.1 Un modèle basé sur les données expérimentales et la littérature

Le modèle que nous avons proposé décrit la diffusion latérale de la syntaxin comme résultant de la diffusion libre, et de deux réactions de liaisons à des partenaires immobiles :



Ces réactions ont deux temps caractéristiques différents (s et min) et sont couplées. Ce modèle décrit la formation du complexe exocytotique en s'appuyant sur les données de SPT (notamment les pauses) et en accord avec la littérature (M_1 constituerait le complexe accepteur, voir section 1.2.1.2 ; de Wit et al. 2009; Weninger et al. 2008; Zilly et al. 2006).

3.1.4.2 Affinités des interactions

Pour caractériser les interactions, nous avons d'abord considéré sur la constante d'affinité (k_{on}/k_{off}) obtenue lors de l'ajustement des courbes. De manière générale, les constantes d'affinité obtenues étaient plus élevées dans les régions synaptiques que dans les régions extrasynaptiques, ce qui indique que les réactions sont plus fréquentes et/ou plus fortes dans les régions synaptiques que dans les régions extrasynaptiques.

Tout d'abord, dans les régions synaptiques, la suppression du domaine N-terminal s'est traduite par une augmentation de la constante d'affinité de la première réaction. En accord avec les interprétations des données de SPT présentées ci-dessus, cela suggère que la présence du domaine Habc inhibe certaines interactions, potentiellement par son interaction avec Munc 18. La constante d'affinité de la deuxième réaction n'était pas affectée, ce qui suggère que cette réaction ne dépend pas de Munc 18.

La suppression du domaine SNARE réduit les constantes d'équilibre des deux réactions aux synapses, suggérant que les interactions via le domaine SNARE sont impliquées dans les deux réactions.

Enfin, lorsque SNAP 25 est clivé par la toxine botulique BoNT/E, le modèle estime que la constante d'affinité de la seconde réaction est diminuée, suggérant que les interactions longues sont déstabilisées en l'absence de SNAP 25. Ce résultat est cohérent avec l'implication de SNAP 25

dans le complexe exocytotique. Par ailleurs, la constante d'affinité de la première réaction n'était pas affectée dans ces conditions. Ce résultat peut paraître surprenant, puisqu'il indiquerait que l'interaction entre syntaxin et SNAP 25 n'intervient pas dans la formation du complexe accepteur (première réaction). Cependant, d'autres protéines comme la synaptotagmin, Munc13 et Munc18 peuvent participer à ce complexe accepteur (voir section 1.2.1.2 et de Wit et al. 2009; Weninger et al. 2008; Zilly et al. 2006). Ces protéines pourraient éventuellement compenser l'absence de SNAP 25 dans cette première réaction. D'ailleurs, bien que la constante d'affinité de la première réaction reste inchangée, les constantes d'association et de dissociation de cette réaction sont modifiées (le taux de dissociation mesuré expérimentalement est plus faible mais il est compensé par un taux d'association plus élevé).

3.1.4.3 *Fréquence des pauses*

Le taux d'association de la première réaction estimé par le modèle s'est révélé plus élevé que la fréquence des pauses courtes observées expérimentalement. Comme suggéré plus haut, la fréquence des pauses mesurée en SPT peut être sous-estimée pour plusieurs raisons : (i) les pauses d'une durée inférieure à 1 s n'étaient pas identifiées, ou (ii) les molécules de stxGFP marquées par les QDs peuvent ne pas être représentatives de la population, ou (iii) le temps de résidence synaptique peut être surestimé si la taille du marquage synaptique est elle-même surestimée. Concernant le biais de marquage, par exemple, si les pauses coïncident avec l'entrée de la syntaxin dans un cluster de protéines (comme suggéré plus haut), on peut imaginer que les molécules de stxGFP marquées par des QDs aient davantage de difficulté à s'engager dans ce cluster à cause de l'encombrement stérique.

Par ailleurs, dans les cellules neuroendocrines, où la syntaxin forme des clusters, la diffusion latérale de la syntaxin a été modélisée comme résultant uniquement de la diffusion libre et des interactions homologues entre molécules de syntaxin (Sieber et al. 2007). Le taux d'association de cette réaction de liaison homologue était estimé à $25\,000\text{ s}^{-1}$, mais la comparaison avec nos résultats est délicate puisque l'organisation de la membrane et le mécanisme d'exocytose diffèrent entre les cellules neuroendocrines et les neurones.

Enfin, nous n'avons pas estimé rigoureusement et quantitativement la sensibilité du modèle aux paramètres. Celle-ci est illustrée qualitativement par le fait qu'un changement de la constante d'association de la première réaction par un facteur 2 provoque une modification non négligeable de la courbe de FRAP (figure 28).

En conclusion, comme illustré sur la figure 30, le comportement diffusif reflète vraisemblablement des interactions impliquées dans la formation du complexe exocytotique. La syntaxin pourrait être immobilisée dans des clusters de protéines membranaires incluant SNAP 25 et le canal calcique avec un temps caractéristique relativement court (s), puis

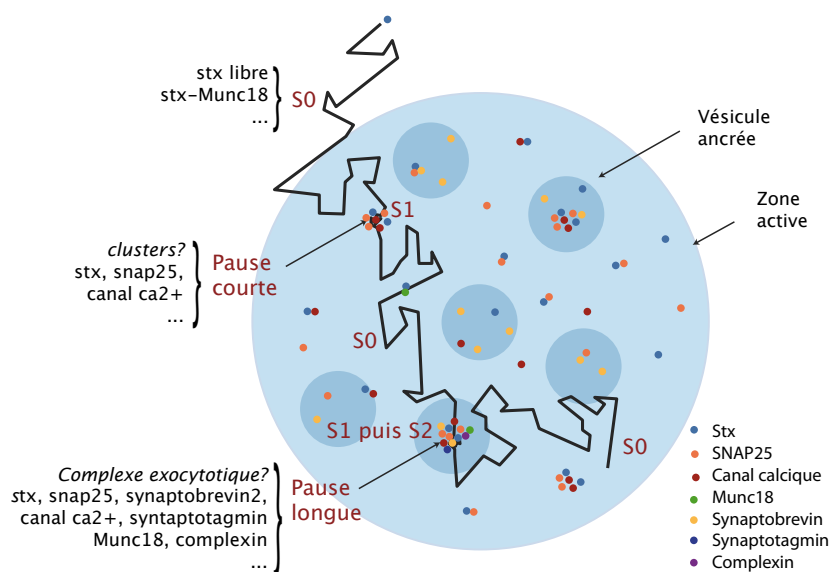


FIGURE 30.: Exemple de scénario moléculaire de la diffusion latérale de la syntaxin. Les notations S_0 , S_1 et S_2 correspondent aux différents états de liaison de la syntaxin décrits dans le modèle. La syntaxin libre (S_0) pourrait être immobilisée par des interactions “courtes” avec des protéines membranaires et former le complexe S_1 , puis s’engager dans le complexe exocytotique S_2 pour une durée plus longue. La densité des protéines représentées sur ce schéma n’est pas réaliste, et les protéines cytoplasmiques participant au complexe exocytotique ne sont représentées que sur la trace dessinée.

dans un complexe exocytotique associé à une vésicule synaptique ancrée à la membrane plasmique avec un temps caractéristique plus long (min). Etant donné la diversité des interactions dans laquelle la syntaxin est impliquée, ce scénario recouvre vraisemblablement un ensemble de situations intermédiaires. Cependant, les données expérimentales et le modèle suggèrent que l’ensemble de ces réactions peut dans un premier temps être décrit par deux étapes.

3.1.5 Diffusion latérale de la syntaxin 1A-pHGFP et activité synaptique

L’étude de la relation entre la diffusion latérale de la stxGFP et l’activité synaptique s’est révélée difficile. Les résultats obtenus suggèrent soit que la diffusion latérale de la stxGFP est robuste face aux changements d’activité synaptique, soit que les méthodes que nous avons utilisées n’étaient pas appropriées pour observer les changements de comportement diffusif de la stxGFP.

3.1.5.1 *Activité de l'ensemble des neurones*

La chélation du calcium intracellulaire n'a provoqué aucune modification de la diffusion de stxGFP (observée en FRAP). De la même manière, aucun effet de la 4-aminopyridine (4AP, antagoniste des canaux potassiques) ou de la tetrodotoxin (TTX, antagoniste des canaux sodiques) — qui respectivement augmentent et diminuent le niveau global d'activité des neurones en culture — n'a été observé en SPT.

Nous ne pouvons pas conclure que la diffusion de la syntaxin ne dépend pas de l'activité synaptique. Nous pouvons seulement affirmer que ces modifications globales de l'activité des neurones n'affectent pas la diffusion latérale de la syntaxin à l'échelle de temps de nos observations. Dans les conditions où l'activité synaptique est réduite (TTX ou chélation du calcium), il est possible qu'à l'échelle de temps d'une heure, si l'exocytose est perturbée, l'ancrage des vésicules et la formation du complexe exocytotique ne soient pas altérés. La diffusion latérale de la stxGFP pourrait donc rester inchangée. Dans les conditions où l'activité synaptique est augmentée (4AP), sachant que la proportion de molécules de stxGFP impliquées dans le complexe exocytotique est probablement faible (les pauses observées en SPT sont relativement rares), la proportion de molécules de syntaxin impliquées dans la fusion d'une vésicule au moment de l'observation est vraisemblablement également très faible. Il est donc possible que la proportion des molécules de stxGFP dont le mouvement est altéré par une augmentation de la fréquence d'exocytose soit trop faible pour être détectée avec nos méthodes.

Enfin, il est à noter que contrairement aux récepteurs des neurotransmetteurs, la syntaxin n'est pas accumulée aux synapses, et rien n'indique que sa distribution ou son mouvement dépendent du niveau d'activité des neurones comme c'est le cas pour les récepteurs des neurotransmetteurs (Bannai et al. 2009; Lévi et al. 2008).

3.1.5.2 *Exocytose et réorganisation de la membrane*

Nous avons également posé la question de l'incidence de la diffusion latérale de la syntaxin sur la vitesse d'exocytose. En effet, nous avons suggéré que la diffusion latérale de la syntaxin pourrait participer à la réorganisation de la membrane plasmique qui suit l'exocytose.

Les expériences de *cross-linking* visant à observer l'effet d'une réduction de la mobilité de la syntaxin sur la cinétique d'exocytose n'ont pas été concluives. Les conditions de *cross-linking* étaient peut-être trop différentes d'une expérience sur l'autre, bien que la quantité d'anticorps et la durée de l'incubation étaient constantes, et provoquaient la formation de clusters dans la membrane. De plus, cette méthode permet d'aggréger les molécules de stxGFP, mais les molécules de syntaxin endogènes restent libres de diffuser dans la membrane, et peuvent être suffisantes pour assurer la réorganisation de la membrane au rythme d'exocytose imposé.

Par ailleurs, une approche théorique peut apporter un élément de réponse à la question que nous avons posée. Si on définit une région circulaire avec un diamètre donné d (la surface de la vésicule fusionnée), et que l'on considère une molécule (la syntaxin) absente de cette région dans les conditions initiales et ayant un coefficient de diffusion donné D , il est possible de calculer la concentration des molécules dans cette région en fonction du temps t (Heine et al. 2008). L'expression utilisée est la suivante :

$$\eta(t) = 1 - \left(\frac{\sqrt{4Dt}}{d} \int_0^{\frac{d}{\sqrt{4Dt}}} \text{Erf}(x) dx \right)^2 \quad (3.3)$$

où Erf est la fonction d'erreur de Gauss, et η est le ratio de la concentration en molécules à l'instant t et de la concentration à l'équilibre (*i.e.* la fraction de la concentration à l'équilibre). Lors de l'exocytose, la surface de membrane vésiculaire (dépourvue de syntaxin) intégrée à la membrane plasmique est un disque de rayon 25 nm, et le coefficient de diffusion de la syntaxin de l'ordre de $0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Le temps nécessaire pour retrouver la moitié de la concentration initiale peut être estimé à environ 2 ms correspondant à une fréquence limite de 500 Hz. D'après ce modèle, la rapidité de la diffusion latérale de la syntaxin permettrait d'assurer une fréquence d'exocytose élevée.

En résumé, si nos méthodes d'observation sont adaptées à cette étude, la diffusion latérale de la syntaxin est robuste aux changements d'activité synaptique que nous avons étudiés. De plus, des considérations théoriques suggèrent que la diffusion latérale de la syntaxin est suffisamment rapide pour que la réorganisation de la composition de la membrane ne soit pas limitante pour la fréquence d'exocytose.

PREMIÈRE CONCLUSION

En conclusion, nous avons montré que la diffusion latérale de la stxGFP présente des phases de diffusion rapide et des périodes d'immobilisation qui correspondent vraisemblablement à son engagement dans le complexe exocytotique. En particulier, ces périodes d'immobilisation transitoire impliquent des liaisons locales, via le domaine SNARE de la stxGFP, dont la liaison avec SNAP 25. Ce scénario demande à être raffiné par une étude spécifique de chacune des liaisons en jeu. On peut cependant s'attendre à ce qu'il soit difficile de trouver une condition dans laquelle la formation du complexe exocytotique est totalement abolie : ni l'absence de SNAP 25 ni celle de synaptobrevin 2 n'empêche complètement l'exocytose (Schoch et al. 2001; Washbourne et al. 2002). Enfin, la combinaison des deux méthodes complémentaires que sont le FRAP et le SPT nous a permis de mieux caractériser la cinétique des interactions impliquées dans la formation du complexe exocytotique. Le fait que la diffusion latérale de la syntaxin soit rapide mais présente des périodes d'immobilisation est compatible avec d'une part une dynamique mem-

branaire importante et d'autre part son engagement dans l'ancrage des vésicules.

Bien que les résultats que nous avons obtenus montrent que la diffusion latérale de la syntaxin reflète la formation du complexe exocytotique et qu'ils permettent de caractériser la cinétique globale des interactions en jeu, ils ne permettent pas de proposer un scénario moléculaire précis et unique. La description que nous pouvons finalement proposer est donc un intermédiaire entre une description uniquement phénoménologique et une description "moléculaire/mécanistique". On peut alors se demander dans quelle mesure les paramètres descriptifs que nous avons choisis peuvent nous permettre de faire des interprétations en termes de mécanisme.

3.2 DE LA DIFFUSION LATÉRALE AUX PROCESSUS MOLÉCULAIRES

Dans cette section, je propose de partager mes réflexions sur la façon dont nous avons formulé la problématique, sur la possibilité de proposer des interprétations de nos données en termes de processus moléculaires avec l'approche que nous avons choisie, ainsi que sur le choix des niveaux de description auxquels se placer.

3.2.1 Redéfinition des termes de la problématique

En introduction, nous avons défini la problématique comme suit : quelles sont les spécificités et les implications de la diffusion latérale de la syntaxin pour la transmission synaptique ?

Dans cette formulation, les expressions *diffusion latérale* et *transmission synaptique* ne sont pas définies précisément. Dans le but de reformuler la problématique et à la lumière du travail réalisé, je propose d'abord de préciser ce qu'on entend par diffusion latérale et transmission synaptique.

3.2.1.1 Qu'entend-on par diffusion latérale d'une protéine ?

L'expression *diffusion latérale* fait d'abord référence à un changement de position en fonction du temps. Il s'agit ici du mouvement de protéines dans une membrane cellulaire.

Comme décrit dans la section 1.4, la diffusion latérale d'une protéine dans une membrane cellulaire résulte de trois processus¹ : (i) une diffusion "libre" (brownienne) induite par les chocs des lipides, (ii) des interactions avec des protéines membranaires ou submembranaires qui constituent des obstacles et (iii) des liaisons avec des protéines "partenaires".

L'expression *diffusion latérale* de la problématique pouvait faire référence au mouvement diffusif "dans son ensemble" (tel qu'il est caractérisé par des paramètres descriptifs comme le coefficient de diffusion) ou aux

1. Nous ne considérons pas ici les processus actifs.

processus moléculaires qui le sous-tendent. Dans la suite, l'expression *diffusion latérale* désignera le mouvement diffusif "dans son ensemble", en opposition aux processus moléculaires en jeu.

3.2.1.2 *Qu'entend-on par transmission synaptique ?*

Dans notre problématique, l'expression *transmission synaptique* ne fait pas seulement référence à l'événement même de transmission synaptique (qui dure 1 ms), mais plus largement au contexte dans lequel la transmission synaptique a lieu, aux propriétés fonctionnelles de l'assemblage synaptique. Ces processus liés à la transmission synaptique peuvent être décrits à différentes échelles de temps :

- à l'état stationnaire, la synapse peut par exemple être caractérisée par le nombre de protéines (de chaque type), leur répartition, leur état biochimique (phosphorylation, conformation...) (Sheng and Hoogenraad 2007) ;
- à l'échelle de temps d'un potentiel d'action (processus dynamique "rapide", environ 1 ms), la transmission synaptique peut être caractérisée par sa durée, la probabilité de libération, la cinétique de libération, le mode d'exocytose, l'amplitude de la réponse postsynaptique (Hanse and Gustafsson 2001) ;
- à l'échelle de quelques potentiels d'action (processus dynamique "intermédiaire", de l'ordre de quelques secondes), on peut quantifier l'information reçue par le neurone post-synaptique, l'amplitude de la réponse postsynaptique, la cinétique de désensibilisation/resensibilisation (Zucker and Regehr 2002) ;
- à plus long terme (processus dynamique "lent"), on peut décrire l'évolution des propriétés de la synapse au cours du temps (heures, jours, ...), la stabilité ou la plasticité des caractéristiques de la transmission (Feldman 2009).

3.2.1.3 *Reformulations*

La question de la place de la diffusion latérale des protéines membranaires dans la transmission synaptique peut donc être précisée en plusieurs sous-questions. On peut étudier les relations entre chacun des aspects de la transmission synaptique (présentés ci-dessus) et (i) la diffusion latérale décrite par un ensemble de paramètres ou (ii) les processus moléculaires qui sous-tendent la diffusion latérale.

Comme nous le verrons plus loin, ces deux approches, qui correspondent à des niveaux de description différents, sont vraisemblablement complémentaires. Concernant la seconde approche, je pose la question suivante : dans quelle mesure l'étude de la diffusion latérale permet-elle de caractériser les processus moléculaires qui la sous-tendent ? Dans les sections suivantes, je présenterai d'abord différents paramètres qui permettent de décrire la diffusion latérale, puis comment ces paramètres dépendent des processus moléculaires en jeu (diffusion libre, obstacles, liaisons). Ensuite, dans le cadre de l'assemblage synaptique, je discuterai la

relation entre ces processus moléculaires, la diffusion latérale et certaines propriétés de la transmission synaptique.

3.2.2 Quels paramètres pour décrire la diffusion latérale ?

Dans cette section, je présente de manière non exhaustive différentes méthodes pour décrire la diffusion latérale.

3.2.2.1 Type de mouvement — déplacement quadratique moyen

MOUVEMENT BROWNIEN Comme décrit plus haut, dans le cas d'un mouvement brownien ("diffusion normale"), le déplacement quadratique moyen est linéaire en fonction du temps (Einstein 1905; Perrin 1909; Saxton 2007).

$$\langle r(t)^2 \rangle \propto t \quad (3.4)$$

DIFFUSION ANOMALE Dans le cas de la diffusion anormale pure, le MSD suit une loi de puissance (Saxton 1994) :

$$\langle r(t)^2 \rangle \propto t^\alpha, \alpha \neq 1 \quad (3.5)$$

DIFFUSION ANOMALE TRANSITOIRE Dans certains cas, la diffusion est anormale de manière transitoire : elle est anormale aux temps courts, et brownienne aux temps longs. Soit t_{CR} le temps caractéristique (de "croisement") à partir duquel la diffusion devient brownienne (Saxton 1994) :

$$\langle r(t)^2 \rangle \propto t^\alpha, \alpha < 1 \text{ pour } t \ll t_{CR} \quad (3.6)$$

$$\langle r(t)^2 \rangle \propto t \text{ pour } t \gg t_{CR} \quad (3.7)$$

En utilisant une représentation logarithmique, $\log(\langle r^2 \rangle / t)$ vs $\log(t)$, il est possible d'identifier une distance caractéristique qui correspond au changement de comportement diffusif :

$$\log\left(\frac{\langle r(t)^2 \rangle}{t}\right) = (\alpha - 1)\log(t) + \text{cte}, \alpha < 1 \text{ pour } t \ll t_{CR} \quad (3.8)$$

$$\log\left(\frac{\langle r(t)^2 \rangle}{t}\right) = \text{cte}' \text{ pour } t \gg t_{CR} \quad (3.9)$$

où cte et cte' sont des constantes. Cette approche permet d'identifier deux paramètres : α à partir de la pente initiale de cette courbe, et le temps caractéristique t_{CR} à partir du changement de pente de la courbe.

"**CONFINEMENT**" Dans notre étude, le terme *confinement* correspond à un mouvement subdiffusif, et est caractérisé sur la base du travail de Kusumi (Kusumi et al. 1993).

Comme décrit dans la section 2.2.3.4, le mouvement est d'abord caractérisé par le paramètre de déviation relative : À t donné,

$$RD(t) = \frac{MSD_{mes}(t)}{MSD_{libre}(t)} \quad (3.10)$$

où MSD_{mes} est la MSD mesurée et MSD_{libre} est calculée en faisant l'hypothèse d'un mouvement brownien avec le coefficient de diffusion D_0 mesuré sur la portion initiale de la courbe : $MSD_{libre} = 4D_0t$.

Si le RD indique un mouvement subdiffusif, le mouvement peut être caractérisé par une longueur caractéristique L en ajustant l'expression suivante sur la MSD expérimentale :

$$MSD(t) = \frac{L^2}{3} \left(1 - \exp\left(\frac{-12D_0t}{L^2}\right) \right) \quad (3.11)$$

3.2.2.2 Type de mouvement — méthode des moments

Une autre approche consiste à prendre en compte l'ensemble des moments (Ferrari et al. 2001; Sbalzarini 2006).

Le moment d'ordre p de la distance parcourue $\|\mathbf{x}(t)\|$ en un temps t s'écrit :

$$\mu_p = \langle \|\mathbf{x}(t)\|^p \rangle \quad (3.12)$$

Chaque moment suit une loi de puissance :

$$\mu_p \propto t^{\gamma(p)} \quad (3.13)$$

Le paramètre $\beta = d\gamma(p)/dp$ est alors introduit pour caractériser le processus de diffusion : pour un mouvement brownien, β est constant quelque soit p et égal à 0.5 ; les processus subdiffusifs sont caractérisés par $\beta < 0.5$ et les processus super-diffusifs par $\beta > 0.5$.

La figure 31 illustre cette méthode. Le paramètre β est calculé sur une fenêtre glissante le long d'une trajectoire, indiquant le type de mouvement en fonction du temps.

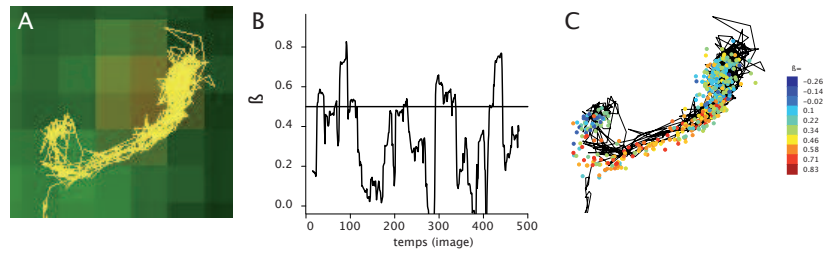


FIGURE 31.: Type de mouvement et analyse des moments. A. Trajectoire d'une protéine de fusion GFP ancrée dans la membrane (par une ancre GPI - glycosylphosphatidylinositol), couplée à un QD, sur une épine dendritique de neurone d'hippocampe (données de L. Henekine). Rouge : région synaptique. B. Paramètre β calculé sur une fenêtre glissante de 15 images, en fonction du temps. Un mouvement brownien est caractérisé par $\beta = 0.5$ (ligne horizontale). C. Valeurs de β localisées sur la trajectoire. Dans la tête de l'épine (région synaptique), le mouvement est subdiffusif; dans le "cou" de l'épine, le mouvement est brownien ou surdiffusif.

3.2.2.3 Coefficient de diffusion — déplacement quadratique moyen

Le coefficient de diffusion permet également de caractériser un mouvement. Cependant, il peut dépendre du temps.

Comme décrit précédemment, dans le cas d'un mouvement brownien (à deux dimensions),

$$\langle r(t)^2 \rangle = 4Dt \quad (3.14)$$

La MSD est linéaire en fonction du temps et le coefficient de diffusion D est constant et proportionnel à la pente de la MSD.

En revanche, dans le cas d'une diffusion anormale, le coefficient de diffusion défini comme $\langle r(t)^2 \rangle / t$ est dépendant du temps (Saxton 1989) :

$$D(t) \propto 1/t^{1-\alpha} \quad (3.15)$$

en corrigeant pour la limite $t \rightarrow 0$ selon $D(t) = \frac{D_0}{1+t^{1-\alpha}}$.

Par exemple, lorsqu'on regarde le mouvement sur des distances courtes (devant l'espacement caractéristique des obstacles), la diffusion peut paraître rapide, car elle n'est pas encore entravée par les obstacles, alors que sur des distances plus longues, la diffusion est entravée et peut paraître plus lente (Saxton 1989, 1993).

3.2.2.4 Densité de probabilité des déplacements

Une autre approche pour décrire un mouvement diffusif consiste à estimer la fonction densité de probabilité des déplacements. Comme indiqué précédemment (section 2.2.3), dans le cas du mouvement brownien à deux dimensions, avec un coefficient de diffusion D , la densité de probabilité de la distance parcourue r en un temps t s'écrit :

$$f(r, t) = \frac{1}{4\pi Dt} \exp\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right) 2\pi r \quad (3.16)$$

D'un point de vue expérimental, cette distribution de probabilité peut être estimée par un histogramme de la fréquence des déplacements à un instant t . Un ajustement de l'histogramme ainsi obtenu avec l'expression de la densité de probabilité ci-dessus permet de déterminer le coefficient de diffusion D . Si l'histogramme ne peut être ajusté par cette expression, cela indique que le mouvement observé recouvre des populations ayant des coefficients de diffusion différents (auquel cas l'histogramme peut être ajusté avec une somme de fonctions exponentielles) ou que la diffusion est anormale (Deverall et al. 2005; Kues et al. 2001; Schütz et al. 1997).

3.2.2.5 Temps de résidence dans une région donnée

Une dernière approche pour caractériser le mouvement diffusif d'une particule consiste à mesurer le temps qu'elle passe dans une région donnée. Cette approche est particulièrement adaptée si l'environnement dans lequel diffuse la particule est structuré en régions, comme c'est le cas par exemple dans notre étude pour les régions synaptiques et extrasynaptiques.

ENVIRONNEMENT HOMOGÈNE On peut définir arbitrairement une région et calculer ou mesurer le temps T passé dans cette région. Ensuite, ce temps T peut être comparé par exemple au temps T' passé dans une autre région, ou au temps T_{br} que l'on attendrait pour un mouvement brownien dans cette même région (avec un coefficient de diffusion donné). En effet, la probabilité qu'une particule avec un mouvement brownien reste dans une région de rayon R pour un temps supérieur à t a été calculée (Saxton 1993); elle dépend en particulier du coefficient de diffusion et du type de diffusion (brownienne, anormale). Ainsi, si le terme *confinement* désigne le comportement d'une particule qui passe plus de temps dans une région donnée que si elle avait un simple mouvement brownien, le ratio entre le temps de résidence mesuré et le temps de résidence attendu pour un mouvement brownien T/T_{br} peut donner une estimation de la "intensité" du confinement.

ENVIRONNEMENT STRUCTURÉ L'espace dans lequel diffuse la particule peut également être structuré, organisé en régions aux propriétés différentes, en raison par exemple d'une répartition particulière d'obstacles dans la membrane. Dans le cas de notre étude, deux types de régions sont distingués dans la membrane plasmique, les régions synaptiques et extrasynaptiques.

La comparaison entre la durée des périodes passées dans chaque région T_1 et T_2 peut permettre de comparer les comportements diffusifs dans les deux régions ainsi que les propriétés de ces régions. Comme détaillé plus bas, le temps passé dans une région donnée dépend notamment de la taille de la région, des propriétés de diffusion dans cette région ainsi que de la perméabilité de la limite de cette région, *i.e.* de la probabilité de sortir de la région.

N.B. : la mesure du temps de résidence dans une région peut être délicate dans la mesure où elle dépend de la résolution spatiale des méthodes d'observation utilisées, à la fois pour localiser la région en question et la position de la particule par rapport à cette région.

3.2.3 Comment les paramètres descriptifs du mouvement résultent-ils des processus moléculaires ?

Les relations entre les paramètres présentés ci-dessus pour décrire la diffusion latérale de particules et les processus moléculaires qui sous-tendent la diffusion ne sont pas toujours rigoureusement explicitées. Ci-

dessous, je mentionne quelques résultats expérimentaux et théoriques de la littérature. J'indique également quelques questions auxquelles je n'ai pas trouvé de réponse. Ces résultats sont résumés dans la table 2.

3.2.3.1 *Diffusion libre et taille de la particule*

Le coefficient de diffusion d'un mouvement "libre" (brownien, sans obstacles ni liaisons) dépend de la taille de la particule, et de la viscosité du milieu, mais la relation entre taille et coefficient de diffusion n'est pas encore clairement établie.

D'après le modèle hydrodynamique de Saffman et Delbrück (Saffman and Delbrück 1975), si la particule qui diffuse dans la membrane est modélisée par un cylindre de rayon R , le coefficient de diffusion de la particule est fonction de $-\log(R)$. Cette faible dépendance rendrait difficile l'estimation de la taille de la particule à partir de son coefficient de diffusion.

Cependant, des mesures récentes des coefficients de diffusion de protéines de différentes tailles dans des bicouches lipidiques suggèrent que le coefficient de diffusion varie avec $1/R$ (Gambin et al. 2006). Une telle dépendance permettrait d'estimer la taille des protéines qui diffusent à partir de leur coefficient de diffusion, et notamment d'estimer le degré d'oligomérisation de ces protéines.

3.2.3.2 *Effet des obstacles sur le mouvement diffusif*

Dans les membranes biologiques, la concentration en protéines varie entre 20 wt% et 70 wt% (Blackwell and Whitmarsh 1990), et la surface occupée par les protéines est en moyenne de l'ordre d'un quart de la surface totale (Grasberger et al. 1986). Les obstacles sont caractérisés par leur taille, leur concentration, et éventuellement une répartition particulière. Leur mobilité dépend de leur taille comme décrit au paragraphe précédent, mais ils peuvent être immobiles s'ils sont ancrés à une structure submembranaire par exemple. Les études de la mobilité de protéines (ou des lipides) en présence d'obstacles qui sont mentionnées ci-dessous considèrent que les obstacles sont répartis de manière homogène (à la différence de quelques autres modèles, par exemple Jr. et al. 2007). Les modèles développés sont soit numériques (notamment des simulations de Monte Carlo²), soit analytiques.

OBSTACLES MOBILES. Quelques études expérimentales ont d'abord décrit la diffusion de lipides ou de protéines dans des liposomes en fonction de la concentration en protéines (mobiles) (Blackwell

2. Dans la suite, plusieurs articles de Saxton seront cités. En effet, Saxton a publié une série d'articles intitulée *Lateral diffusion in an archipelago* dans lesquels il décrit la diffusion latérale dans différentes situations d'obstacles et de sites de liaisons, en réalisant des simulations de Monte Carlo. Les résultats des simulations apportent des informations sur la diffusion latérale dans ces conditions, mais les hypothèses de ces simulations sont parfois limitées, comme décrit dans le texte.

and Whitmarsh 1990; Peters and Cherry 1982; Tank et al. 1982; Vaz et al. 1984). Les premières expériences ont qualitativement montré que le coefficient de diffusion diminue quand la concentration en protéines augmente.

Un peu plus tard, une étude systématique de la diffusion latérale de la plastoquinone — une co-enzyme contenant une longue chaîne carbonée insérée dans la membrane, $C_{53}H_{80}O_2$) — en fonction de la concentration de différentes protéines a été réalisée dans des liposomes (Blackwell and Whitmarsh 1990). Le coefficient de diffusion mesuré en absence de protéines est de l'ordre de $2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ soit $20 \mu\text{m}^2/\text{s}$. En revanche, lorsque les protéines occupent 16 à 26 % de la surface, le coefficient de diffusion est diminué d'un facteur 10. Dans ces expériences, le coefficient de diffusion diminue de manière exponentielle avec le ratio molaire protéine/lipide.

En revanche, le type de mouvement (brownien ou anomal) de protéines dans les membranes en présence d'obstacles mobiles ne semble pas faire l'objet d'un consensus du point de vue expérimental (Dix and Verkman 2008).

D'après des simulations (Saxton 1987), en présence d'obstacles mobiles le coefficient de diffusion (aux temps longs) diminue quand la concentration d'obstacles augmente, et cette diminution est ajustée une expression polynomiale obtenue analytiquement (van Beijeren H and Kutner 1985). Par ailleurs, dans ces simulations, la diffusion d'une particule est anormale de manière transitoire. Cependant, les modèles sous-estiment l'effet des obstacles sur la diffusion tel qu'il est observé expérimentalement (Blackwell and Whitmarsh 1990). Seul le cas de la gramicidin (la plus petite protéine étudiée dans ce travail expérimental) est correctement prédit par les modèles (sauf par les simulations de Monte Carlo).

On peut noter que dans ces simulations, les obstacles sont décrits uniquement comme des sphères à coeur dur, n'interagissant d'aucune manière avec les molécules environnantes (il n'y a qu'un effet de volume exclu). D'autres modèles préfèrent décrire ces obstacles comme ayant également des interactions électrostatiques et hydrodynamiques avec l'environnement (Abney et al. 1989).

OBSTACLES IMMOBILES. Certaines protéines membranaires peuvent être immobilisées, par exemple par un ancrage au cytosquelette submembranaire. Plusieurs approches indiquent que l'effet des obstacles immobiles sur la diffusion latérale des protéines est différent de celui des obstacles mobiles. De plus, lorsque les obstacles sont immobiles, il existe une concentration limite d'obstacles, au-delà de laquelle un amas de taille infinie apparaît : il s'agit du seuil de percolation. Les particules ne peuvent alors plus diffuser sur des longues distances.

La diffusion de lipides et protéines a été étudiée dans des membranes synthétiques dans lesquels certains lipides sont immobi-

lisés, constituant ainsi des obstacles immobiles (Deverall et al. 2005).

- Lorsque la concentration d'obstacles augmente, la distribution des déplacements pendant un intervalle de temps donné, est modifiée : elle n'est plus ajustée par une exponentielle et est décalée vers les petits déplacements. Ceci indique vraisemblablement que la diffusion en présence d'obstacles est anormale transitoire, et que le temps de croisement t_{CR} entre une diffusion brownienne et anormale augmente quand la concentration d'obstacles augmente.
- Le coefficient de diffusion mesuré (aux temps longs) diminue linéairement avec la concentration d'obstacles. Il devient nul lorsque la concentration d'obstacles atteint le seuil de percolation.

Par ailleurs, les simulations indiquent que pour une concentration d'obstacles inférieure au seuil de percolation, la diffusion est anormale de manière transitoire (Jr. et al. 2007; Saxton 1994). Les relations entre la concentration d'obstacles C et les paramètres descriptifs du mouvement, obtenues par différents modèles, sont les suivantes :

- D'après des simulations, le coefficient de diffusion aux temps longs diminue linéairement avec la concentration d'obstacles (Saxton 1994). D'après un modèle analytique, le coefficient de diffusion diminue avec C selon une fonction polynomiale de degré 2 (Almeida et al. 1992).
- L'exposant α diminue avec C (selon une fraction polynomiale ajustée sur la courbe (Saxton 1994), de 1 à 0.7 pour une densité d'obstacles augmentant de 0 à 0.5 (Jr. et al. 2007).
- Le temps caractéristique de croisement t_{CR} augmente avec C (aucune expression n'est proposée, Saxton 1994).
- Le temps de résidence dans une région donnée augmente avec C (aucune expression n'est proposée non plus, Saxton 1993).

Pour les concentrations au-delà du seuil de percolation, la diffusion est toujours anormale. Le coefficient de diffusion aux temps longs devient nul. Ces résultats sont en accord avec les observations expérimentales présentées ci-dessus.

3.2.3.3 *Effet des liaisons sur le mouvement diffusif*

Les sites de liaisons sont, comme les obstacles, caractérisés par leur taille, leur concentration, leur répartition et leur mobilité, mais ils sont également caractérisés par le taux d'association et de dissociation de la liaison à laquelle ils participent. L'impact d'une liaison sur la mobilité de la protéine suivie dépend notamment de la mobilité du site de liaison : lorsque la protéine se lie à un partenaire, sa mobilité devient celle du complexe formé. Si le partenaire a une mobilité comparable, l'effet de la liaison sur la mobilité de la protéine sera dû uniquement à l'augmenta-

tion de la taille de l'objet qui diffuse, et la mobilité sera donc légèrement réduite (voir section 3.2.3.1). En revanche, si le partenaire est très peu mobile, la liaison aura pour effet de diminuer fortement la mobilité de la protéine.

- Des simulations indiquent que, comme dans le cas des obstacles, la diffusion est anormale aux temps courts et redevient normale aux temps longs. Le caractère anormal de la diffusion n'est pas lié aux caractéristiques des liaisons, mais est dû au fait que ces sites de liaison sont aussi des obstacles (Saxton 1996).
- Le coefficient de diffusion (aux temps longs) diminue quand le temps caractéristique de dissociation augmente (*i.e.* quand l'affinité augmente), selon des expressions variables selon les hypothèses du modèle (Pink et al. 1986; Saxton 1996). A titre indicatif, d'après ces simulations, une énergie d'interaction de 0.6 kcal est associée à une réduction du coefficient de diffusion d'un facteur 2.2 pour une concentration de sites de liaison (fraction des sites occupés) de 0.1 (les interactions intermoléculaires peuvent correspondre à des énergies de 0.03 à 12 kcal environ). Dans le cas où il y a plusieurs types de liaisons (avec des temps caractéristiques différents), le coefficient de diffusion est encore plus fortement diminué.

De plus, d'un point de vue théorique, si le temps caractéristique des liaisons est inférieur à la résolution temporelle de la méthode d'observation, le coefficient de diffusion "effectif" s'écrit :

$$D_{eff} = D_{free} \frac{t_{free}}{t_{tot}} + D_{bound} \frac{t_{bound}}{t_{tot}} \quad (3.17)$$

où D_{free} et D_{bound} sont les coefficients de diffusion de la molécule dans les états libre et lié respectivement, et t_{free}/t_{tot} et t_{bound}/t_{tot} sont les fractions de temps passé dans les états libre et lié respectivement. Si la molécule est immobile dans l'état lié, on retrouve $D_{eff} = \frac{D_f}{1+k_{on}^*/k_{off}}$, où k_{on} , k_{off} sont les constantes d'association et de dissociation de la réaction en jeu (Sprague et al. 2004). Cependant, cette analyse ne prend pas en compte l'encombrement des sites de liaisons qui constituent également des obstacles et pourraient conduire à une diffusion anormale.

- Le temps de résidence d'une protéine dans une région donnée est également affecté par les liaisons dans lesquelles elle s'engage dans cette région. Plus précisément, Le rapport des temps de résidence dans deux régions adjacentes x et z dépend des aires $A_{x,z}$ de ces deux régions et des énergies libres associées à ces deux régions $U_{x,z}$, qui elles-mêmes dépendent des affinités des interactions. La fraction de temps P_z passée dans la région z s'écrit :

$$P_z = \frac{A_z e^{-\beta U_z}}{A_z e^{-\beta U_z} + A_x e^{-\beta U_x}} \quad (3.18)$$

où $\beta = k_B T^{-1}$. En particulier, lorsque les liaisons ont lieu spécifiquement dans une région, l'énergie libre correspondant à cette région est diminuée. Le temps de résidence dans une région augmente donc lorsque des liaisons ont lieu spécifiquement dans cette région.

3.2.3.4 Effet de la géométrie sur le mouvement diffusif

Lorsqu'une particule diffuse dans une région limitée mais aux parois semi-perméables, son comportement diffusif est affecté quand la distance explorée atteint l'ordre de grandeur de la taille de la région, *i.e.* quand la particule commence à heurter les parois.

Pour un mouvement dans une région à la géométrie définie, le déplacement quadratique moyen dépend des dimensions et de la géométrie de la région, du coefficient de diffusion, et de la perméabilité des parois. L'expression analytique du MSD a été calculée pour plusieurs géométries particulières ; lorsque les parois sont perméables, le MSD est sublinéaire mais ne suit pas une loi de puissance (Wieser and Schütz 2008), et lorsque les parois ne sont pas perméables, le MSD atteint un plateau.

Pour un mouvement dans une région circulaire ayant une paroi réflexive à l'exception d'une petite ouverture par laquelle la particule peut s'échapper, le temps moyen passé dans la région avant que la particule ne s'échappe dépend de la taille de la région, du ratio de la taille des parois réflexive et ouverte, et du coefficient de diffusion (Holcman and Schuss 2005). Cette géométrie est celle qui a été utilisée dans certains modèles de la synapse.

Finalement, les paramètres descriptifs de la diffusion latérale ne semblent pas tous avoir été caractérisés dans les conditions d'obstacles et de liaison que nous venons de décrire. Certaines questions restent ouvertes, comme l'indique le tableau récapitulatif présenté dans la table 2.

3. k_B est la constante de Boltzmann et T la température

	Obstacles immobiles (concentration $C < C_{perc}$:)	Obstacles mobiles (concentration C)	Liaisons
Type de diffusion	Sim. : anormale transitoire (Jr. et al. 2007; Saxton 1994) An. ? Exp. : anormale transitoire (Deverall et al. 2005)	Sim. : anormale transitoire (Saxton 1987) An. ? Exp. : Brownian ou anormale transitoire ? (Dix and Verkman 2008)	Sim. : anormale transitoire (Saxton 1996) An. ? Exp. ?
Coefficient de diffusion	Sim. : $D \propto -C$ (Saxton 1994) An. : D diminue avec C selon une fonction polynomiale de degré 2 (Almeida et al. 1992) Exp. : $D \propto -C$ et ajusté avec l'expression analytique polynomiale de degré 2 (Deverall et al. 2005)	Sim. : D diminue quand C augmente et quand μ diminue (Saxton 1987) An. : D diminue quand C augmente (fonctions polynomiales) (Abney et al. 1989; van Beijeren H and Kutner 1985), en accord avec les simulations. Exp. : D diminue de manière exponentielle avec le ratio molaire protéine/lipide (Blackwell and Whitmarsh 1990).	Sim. : D diminue quand le temps caractéristique de dissociation augmente (Saxton 1996) An. : $Def f = D_{free} \frac{t_{free}}{t_{tot}} + D_{bound} \frac{t_{bound}}{t_{tot}}$ (Sprague et al. 2004) Exp. ?
Temps de résidence dans une région donnée	Sim. : ? An. : ? Exp. : ?	Sim. : augmente avec C (Saxton 1993) An. : ? Exp. : ?	Sim. : ? An. : diminue quand l'affinité des liaisons augmente ? (Sekimoto and Triller 2009) Exp. : ?

TABLE 2.: Relations entre les paramètres descriptifs du mouvement diffusif et les processus moléculaires qui sous-tendent le mouvement. Ce tableau résume les différentes relations décrites dans le texte, en précisant les différentes méthodes : Sim. : simulations ; An. : analytique ; Exp. : expériences.

3.2.4 Diffusion libre, obstacles, liaisons : quelles relations avec la fonction synaptique ?

Reprenons chaque point de la nouvelle problématique : quelles relations y a-t-il entre chacun des aspects de la transmission synaptique et (i) les processus moléculaires qui sous-tendent la diffusion latérale, et (ii) les paramètres descriptifs de la diffusion latérale ? Ci-dessous, je considère quelques caractéristiques de la fonction synaptique : le nombre de récepteurs synaptiques à l'état stationnaire, puis quelques aspects dynamiques de la transmission synaptique.

3.2.4.1 Quelles relations entre le nombre de récepteurs synaptiques à l'état stationnaire et les processus moléculaires qui sous-tendent la diffusion latérale ?

Prenons une des caractéristiques de l'état stationnaire qui a été bien étudiée : le nombre de récepteurs des neurotransmetteurs, qui sont accumulés à la synapse (Choquet and Triller 2003). Avant d'aller plus loin, précisons les notions d'*état stationnaire* et d'*accumulation* :

- Par *état stationnaire*, nous entendons seulement le fait que les paramètres avec lesquels nous décrivons l'assemblage synaptique ne varient pas en fonction du temps, aux échelles de temps et d'espace choisies. Le nombre exact de récepteurs synaptiques à un instant donné peut varier légèrement au cours du temps, car des récepteurs entrent et sortent de la synapse par diffusion latérale. Cependant, à l'état stationnaire, le nombre moyen de récepteurs à la synapse, mesuré sur une fenêtre de temps de 10 s par exemple, ne varie pas en fonction du temps. Par ailleurs, l'expression *état stationnaire* ne fait pas particulièrement référence à un état d'équilibre au sens thermodynamique du terme.
- Nous utilisons le terme *accumulation* pour désigner le fait que la concentration en récepteurs à la synapse est plus élevée que dans la région extrasynaptique. Nous préférons le terme *accumulation* au terme *concentration* qui correspond à un nombre de molécules par unité de volume (de surface) mais n'indique pas si ce nombre est plus élevé dans une région ou dans une autre.

L'accumulation des récepteurs de la glycine à la synapse dépend de leur interaction avec la gephyrin (Zita et al. 2007), et une perturbation de cette interaction est associée avec une réduction du coefficient de diffusion du récepteur (Ehrensperger et al. 2007).

Quels liens y a-t-il entre l'accumulation des récepteurs, le mouvement diffusif des récepteurs, et les interactions moléculaires ?

Deux modèles ont été proposés à ce jour pour rendre compte de l'accumulation des récepteurs, en se basant sur les processus moléculaires qui sous-tendent la diffusion. Le premier, proposé par K. Sekimoto, décrit l'accumulation de récepteurs uniquement comme résultant des affinités entre les récepteurs et les protéines avec lesquelles ils interagissent,

et d'un "champ attracteur" qui traduit la présence de la terminaison présynaptique (Sekimoto and Triller 2009). Le second, proposé par D. Holcman, fait intervenir les affinités entre le récepteur et ses partenaires, ainsi que le temps de résidence dans la synapse (voir paragraphe précédent 3.2.2), et le flux entrant (Holcman and Triller 2006). Aucun de ces modèles n'a été confronté aux résultats expérimentaux.

Pour considérer la relation entre l'accumulation des récepteurs dans la région synaptique et les processus moléculaires (du mouvement diffusif), considérons d'abord deux régions géométriquement identiques, adjacentes, mais aux propriétés (composition, viscosité...) différentes. En prenant les processus moléculaires un à un, voici les questions qui se posent.

Quelle relation entre accumulation et diffusion "libre" ? En d'autres termes, si les deux régions diffèrent uniquement en ce que la protéine a un coefficient de diffusion libre différent dans chacune d'elle, y aura-t-il une accumulation de la protéine dans une des deux régions ? D'un point de vue théorique, si l'état stationnaire est un état de quasi-équilibre (Sekimoto and Triller 2009), il n'y a pas d'accumulation. Si le coefficient de diffusion d'une région A est plus faible que celui de la région B , le temps de résidence dans A est plus élevé mais la probabilité d'y entrer venant de B serait plus faible, de sorte que la probabilité de passer de A à B est identique à celle de passer de B à A .

Attention : ceci n'est pas valable pour un coefficient de diffusion effectif, qui "inclurait" des liaisons. La présence d'interactions peut être à l'origine d'une accumulation (voir ci-dessous), mais elle peut également diminuer le coefficient de diffusion (voir précédemment). Dans ce cas, la diminution du coefficient de diffusion ne serait pas elle-même à l'origine de l'accumulation. Elle ne ferait que résulter de / refléter les interactions qui sont en jeu. D'où la nécessité de distinguer diffusion libre - liaisons - obstacles.

Le coefficient de diffusion libre n'est donc pas un paramètre critique à mesurer pour la question de l'accumulation des récepteurs.

Quelle relation entre accumulation et obstacles ? En d'autres termes, si la densité d'obstacles est différente dans les deux régions, y aura-t-il une accumulation de la protéine en question dans une des deux régions ? Je n'ai pas trouvé d'élément de réponse à cette question. Il s'agirait d'estimer les probabilités P_{AB} et P_{BA} de passer de A à B et de B à A respectivement (si elles sont identiques, il n'y aurait pas d'accumulation, si $P_{AB} > P_{BA}$ il y aurait une accumulation dans la région B).

Quelle relation entre accumulation et liaisons ? En d'autres termes, si la densité de sites de liaisons est différente dans les deux régions (ou si l'affinité des liaisons est plus importante dans l'une des deux),

y aura-t-il une accumulation de la protéine en question dans une des deux régions ? Ce cas est étudié dans le modèle de K. Sekimoto (Sekimoto and Triller 2009) dans les conditions de quasi-équilibre : l'affinité des liaisons diminue l'énergie libre de la région correspondante, et mène effectivement à une accumulation des protéines dans la région où ont lieu les liaisons. Si une région *A* contient plus de sites de liaison (d'une affinité donnée) que la région adjacente *B*, il y aura donc une accumulation de protéines dans la région *A*. Comme nous l'avons décrit plus haut, ces liaisons se traduiront par une diminution du coefficient de diffusion, mais ce n'est pas ce ralentissement à proprement parler qui est à l'origine de l'accumulation.

Quelle relation entre accumulation et géométrie ? Si les deux régions ne sont plus géométriquement identiques, par exemple si l'une est un disque au milieu de l'autre, comme pour la synapse, ou s'il existe une barrière asymétrique entre ces deux régions, peut-il y avoir une accumulation dans une des deux régions ?

Par exemple, dans un espace scindé en deux par une barrière asymétrique (une paroi contenant des ouvertures en forme d'entonnoirs), des bactéries motiles s'accumulent d'un des côtés de la paroi (Galajda et al. 2007), indiquant que les probabilités de passer la barrière dans un sens ou dans l'autre ne sont pas identiques. Il est à noter que les bactéries motiles n'ont pas à proprement parler un mouvement brownien (leur mouvement consiste en une alternance de mouvement dirigé et de périodes de culbute pendant lesquelles les bactéries changent de direction, Berg and Turner 1990). Ce phénomène n'est pas observé pour les bactéries non motiles. Comme l'accumulation dans une région donnée dépend de la probabilité pour une particule d'y entrer et d'en sortir, les propriétés de la limite entre les deux régions peuvent influencer cette accumulation.

Enfin, parmi les paramètres descriptifs de la diffusion latérale, on notera que l'accumulation des récepteurs est directement reliée aux temps de résidence dans les régions synaptiques et extrasynaptiques, si on connaît les aires de ces régions. Comme indiqué dans la section 3.2.3.3, ces temps de résidence sont reliés aux énergies libres de ces régions, qui elles-mêmes sont reliées à l'accumulation des récepteurs (Sekimoto and Triller 2009). La relation entre l'accumulation des récepteurs et la diffusion latérale peut donc être décrite en termes de temps de résidence. Si on souhaite décrire plus avant la relation entre l'accumulation des récepteurs et les processus moléculaires, on peut donc poser la question de la relation entre les temps de résidence dans les régions synaptiques et extrasynaptiques et ces processus moléculaires.

3.2.4.2 *Quelles relations y a-t-il entre les aspects dynamiques de la transmission synaptique, la diffusion latérale et les processus moléculaires qui la sous-tendent ?*

PROCESSUS DYNAMIQUES “RAPIDES” Le délai entre l’arrivée d’un potentiel d’action dans le terminal présynaptique et le déclenchement du potentiel postsynaptique est de l’ordre de 1 ms. Les différents types de phénomènes qui participent à la transmission synaptique incluent des changements de conformation (*e.g.* ouverture des canaux ioniques), des événements de liaison (*e.g.* des ions calcium à la synaptotagmin) et la diffusion de petites molécules comme les ions ou les neurotransmetteurs. Pendant ce délai, le déplacement de protéines membranaires avec un coefficient de diffusion de $0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ est de l’ordre de 15 nm. Nous n’avons pas étudié le mouvement à cette échelle de temps (notre résolution temporelle était de 75 ms). Même si on peut s’attendre à ce que le coefficient de diffusion “libre” soit plus élevé que celui mesuré avec une fréquence de 75 ms (voir section 3.2.2 sur la diffusion anormale transitoire), il reste peu probable que la diffusion latérale des protéines, en tant que déplacement, contribue au processus de transmission synaptique.

En revanche, à un moment donné, le caractère aléatoire de la diffusion libre (la direction de chaque déplacement est aléatoire, voir section 1.4.1) résulte en une variabilité de la position des protéines. On peut se demander dans quelle mesure cette variabilité de la position / de la répartition des protéines est à l’origine de la variabilité de la réponse postsynaptique qui suit un événement d’exocytose. En effet, dans une synapse donnée, le potentiel postsynaptique évoqué en réponse à la fusion d’une vésicule est très variable : le coefficient de variation de la réponse postsynaptique dans des synapses de l’hippocampe a été estimé à environ 0.39 (Hanse and Gustafsson 2001) — sans ajouter que la fusion d’une vésicule est elle-même probabiliste. Les sources de cette variabilité sont multiples. Dans une revue en annexe (A.3), nous proposons une réflexion sur la contribution de la stochasticité des processus moléculaires (biochimiques et diffusifs) à la variabilité de la réponse postsynaptique.

Par exemple, le nombre de récepteurs postsynaptiques à la synapse est de l’ordre de quelques dizaines, et détermine en partie l’amplitude de la réponse postsynaptique. Étant donnée la petite taille de la synapse, les récepteurs peuvent entrer ou sortir de la synapse par diffusion latérale relativement rapidement : en 10 ms, une protéine peut se déplacer sur environ 50 nm. Ce déplacement pourrait contribuer à une variabilité du nombre de récepteurs présents à la synapse entre deux potentiels d’action successifs. De plus, la position des canaux calciques sensibles au voltage à proximité des vésicules peut également modifier la probabilité de fusion de la vésicule. La diffusion latérale de ces canaux calciques par un mou-

vement aléatoire peut donc également contribuer au caractère probabiliste de la fusion des vésicules synaptiques (Shahrezaei and Delaney 2004).

PROCESSUS DYNAMIQUES “INTERMÉDIAIRES” Un potentiel d'action modifie l'état de la synapse sur un temps assez court, de l'ordre d'une fraction de seconde : par exemple, dans le compartiment postsynaptique, les récepteurs restent un moment dans un état “désensibilisé”, et dans le compartiment présynaptique, la fusion d'une vésicule avec la membrane plasmique modifie localement et transitoirement l'organisation et la composition de la membrane plasmique. De plus, quand un neurone est stimulé à une fréquence élevée, la réponse postsynaptique diminue, d'autant plus rapidement que la fréquence de stimulation est élevée (Zucker and Regehr 2002). C'est ce qu'on appelle un phénomène de dépression.

Dans le compartiment présynaptique, alors que la “resensibilisation” était classiquement expliquée par une transition des récepteurs vers un état à nouveau sensibilisé, Heine *et al* ont étudié la contribution du remplacement des récepteurs désensibilisés par des récepteurs extrasynaptiques “intacts” à cette resensibilisation. Ils ont observé qu'entraver la diffusion latérale des récepteurs par *cross-linking* amplifie la dépression synaptique (Heine *et al.* 2008), montrant ainsi que la diffusion latérale des récepteurs contribue à la resensibilisation qui suit la dépression synaptique.

Dans le compartiment présynaptique, la dépression est parfois expliquée par un épuisement du réservoir de vésicules synaptiques. Cependant, comme détaillé dans le paragraphe 3.1.5.2, la désorganisation de la membrane plasmique, et la dilution des protéines impliquées dans l'exocytose par ajout de membrane des vésicules pourraient également jouer un rôle dans la dépression. La diffusion latérale des protéines pourrait donc être impliquée dans la réorganisation de la membrane.

La contribution de la diffusion latérale à la resensibilisation dépend de la distance caractéristique de déplacement des protéines pendant un temps très court (fraction de seconde). Cette distance caractéristique peut être obtenue par l'étude de la diffusion latérale sans considérer les processus moléculaires qui la sous-tendent. Par ailleurs, cette distance caractéristique dépend vraisemblablement du coefficient de diffusion libre, et peut dépendre des interactions ou des obstacles, selon les temps caractéristiques des interactions et la concentration des obstacles. Des données quantitatives seraient nécessaires pour estimer la contribution de chacun de ces processus à la diffusion latérale à cette échelle de temps.

PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À “LONG TERME” L'activité des neurones est associée à des changements des propriétés de la transmission synaptique sur le long terme, qui peuvent être maintenus pendant des heures, des jours, des années. Ce phénomène est généralement reconnu sous le terme plasticité synaptique de

moyen ou long terme (Feldman 2009). Dans certaines conditions, une augmentation de l'activité affaiblit la transmission synaptique en diminuant le nombre de récepteurs présents et s'accompagne d'une modification de la diffusion des récepteurs (Bannai et al. 2009). Le mouvement diffusif des récepteurs pourrait donc être impliqué dans la plasticité synaptique.

Il est à nouveau prudent de distinguer les différentes composantes du mouvement diffusif, diffusion libre, obstacles et liaisons. En effet, comme décrit dans le paragraphe 3.2.4.1, le nombre de récepteurs à l'état stationnaire ne dépend pas à proprement parler de la diffusion latérale des récepteurs, mais plutôt des liaisons dans lesquelles ils sont impliqués.

En revanche, la vitesse d'échange des protéines entre la région synaptique et extrasynaptique pourrait influencer la vitesse avec laquelle l'assemblage synaptique va passer d'un état stationnaire à un autre. Cette vitesse d'échange pourrait être estimée en étudiant la diffusion latérale, sans faire d'hypothèses sur les processus moléculaires en jeu (comme dans le cas de la resensibilisation décrite ci-dessus). Un modèle décrivant la potentiation et la dépression synaptiques à long terme (deux aspects de la plasticité synaptique), en fonction de la dynamique des récepteurs (diffusion latérale, endocytose et exocytose) a été proposé (Earnshaw and Bressloff 2006). Dans ce modèle, les temps caractéristiques de changement de l'état stationnaire sont de l'ordre de quelques minutes, et dépendent de la mobilité des protéines et des interactions dans lesquelles elles s'engagent. Cependant, ce modèle ne se base pas sur des valeurs de la mobilité mesurées expérimentalement, et étudie l'effet des modifications des paramètres de liaison et de mobilité en même temps, sans distinguer la contribution de chacun de ces deux processus.

Pour estimer la contribution des différents processus moléculaires à la vitesse de changement d'état de la synapse, des données quantitatives seraient également nécessaires. Par exemple, pour la syntaxine, la durée d'un déplacement libre sur 150 nm est de l'ordre de 80 ms, alors que le temps caractéristique des interactions qui correspondent aux pauses est de l'ordre de quelques secondes. Dans ce cas, le temps caractéristique des interactions (plutôt que celui de la diffusion libre) serait critique pour le changement d'état de la synapse.

DEUXIÈME CONCLUSION

Comme nous l'avons suggéré au début de cette section, il est important de choisir si l'on veut étudier les caractéristiques de la transmission synaptique en fonction des paramètres descriptifs du mouvement diffusif ou des processus moléculaires qui sous-tendent ce mouvement.

Si l'on cherche à identifier les processus moléculaires en jeu, nous pouvons remarquer que les paramètres descriptifs de la diffusion latérale permettent difficilement de décrire ces processus. Bien que la synthèse présentée ici soit loin d'être complète, les situations étudiées sont plus simples que ne l'est l'environnement des protéines dans la membrane neuronale. Pourtant les relations entre diffusion latérale et processus moléculaires ne sont pas toujours élucidées et varient encore d'une étude à l'autre. Compte tenu de la complexité de l'environnement moléculaire dans lequel diffusent les protéines synaptiques, il semble à ce jour que le cadre qui permettrait d'interpréter le mouvement diffusif de la syntaxin en termes de processus moléculaires est insuffisant.

Une approche qui est peu répandue mais semble prometteuse concerne l'étude des variations de la diffusion latérale en fonction du temps : par exemple, dans notre étude, les interactions sont reflétées par des changements brutaux et transitoires de la mobilité de la syntaxin. Une autre suggestion pour identifier les périodes d'interaction consisterait à suivre en même temps le mouvement de deux types de molécules susceptibles d'interagir, et interpréter les périodes de co-diffusion comme des événements de liaison. Des données préliminaires de ce type ont récemment été obtenues au laboratoire par M. Renner, et un article sur cette méthode vient récemment d'être publié par un autre laboratoire (Ruprecht et al. 2010).

Enfin, on notera que l'étude de la diffusion latérale, sans considérer les processus moléculaires qui la sous-tendent, peut également contribuer à la description des différents aspects de la transmission synaptique. Dans cette approche, les temps caractéristiques (temps de résidence, vitesse d'échange) semblent être des paramètres particulièrement pertinents.

3.3 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Des conclusions ont déjà été énoncées à la fin de chaque section de cette discussion, ci-dessous je rappelle brièvement leur contenu et développe quelques perspectives de ce travail.

3.3.1 *Diffusion latérale de la syntaxin*

Nous avons montré que la diffusion latérale de la syntaxin dépend des interactions intermoléculaires dans lesquelles elle est engagée, et que ces interactions correspondent vraisemblablement à la formation du complexe exocytotique.

Le comportement diffusif de la syntaxin est particulier en ce qu'il est très rapide, et présente des périodes transitoires d'immobilisation (pauses). Ces caractéristiques sont cohérentes avec le fait que la membrane plasmique est le lieu d'un ancrage stable des vésicules synaptiques, mais constitue également une structure dynamique capable d'une réorganisation rapide lors des événements d'exocytose (et d'endocytose).

Une des spécificités de notre approche est d'avoir pu réconcilier les observations faites à l'échelle de la molécule individuelle (SPT) et de la population (FRAP) en construisant un modèle de la diffusion de la syntaxin. Ce modèle a permis d'interpréter les courbes de FRAP avec un scénario moléculaire, et de s'affranchir de la limite d'échantillonnage du SPT.

Pour affiner la description de la diffusion latérale de la syntaxin, on peut envisager d'étudier spécifiquement la contribution de chaque partenaire de la syntaxin à la diffusion latérale de celle-ci. Avant cela, je pense qu'il serait important d'identifier quels paramètres descriptifs de la diffusion latérale de la syntaxin sont pertinents d'un point de vue fonctionnel.

3.3.2 *Implications de l'étude du mouvement diffusif*

L'étude du mouvement diffusif des protéines synaptiques a deux versants : le mouvement diffusif peut être étudié "dans son ensemble", en tant que processus dynamique, ou en termes de processus moléculaires (diffusion libre, obstacles, liaisons).

Dans le cas de l'étude de l'assemblage synaptique, j'ai discuté la possibilité d'étudier les propriétés de cet assemblage en fonction des paramètres descriptifs du mouvement diffusif ou des processus moléculaires qui sous-tendent ce mouvement. Ces deux approches (description du mouvement ou des processus moléculaires) ne sont pas vraiment dissociables, il s'agit plutôt de deux points de vue différents.

Cependant, si ces deux approches peuvent contribuer à l'étude de la transmission synaptique, on notera que la possibilité de caractériser les processus moléculaires à partir de la diffusion latérale reste à ce jour limitée. Dans cette perspective, l'étude des variations du mouvement diffusif en fonction du temps est une direction qui mérite d'être approfondie.

3.3.3 *Questions ouvertes*

A l'issue de cette étude, de nombreuses questions restent ouvertes. En voici quelques-unes.

3.3.3.1 *Quelles sont les implications fonctionnelles de la diffusion latérale de la syntaxin ?*

En particulier, la diffusion latérale de la syntaxin est-elle impliquée, en tant que processus dynamique, dans le phénomène de transmission synaptique, à l'échelle de temps d'un ou de plusieurs potentiels d'action ? Bien que des arguments théoriques suggèrent que c'est le cas, nous n'avons pas de données expérimentales qui soutiennent cette hypothèse. Pour poursuivre l'approche que nous avons proposée, c'est-à-dire observer la réponse synaptique à une stimulation continue (ou des stimulations successives) quand la diffusion latérale des molécules de syntaxin est ralentie par *crosslinking*, il serait utile de pouvoir contrôler la mobilité de l'en-

semble des molécules de syntaxin (y compris les molécules endogènes). Pour cela, il faudrait envisager de contrôler la mobilité des molécules endogènes, ou de faire les expériences dans des conditions où la syntaxin endogène ne serait pas exprimée. De plus, la mise en place d'une stimulation électrique et locale pourrait permettre un contrôle spatial et temporel de la stimulation que l'application de la solution dépolarisante de chlorure de potassium ne permet pas. Cela pourrait assurer une meilleure reproductibilité des résultats. La méthode de stimulation électrique pourrait peut-être aussi permettre d'explorer différentes conditions de stimulation dans le cas où certaines seraient particulièrement limitées par la diffusion latérale de la syntaxin.

On pourrait également tenter de caractériser le mouvement de la syntaxin à l'échelle de la molécule unique, avec une résolution temporelle proche de la durée d'un événement d'exocytose. La méthode de SPT permet pour le moment de faire des acquisitions à une fréquence de 100 Hz. En combinant une stimulation électrique locale avec l'observation de la diffusion de la syntaxin à haute fréquence, il serait peut-être possible d'observer le comportement diffusif de la syntaxin dans les instants qui précèdent et suivent l'exocytose. Cependant, dans cette approche, la probabilité que la molécule marquée et observée soit impliquée dans un complexe exocytotique peut être limitante.

3.3.3.2 *Comment réconcilier modèles et données expérimentales pour décrire la relation entre le mouvement diffusif et les propriétés de la transmission synaptique ?*

Comme indiqué précédemment, les modèles de la dynamique de l'assemblage synaptique ne reposent pas sur des paramètres mesurables. De plus, ils impliquent davantage des paramètres décrivant les processus moléculaires (liaisons, diffusion libre) que des paramètres descriptifs de la diffusion latérale. Pour réconcilier modèles et expériences, on peut envisager des approches différentes :

- Construire un modèle qui repose uniquement sur les paramètres mesurés
- "Prolonger" les modèles actuels : identifier comment les paramètres de ces modèles, tels qu'ils sont définis actuellement, peuvent être exprimés en fonction d'autres paramètres qui eux seraient mesurés ou mesurables ?
- Imaginer et réaliser de nouvelles expériences, de nouvelles mesures, qui donneraient accès aux paramètres actuels du modèles.

Les deux dernières approches pourraient s'avérer complémentaires. Dans ce cadre, il pourrait également être intéressant de tenter de regrouper l'ensemble des données sur le mouvement diffusif des protéines synaptiques pour construire ce modèle. Une telle "méta-analyse" permettrait aussi d'identifier les points communs et les spécificités des comportements diffusifs de chaque molécule.

3.3.3.3 *En quoi consistent les relations entre le mouvement diffusif et les interactions moléculaires dans d'autres systèmes ?*

Comme suggéré dans la section 3.2.2, les relations entre les interactions moléculaires et le mouvement diffusif des protéines sont encore peu caractérisées. Il pourrait être intéressant de mettre en place des expériences pour étudier ces relations dans des systèmes artificiels contrôlés.

Par ailleurs, des assemblages moléculaires autres que la synapse ont également des constituants mobiles. La synapse est un système difficile à étudier, dans la mesure où elle implique de nombreuses protéines différentes, où elle présente des propriétés de plasticité qui ne sont pas toujours contrôlées, et où les neurones sont des cellules particulièrement fragiles. La relation entre les propriétés d'un assemblage et la dynamique de ses éléments pourrait être étudiée dans des systèmes plus simples à manipuler et mieux caractérisés. Par exemple, le moteur du flagelle chez *E. coli* est constitué de sous-unités, dont certaines sont échangées avec celles d'un réservoir membranaire (Leake et al. 2006). Le temps de résidence d'une sous-unité dans l'assemblage est de l'ordre de 30 s. Il pourrait être intéressant de comparer les descriptions et les implications fonctionnelles du mouvement diffusif des constituants pour des assemblages ayant des propriétés et des niveaux de complexité différents.

BIBLIOGRAPHIE

- J. Abney, B. Scalettar, and J. Owicki. 1989. Self diffusion of interacting membrane proteins. *Biophysical Journal*, 55(5):817–833.
- I. Ahmed, L. I. Cosen-Binker, Y. M. Leung, H. Y. Gaisano, and N. E. Diamant. 2007. Modulation of the kv4.3 channel by syntaxin 1A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(3):789–795.
- P. Alivisatos. 2004. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotech*, 22(1):47–52.
- P. F. Almeida, W. L. Vaz, and T. E. Thompson. 1992. Lateral diffusion and percolation in two-phase, two-component lipid bilayers. topology of the solid-phase domains in-plane and across the lipid bilayer. *Biochemistry*, 31(31):7198–7210.
- S. J. An, C. P. Grabner, and D. Zenisek. 2010. Real-time visualization of complexin during single exocytic events. *Nat Neurosci*, 13(5):577–583.
- A. M. Aravanis, J. L. Pyle, and R. W. Tsien. 2003. Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature*, 423(6940):643–7.
- H. Arien, O. Wiser, I. T. Arkin, H. Leonov, and D. Atlas. 2003. Syntaxin 1A modulates the voltage-gated l-type calcium channel (Ca(v)1.2) in a cooperative manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(31):29231–9.
- U. Ashery, F. Varoqueaux, T. Voets, A. Betz, P. Thakur, H. Koch, E. Neher, N. Brose, and J. Rettig. 2000. Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J*, 19(14):3586–3596.
- U. Ashery, N. Bielopolski, B. Barak, and O. Yizhar. 2009. Friends and foes in synaptic transmission : the role of tomosyn in vesicle priming. *Trends in Neurosciences*, 32(5):275–282.
- D. Axelrod, P. Ravdin, D. E. Koppel, J. Schlessinger, W. W. Webb, E. L. Elson, and T. R. Podleski. 1976. 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(12):4594–4598.
- J. Bai, W. C. Tucker, and E. R. Chapman. 2004. PIP₂ increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. *Nat Struct Mol Biol*, 11(1):36–44.
- J. Balaji and T. A. Ryan. 2007. Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51):20576–20581.
- H. Bannai, S. Lévi, C. Schweizer, T. Inoue, T. Launey, V. Racine, J. Sibarita, K. Mikoshiba, and A. Triller. 2009. Activity-Dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. *Neuron*, 62(5):670–682.
- L. S. Barak and W. W. Webb. 1982. Diffusion of low density lipoprotein-receptor complex on human fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 95(3):846–852.
- M. K. Bennett, N. Calakos, and R. H. Scheller. 1992. Syntaxin : a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5067):255–259.

- M. R. Bennett. 1999. The early history of the synapse : from plato to sherrington. *Brain Research Bulletin*, 50(2) : 95–118.
- H. Berg and L. Turner. 1990. Chemotaxis of bacteria in glass capillary arrays. *escherichia coli*, motility, microchannel plate, and light scattering. *Biophysical Journal*, 58(4) : 919–930.
- A. Betz, M. Okamoto, F. Benseler, and N. Brose. 1997. Direct interaction of the rat unc-13 homologue munc13-1 with the n terminus of syntaxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(4) : 2520–6.
- I. Bezprozvanny, P. Zhong, R. H. Scheller, and R. W. Tsien. 2000. Molecular determinants of the functional interaction between syntaxin and n-type Ca^{2+} channel gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25) : 13943–8.
- U. S. Bhalla. 2004. Signaling in small subcellular volumes. i. stochastic and diffusion effects on individual pathways. *Biophysical Journal*, 87(2) : 733–44.
- M. F. Blackwell and J. Whitmarsh. 1990. Effect of integral membrane proteins on the lateral mobility of plastoquinone in phosphatidylcholine proteoliposomes. *Biophysical Journal*, 58(5) : 1259–1271.
- J. Blasi, E. R. Chapman, E. Link, T. Binz, S. Yamasaki, P. D. Camilli, T. C. Südhof, H. Niemann, and R. Jahn. 1993. Botulinum neurotoxin a selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature*, 365(6442) : 160–163.
- J. Blasi, E. R. Chapman, S. Yamasaki, T. Binz, H. Niemann, and R. Jahn. 1993. Botulinum neurotoxin c1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *The EMBO Journal*, 12(12) : 4821–4828.
- J. B. Bock, H. T. Matern, A. A. Peden, and R. H. Scheller. 2001. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*, 409(6822) : 839–841.
- A. J. Borgdorff and D. Choquet. 2002. Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature*, 417(6889) : 649–53.
- M. E. Bowen, K. Weninger, J. Ernst, S. Chu, and A. T. Brunger. 2005. Single-Molecule studies of synaptotagmin and complexin binding to the SNARE complex. *Biophysical Journal*, 89(1) : 690–702.
- T. Branco and K. Staras. 2009. The probability of neurotransmitter release : variability and feedback control at single synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(5) : 373–383.
- K. Broadie, A. Prokop, H. J. Bellen, C. J. O’Kane, K. L. Schulze, and S. T. Sweeney. 1995. Syntaxin and synaptotagmin function downstream of vesicle docking in drosophila. *Neuron*, 15(3) : 663–673.
- R. Brown. 1828. A brief account of microscopical observations made in the months of june, july and august, 1827, on the particles contained in the pollen of plants ; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philosophical Magazine*, 4 : 161–173.
- M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos. 1998. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 281(5385) : 2013–2016.
- A. T. Brunger, K. Weninger, M. Bowen, and S. Chu. 2009. Single-molecule studies of the neuronal SNARE fusion machinery. *Annual Review of Biochemistry*, 78 : 903–928.
- I. Bucurenciu, A. Kulik, B. Schwaller, M. Frotscher, and P. Jonas. 2008. Nanodomain coupling between Ca^{2+} channels and Ca^{2+} sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse. *Neuron*, 57(4) : 536–545.

- M. Bähler and P. Greengard. 1987. Synapsin i bundles f-actin in a phosphorylation-dependent manner. *Nature*, 326(6114):704–707.
- M. Calamai, C. G. Specht, J. Heller, D. Alcor, P. Machado, C. Vannier, and A. Triller. 2009. Gephyrin oligomerization controls GlyR mobility and synaptic clustering. *J. Neurosci.*, 29(24):7639–7648.
- W. C. W. Chan and S. Nie. 1998. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281(5385):2016–2018.
- E. R. Chapman. 2008. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annual Review of Biochemistry*, 77:615–41.
- C. Charrier, M. Ehrensperger, M. Dahan, S. Levi, and A. Triller. 2006. Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane. *J. Neurosci.*, 26(33):8502–8511.
- X. Chen, D. R. Tomchick, E. Kovrigin, D. Araç, M. Machius, T. C. Südhof, and J. Rizo. 2002. Three-Dimensional structure of the Complexin/SNARE complex. *Neuron*, 33(3):397–409.
- P. Chi, P. Greengard, and T. A. Ryan. 2001. Synapsin dispersion and recluster during synaptic activity. *Nature Neuroscience*, 4(12):1187–93.
- P. Chi, P. Greengard, and T. A. Ryan. 2003. Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin i phosphorylation pathways at different frequencies. *Neuron*, 38(1):69–78.
- W. J. Cho, A. Jeremic, and B. P. Jena. 2005. Size of supramolecular SNARE complex : membrane-directed self-assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 127(29):10156–7.
- D. Choquet and A. Triller. 2003. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(4):251–65.
- S. M. Cibulsky, H. Fei, and I. B. Levitan. 2005. Syntaxin-1A binds to and modulates the slo Calcium-Activated potassium channel via an interaction that excludes syntaxin binding to calcium channels. *J Neurophysiol*, 93(3):1393–1405.
- J. S. Coggan, T. M. Bartol, E. Esquenazi, J. R. Stiles, S. Lamont, M. E. Martone, D. K. Berg, M. H. Ellisman, and T. J. Sejnowski. 2005. Evidence for ectopic neurotransmission at a neuronal synapse. *Science*, 309(5733):446–451.
- S. Courty, C. Bouzigues, C. Luccardini, M. (true graphic)]Virginie Ehrensperger, S. Bonneau, M. Dahan, and J. Inglese. 2006. Tracking individual proteins in living cells using single quantum dot imaging. In *Measuring Biological Responses with Automated Microscopy*, volume Volume 414, pages 211–228. Academic Press.
- M. Dahan, S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, and A. Triller. 2003. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5644):442–5.
- K. J. Darcy, K. Staras, L. M. Collinson, and Y. Goda. 2006. Constitutive sharing of recycling synaptic vesicles between presynaptic boutons. *Nature Neuroscience*, 9(3):315–21.
- H. de Wit, L. N. Cornelisse, R. F. Toonen, and M. Verhage. 2006. Docking of secretory vesicles is syntaxin dependent. *PLoS ONE*, 1(1):e126.
- H. de Wit, A. M. Walter, I. Milosevic, A. Gulyás-Kovács, D. Riedel, J. B. Sørensen, and M. Verhage. 2009. Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to Syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell*, 138(5):935–946.

- F. Deak, Y. Xu, W. Chang, I. Dulubova, M. Khvotchev, X. Liu, T. C. Südhof, and J. Rizo. 2009. Munc18-1 binding to the neuronal SNARE complex controls synaptic vesicle priming. *J. Cell Biol.*, 184(5):751–764.
- C. Dean and T. Dresbach. 2006. Neuroligins and neuroligins : linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends in Neurosciences*, 29(1) : 21–29.
- M. Deverall, E. Gindl, E. Sinner, H. Besir, J. Ruehe, M. Saxton, and C. Naumann. 2005. Membrane lateral mobility obstructed by Polymer-Tethered lipids studied at the single molecule level. *Biophysical Journal*, 88(3):1875–1886.
- A. Dif, F. Boulmedais, M. Pinot, V. Roullier, M. Baudy-Floc'h, F. M. Coquelle, S. Clarke, P. Neveu, F. Vignaux, R. L. Borgne, M. Dahan, Z. Gueroui, and V. Marchi-Artzner. 2009. Small and stable peptidic PEGylated quantum dots to target Polyhistidine-Tagged proteins with controlled stoichiometry. *Journal of the American Chemical Society*, 131(41):14738–14746.
- J. A. Dix and A. Verkman. 2008. Crowding effects on diffusion in solutions and cells. *Annual Review of Biophysics*, 37(1):247–263.
- T. Dresbach, B. Qualmann, M. M. Kessels, C. C. Garner, and E. D. Gundelfinger. 2001. The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 58(1):94–116.
- I. Dulubova, S. Sugita, S. Hill, M. Hosaka, I. Fernandez, T. C. Südhof, and J. Rizo. 1999. A conformational switch in syntaxin during exocytosis : role of munc18. *The EMBO Journal*, 18(16):4372–82.
- I. Dulubova, M. Khvotchev, S. Liu, I. Huryeva, T. C. Südhof, and J. Rizo. 2007. Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(8):2697–2702.
- A. Dumoulin, P. Rostaing, C. Bedet, S. Lévi, M. F. Isambert, J. P. Henry, A. Triller, and B. Gasnier. 1999. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 6):811–23.
- A. Dumoulin, S. Lévi, B. Riveau, B. Gasnier, and A. Triller. 2000. Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 12(11):3883–3892.
- B. A. Earnshaw and P. C. Bressloff. 2006. Biophysical model of AMPA receptor trafficking and its regulation during Long-Term Potentiation/Long-Term depression. *J. Neurosci.*, 26(47):12362–12373.
- M. Edidin, Y. Zagyansky, and T. J. Lardner. 1976. Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science (New York, N.Y.)*, 191(4226):466–468.
- M. Ehrensperger. 2007. *Suivi de molécules uniques à l'aide de nanocristaux semiconducteurs : méthodes et application à l'étude de la dynamique du récepteur de la glycine*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- M. Ehrensperger, C. Hanus, C. Vannier, A. Triller, and M. Dahan. 2007. Multiple association states between glycine receptors and gephyrin identified by SPT analysis. *Biophysical Journal*, 92(10):3706–3718.
- A. Einstein. 1905. On the movement of small particles suspended in a stationary liquid demanded by the Molecular-Kinetic theory of heat. *Annalen der Physik*, 322(8):549–560.
- R. J. Ellis. 2001. Macromolecular crowding : obvious but underappreciated. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(10):597–604.

- D. M. Engelman. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438(7068): 578–580.
- E. A. Ertel, K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien, and W. A. Catterall. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25(3): 533–5.
- D. Fasshauer and M. Margittai. 2004. A transient n-terminal interaction of SNAP-25 and syntaxin nucleates SNARE assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(9): 7613–7621.
- D. Fasshauer, H. Otto, W. K. Eliason, R. Jahn, and A. T. Brünger. 1997. Structural changes are associated with soluble N-Ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(44): 28036–28041.
- D. Fasshauer, W. Antonin, V. Subramaniam, and R. Jahn. 2002. SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis. *Nat Struct Mol Biol*, 9(2): 144–151.
- D. E. Feldman. 2009. Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1): 33–55.
- S. D. Fenster, W. J. Chung, R. Zhai, C. Cases-Langhoff, B. Voss, A. M. Garner, U. Kaempf, S. Kindler, E. D. Gundelfinger, and C. C. Garner. 2000. Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron*, 25(1): 203–214.
- I. Fernandez, J. Ubach, I. Dulubova, X. Zhang, T. C. Südhof, and J. Rizo. 1998. Three-Dimensional structure of an evolutionarily conserved N-Terminal domain of syntaxin 1A. *Cell*, 94(6): 841–849.
- R. Fernandez-Chacon, A. Königstorfer, S. H. Gerber, J. Garcia, M. F. Matos, C. F. Stevens, N. Brose, J. Rizo, C. Rosenmund, and T. C. Südhof. 2001. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, 410(6824): 41–49.
- T. Fernández-Alfonso, R. Kwan, and T. A. Ryan. 2006. Synaptic vesicles interchange their membrane proteins with a large surface reservoir during recycling. *Neuron*, 51(2): 179–86.
- R. Ferrari, A. J. Manfroi, and W. R. Young. 2001. Strongly and weakly self-similar diffusion. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 154(1-2): 111–137.
- K. M. Fiebig, L. M. Rice, E. Pollock, and A. T. Brunger. 1999. Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nat Struct Mol Biol*, 6(2): 117–123.
- S. Fletcher, S. E. H. Bowden, and N. V. Marrion. 2003. False interaction of syntaxin 1A with a Ca²⁺-activated K⁺ channel revealed by co-immunoprecipitation and pull-down assays: implications for identification of protein-protein interactions. *Neuropharmacology*, 44(6): 817–827.
- N. B. Fredj and J. Burrone. 2009. A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse. *Nature neuroscience*, 12(6): 751–758.
- E. Frey and K. Kroy. 2005. Brownian motion: a paradigm of soft matter and biological physics. *cond-mat/0502602*.
- J. Fritschy, R. J. Harvey, and G. Schwarz. 2008. Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends in Neurosciences*, 31(5): 257–264.
- M. A. Gaffield and W. J. Betz. 2007. Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. *Nat. Protocols*, 1(6): 2916–2921.
- P. Galajda, J. Keymer, P. Chaikin, and R. Austin. 2007. A wall of funnels concentrates swimming bacteria. *J. Bacteriol.*, 189(23): 8704–8707.

- T. Galli, E. P. Garcia, O. Mundigl, T. J. Chilcote, and P. D. Camilli. 1995. v- and t-SNAREs in neuronal exocytosis : a need for additional components to define sites of release. *Neuropharmacology*, 34(11):1351–1360.
- Y. Gambin, R. Lopez-Esparza, M. Reffay, E. Sierecki, N. S. Gov, M. Genest, R. S. Hodges, and W. Urbach. 2006. Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7):2098–2102.
- E. P. Garcia, P. S. McPherson, T. J. Chilcote, K. Takei, and P. D. Camilli. 1995. rbSec1A and b colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin. *The Journal of Cell Biology*, 129(1):105–20.
- C. C. Garner, S. Kindler, and E. D. Gundelfinger. 2000. Molecular determinants of presynaptic active zones. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(3):321–327.
- H. Geerts, M. D. Brabander, R. Nuydens, S. Geuens, M. Moeremans, J. D. Mey, and P. Hollenbeck. 1987. Nanovid tracking : a new automatic method for the study of mobility in living cells based on colloidal gold and video microscopy. *Biophysical Journal*, 52(5):775–782.
- S. H. Gerber, J. Rah, S. Min, X. Liu, H. de Wit, I. Dulubova, A. C. Meyer, J. Rizo, M. Arancillo, R. E. Hammer, M. Verhage, C. Rosenmund, and T. C. Südhof. 2008. Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science (New York, N. Y.)*, 321(5895):1507–10.
- D. Gerion, F. Pinaud, S. Williams, W. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, and A. Alivisatos. 2001. Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated CdSe/ZnS semiconductor quantum dots. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B*, 105(37):8861–8871.
- C. G. Giraudo, W. S. Eng, T. J. Melia, and J. E. Rothman. 2006. A clamping mechanism involved in SNARE-Dependent exocytosis. *Science*, 313(5787):676–680.
- C. G. Giraudo, A. Garcia-Diaz, W. S. Eng, Y. Chen, W. A. Hendrickson, T. J. Melia, and J. E. Rothman. 2009. Alternative zippering as an On-Off switch for SNARE-Mediated fusion. *Science*, 323(5913):512–516.
- B. Grasberger, A. P. Minton, C. DeLisi, and H. Metzger. 1986. Interaction between proteins localized in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(17):6258–6262.
- L. Groc, M. Heine, L. Cognet, K. Brickley, F. A. Stephenson, B. Lounis, and D. Choquet. 2004. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci*, 7(7):695–696.
- A. Gulyas-Kovacs, H. de Wit, I. Milosevic, O. Kochubey, R. Toonen, J. Klingauf, M. Verhage, and J. B. Sorensen. 2007. Munc18-1 : Sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *J. Neurosci.*, 27(32):8676–8686.
- A. Hagiwara, Y. Fukazawa, M. Deguchi-Tawarada, T. Ohtsuka, and R. Shigemoto. 2005. Differential distribution of release-related proteins in the hippocampal CA3 area as revealed by freeze-fracture replica labeling. *The Journal of comparative neurology*, 489(2):195–216.
- M. Hammarlund, M. T. Palfreyman, S. Watanabe, S. Olsen, and E. M. Jorgensen. 2007. Open syntaxin docks synaptic vesicles. *PLoS Biol*, 5(8):e198.
- X. Han, C. Wang, J. Bai, E. R. Chapman, and M. B. Jackson. 2004. Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca²⁺-Triggered exocytosis. *Science*, 304(5668):289–292.

- E. Hanse and B. Gustafsson. 2001. Quantal variability at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus. *The Journal of Physiology*, 531(Pt 2): 467–80.
- C. Hanus, M. Ehrensperger, and A. Triller. 2006. Activity-Dependent movements of postsynaptic scaffolds at inhibitory synapses. *J. Neurosci.*, 26(17): 4586–4595.
- N. C. Harata, S. Choi, J. L. Pyle, A. M. Aravanis, and R. W. Tsien. 2006. Frequency-dependent kinetics and prevalence of kiss-and-run and reuse at hippocampal synapses studied with novel quenching methods. *Neuron*, 49(2): 243–56.
- G. S. Harms, L. Cagnet, P. H. Lommerse, G. A. Blab, H. Kahr, R. Gamsjäger, H. P. Spaink, N. M. Soldatov, C. Romanin, and T. Schmidt. 2001. Single-Molecule imaging of L-Type Ca^{2+} channels in live cells. *Biophysical Journal*, 81(5): 2639–2646.
- G. S. Harms, L. Cagnet, P. H. Lommerse, G. A. Blab, and T. Schmidt. 2001. Auto-fluorescent proteins in Single-Molecule research : Applications to live cell imaging microscopy. *Biophysical Journal*, 80(5): 2396–2408.
- T. Hayashi, H. McMahon, S. Yamasaki, T. Binz, Y. Hata, T. C. Südhof, and H. Niemann. 1994. Synaptic vesicle membrane fusion complex : action of clostridial neurotoxins on assembly. *The EMBO Journal*, 13(21): 5051–5061.
- L. He, X. Wu, R. Mohan, and L. Wu. 2006. Two modes of fusion pore opening revealed by cell-attached recordings at a synapse. *Nature*, 444(7115): 102–105.
- M. Heine, L. Groc, R. Frischknecht, J. Béïque, B. Lounis, G. Rumbaugh, R. L. Huganir, L. Cagnet, and D. Choquet. 2008. Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5873): 201–5.
- D. Holcman and Z. Schuss. 2005. Stochastic chemical reactions in microdomains. *Journal of Chemical Physics*, 122(11).
- D. Holcman and A. Triller. 2006. Modeling synaptic dynamics driven by receptor lateral diffusion. *Biophysical Journal*, 91(7): 2405–2415.
- M. B. Jackson and E. R. Chapman. 2006. Fusion pores and fusion machines in Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 35: 135–60.
- M. B. Jackson and E. R. Chapman. 2008. The fusion pores of Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(n7): 684–689.
- T. C. Jacob, Y. D. Bogdanov, C. Magnus, R. S. Saliba, J. T. Kittler, P. G. Haydon, and S. J. Moss. 2005. Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABA receptors. *J. Neurosci.*, 25(45): 10469–10478.
- R. Jahn and R. H. Scheller. 2006. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(9): 631–43.
- J. K. Jaiswal and S. M. Simon. 2004. Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends in Cell Biology*, 14(9): 497–504.
- R. Jordan, E. A. Lemke, and J. Klingauf. 2005. Visualization of synaptic vesicle movement in intact synaptic boutons using fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 89(3): 2091–102.
- D. V. N. Jr., J. F. Hancock, and K. Burrage. 2007. Sources of anomalous diffusion on cell membranes : A monte carlo study. *Biophysical Journal*, 92(6): 1975–1987.
- M. Kaern, T. C. Elston, W. J. Blake, and J. J. Collins. 2005. Stochasticity in gene expression : from theories to phenotypes. *Nature Reviews. Genetics*, 6(6): 451–64.

- S. Kalla, M. Stern, J. Basu, F. Varoquaux, K. Reim, C. Rosenmund, N. E. Ziv, and N. Brose. 2006. Molecular dynamics of a presynaptic active zone protein studied in *munc13-1*-enhanced yellow fluorescent protein knock-in mutant mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(50):13054–13066.
- E. T. Kavalali. 2007. Multiple vesicle recycling pathways in central synapses and their impact on neurotransmission. *The Journal of Physiology*, 585(Pt 3):669–679.
- Y. Kee and R. H. Scheller. 1996. Localization of synaptotagmin-binding domains on syntaxin. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(6):1975–1981.
- R. J. Kittel, C. Wichmann, T. M. Rasse, W. Fouquet, M. Schmidt, A. Schmid, D. A. Wagh, C. Pawlu, R. R. Kellner, K. I. Willig, S. W. Hell, E. Buchner, M. Heckmann, and S. J. Sigrist. 2006. Bruchpilot promotes active zone assembly, *ca2+* channel clustering, and vesicle release. *Science*, 312(5776):1051–1054.
- T. Kues, A. Dickmanns, R. Lührmann, R. Peters, and U. Kubitscheck. 2001. High intranuclear mobility and dynamic clustering of the splicing factor *u1* snRNP observed by single particle tracking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21):12021–12026.
- A. Kusumi, Y. Sako, and M. Yamamoto. 1993. 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(5):2021–2040.
- A. Kusumi, C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R. S. Kasai, J. Kondo, and T. Fujiwara. 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. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 34:351–78.
- R. Laage, J. Rohde, B. Brosig, and D. Langosch. 2000. A conserved membrane-spanning amino acid motif drives homomeric and supports heteromeric assembly of presynaptic SNARE proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(23):17481–7.
- M. C. Leake, J. H. Chandler, G. H. Wadhams, F. Bai, R. M. Berry, and J. P. Armitage. 2006. Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes. *Nature*, 443(7109):355–358.
- S. Leal-Ortiz, C. L. Waites, R. Terry-Lorenzo, P. Zamorano, E. D. Gundelfinger, and C. C. Garner. 2008. Piccolo modulation of synapsin1a dynamics regulates synaptic vesicle exocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 181(5):831–46.
- E. A. Lemke and J. Klingauf. 2005. Single synaptic vesicle tracking in individual hippocampal boutons at rest and during synaptic activity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(47):11034–44.
- J. L. Lewis, M. Dong, C. A. Earles, and E. R. Chapman. 2001. The transmembrane domain of syntaxin 1A is critical for cytoplasmic domain protein-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(18):15458–65.
- J. Lippincott-Schwartz, N. Altan-Bonnet, and G. H. Patterson. 2003. Photobleaching and photoactivation : following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biology*, Suppl:S7–14.
- J. E. Lisman, S. Raghavachari, and R. W. Tsien. 2007. The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(8):597–609.

- T. Liu, W. C. Tucker, A. Bhalla, E. R. Chapman, and J. C. Weisshaar. 2005. SNARE-Driven, 25-Millisecond vesicle fusion in vitro. *Biophysical Journal*, 89(4): 2458–2472.
- W. Liu, V. Montana, J. Bai, E. R. Chapman, U. Mohideen, and V. Pappas. 2006. Single molecule mechanical probing of the SNARE protein interactions. *Biophysical Journal*, 91(2): 744–758.
- X. Lu, Y. Zhang, and Y. Shin. 2008. Supramolecular SNARE assembly precedes hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 15(7): 700–706.
- S. Lévi, C. Schweizer, H. Bannai, O. Pascual, C. Charrier, and A. Triller. 2008. Homeostatic regulation of synaptic GlyR numbers driven by lateral diffusion. *Neuron*, 59(2): 261–273.
- J. M. Madison, S. Nurrish, and J. M. Kaplan. 2005. UNC-13 interaction with syntaxin is required for synaptic transmission. *Current Biology : CB*, 15(24): 2236–42.
- M. Margittai, D. Fasshauer, R. Jahn, and R. Langen. 2003. The habc domain and the SNARE core complex are connected by a highly flexible linker. *Biochemistry*, 42(14): 4009–4014.
- M. Margittai, J. Widengren, E. Schweinberger, G. F. Schröder, S. Felekyan, E. Haustein, M. König, D. Fasshauer, H. Grubmüller, R. Jahn, and C. A. M. Seidel. 2003. Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26): 15516–21.
- A. Maximov, J. Tang, X. Yang, Z. P. Pang, and T. C. Sudhof. 2009. Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion. *Science*, 323(5913): 516–521.
- J. G. McNally and K. F. Sullivan. 2008. Quantitative FRAP in analysis of molecular binding dynamics in vivo. In *Fluorescent Proteins*, volume Volume 85, pages 329–351. Academic Press.
- J. Meier, C. Vannier, A. Sergé, A. Triller, and D. Choquet. 2001. Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nature Neuroscience*, 4(3): 253–260.
- A. Meir, S. Ginsburg, A. Butkevich, S. G. Kachalsky, I. Kaiserman, R. Ahdut, S. Demirgoren, and R. Rahamimoff. 1999. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol. Rev.*, 79(3): 1019–1088.
- X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss. 2005. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 307(5709): 538–544.
- G. Miesenböck, D. A. D. Angelis, and J. E. Rothman. 1998. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*, 394(6689): 192–195.
- K. M. Misura, R. H. Scheller, and W. I. Weis. 2000. Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature*, 404(6776): 355–62.
- S. J. Mitchell and T. A. Ryan. 2005. Munc18-dependent regulation of synaptic vesicle exocytosis by syntaxin-1A in hippocampal neurons. *Neuropharmacology*, 48(3): 372–80.
- S. J. Mitchell and T. A. Ryan. 2004. Syntaxin-1A is excluded from recycling synaptic vesicles at nerve terminals. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(20): 4884–8.

- C. Montecucco, G. Schiavo, and S. Pantano. 2005. SNARE complexes and neuroexocytosis : how many, how close ? *Trends in Biochemical Sciences*, 30(7) : 367–72.
- S. Nofal, U. Becherer, D. Hof, U. Matti, and J. Rettig. 2007. Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(6) : 1386–95.
- G. A. Oyler, G. A. Higgins, R. A. Hart, E. Battenberg, M. Billingsley, F. E. Bloom, and M. C. Wilson. 1989. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *The Journal of Cell Biology*, 109(6 Pt 1) : 3039–3052.
- S. Pabst, M. Margittai, D. Vainius, R. Langen, R. Jahn, and D. Fasshauer. 2002. Rapid and selective binding to the synaptic SNARE complex suggests a modulatory role of complexins in neuroexocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10) : 7838–7848.
- Z. P. Pang, O. Shin, A. C. Meyer, C. Rosenmund, and T. C. Sudhof. 2006. A Gain-of-Function mutation in synaptotagmin-1 reveals a critical role of Ca²⁺-Dependent soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive factor attachment protein receptor complex binding in synaptic exocytosis. *J. Neurosci.*, 26(48) : 12556–12565.
- J. Perrin. 1909. Mouvement brownien et réalité moléculaire. *Annales de Chimie et de Physique*, 19(8) : 5–114.
- R. Peters and R. J. Cherry. 1982. 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(14) : 4317–4321.
- D. A. Pink, D. J. Laidlaw, and D. M. Chisholm. 1986. Protein lateral movement in lipid bilayers. monte carlo simulation studies of its dependence upon attractive protein-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 863(1) : 9–17.
- H. Qian, M. Sheetz, and E. Elson. 1991. Single particle tracking, analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophysical Journal*, 60(4) : 910–921.
- S. Ramón y Cajal. 1906. The structure and connexions of neurons. *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1901-1921*.
- C. Reese, F. Heise, and A. Mayer. 2005. Trans-SNARE pairing can precede a hemifusion intermediate in intracellular membrane fusion. *Nature*, 436(7049) : 410–414.
- C. Ribault, A. Triller, and K. Sekimoto. 2007. Diffusion trajectory of an asymmetric object : information overlooked by the mean square displacement. *Physical Review E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 75(2 Pt 1) : 021112.
- J. E. Richmond, R. M. Weimer, and E. M. Jorgensen. 2001. An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature*, 412(6844) : 338–341.
- C. Rickman, F. A. Meunier, T. Binz, and B. Davletov. 2004. High affinity interaction of syntaxin and SNAP-25 on the plasma membrane is abolished by botulinum toxin e. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1) : 644–651.
- J. Rizo and C. Rosenmund. 2008. Synaptic vesicle fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(7) : 665–674.
- J. Rizo and T. C. Sudhof. 2002. Snares and munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci*, 3(8) : 641–653.
- S. O. Rizzoli and W. J. Betz. 2005. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*, 6(1) : 57–69.
- J. E. Rothman and G. Warren. 1994. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Current Biology*, 4(3) : 220–233.

- V. Ruprecht, M. Brameshuber, and G. Schutz. 2010. Two-color single molecule tracking combined with photobleaching for the detection of rare molecular interactions in fluid biomembranes. *SOFT MATTER*, 6(3):568–581.
- P. G. Saffman and M. Delbrück. 1975. Brownian motion in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(8):3111–3113.
- T. Sakisaka, T. Baba, S. Tanaka, G. Izumi, M. Yasumi, and Y. Takai. 2004. Regulation of SNAREs by tomosyn and ROCK: implication in extension and retraction of neurites. *The Journal of Cell Biology*, 166(1):17–25.
- S. Sankaranarayanan, P. P. Atluri, and T. A. Ryan. 2003. Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat Neurosci*, 6(2):127–135.
- M. Saxton. 1994. Anomalous diffusion due to obstacles: a monte carlo study. *Biophysical Journal*, 66(2, Part 1):394–401.
- M. Saxton. 1996. Anomalous diffusion due to binding: a monte carlo study. *Biophysical Journal*, 70(3):1250–1262.
- M. Saxton. 1987. Lateral diffusion in an archipelago. the effect of mobile obstacles. *Biophysical Journal*, 52(6):989–997.
- M. Saxton. 1989. Lateral diffusion in an archipelago. distance dependence of the diffusion coefficient. *Biophysical Journal*, 56(3):615–622.
- M. Saxton. 1993. Lateral diffusion in an archipelago. single-particle diffusion. *Biophysical Journal*, 64(6):1766–1780.
- M. J. Saxton. 2007. A biological interpretation of transient anomalous subdiffusion. i. qualitative model. *Biophysical Journal*, 92(4):1178–1191.
- M. J. Saxton and K. Jacobson. 1997. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 26:373–399.
- I. F. Sbalzarini. 2006. *Analysis, Modeling, and Simulation of Diffusion Processes in Cell Biology*. PhD thesis, ETH Zurich.
- J. R. Schaub, X. Lu, B. Doneske, Y. Shin, and J. A. McNew. 2006. Hemifusion arrest by complexin is relieved by ca2+-synaptotagmin i. *Nat Struct Mol Biol*, 13(8):748–750.
- G. Schiavo, M. Matteoli, and C. Montecucco. 2000. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.*, 80(2):717–766.
- T. Schikorski and C. F. Stevens. 1997. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci.*, 17(15):5858–5867.
- O. M. Schluter, F. Schmitz, R. Jahn, C. Rosenmund, and T. C. Sudhof. 2004. A complete genetic analysis of neuronal rab3 function. *J. Neurosci.*, 24(29):6629–6637.
- S. Schoch, F. Deak, A. Königstorfer, M. Mozhayeva, Y. Sara, T. C. Sudhof, and E. T. Kavalali. 2001. SNARE function analyzed in Synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science*, 294(5544):1117–1122.
- Z. Schuss. 1980. *Theory and Applications of Stochastic Differential Equations*.
- G. Schütz, H. Schindler, and T. Schmidt. 1997. Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophysical Journal*, 73(2):1073–1080.
- K. Sekimoto and A. Triller. 2009. Compatibility between itinerant synaptic receptors and stable postsynaptic structure. *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 79(3 Pt 1):031905.

- A. Serge, L. Fourgeaud, A. Hemar, and D. Choquet. 2002. Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *J. Neurosci.*, 22(10):3910–3920.
- V. Shahrezaei and K. R. Delaney. 2004. Consequences of Molecular-Level ca_2^+ channel and synaptic vesicle colocalization for the ca_2^+ microdomain and neurotransmitter exocytosis : A monte carlo study. *Biophysical Journal*, 87(4):2352–2364.
- K. Sharma, D. K. Fong, and A. M. Craig. 2006. Postsynaptic protein mobility in dendritic spines : Long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(4):702–712.
- M. Sheng and C. C. Hoogenraad. 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses : a more quantitative view. *Annual Review of Biochemistry*, 76:823–47.
- Z. H. Sheng, J. Rettig, M. Takahashi, and W. A. Catterall. 1994. Identification of a syntaxin-binding site on n-type calcium channels. *Neuron*, 13(6):1303–1313.
- M. Shtrahman, C. Yeung, D. W. Nauen, G. qiang Bi, and X. lun Wu. 2005. Probing vesicle dynamics in single hippocampal synapses. *Biophysical Journal*, 89(5):3615–3627.
- J. J. Sieber, K. I. Willig, C. Kutzner, C. Gerding-Reimers, B. Harke, G. Donnert, B. Rammner, C. Eggeling, S. W. Hell, H. Grubmüller, and T. Lang. 2007. Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5841):1072–6.
- L. Siksou, P. Rostaing, J. Lechaire, T. Boudier, T. Ohtsuka, A. Fejtová, H. Kao, P. Greengard, E. D. Gundelfinger, A. Triller, and S. Marty. 2007. Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(26):6868–77.
- L. Siksou, F. Varoqueaux, O. Pascual, A. Triller, N. Brose, and S. Marty. 2009. A common molecular basis for membrane docking and functional priming of synaptic vesicles. *European Journal of Neuroscience*, 30(1):49–56.
- S. J. Singer and G. L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 175(23):720–731.
- D. Singer-Lahat, A. Sheinin, D. Chikvashvili, S. Tsuk, D. Greitzer, R. Friedrich, L. Feinshreiber, U. Ashery, M. Benveniste, E. S. Levitan, and I. Lotan. 2007. K^+ channel facilitation of exocytosis by dynamic interaction with syntaxin. *J. Neurosci.*, 27(7):1651–1658.
- C. G. Specht and A. Triller. 2008. The dynamics of synaptic scaffolds. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 30(11-12):1062–74.
- B. L. Sprague and J. G. McNally. 2005. FRAP analysis of binding : proper and fitting. *Trends in Cell Biology*, 15(2):84–91.
- B. L. Sprague, R. L. Pego, D. A. Stavreva, and J. G. McNally. 2004. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical Journal*, 86(6):3473–3495.
- E. N. Star, D. J. Kwiatkowski, and V. N. Murthy. 2002. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci*, 5(3):239–246.
- R. B. Sutton, D. Fasshauer, R. Jahn, and A. T. Brunger. 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395(6700):347–53.
- T. Söllner, S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, and J. E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362(6418):318–324.

- J. B. Sørensen, G. Nagy, F. Varoqueaux, R. B. Nehring, N. Brose, M. C. Wilson, and E. Neher. 2003. Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell*, 114(1):75–86.
- T. C. Südhof and J. E. Rothman. 2009. Membrane fusion : grappling with SNARE and SM proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5913):474–7.
- T. C. Südhof, M. Baumert, M. S. Perin, and R. Jahn. 1989. A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to drosophila. *Neuron*, 2(5):1475–1481.
- S. Takamori, M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Grønborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brügger, P. Ringler, S. A. Müller, B. Rammner, F. Gräter, J. S. Hub, B. L. D. Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmüller, J. Heuser, F. Wieland, and R. Jahn. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4):831–46.
- E. Takao-Rikitsu, S. Mochida, E. Inoue, M. Deguchi-Tawarada, M. Inoue, T. Ohtsuka, and Y. Takai. 2004. Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and bassoon, in neurotransmitter release. *J. Cell Biol.*, 164(2):301–311.
- J. Tang, A. Maximov, O. Shin, H. Dai, J. Rizo, and T. C. Südhof. 2006. A Complexin/Syntaxin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell*, 126(6):1175–1187.
- D. W. Tank, E. S. Wu, P. R. Meers, and W. W. Webb. 1982. Lateral diffusion of gramicidin c in phospholipid multibilayers. effects of cholesterol and high gramicidin concentration. *Biophysical Journal*, 40(2):129–135.
- D. Tareste, J. Shen, T. J. Melia, and J. E. Rothman. 2008. SNAREpin/Munc18 promotes adhesion and fusion of large vesicles to giant membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(7):2380–2385.
- F. Y. Teng, Y. Wang, and B. L. Tang. 2001. The syntaxins. *Genome Biology*, 2(11):REVIEWS3012.
- H. Tokumaru, K. Umayahara, L. L. Pellegrini, T. Ishizuka, H. Saisu, H. Betz, G. J. Augustine, and T. Abe. 2001. SNARE complex oligomerization by Synaphin/Complexin is essential for synaptic vesicle exocytosis. *Cell*, 104(3):421–432.
- R. F. Toonen, O. Kochubey, H. de Wit, A. Gulyas-Kovacs, B. Konijnenburg, J. B. Sørensen, J. Klingauf, and M. Verhage. 2006. Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *EMBO J*, 25(16):3725–3737.
- R. F. G. Toonen and M. Verhage. 2003. Vesicle trafficking : pleasure and pain from SM genes. *Trends in Cell Biology*, 13(4):177–86.
- A. Triller and D. Choquet. 2008. New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. *Neuron*, 59(3):359–74.
- A. Triller and D. Choquet. 2005. Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes : and yet they do move ! *Trends in Neurosciences*, 28(3):133–9.
- M. Trus, O. Wiser, M. C. Goodnough, and D. Atlas. 2001. The transmembrane domain of syntaxin 1A negatively regulates voltage-sensitive ca(2+) channels. *Neuroscience*, 104(2):599–607.
- S. Tsuruel, R. Geva, P. Zamorano, T. Dresbach, T. Boeckers, E. D. Gundelfinger, C. C. Garner, and N. E. Ziv. 2006. Local sharing as a predominant determinant of synaptic matrix molecular dynamics. *PLoS Biology*, 4(9):e271.
- S. Tsuruel, A. Fisher, N. Wittenmayer, T. Dresbach, C. C. Garner, and N. E. Ziv. 2009. Exchange and redistribution dynamics of the cytoskeleton of the active zone molecule bassoon. *J. Neurosci.*, 29(2):351–358.

- N. Uchida, Y. Honjo, K. R. Johnson, M. J. Wheelock, and M. Takeichi. 1996. The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *The Journal of Cell Biology*, 135(3):767-779.
- M. Ueda, Y. Sako, T. Tanaka, P. Devreotes, and T. Yanagida. 2001. Single-Molecule analysis of chemotactic signaling in dictyostelium cells. *Science*, 294(5543):864-867.
- van Beijeren H and Kutner. 1985. Mean square displacement of a tracer particle in a hard-core lattice gas. *Physical Review Letters*, 55(2):238-241.
- F. Varoqueaux, A. Sigler, J. Rhee, N. Brose, C. Enk, K. Reim, and C. Rosenmund. 2002. Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of munc13-mediated vesicle priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13):9037-9042.
- W. Vaz, F. Goodsaidzaldondo, and K. Jacobson. 1984. Lateral diffusion of lipids and proteins in bilayer-membranes. *FEBS Letters*, 174(2):199-207.
- M. Veit, T. H. Söllner, and J. E. Rothman. 1996. Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25. *FEBS Letters*, 385(1-2):119-123.
- G. Vereb, J. Szöllösi, J. Matkó, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Mátyus, T. A. Waldmann, and S. Damjanovich. 2003. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14):8053-8058.
- M. Verhage and R. F. Toonen. 2007. Regulated exocytosis: merging ideas on fusing membranes. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(4):402-408.
- M. Verhage, A. S. Maia, J. J. Plomp, A. B. Brussaard, J. H. Heeroma, H. Vermeer, R. F. Toonen, R. E. Hammer, T. K. van den Berg, M. Missler, H. J. Geuze, and T. C. Südhof. 2000. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*, 287(5454):864-869.
- L. L. Voronin and E. Cherubini. 2003. "Presynaptic silence" may be golden. *Neuropharmacology*, 45(4):439-449.
- C. L. Waites, C. G. Specht, K. Hartel, S. Leal-Ortiz, D. Genoux, D. Li, R. C. Drisdell, O. Jeyifous, J. E. Cheyne, W. N. Green, J. M. Montgomery, and C. C. Garner. 2009. Synaptic SAP97 isoforms regulate AMPA receptor dynamics and access to presynaptic glutamate. *J. Neurosci.*, 29(14):4332-4345.
- T. Wang, E. A. Smith, E. R. Chapman, and J. C. Weisshaar. 2009. Lipid mixing and content release in Single-Vesicle, SNARE-Driven fusion assay with 1-5 ms resolution. *Biophysical Journal*, 96(10):4122-4131.
- P. Washbourne, P. M. Thompson, M. Carta, E. T. Costa, J. R. Mathews, G. Lopez-Bendito, Z. Molnar, M. W. Becher, C. F. Valenzuela, L. D. Partridge, and M. C. Wilson. 2002. Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci*, 5(1):19-26.
- P. Washbourne, A. Dityatev, P. Scheiffele, T. Biederer, J. A. Weiner, K. S. Christopherson, and A. El-Husseini. 2004. Cell adhesion molecules in synapse formation. *J. Neurosci.*, 24(42):9244-9249.
- T. Weber, B. V. Zemelman, J. A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T. H. Söllner, and J. E. Rothman. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 92(6):759-772.
- R. M. Weimer, J. E. Richmond, W. S. Davis, G. Hadwiger, M. L. Nonet, and E. M. Jorgensen. 2003. Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants. *Nat Neurosci*, 6(10):1023-1030.

- R. M. Weimer, E. O. Gracheva, O. Meyrignac, K. G. Miller, J. E. Richmond, and J. Besereau. 2006. UNC-13 and UNC-10/Rim localize synaptic vesicles to specific membrane domains. *J. Neurosci.*, 26(31):8040–8047.
- K. Weninger, M. E. Bowen, U. B. Choi, S. Chu, and A. T. Brunger. 2008. Accessory proteins stabilize the acceptor complex for synaptobrevin, the 1:1 syntaxin/SNAP-25 complex. *Structure (London, England : 1993)*, 16(2):308–20.
- V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, and S. W. Hell. 2008. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5873):246–9.
- K. Wiederhold and D. Fasshauer. 2009. Is assembly of the SNARE complex enough to fuel membrane fusion? *Journal of Biological Chemistry*, 284(19):13143–13152.
- S. Wieser and G. J. Schütz. 2008. Tracking single molecules in the live cell plasma membrane—Do's and don't's. *Methods*, 46(2):131–140.
- D. J. Woodbury and K. Rognien. 2000. The t-SNARE syntaxin is sufficient for spontaneous fusion of synaptic vesicles to planar membranes. *Cell Biology International*, 24(11):809–818.
- J. Xu, Z. P. Pang, O. Shin, and T. C. Sudhof. 2009. Synaptotagmin-1 functions as a Ca²⁺ sensor for spontaneous release. *Nat Neurosci*, advanced online publication.
- M. Xue, A. Stradomska, H. Chen, N. Brose, W. Zhang, C. Rosenmund, and K. Reim. 2008. Complexins facilitate neurotransmitter release at excitatory and inhibitory synapses in mammalian central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(22):7875–7880.
- M. Xue, Y. Q. Lin, H. Pan, K. Reim, H. Deng, H. J. Bellen, and C. Rosenmund. 2009. Tilting the balance between facilitatory and inhibitory functions of mammalian and drosophila complexins orchestrates synaptic vesicle exocytosis. *Neuron*, 64(3):367–380.
- D. Zenisek, J. A. Steyer, and W. Almers. 2000. Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature*, 406(6798):849–854.
- D. Zenisek, J. A. Steyer, M. E. Feldman, and W. Almers. 2002. A membrane marker leaves synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells. *Neuron*, 35(6):1085–1097.
- Q. Zhang, Y. Li, and R. W. Tsien. 2009. The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5920):1448–1453.
- Y. Zhang and Y. Shin. 2006. Transmembrane organization of yeast syntaxin-analogue sso1p. *Biochemistry*, 45(13):4173–4181.
- F. E. Zilly, J. B. Sørensen, R. Jahn, and T. Lang. 2006. Munc18-Bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes. *PLoS Biol*, 4(10):e330.
- M. M. Zita, I. Marchionni, E. Bottos, M. Righi, G. D. Sal, E. Cherubini, and P. Zacchi. 2007. Post-phosphorylation prolyl isomerisation of gephyrin represents a mechanism to modulate glycine receptors function. *EMBO J*, 26(7):1761–1771.
- N. E. Ziv and C. C. Garner. 2004. Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat Rev Neurosci*, 5(5):385–399.
- R. S. Zucker and W. G. Regehr. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annual Review of Physiology*, 64:355–405.

ANNEXES

A.1 ARTICLE 1 : DIFFUSION TRAJECTORY OF AN ASYMMETRIC OBJECT

L'article présenté ici retrace le projet que j'ai réalisé en deuxième année de master, et finalisé en début de thèse. Ce travail a été dirigé par Ken Sekimoto.

L'analyse des trajectoires que nous utilisons repose sur l'hypothèse que les particules qui diffusent sont isotropes : elles n'ont pas de direction de diffusion privilégiée et ont donc un unique coefficient de diffusion translationnel (en opposition au coefficient de diffusion rotationnel). Si une particule est anisotrope, par exemple si elle a la forme d'un bâtonnet, elle diffusera plus "facilement" dans la direction longitudinale du bâtonnet que dans sa direction orthogonale. Elle aura donc deux coefficients de diffusion translationnels, un dans chacune de ces directions. L'analyse que nous utilisons ne permet de mesurer que le coefficient de diffusion translationnel moyen d'une telle particule.

La syntaxin est une protéine ancrée en un seul point de la membrane, elle a donc un mouvement isotrope lorsqu'elle n'interagit avec aucune autre molécule. En revanche, lorsque la syntaxin interagit avec SNAP 25, une protéine également membranaire, elle forme un complexe ancré en deux points de la membrane, et pourrait avoir une diffusion anisotrope.

Nous avons donc proposé une méthode d'analyse des trajectoires pour obtenir les coefficients de diffusion translationnels et rotationnels d'une particule anisotrope en deux dimensions. Brièvement, le déplacement quadratique moyen permet d'obtenir le coefficient de diffusion translationnel moyen. Pour distinguer les deux coefficients de diffusion dans chaque direction, nous avons introduit une grandeur qui caractérise la persistance de la direction dans laquelle la particule diffuse. Une persistance longue indique une forte anisotropie de la particule. Dans l'article, nous discutons également la possibilité d'estimer ces coefficients de diffusion en pratique, en considérant notamment les temps et distance caractéristiques de l'anisotropie de la diffusion par rapport aux résolutions spatiale et temporelle des méthodes d'observation du mouvement diffusif.

Diffusion trajectory of an asymmetric object: Information overlooked by the mean square displacement

Claire Ribault* and Antoine Triller†

*Inserm, U789, Biologie Cellulaire de la Synapse N&P, Paris, France
and Ecole Normale Supérieure, Paris, France*

Ken Sekimoto‡

UMR MSC CNRS-Paris 7 7057, and UMR Gulliver, CNRS-ESPCI 7083, Paris, France

(Received 10 November 2006; published 14 February 2007)

Diffusion of an asymmetric object is characterized by its translational and rotational diffusion coefficients. Until now, anisotropic diffusion studies have been based on ensemble averages. Here we present a theoretical basis for the analysis of the trajectories of a single particle with anisotropic diffusion coefficients. We discuss the relevance of this method for motion of biomolecules in the membrane of living cells.

DOI: [10.1103/PhysRevE.75.021112](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.75.021112)

PACS number(s): 05.40.Jc, 82.37.Rs, 46.65.+g

I. INTRODUCTION

Experimental studies of diffusion of particles have originally been carried out by using methods that measure the average behavior of an entire population, such as dynamic light scattering [1] or neutron scattering [2] in physics, or fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) [3] or fluorescence correlation spectroscopy (FCS) [4] commonly used in biology. For 20 years now, optical methods have been developed for observing the motion of single particles [5,6]. These methods, referred to as single particle tracking (SPT) methods, consist in following the trajectory of a marker attached to the diffusing molecule. Transport properties of the particle are then derived through a statistical analysis of the trajectory, that includes, for instance, measurement of the mean square displacement. SPT methods thereby provide information not available through measurements of the properties of large ensembles of particles.

Visualization of the diffusive behavior of single membrane proteins in living cells has revealed that these molecules undergo a variety of motions, such as Brownian, confined, or directed motion [6,7]. In this context, SPT is a powerful tool for investigating the membrane structure and the mechanisms responsible for these motions, which ultimately influence reactions and interactions between biomolecules [8]. Current analyses of trajectories allow the determination of the translational diffusion coefficient of a symmetric molecule which undergoes isotropic diffusion.

However, in a two-dimensional isotropic homogeneous environment, asymmetric molecules have two distinct translational diffusion coefficients, D_{\parallel} for diffusion along the longitudinal (or principal) axis of the particle and D_{\perp} ($D_{\parallel} \geq D_{\perp}$) [9–11] along the transversal axis, and a rotational diffusion coefficient, D_r (see Fig. 1).

Since translational mobility is anisotropic, translational and rotational diffusion are coupled. Qualitatively, the slower

the rotational diffusion is, the longer the particle will diffuse in the same direction. As a consequence, trajectories of asymmetric molecules differ from those of symmetric ones as is illustrated by Fig. 2. A method of analyzing the motion of single anisotropic molecules was developed by Perrin [12,13]. Motivated by the recent development of SPT methods, we revisit this issue and focus on the trajectories of a single anisotropic molecule. In this study, we propose a method to deduce the translational and rotational diffusion coefficients of an asymmetric object diffusing in a two-dimensional space from the trajectory of its pointlike marker.

Our strategy has been to solve the evolution or Langevin equation, which has allowed calculation of the exact analytical expressions of some statistical quantities, that characterize the geometry of the trajectory. This analytical method is more powerful than those based on the characterization of collective properties of an ensemble of particles: the latter require knowledge of the probability distribution function, which cannot be analytically determined [14–16], and therefore are based on a perturbation approximation and are only valid for weakly asymmetric particles [16].

We present below the Langevin equation for a single asymmetric object, then the statistical functions obtained from ensembles of trajectories from which we can determine the diffusion coefficients. In the last section we discuss the relevance of this theoretical approach in a biological context.

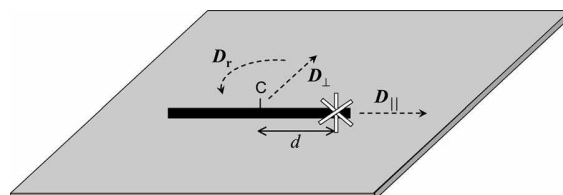


FIG. 1. Definition of principal axes of the translational diffusion coefficients, D_{\parallel} and D_{\perp} , and the rotational diffusion coefficient, D_r , around the center of diffusion (C; position $\vec{X}^{(0)}$). The marker (asterisk, position \vec{X}) is at a distance d off the center along the longitudinal direction.

*Electronic address: claire.ribault@ens.fr

†Electronic address: triller@biologie.ens.fr

‡Electronic address: ken.sekimoto@espci.fr

II. DYNAMICS OF DIFFUSING ANISOTROPIC OBJECT ON A PLANE

D_{\parallel} and D_{\perp} are the translational diffusion coefficients corresponding, respectively, to the longitudinal and transverse axes of the object, and D_r is the rotational diffusion coefficient. For simplicity of the calculation, we first describe the motion of the center of diffusion (CD), which is the appro-

prate point to which translational and rotational quantities must be referred [17]. We denote by $\vec{X}_t^{(0)} = (X_t^{(0)}, Y_t^{(0)})$ the position of the CD of the diffusing object in the xy plane, and by ϕ_t the angle made by the longitudinal axis and the positive x axis.

An extension of simple Brownian motion leads to the following coupled equations [18]:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X_t^{(0)} \\ Y_t^{(0)} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sqrt{2D_{\parallel}} \cos^2 \phi_t + \sqrt{2D_{\perp}} \sin^2 \phi_t & (\sqrt{2D_{\parallel}} - \sqrt{2D_{\perp}}) \cos \phi_t \sin \phi_t \\ (\sqrt{2D_{\parallel}} - \sqrt{2D_{\perp}}) \cos \phi_t \sin \phi_t & \sqrt{2D_{\parallel}} \sin^2 \phi_t + \sqrt{2D_{\perp}} \cos^2 \phi_t \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \Theta_{x,t} \\ \Theta_{y,t} \end{bmatrix}, \quad (1)$$

where the angle ϕ_t evolves with

$$\frac{d\phi_t}{dt} = \sqrt{2D_r} \xi_t. \quad (2)$$

The random forces, $(\Theta_{x,t}, \Theta_{y,t}, \xi_t)$, are assumed to be independent correlation-free Gaussian random noises satisfying $\langle \Theta_{x,t} \rangle = \langle \Theta_{y,t} \rangle = \langle \xi_t \rangle = 0$, and $\langle \Theta_{x,t'} \Theta_{x,t} \rangle = \langle \Theta_{y,t'} \Theta_{y,t} \rangle = \langle \xi_{t'} \xi_t \rangle = \delta(t' - t)$. The Langevin equations can be solved analytically since the evolution of ϕ_t is obtained by solving separately (2) (see the Appendix A). The position of the marker, $\vec{X}_t = (X_t, Y_t)$, is then obtained by

$$X_t = X_t^{(0)} + d \cos \phi_t, \quad Y_t = Y_t^{(0)} + d \sin \phi_t, \quad (3)$$

where d specifies the distance between the CD and the marker along the longitudinal axis (generalization to other positions of the marker is in principle feasible). Our method allows the determination of this distance d , while the exact position of the marker is not known in classical SPT experiments. We also note that the probability distribution function still cannot be determined because it requires the average over infinitely many moments ($\langle \vec{X}_t \rangle$, $\langle \vec{X}_t \vec{X}_t \rangle$, $\langle \vec{X}_t \vec{X}_t \vec{X}_t \rangle$, etc.).

In addition, the trajectories of the marker based on these equations can readily be simulated. Simulations will allow the estimation of the number of trajectories required for an accurate assessment of the diffusion coefficients. Details of the numerical method used are summarized in the Appendix C.

We define the following characteristic length and time scales,

$$\ell = \left(\frac{D_{\parallel} + D_{\perp}}{2D_r} \right)^{1/2}, \quad \tau = (D_r)^{-1}. \quad (4)$$

The above Langevin equations can then be nondimensionalized (see the Appendix A), where the anisotropy of the particle is characterized by a parameter η , which takes a value between 0 and 1,

$$\eta = (D_{\parallel} - D_{\perp}) / (D_{\parallel} + D_{\perp}). \quad (5)$$

Qualitatively, the particle does not appreciably change its orientation until it diffuses along a distance $\sim \ell$ for time $\sim \tau$.

Then, for large η (e.g., Ref. [19]), the particles which are initially randomly oriented but spatially localized around the origin will become oriented along the radial direction of their displacements at short time. See (6) and Fig. 2.

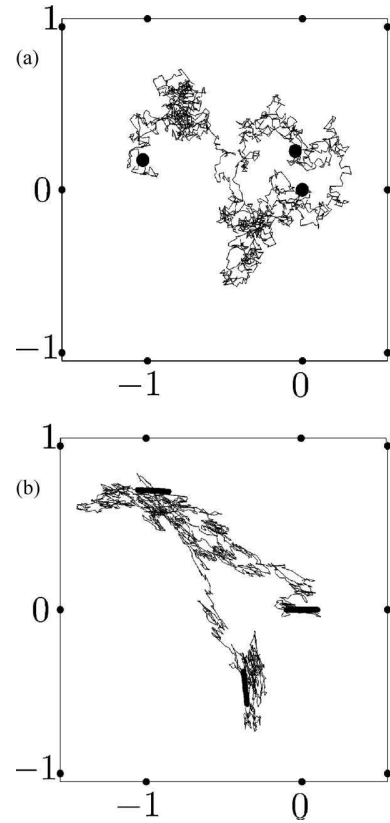


FIG. 2. Examples of trajectories of symmetric (a) and asymmetric (b) particles generated numerically. The marker on the particle is placed at the center of diffusion ($d=0$). The thick black symbols represent the position of the particle at $t=0$ [at the origin $(0,0)$], $t = \tau/2$, and $t = \tau$. The principal diffusion coefficients are chosen to be $(D_{\parallel}, D_{\perp}, D_r) = (1, 1, 1/2)$ (a) or $(1, 1/10, 1/2)$ (b), in the length units of ℓ and the time unit of τ . Spatial coordinates are also represented in units of ℓ . The time step of calculation is chosen to be $\Delta t = \tau/200$.

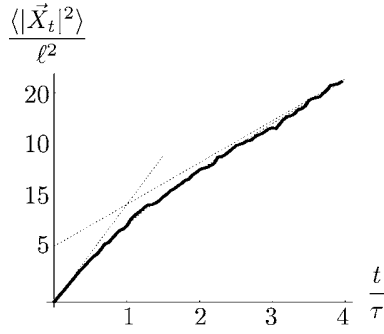


FIG. 3. Comparison of the simulated mean square displacements (MSD), $\langle |\vec{X}_t - \vec{X}_0|^2 \rangle$ ($d \neq 0$) using 600 trajectories (thick curve) with the analytical result (dashed curve). The dashed lines are the initial and final asymptotes. Except for the off-center distance of the marker chosen, $d=2\ell$, the result is completely scaled by the characteristic length ℓ and time τ , irrespective to the anisotropy parameter, η . The time step of calculation is chosen to be $\Delta t = \tau/20$.

III. STATISTICAL PROPERTIES OF TRAJECTORIES

From the solution of the Langevin equations, we are able to calculate statistical quantities that characterize the motion of the particle and thereby derive its diffusion coefficients. The analytical expressions of those quantities are presented in the Appendix B. In the analysis below we assume that the origin is at the initial position of the CD, $(X_0^{(0)}, Y_0^{(0)}) = (0, 0)$, and that the initial angle, ϕ_0 , is homogeneously distributed over the entire angle, $[0, 2\pi]$.

First, the mean square displacement (MSD) $\langle |\vec{X}_t - \vec{X}_0|^2 \rangle$ as a function of time is shown in Fig. 3.

The MSD depends on ℓ , and if d is nonzero, of d and τ . It is, however, independent on the anisotropy parameter η . In particular, if the marker is fixed at the CD of the particle, the observed MSD is linear, even though the particle is asymmetric. When the marker is not located at the CD, the MSD exhibits an initial transient that allows the determination of the characteristic time τ . The initially greater slope of the MSD is attributed to the displacement of the marker due to the rotation of the particle (which is not negligible compared to the initial small displacements due to translational diffusion), while the final slope represents only the translational diffusion. The latter asymptote is offset from the origin by $2d^2$, which results from the uncorrelated rotational fluctuations at the initial and final time, ϕ_0 and ϕ_t , respectively.

Then the anisotropy parameter η remains to be determined. Equation (1) shows that the spatial motion of the CD is not a Markov process, in the sense that the probability of a position at a future time, t_1 , is not completely specified by the position at present time $t_0 (< t_1)$, but also depends on the orientation of the particle at t_0 .

Such a correlation between the orientation of the displacement of the particle, $\vec{X}_t^{(0)}$, and that of the diffusing particle itself, \hat{u}_t , can be expressed by the following function:

$$\hat{C}(t) = \langle [\vec{X}_t^{(0)} \cdot \hat{u}_t]^2 \rangle - \frac{1}{2} \langle |\vec{X}_t^{(0)}|^2 \rangle, \quad (6)$$

where $\vec{p} \cdot \vec{q}$ denotes the scalar product. This quantity is shown in Fig. 4(a) for several values of η . The result can be inter-

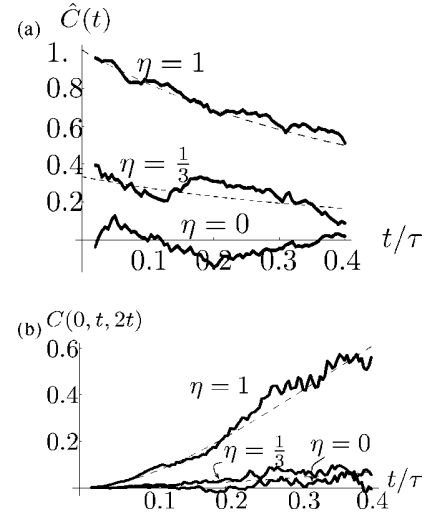


FIG. 4. Cross correlation between the displacement and particle orientation, $\hat{C}(t)$ (a), and persistence of the diffusing direction $C(0, t, 2t)$ (b). See (6) and (7), respectively, for the definitions. The functions are presented vs t/τ for various values of the anisotropy parameter, $\eta=0$ (bottom), $1/3$ (middle), 1 (top). The off-center distance of the marker was chosen to be $d=0$. Analytical results (dashed curves) are compared with the simulated data over 600 trajectories (thick curves). In (b) the calculation is truncated at $t = 0.4\tau$ since, with the present time step of calculation ($\Delta t = \tau/600$), the accuracy becomes poor beyond this point [due mainly to the fact that the function $C(0, t, 2t)$ is a subtle difference between two growing terms of $\sim t^2$].

preted as follows: For $t < \tau$ the orientation \hat{u}_t has undergone only small fluctuations with respect to the initial one, \hat{u}_0 , and the diffusive displacement, $\vec{X}_t^{(0)}$, is more or less directed along \hat{u}_0 . The analytical expression of this quantity allows determining the anisotropy parameter. However, classical SPT experiments do not reveal the orientation of the diffusing particle (see the Discussion). We propose the following function $C(0, t, t')$ to express the translation-rotation coupling in terms of the observable displacement \vec{X}_t only,

$$C(0, t, t') = 2 \langle [(\vec{X}_t - \vec{X}_0) \cdot (\vec{X}_{t'} - \vec{X}_t)]^2 \rangle - \langle |\vec{X}_t - \vec{X}_0|^2 |\vec{X}_{t'} - \vec{X}_t|^2 \rangle, \quad (7)$$

with $0 < t < t'$. Up to time $\sim \tau$ this quantity gives an estimation of the persistence of the diffusing direction, see Fig. 4(b).

In principle, the translational and rotational diffusion coefficients and the off-center distance can be derived from the MSD and the function $C(0, t, t')$. The $\langle |X_t|^4 \rangle$ has also been shown to depend on the anisotropy parameter η , but with such a subtle dependence that it does not allow deduction of the diffusion coefficients. The analytical result of $\langle |\vec{X}_t|^4 \rangle$ (see the Appendix B) however, shows clearly that the position \vec{X}_t does not obey a Gaussian distribution since it does not satisfy $\langle |X_t|^4 \rangle = 2 \langle |X_t|^2 \rangle^2$.

IV. DISCUSSION

In this paper we have developed a theoretical approach for two-dimensional diffusion of asymmetric objects in an isotropic homogeneous environment. We have focused our analysis on trajectories of a pointlike marker attached to a single diffusing particle. In particular, we have shown how the translation-rotation coupling can be uncovered using new statistical functions obtainable from these trajectories. From this analysis we have established a method to derive the diffusion coefficients of an asymmetric particle from the trajectory of a pointlike marker. We have shown that diffusion anisotropy, η , cannot be approached using the MSD: the MSD depends only on the characteristic time $\tau=(D_r)^{-1}$, the characteristic length $\ell=[(D_{\parallel}+D_{\perp})/(2D_r)]^{1/2}$, and the off-center distance of the marker with respect to the center of diffusion, d . Analyses of trajectories of diffusing membrane proteins (obtained by SPT) are usually based on MSD measurements only and, therefore, are not able to give any information about the anisotropy of the trajectory. We have established an additional statistical function, $C(0, t, 2t)$ (defined in the text) that allows the determination of the anisotropy parameter $\eta=(D_{\parallel}-D_{\perp})/(D_{\parallel}+D_{\perp})$. Therefore, when the $C(0, t, 2t)$ is combined with the MSD analysis, the three diffusion coefficients (D_{\parallel} , D_{\perp} , and D_r) can be determined. This framework can be generalized to the three-dimensional case: the mathematical structure of the Langevin equation is common to the two-dimensional case since the orientation of the particle evolves separately from that of the position vector \vec{X}_r . Practically, however, the complexity of calculations is higher in three dimensions because of the noncommutativity of rotations of three-dimensional objects [20].

From an experimental point of view, the accuracy of the determination of the diffusion coefficients depends on at least three conditions.

First, in the method we propose, the determination of the diffusion coefficients is based on statistical averages. We have not calculated the statistical error, due to the finite number of analyzed trajectories. In order to estimate the number of trajectories required to assess the diffusion coefficients, we performed numerical simulations. (Temporal discretization of Langevin equation introduces another type of error, which is discussed in the Appendix C.) These simulations indicate that a fairly good estimation of the parameters (see Figs. 3 and 4) is obtained with only a few hundreds trajectories analyzed on a time interval $t \sim \tau/2$. Such a number of trajectories can be experimentally obtained.

Second, if the orientation of a particle can be directly accessed, the rotational diffusion coefficient can be independently determined. This would facilitate the estimation of the anisotropy parameter η , through, for example, the function $\hat{C}(t)$ [see (6)]. Recently, a method based on the analysis of the light emission pattern of quantum dots (inorganic fluorescent markers [6]) has been developed to observe their orientation [21]. In another technique, two markers are attached to the diffusing particle and their relative positions inform about the orientation of the diffusing object [22]. The rotational diffusion coefficient could also be estimated by methods measuring the average behavior of the particle, such as

time resolved fluorescence anisotropy measurements for instance [23].

Third, the spatial and temporal resolutions of the techniques used for the observation of trajectories are of critical importance: they should be higher than the characteristic length and time, beyond which anisotropy is practically not appreciable. Various experimental methods such as FRAP or SPT allow determination of isotropic diffusion coefficients of symmetric membrane proteins. Based on these values, we estimate the order of magnitude of anisotropic diffusion coefficients of asymmetric membrane proteins. The characteristic length and time would be $\ell \sim 1$ nm and $\tau \sim 10$ μ s, taking $D_{\parallel}=0.2$ μ m²/s (for membrane proteins in model bilayers [10]), $D_{\parallel}/D_{\perp}=2$ (representative ratio for 3D Brownian motion in Newtonian fluids, which depends on the properties of the environment and on the particle geometry [11]), and $D_r=10^5$ s⁻¹ [24]. The spatio-temporal resolutions compatible with these characteristic parameters are beginning to be available [25–27].

Below, we discuss the relevance of this study for the diffusion of proteins in membranes of living cells.

The model we have presented is valid for particles diffusing in a homogeneous isotropic environment. This is not the case at all scales for biological membranes of living cells. The cell membrane (i) contains various membrane proteins that can either act as traps by transiently immobilizing the diffusing particle or as obstacles by hindering its diffusion [25], (ii) contains lipid microdomains, the size of which can range from tens to hundreds of nanometers [28], and (iii) is further compartmentalized with domains as large as a few hundreds nanometers in diameter [25]. This latter compartmentalization results from the existence of corrals formed by membrane proteins anchored to a submembranous cytoskeleton network. This membrane organization should be considered in a context where proteins diffuse and lipid rafts have a finite lifetime. This heterogeneity, whether structured or not, dynamic or not, is likely to affect the diffusion of proteins in the membrane. This heterogeneity can be quantified by a characteristic length below which the membrane is homogeneous and does not contain any obstacle and/or trap for the diffusing protein. The motion of a protein diffusing over such a distance should therefore remain unaffected by membrane heterogeneity. The anisotropic motion we have described in this study therefore might be visible in small homogeneous patches of membranes, i.e., when the observation length scale is small compared to the heterogeneity characteristic length. By contrast, when the protein diffuses over larger distances, its motion will be influenced by interactions with other proteins. Its behavior is expected to deviate from that of proteins diffusing in a homogeneous environment. Modifications of the membrane heterogeneity, for instance by altering the lipid composition or disrupting the actin cytoskeleton responsible for the membrane compartmentalization [25], will then help interpret deviation from the homogeneous membrane model. In addition, simulations of diffusion in crowded environments can also be performed and then compared with experimental data, as has already been done for isotropic particles [25,29]. Preceding simulations [30,31] have shown that the motion of a rod diffusing in an environment that contains fixed obstacles becomes

non-Brownian for a high density of obstacles (that is when the observation length becomes large compared to the heterogeneity characteristic length). Incorporation of the environment heterogeneity and structure into the diffusion model therefore is one of the future tasks to be challenged.

Beyond investigation of the membrane organization, observing the diffusive behavior of membrane proteins could provide a tool for studying interactions between proteins. Protein motion depends on the shape of the protein and especially, as we have shown here, on its anisotropy. Any change in the shape of the diffusing object will then reflect in its trajectory. Proteins can transiently form asymmetric complexes with some of their partners. In some cases, complex formation is induced by a ligand. For instance, tyrosin kinase receptors dimerize in response to ligand binding [32]. A change in the diffusion properties as described above will reflect interaction of the protein with the signalling partner. In other cases, complex formation is required for a protein to participate in specific cellular processes. For example, the membrane protein syntaxin binds to another protein SNAP25 to form an asymmetric complex which is involved in vesicle exocytosis [33]. In both cases, analysis of trajectories will give access to the duration of molecular interactions, thereby providing complementary data to those obtained by observing the average behavior of molecules.

Note added. A few days before submitting the present paper a report was published, dealing with the two-dimensional diffusion of an ellipsoid [34]. The authors solved the Langevin equation, as we did, and they analyzed some statistical quantities at a given time point, such as the second and fourth moments of the displacement of the center of diffusion of the particle.

In our approach, we show how the deviation from the Gaussian behavior can be evidenced by the trajectory of a pointlike marker attached to the diffusing particle at an unknown position. In particular we demonstrate that (1) the diffusion coefficients ($D_{\parallel}, D_{\perp}, D_r$) can be deduced from the trajectories of the pointlike marker and (2) a few hundred trajectories allows a good estimation of these parameters.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors especially acknowledge A. Maggs for informative discussions. This project has been carried out while one of the authors (C.R.) was at the laboratory of Physico-Chimie Theorique at ESPCI as part of the Interdisciplinary Approaches of Life Sciences master program (Paris 5 and Paris 7 Universities and Ecole Normale Supérieure). This project was financially supported by the ACI DRAB to one of the authors (A.T.).

APPENDIX A: LANGEVIN EQUATION AND ITS ANALYTICAL SOLUTION

The Langevin equation for the center of diffusion [(1) in the text] can be written in the nondimensionalized matrix form

$$\frac{d\vec{X}_t^{(0)}}{dt} = [\sqrt{2}(1+\eta)^{1/2}\hat{u}_t\hat{u}_t + \sqrt{2}(1-\eta)^{1/2}(\mathbf{1}-\hat{u}_t\hat{u}_t)] \cdot \vec{\Theta}_t, \quad (\text{A1})$$

$$\frac{d\phi_t}{dt} = \sqrt{2}\xi_t, \quad (\text{A2})$$

where the length and time units are ℓ and τ , respectively, and $\hat{u}_t = (\cos \phi_t, \sin \phi_t)^T$ is the unit vector oriented in the longitudinal axis of diffusion associated to D_{\parallel} . In polar coordinates, $(x, y) = r(\cos \theta, \sin \theta)$, the corresponding Fokker-Planck equation for the probability density, $P = P(r, \theta, \phi; t)$ writes as follows:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \left(\nabla \cdot \{ (1+\eta)\hat{u}(\phi)\hat{u}(\phi) + (1-\eta)[\mathbf{1}-\hat{u}(\phi)\hat{u}(\phi)] \} \cdot \nabla + \frac{\partial^2}{\partial \phi^2} \right) P, \quad (\text{A3})$$

where $\nabla = (\partial/\partial x, \partial/\partial y)^T$, and $\hat{u}(\phi) = (\cos \phi, \sin \phi)^T$. The above Langevin equation can be integrated analytically, because the orientational degree of freedom \hat{u}_t evolves independently of the translational ones. This is also the case in three dimensions. We may simplify the calculation by introducing the complex notations: $\mathcal{X}_t^{(0)} = X_t^{(0)} + iY_t^{(0)}$ and $\mathcal{X}_t = \mathcal{X}_t^{(0)} + \delta e^{i\phi_t}$ for $\vec{X}_t^{(0)}$ and \vec{X}_t ($\delta = d/\ell$), respectively, and $d\mathcal{B}_t = dB_{x,t} + i dB_{y,t}$ for $\int_t^{t+dt} \vec{\Theta}_s ds$. Here \mathcal{B}_t with $\mathcal{B}_0 \equiv 0$ is then a complex Wiener process, satisfying $d\mathcal{B}_s^* d\mathcal{B}_s = 2ds$ [35]. (z^* is the complex conjugate of z .) By introducing also a real Wiener process W_t through $dW_t = \int_t^{t+dt} \xi_s ds$, the equations (A1) are solved,

$$\mathcal{X}_t^{(0)} = a\mathcal{B}_t + b e^{2i\phi_0} \int_0^t e^{2i\sqrt{2}W_s} d\mathcal{B}_s^*, \quad (\text{A4})$$

where $a = (1+\eta)^{1/2}/\sqrt{2} + (1-\eta)^{1/2}/\sqrt{2}$ and $b = (1+\eta)^{1/2}/\sqrt{2} - (1-\eta)^{1/2}/\sqrt{2}$. The position of the marker is given by

$$\mathcal{X}_t = \mathcal{X}_t^{(0)} + \delta e^{i\phi_0} e^{i\sqrt{2}W_t}. \quad (\text{A5})$$

In order to derive the various statistical averages, we used the formula $\vec{Q} \cdot \vec{R} = \text{Re}[Q^* \mathcal{R}]$ that holds for any $Q = Q_x + iQ_y$, etc. For example, $\hat{u}_{t'} \cdot \hat{u}_t = \text{Re}(e^{-i\sqrt{2}W_{t'-t}})$ and the property of the Gaussian stochastic process [35] yields $\langle \text{Re}(e^{-i\sqrt{2}(W_{t'}-W_t)}) \rangle = e^{-|t'-t|}$. The calculation can be further simplified when the result does not depend on the initial angle, ϕ_0 . For instance, in the calculation of $\langle [\vec{X}_t^{(0)} \cdot \hat{u}_t]^2 \rangle$ of (B2), all the terms containing the multiplicative factor $e^{in\phi_0}$ ($n \neq 0$) can be ignored.

APPENDIX B: ANALYTICAL RESULTS OF STOCHASTIC AVERAGES

In nondimensionalized units, the MSD is

$$\langle |\vec{X}_t - \vec{X}_0|^2 \rangle = 4t + 2\delta^2(1 - e^{-t}). \quad (\text{B1})$$

There is no sign of the diffusion anisotropy, η . At short time ($t \ll 1$), the MSD is the sum of the two-dimensional MSD of

the center of diffusion ($4t$) and a term resulting from the displacement of the marker due to the rotation of the particle ($2\delta^2 t$). At long time ($t \gg 1$) only the former contributes to the growth of the MSD, while the additive constant $2\delta^2$ reflects the independent angles of the particle, ϕ_0 and ϕ_t .

The diffusion anisotropy is revealed in the statistical quantities $\hat{C}(t)$ and $C(0, t, t')$, which reflect the translation-rotation coupling and are calculated as

$$\begin{aligned} \hat{C}(t) &\equiv 2\langle [\vec{X}_t^{(0)} \cdot \hat{u}_t]^2 \rangle \langle |\vec{X}_t^{(0)}|^2 \rangle^{-1} - 1 \\ &= \eta(4t)^{-1}(1 - e^{-4t}), \end{aligned} \quad (\text{B2})$$

$$\begin{aligned} C(t', t, 0) &\equiv 2\langle [(\vec{X}_t - \vec{X}_0) \cdot (\vec{X}_{t'} - \vec{X}_t)]^2 \rangle - \langle |\vec{X}_t - \vec{X}_0|^2 |\vec{X}_{t'} - \vec{X}_t|^2 \rangle \\ &= [\eta(1 - e^{-4(t'-t)}) + \delta^2(1 - 2e^{-(t'-t)} + e^{-4(t'-t)})] \\ &\quad \times [\eta(1 - e^{-4t}) + \delta^2(1 - 2e^{-t} + e^{-4t})]. \end{aligned} \quad (\text{B3})$$

At small time $t \ll 1$, the average $C(0, t, 2t)$ increases as $16(\eta - \delta^2/2)^2 t^2$, and finally tends to a constant, $C(0, t, t') \simeq (\eta + \delta^2)^2$ at $t \gg 1$ and $(t' - t) \gg 1$. We note that the following simple relationship holds:

$$\langle |\vec{X}_t - \vec{X}_0|^2 |\vec{X}_{t'} - \vec{X}_t|^2 \rangle = \langle |\vec{X}_t - \vec{X}_0|^2 \rangle \langle |\vec{X}_{t'} - \vec{X}_t|^2 \rangle, \quad (\text{B4})$$

which is not evident knowing that the displacement vectors $\vec{X}_t - \vec{X}_0$ and $\vec{X}_{t'} - \vec{X}_t$ are correlated through the orientation of the object at time t .

The effect of anisotropy also appears in the fourth order moment of the displacement,

$$\begin{aligned} \langle |\vec{X}_t - \vec{X}_0|^4 \rangle &= 32t^2 + 32\delta^2 t(1 - e^{-t}) + \delta^4(6 - 8e^{-t} + 2e^{-4t}) \\ &\quad + \eta^2(1 - e^{-4t})^2 + 4\delta^2 \eta(1 - e^{-4t} - 4te^{-t}). \end{aligned} \quad (\text{B5})$$

This shows the non-Gaussian nature of the displacement,

$\vec{X}_t - \vec{X}_0$: even with $\delta=0$ the equality of the two-dimensional random walk, $\langle |\vec{X}_t - \vec{X}_0|^4 \rangle = 2\langle |\vec{X}_t - \vec{X}_0|^2 \rangle^2$, is not recovered.

APPENDIX C: NUMERICAL METHOD FOR SIMULATING LANGEVIN EQUATION

We have used the Heun's method, which is an improved version of the second order Runge-Kutta method. With a given nondimensionalized time step Δt , the update of the present position, $\vec{X}_{n\Delta t}$, and that of the angle, $\phi_{n\Delta t}$, at the discretized time $n\Delta t$ ($n \geq 0$) are, respectively, given as follows:

$$\vec{X}_{(n+1)\Delta t} = \vec{X}_{n\Delta t} + \frac{1}{2}(\mathcal{M}_{(n+1)\Delta t} + \mathcal{M}_{n\Delta t}) \cdot \Delta B_{n+1},$$

$$\phi_{(n+1)\Delta t} = \phi_{n\Delta t} + \sqrt{2}\Delta W_{n+1}, \quad (\text{C1})$$

where \mathcal{M}_i is the 2×2 matrix defined as

$$\mathcal{M}_i = \sqrt{2}(1 + \eta)^{1/2} \hat{u}_i \hat{u}_i + \sqrt{2}(1 - \eta)^{1/2} (\mathbf{1} - \hat{u}_i \hat{u}_i), \quad (\text{C2})$$

and $\{\Delta B_1, \Delta B_2, \dots\}$ and $\{\Delta W_1, \Delta W_2, \dots\}$ are the independent Gaussian random numbers obeying the standard normal distributions, i.e., $\langle \Delta B_n \rangle = 0$ and $\langle \Delta B_n^2 \rangle = 1$, etc.

In the Heun's scheme, the truncation error due to the temporal discretization of the Langevin equation varies as n^{-2} at each time step, where n is the number of divisions of a given time interval t of calculation (i.e., $\Delta t = t/n$). This method, therefore, results in a maximum error of $\sim n^{-1}$ through the entire interval (see, for example, Ref. [36]). For the time span of $t \sim \tau/2$, the time step of $\Delta t < \tau/600$ was sufficient for the purpose of distinguishing different values of the anisotropy parameter, η (see the figures in the text).

-
- [1] B. J. Berne and R. Pecora, *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics* (Dover, New York, 2000).
- [2] J. S. Higgins and H. C. Benoit, *Polymers and Neutron Scattering* (Oxford University Press, Oxford, 1997).
- [3] N. J. Reits and J. J. Neefjes, *Nat. Cell Biol.* **3**, E145 (2001).
- [4] S. P. Bacia and P. Schwille, *Methods* **29**, 74 (2003).
- [5] H. Geerts, M. De Brabander, R. Nyudens, S. Geuens, J. D. M. Moeremans, and P. Hollenbeck, *Biophys. J.* **52**, 775 (1987).
- [6] M. J. Saxton and K. Jacobson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 373 (1997).
- [7] A. Kusumi, C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R. S. Kasai, J. Kondo, and T. Fujiwara, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 351 (2005).
- [8] M. Dahan, S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, and A. Triller, *Science* **302**, 442 (2003).
- [9] P. G. Saffman and M. Delbrück, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 3111 (1975).
- [10] Y. Gambin, R. Lopez-Esparza, M. Reffay, E. Sierrecki, N. S. Gov, M. Genest, R. S. Hodges, and W. Urbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 2098 (2006).
- [11] A. J. Levine, T. B. Liverpool, and F. C. MacKintosh, *Phys. Rev. E* **69**, 021503 (2004).
- [12] F. Perrin, *J. Phys. Radium* **5**, 497 (1934).
- [13] F. Perrin, *J. Phys. Radium* **7**, 1 (1936).
- [14] R. Pecora, *J. Chem. Phys.* **40**, 1604 (1964).
- [15] L. I. Komarov and I. Z. Fisher, *Zh. Eksp. Teor. Fiz.* **43**, 1927 (1962).
- [16] H. Maeda and N. Saitô, *J. Phys. Soc. Jpn.* **27**, 984 (1969).
- [17] S. H. Harvey and J. García de la Torre, *Macromolecules* **13**, 960 (1980).
- [18] Y.-G. Tao, W. K. den Otter, J. T. Padding, J. K. G. Dhont, and W. J. Briels, *J. Chem. Phys.* **122**, 244903 (2005).
- [19] T. Nakata, R. Saito-Yoshitake, Y. Okada, and N. Hirokawa, *Biophys. J.* **65**, 2504 (1993).
- [20] M. X. Fernandes and J. García de la Torre, *Biophys. J.* **83**,

- 3039 (2002).
- [21] X. Brokmann, M.-V. Ehrensperger, J.-P. Hermier, A. Triller, and M. Dahan, *Chem. Phys. Lett.* **406**, 210 (2005).
- [22] M. Y. Ali, K. Homma, A. Hikikoshi-Iwane, K. Adachi, H. Itoh, K. Kinoshita Jr., T. Yanagida, and M. Ikebe, *Biophys. J.* **86**, 3804 (2004).
- [23] M. M. Krishna and A. S. N. Periasamy, *Biophys. Chem.* **90**, 123 (2001).
- [24] S. H. Park, A. A. Mrse, A. A. Nevzorov, A. A. D. Angelis, and S. J. Opella, *J. Magn. Reson.* **178**, 162 (2006).
- [25] T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Murakoshi, and K. J. A. Kusumi, *J. Cell Biol.* **157**, 1071 (2002).
- [26] K. I. Willig, R. R. Kellner, R. Medda, B. Hein, S. Jakobs, and S. W. Hell, *Nat. Methods* **3**, 721 (2006).
- [27] M. Nishiyama, E. Muto, Y. Inoue, T. Yanagida, and H. Higuchi, *Nat. Cell Biol.* **3**, 425 (2001).
- [28] M. Edidin, *Trends Cell Biol.* **11**, 492 (2001).
- [29] S. Khan, A. M. Reynolds, I. E. G. Morrison, and R. J. Cherry, *Phys. Rev. E* **71**, 041915 (2005).
- [30] A. Moreno and W. Kob, *J. Chem. Phys.* **121**, 380 (2004).
- [31] A. Moreno and W. Kob, *Philos. Mag.* **84**, 1383 (2004).
- [32] R. M. Lindsay, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* **351**, 365 (1996).
- [33] J. B. Sorensen, *Trends Neurosci.* **28**, 453 (2005).
- [34] Y. Han, A. M. Alsayed, M. Nobili, J. Zhang, T. C. Lubensky, and A. G. Yodh, *Science* **314**, 626 (2006).
- [35] C. W. Gardiner, *Handbook of Stochastic Methods: For Physics, Chemistry and the Natural Sciences*, 3rd ed. (Springer, New York, 2004).
- [36] M. T. Heath, *Scientific Computing, An Introductory Survey (Section 9.3.7.)*, 2nd ed. (McGraw-Hill, New York, 2002).

A.2 ARTICLE 2 : SYNTAXIN1A DIFFUSION REVEALS LOCAL AND
TRANSIENT SNARE INTERACTIONS

Cet article regroupe la majeure partie des résultats présentés dans cette thèse. Nous venons de le soumettre à *PLoS Biology*.

Syntaxin1A Lateral Diffusion Reveals Transient and Local SNARE Interactions.

Claire Ribault¹, Jurgen Reingruber², Patricia Machado¹, Noam E. Ziv³, David Holcman², Antoine Triller¹.

¹Biologie Cellulaire de la Synapse, INSERM U789, Ecole Normale Supérieure, Paris, France.

²Department of Computational Biology, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm 75005 Paris, France.

³The Rappaport Family Institute for Research in the Medical Sciences, Department of Physiology, Technion Faculty of Medicine, and the Lorry Lokey Interdisciplinary Center for Life Sciences and Engineering, Haifa 32000, Israel,

Financial Disclosure

The experimental costs were supported by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale”, by the “Agence Nationale de la Recherche” grant (MorphoSynDif) and by a grant from the High Council for Scientific and Technological Cooperation between France-Israel. CR has been a recipient of a fellowship from “Ministère de la Recherche et de la Technologie”, France and is now supported by “Association Française contre les Myopathies” DH research is supported by HFSP and an ERC-Starting grant.

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interest

The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations

Stx::pHGFP, syntaxin1A::pHGFP; FRAP, Fluorescence Recovery After Photobleaching; SPT, Single Particle Tracking; BoNT/E, Botulinum Neurotoxin E, KI : knock-in.

ABSTRACT

At the synapse, synaptic vesicles stably dock at a precise localisation, the active zone. However, cycles of exo- and endocytosis impose a dynamic reorganisation of the plasma membrane. Furthermore, in cellular membranes, proteins undergo a diffusive motion regulated by interactions. How the diffusive motion of membrane proteins involved in the exocytosis of vesicles is compatible both with the docking of vesicles and the constitutive remodelling of the plasma membrane is not known. As a step to overcome this apparent paradox, we studied the motion of the presynaptic membrane protein syntaxin1A. Both at the population level and at the single molecule level, we observed that syntaxin1A was rapidly exchanged between synaptic and extrasynaptic regions. We show that dramatic changes in mobility of syntaxin1A were associated with interactions related to the formation of the exocytotic complex. Finally, we propose a model describing how the observed diffusive properties of the population result from the diffusive behaviour at the single molecule level. This model allows describing the kinetics of interactions between syntaxin1A and its partners that lead to its transient stabilisation at the synapse.

INTRODUCTION

Synaptic transmission follows a precise sequence of regulated events, where synaptic vesicles fuse with the membrane, releasing neurotransmitters into the synaptic cleft, which will then bind to postsynaptic receptors. In the presynaptic compartment, exocytosis of synaptic vesicles is tightly regulated, and the resulting increase in membrane area is compensated for by matched rates of endocytosis^[1,2].

Synaptic release occurs in a context where membranes have to be considered as a two-dimensional fluid in which proteins are dispersed in a lipid matrix: this picture corresponds to the “fluid mosaic model” proposed by Singer and Nicolson^[3]. This model predicts that proteins would undergo lateral diffusion at a rate determined in part by the viscosity of the membrane, unless they are engaged in specific interactions. This model has been largely confirmed^[4] at the population^{[5][6]}, and more recently at the single molecule level^[7]. In the nervous system, the study of postsynaptic membrane proteins diffusion has revealed that despite their precise localization, receptors of neurotransmitters move in and out of the synaptic region by lateral diffusion, within minutes^[8,9]. Cytoplasmic proteins such as gephyrin^[10] and actin^[11] in the postsynaptic terminal, or Munc13^[12] and bassoon^[13] are also exchanged by diffusion between synaptic and extrasynaptic regions within the cytosol. Similarly the potassium voltage gated ion channel Eag1 also diffuses in the presynaptic terminal^[14]. Therefore, the synapse is made of a dynamic assembly of molecules having residency times much shorter than the life span of the synapse itself^[15]. Interestingly, the characteristics of these motions are related to the functional states of the synapse^[16,17] and contribute to its adaptation to neuronal activity^[18].

A specific feature of the presynaptic membrane is that it has to reconcile the stability of the docked vesicles with the ability to quickly reorganize during frequent cycles of exo and endocytosis^[18,19]. Specifically, presynaptic membrane proteins, particularly those involved

in vesicle docking and fusion, have to reconcile apparently conflicting demands: i) to form the protein complexes that participate in docking and fusion; ii) to remain relatively stationary in this form; and iii) to move away rapidly once fusion has occurred; and iv) to reconstitute the molecular composition of the presynaptic membrane for subsequent docking/fusion events. Yet to date, the molecular dynamics of presynaptic membrane proteins involved in vesicle docking and fusion remain largely unknown.

Here we investigated the lateral diffusion of syntaxin1A. Syntaxin 1A interacts with a synaptic vesicle protein, synaptobrevin2, and a plasma membrane associated protein, SNAP25. These three proteins, called SNARE proteins, assemble into a complex thought to bridge the vesicle to the plasma membrane and actively participate in its fusion^[19,20]. The regulation of vesicle fusion also involves other proteins, which bind to SNARE proteins in different ways, forming the exocytotic complex^[21]. Since syntaxin1A interacts with many of these regulatory proteins, it is at the core of the exocytotic complex^[22]. In the current study, we have characterized the motion of syntaxin 1A both at the population level using Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) and at the single (or close to) molecule level using Single Particle Tracking (SPT). We showed that syntaxin1A was rapidly exchanged between synaptic and extrasynaptic regions. Its motion was different at synaptic and extrasynaptic regions, and was modulated by its interactions with its partners. We identified some of these interactions to be related to the formation of the exocytotic complex. To further characterize these interactions, we proposed a computational model of the population dynamics (as observed with FRAP experiments) that relies on the behaviour of individual molecules (as observed with SPT experiments). This model described the different kinetics of interactions between syntaxin and its partners that ultimately lead to its transient stabilisation at the synapse.

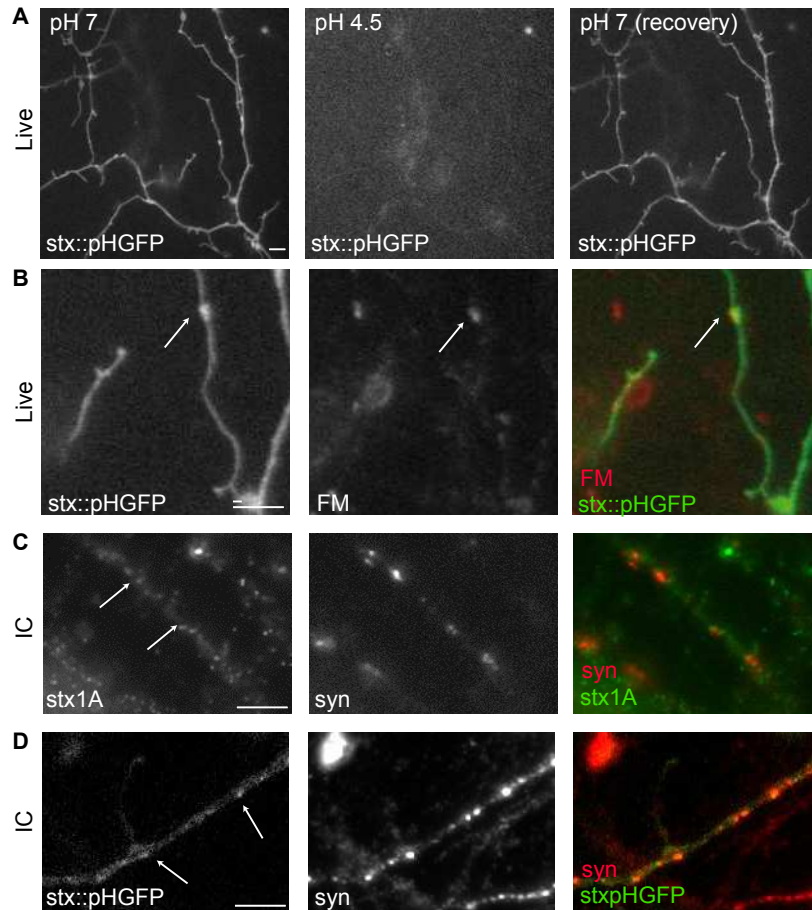


Figure 1 –Widespread distribution of stx:: pHGFP in the plasma membrane of cultured spinal cord neurons.

(A-B) Live imaging of cultured spinal cord neurons (9DIV) transfected with stx::pHGFP. (A) Surface stx::pHGFP fluorescence was quenched by bath application of medium at pH=4.5. (B) Active synapses were labelled with FM 4-64. red : FM 4-64; green: stx::pHGFP. Note that stx::pHGFP was detected at synapses (arrows) and outside of synapses. (C) Syntaxin-1A (Stx; green) and synapsin (Syn;red) IF labelling in cultured spinal cord neurons (9 DIV). (D) Synapsin (Syn;red) IF labelling in cultured spinal cord neurons (9 DIV) transfected with syntaxin1A::pHGFP (stx::pHGFP;green). Scale bar: 10 μ m

RESULTS

Syntaxin::GFP is regularly distributed along the axonal plasma membrane.

Spinal cord neurons were transfected after 8 days in vitro (DIV) with syntaxin1A fused to the pHluorin sequence (stx::pHGFP) at its extracellular C-terminus[23]. All the experiments described here were performed at 9DIV, a stage at which most spinal cord synapses are mature^[24]. pHluorin is not fluorescent at pH under 5 when excited with blue light. To ascertain that the fluorescence signal was associated to plasma membrane stx::pHGFP, we bath-applied an acidic solution (pH 4.5). This resulted in a total loss of pHGFP fluorescence, reversible under physiological pH (Fig. 1A; see also [23]); this indicated that the fluorescence signal was that of plasma membrane stx::pHGFP only. Stx::pHGFP was present both in dendrites and axons, as shown by immunostaining of transfected cells for MAP2 and Tau respectively (Fig. S1 A-B). In live neurons, axons were identified as thin neurites (compared to dendrites) containing synapses (Fig.1B), with synapses being stained with FM 4-64 (see Methods). In the following, we will focus only on axonal syntaxin1A. In live neurons, stx::pHGFP was distributed all along the axon (Fig.1B), with a slightly higher intensity at synapses ($\text{syn/extrasyn}=1.2\pm 0.02$, $\text{mean}\pm\text{SEM}$, see Fig S1 C). Immunostaining of endogenous syntaxin1A requires access to the intracellular domain of the protein (no antibody against the 6-aa extracellular domain is available), therefore the distribution of endogenous syntaxin1A could not be characterized on live cells with optical methods. In agreement with published data^[25,26], after fixation, permeabilization and immunostaining, endogenous syntaxin1A was found to be evenly distributed along axons (Fig. 1C), but formed small patches. Similarly in transfected cells the distribution of stx::pHGFP was even and patchy after immunostaining (Fig. 1D). To evaluate whether stx::pHGFP overexpression affected exocytosis, we compared the kinetics of FM 4-64 unloading under KCl application in transfected and non-transfected neurons. Consistent with previous studies in hippocampal

neurons^[27], characteristic times were on the order of tens of seconds and the unloading rate was slightly lowered in transfected cells (Fig. S1D). Overall, these data show a high similarity between the distribution of stx::pHGFP and that of the endogenous protein and a minor effect of overexpression on exocytosis.

stx::pHGFP exchange dynamics within the plasma membrane is hindered at synapses.

We compared the global dynamic behaviour of stx::pHGFP at synaptic and extrasynaptic regions. To this end, we performed Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments on 9DIV spinal cord neurons transfected with syntaxin::pHGFP. Synapses were identified following FM4-64 staining. The super-ecliptic GFP being invisible at acidic pH, the monitored signal could only be attributed to plasma membrane stx::pHGFP. We bleached circular areas of about $1\mu\text{m}$ diameter, at synaptic and extrasynaptic sites. The bleached area was larger than the synaptic region (about 200nm in diameter), but for smaller bleached areas, rates of recovery were faster but not accurately and reliably measurable. After the bleach, fluorescence was reduced to about 40% of its initial value and it gradually recovered to reach a plateau (Fig 2A-B). Comparison of the recovery levels after 6s, showed that the normalized recovery was 51% at synapses vs 66% at extrasynaptic regions ($p < 10^{-4}$) and after 28s, it was 68% vs 83% ($p < 10^{-4}$). After 150s the recovery reached a plateau, which was 84% vs 94% ($p = 0.02$) at synaptic and extrasynaptic membrane, respectively. In another approach we fitted the recovery profiles with biexponential curves. Under specific hypotheses, the parameters of this biexponential fit have a physical meaning^[28,29], but this is not the case here. However, a biexponential fit could be properly performed for most of the recovery profiles, and allowed to estimate three parameters: a short characteristic time τ_f (fast), a long characteristic time τ_s (slow), and a fraction P_f that reflects the prevalence of the short characteristic time. τ_f was 4.2s vs 2.3s ($p=0.009$), τ_s was 187s vs 126s respectively ($p = 0.17$), and P_f was 55% vs 66% ($p=0.009$) at synapses at extrasynaptic regions, respectively.

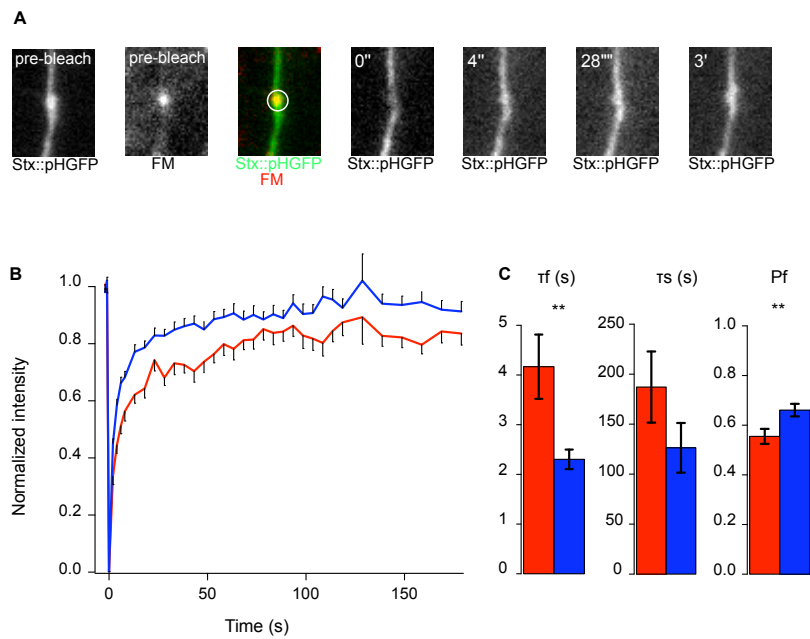


Figure 2 – Slower rates of fluorescence recovery after photobleaching of stx::pHGFP at synaptic and extrasynaptic regions.

(A) Examples of images recorded during a FRAP experiment. Images of stx::pHGFP and synapses labelled with FM 4-64 (FM) are taken before the bleach ("pre-bleach"). The bleached area is indicated by a white circle on the corresponding overlay. Images from the time lapse recording following the bleaching are shown at times 0s, 4s, 28s and 3min. (B) Averaged normalized fluorescence recovery of stx::pHGFP (mean \pm SEM) versus time at synaptic (red) and extrasynaptic (blue) regions. (C) Parameters from the biexponential fit of the experimental curves (see Material and Methods): short characteristic time τ_f , long characteristic time τ_s , and fast fraction Pf (mean \pm SEM), for synaptic (S, red) and extrasynaptic (E, blue) regions. Two-tailed t-test, ** $p < 0.01$

Both approaches indicated that the fluorescence recovery was slower at synaptic than at extrasynaptic regions.

Individual trajectories of stx::pHGFP exhibit different characteristics at synaptic and extrasynaptic regions.

FRAP only gives bulk estimates of the mobility of proteins. For a better description of the motion of stx::pHGFP, we used the Single Particle Tracking (SPT) approach which allows to follow individual trajectories with 15-20nm resolution [8]. Stx::pHGFP molecules were labelled with quantum dots (QD) pre-coupled to anti-GFP antibodies (see Material and Methods). Trajectories were then followed during 37.5s long recording sessions at 13Hz. We observed various diffusive behaviours, ranging from random motion within large areas (Fig. 3-Ai), to restricted diffusion (Fig. 3-Aii) or “pause events” (Fig. 3-Aiii). The analysis of the trajectories was based on the computation of the mean square displacement (MSD) of each particle as a function of time. Trajectories were identified as Brownian when their MSD was linear, and as confined when the MSD curve was convex (see Materials and Methods). The initial slope of the MSD, equal to 4 times the diffusion coefficient for a two-dimensional motion, was smaller at synapses than at extrasynaptic sites (Fig. 3B), indicating a smaller mean diffusion coefficient at synapses. Diffusion coefficients calculated for individual trajectories ranged from 10^{-4} to $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ both at synapses and extrasynaptic regions. $10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ was the median value for QDs dried on a coverslip, and was taken as the limit of resolution, any QDs with diffusion coefficient at or below this value were considered as being immobile. To visualize and compare these broad and non normal distributions, we plotted and compared the cumulative frequency distributions (Fig. 3C). Overall, the distribution of diffusion coefficients at synapses was significantly shifted towards smaller diffusion coefficients compared to extrasynaptic regions (Fig. 3C). The median values were $0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$ vs. $0.20 \mu\text{m}^2/\text{s}$ at synaptic and extrasynaptic loci, respectively (KS test $p=2.10^{-16}$). For confined trajectories, a diameter of the

confinement area was obtained from the asymptote of the MSD towards long times (see Materials and Methods). At synaptic regions, $72.61 \pm 3.83 \%$ of the trajectories were confined, within a surface area having a diameter of 338nm (median value – Fig 3D). For comparison, the size of the FM 4-64 staining was 692nm wide (median value; it should be noted that these values are not directly comparable since the former was estimated with a 20nm resolution, and defined a region within the membrane, while the estimation of the latter was limited by light diffraction, and the stained region corresponded to the pool of recycling vesicles). At extrasynaptic regions, only $52.07 \pm 4.55 \%$ of the trajectories were confined ($p=0.004$, Student t-test) and the confinement diameter was 662nm (median value – $p < 10^{-12}$, KS test). We analysed separately the “pause events”: some quantum dots displayed a strong and rapid decrease in the instantaneous diffusion coefficient (about two orders of magnitude). During these “pause events”, the diffusion coefficient was small (Fig 3B-C, median = $2.3 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$, comparable ($p=0.03$, KS test, $p=0.005$, Wilcoxon test) to that of QDs dried on a coverslip which is of about $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$). During these pauses the explored area was 128nm wide (median – Fig 3E). These pauses lasted from a few seconds to a few minutes (a few recordings 5-8min long were made to show that pauses could last up to a few minutes). During the 37.5s recordings, we distinguished between trajectories of particles which paused during all the recording session (“long pauses”), those for which one end of the pause could be observed (“truncated pauses”) and those for which both ends were observed (“short pause”). We calculated the frequency of these events by dividing their number by the residence time of stx::pHGFP coupled to QD at synaptic and extrasynaptic locations (see Material and Methods). Pause events were more frequent at synapses than at extrasynaptic regions (Fig 3E) (0.007 vs $3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $p=0.01$ for long ones, $3 \cdot 10^{-3}$ vs $6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $p=0.09$ for truncated pauses, and $2 \cdot 10^{-3}$ vs $1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $p=0.7$ for short pauses). The median of the duration of the short pauses was 4.5s. Therefore the short pauses are not likely to

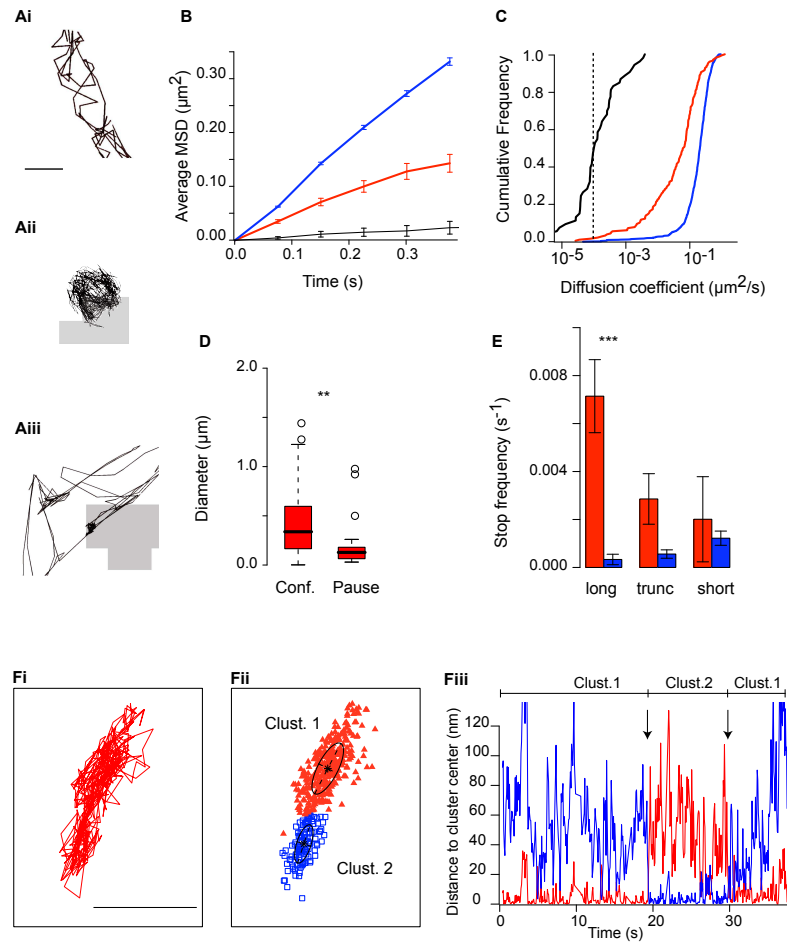


Figure 3 – Lateral diffusion of stx::pHGFP coupled to QDs in cultured spinal cord neurons.

(A) Examples of trajectories of stx::pHGFP coupled to QDs. The motion can be Brownian (Ai), confined (Aii) or display a pause event (Aiii and see text). Grey regions on Ai and Aiii correspond to synapses identified by FM 4-64 labelling. Scale bar: 300nm. (B) Average MSD (\pm SEM) for trajectories at synaptic (red) or extrasynaptic (blue) regions, and for pause events (black). (C) Cumulative frequencies of the diffusion coefficients. Same color code as in (B). Vertical dotted line indicates the threshold for quantum dots considered immobile, as measured on blank coverslips. (D) Distribution of the diameter of the confinement area at synapses (conf) or the area explored during pause events (pause) (median and 25%-75% IQR, whiskers: 5 and 95% confidence limits). KS test, ** $p < 0.01$. (E) Frequencies of the different types of pauses (mean \pm SEM) : long, truncated (trunc), and short pauses, at synapses (red) or extrasynaptic regions (blue). These different types of events are defined in the text. Two-tailed student t-test, *** $p < 0.001$. (F) Example of a “subcompartmented” trajectory. (Fi) Trajectory of a synaptic pause event. (100nm) (Fii) Two Gaussian clusters of positions were identified by a Gaussian mixture analysis (see Materials and Methods), and are shown here in red and blue. (Fiii) Distance of the QD to the centre of each cluster (identified in Fii) as a function of time (cluster 1: red, cluster 2: blue). At the beginning of the recording, the distance of the QD to the centre of cluster 1 is very small compared to that of cluster 2, indicating the QD diffuses within cluster 1. Then, the QD moves to cluster 2 (arrow), as shown by the short distance to cluster 2 relative to cluster 1. Finally, it moves back to cluster 1 (arrow).

correspond to the tail of the distribution of the long pauses, but correspond to a different population.

Some of the trajectories of the pauses displayed a specific pattern: the surface area explored could be divided into two or more subdomains separated by a few tens of nanometers (Fig 3-Fi). To further analyse these trajectories, we first classified the positions of the particle into subdomains (Fig. 3-Fii), using a Gaussian Mixture Analysis (see Material and Methods). This classification is based only on the distances between positions. Then, to test whether the particle was diffusing within the entire “peanut-shape” area or was dwelling separately in each subdomains, we measured the distance of the particle to the centre of each cluster as a function of time (Fig. 3-Fiii). We found that the particle spent a few seconds in a first subdomain before moving to the other, a behaviour that could correspond to consecutive pause events at adjacent locations. Overall, SPT revealed a large heterogeneity of diffusive behaviours. The slower, more confined diffusion and more frequent pauses at synapses were consistent with the slower recovery kinetics observed in FRAP experiments at synaptic as compared to extrasynaptic regions.

Intracellular interactions affect the trajectories of stx::pHGFP.

The motion of membrane proteins results from so-called Brownian forces (thermal agitation of lipids and other proteins), obstacles, and binding. Syntaxin1A is involved in many binding interactions, some of which are specifically synaptic. We therefore asked how intracellular interactions could influence the characteristics of the motion. To that end we generated two truncated constructs of stx::pHGFP (Fig. 4A): SNARE::pHGFP (“SNARE”), where the Habc domain was deleted, (aa 1-28, 183-288), and TMR::pHGFP (“TMR”), where both the Habc and the SNARE domains were deleted, consisting only of the transmembrane (TMR) region and a small N-terminal domain (aa 1-28, 259-288). In SPT experiments and for each construct taken independently, the motion remained different between synaptic and extrasynaptic regions

(Fig. 4): as for the full-length stx::pHGFP (“FL”), trajectories had smaller diffusion coefficients (Fig. 4B-C, $p=2.10^{-16}$, KS test), were more frequently confined (FigS2-A), the confinement surface areas were smaller (FigS2-B), and pauses were more frequent (Fig. 4D), at synaptic than at extrasynaptic regions. However, the dynamic behaviours of the three constructs were different. In order to analyse the role of the Habc domain, we compared the behaviour of the full-length construct to that of the SNARE construct (lacking much of the Habc domain). At extrasynaptic regions, the median of the distribution of the diffusion coefficients was slightly higher for the SNARE than for the FL construct (0.25 vs $0.20 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $p < 10^{-4}$ KS test). At synapses, the distribution of diffusion coefficients of the SNARE construct was not significantly different from that of the FL construct (Fig. 4C) and the proportion of confined trajectories was also unchanged (FigS2-A). However, the SNARE construct had short pauses, which were more frequent than for the FL construct (0.007 s^{-1} vs 0.002 s^{-1} , $p = 0.07$, Fig. 4D). We evaluated the contribution of the SNARE domain to the pauses by comparing the behaviour of the SNARE construct to that of the TMR construct (lacking the SNARE domain). At extrasynaptic regions, the distribution of the diffusion coefficients was shifted towards higher values (0.27 vs $0.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $p < 10^{-4}$ KS test). At synapses, the distribution of diffusion coefficients of the TMR was also shifted to higher values when compared to the SNARE construct (median $0.13 \mu\text{m}^2/\text{s}$ vs $0.063 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $p=0.01$) (Fig. 4C). The proportion of confined trajectories was also unchanged (FigS2-A). Finally, the TMR construct also displayed short pauses that were less frequent than for the SNARE construct (0.007 s^{-1} vs 0.001 s^{-1} , $p = 0.02$, Fig. 4D).

To summarize, removal of the Habc domain resulted in more frequent short pauses, whereas further removal of the SNARE domain increased the diffusion coefficient and decreased the frequency of short pauses. However, the pause events were relatively rare, which rendered the estimation of their frequency for each construct imprecise. This is likely to be due to the undersampling which is

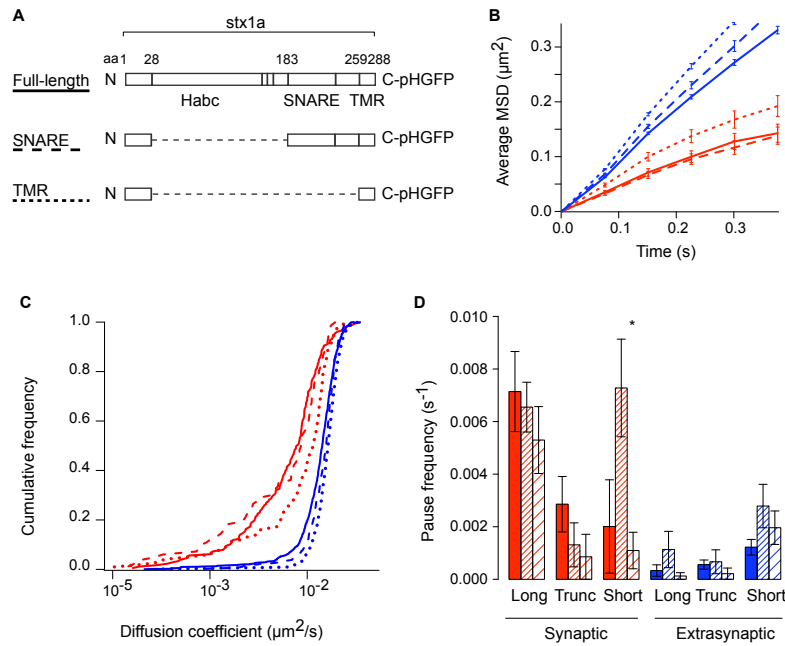


Figure 4 – Effects of deletions of the Habc and SNARE domains on the lateral diffusion of QD-labelled stx:pHGFP.

(A) Schematic representation of the three constructs of syntaxin. The full-length construct consists of syntaxin1a (stx1a) fused to the pHGFP at its C-terminal end. Stx1a consists of three main domains: the transmembrane region (TMR), the SNARE domain (SNARE) and the Habc domain. Two truncated constructs were generated: the SNARE construct (aa 1-28, 183-288) and the TMR construct (aa 1-28, 259-288). Positions of the amino acids (aa) are indicated on the full-length construct. (B) Average MSD (\pm SEM) for stx:pHGFP (solid lines), SNARE::pHGFP (dashed lines), and TMR::pHGFP (dotted lines) trajectories, at synaptic (red) or extrasynaptic (blue) regions. (C) Cumulative frequencies of the diffusion coefficients. Same color code as in (B). (D) Frequencies of the different kinds of pause events (mean \pm SEM) : long, truncated, and short pauses, at synapses or extrasynaptic regions, and for each construct (stx::pHGFP full-length : filled, SNARE::pHGFP : tight hatches; TMR::pHGFP : loose hatches). Two-tailed t-test, * $p < 0.05$

inherent to the SPT approach. The FRAP experiments were appropriate to overcome this limitation of the SPT technique.

Intracellular interactions affect the FRAP rate of stx::pHGFP

In FRAP experiments, the rates of recovery of the various constructs were slower at synaptic than at extrasynaptic regions (Fig 5 A-B). This could be quantified both by the levels of recovery at specific time points and by the parameters of the biexponential fit (Fig 5 C-D). At extrasynaptic regions, the recovery was not significantly different between the three constructs. At synapses, removal of the Habc domain led to a slower recovery for the SNARE construct as compared to that of the full-length construct: after 6s, 35% vs 51% ($p < 10^{-4}$), and after 28s, 56% vs 68% ($p = 0.009$) were recovered, and the plateau values at 150s were 75% and 84% ($p = 0.1$), respectively. Consistently, the biexponential fits indicated that the fraction corresponding to the short characteristic time was smaller for the SNARE construct than for the FL construct (45% vs 55%, $p = 0.04$). Further removal of the SNARE domain led to a faster recovery. The levels of recovery for the TMR and the SNARE constructs were 46% vs 35% ($p = 0.007$), 75% vs 56% ($p = 0.0009$) and 95% vs 75% ($p = 0.02$) after 6, 28 and 150s respectively. These differences could also be seen when comparing the parameters of the biexponential fit: τ_s was 143s vs 261s ($p = 0.05$), and P_f was 60% vs 45% ($p = 0.006$) for the TMR and the SNARE constructs respectively. In conclusion, removal of the Habc domain of stx::pHGFP slowed down fluorescence recovery process, and further removal of the SNARE domain accelerated the recovery. This was consistent with the differences in pause frequencies between the three constructs seen in SPT experiments (Fig. 4D).

Cleavage of the partner SNAP25 affects the trajectories of stx::pHGFP

SNAP-25 is the other t-SNARE protein involved in the SNARE complex. It is a palmitoylated protein, which forms a binary complex with syntaxin1A^[30]. To target SNAP-

25, we used the light chain of Botulinum toxin E (BoNT/E) that proteolyzes the 26 C-terminal amino acids residues of SNAP-25, and thereby disrupts the interaction with syntaxin1A^[31]. Because cleavage of SNAP-25 by BoNT/E is known to block calcium-dependent evoked exocytosis^{[32][33]}, FM4-64 dye cannot be used, therefore experiments were performed in spinal cord cultured neurons from knock-in mice expressing the fusion protein gephyrin::mRFP. Gephyrin is a scaffold protein stabilizing the inhibitory glycine and GABA receptors at synapses and is a core component of the post-synaptic differentiation^[34]. Inhibitory synapses represent about 65% of synapses in the spinal cord^[35]. Neurons were transfected with stx::pHGFP alone (control) or with stx::pHGFP together with the BoNT/E light chain. Stx::pHGFP expression was similar with and without BoNT/E, and widely distributed along axons as in rat spinal cord neurons. In control neurons, the same diffusive behaviours as in rat neurons were observed (Fig 6). The diffusion coefficients were lower ($0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ vs $0.18 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $p = 0.06$ wilcoxon test), the trajectories were more frequently confined (68% vs 47%, $p = 0.03$) and the confinement area was smaller (458nm vs 604 nm, $p = 10^{-5}$) at synaptic than at extrasynaptic regions. Pauses were also more frequent at synaptic than extrasynaptic regions (0.01 vs $6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $p = 0.1$ for long ones, $6 \cdot 10^{-3}$ vs $9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $p = 0.008$ for truncated pause events, and 0.01 vs $2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $p = 0.01$ for short pause events). In the presence of BoNT/E, differences between synaptic and extrasynaptic behaviours could still be seen: diffusion was slower ($0.13 \mu\text{m}^2/\text{s}$ vs $0.23 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $p < 10^{-5}$ wilcoxon test) and trajectories were more confined at synapses (68% vs 45%, $p = 0.001$), with more frequent pauses, compared to extrasynaptic regions (0.005 vs $3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $p = 0.08$ for long pauses, $5 \cdot 10^{-3}$ vs $8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $p = 0.01$ for truncated pauses, and $7 \cdot 10^{-3}$ vs $1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $p = 0.01$ for short pauses). However, the cleavage of SNAP-25 by the BoNT/E slightly increased the diffusion coefficient of stx::pHGFP at synaptic and extrasynaptic regions (0.12 to $0.13 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $p = 0.06$, and 0.18 to $0.23 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $p < 10^{-3}$) (Fig. 6A-B) but neither the fraction of confined trajectories nor the size of the confinement

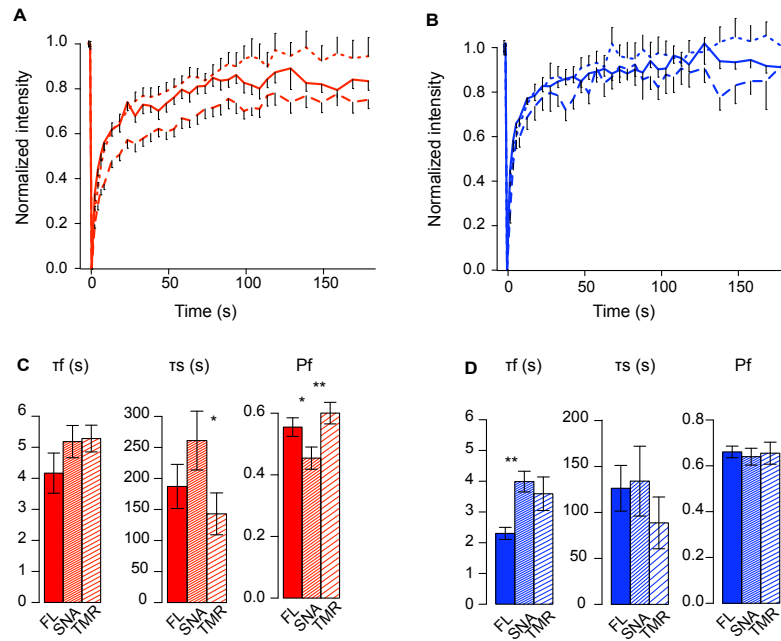


Figure 5 – Effects of deletions of the Habc and SNARE domains on the FRAP rates.

(A) Averaged normalized fluorescence recovery (mean \pm SEM) of stx::pHGFP (solid line), the SNARE::pHGFP construct (dashed line) and the TMR::pHGFP construct (dotted line) versus time, at synaptic locations. (B) Averaged normalized fluorescence recovery (mean \pm SEM) of the three constructs at extrasynaptic locations as a function of time. Same line code as in (A). (C) Parameters from the biexponential fit of the synaptic experimental curves (see Material and Methods): short characteristic time τ_f , long characteristic time τ_s , and fast fraction Pf (mean \pm SEM), for the three constructs, full-length (filled), SNARE::pHGFP (tight hatches) and TMR::pHGFP (loose hatches). Two-tailed t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (D) Parameters from the biexponential fit of the extrasynaptic experimental curves. Same codes as in (C).

domain (Fig. 6A and S2), nor the frequency of short pauses were affected (Fig. 6C). However, the frequency of all types of pauses taken together was decreased (0.032 s^{-1} to 0.017 s^{-1} , $p=0.06$, MW test). Finally, the median duration of the pause events was decreased from 3.75s to 1.65s ($p=0.11$ KS test) under BoNT/E expression (Fig. 6D).

Overall, cleavage of SNAP25 increased the diffusion of stx::pHGFP and the pauses tended to be less frequent and shorter.

Botulinum neurotoxin E affects the exchange dynamics of stx::pHGFP

FRAP was performed at synaptic and extrasynaptic regions, in neurons transfected with stx::pHGFP (control) alone or co-transfected with stx::pHGFP and BoNT/E. In control neurons as well as in co-transfected neurons, the recovery was slower at synaptic regions than at extrasynaptic regions (Fig 7A). With BoNT/E the rate of recovery was not modified at extrasynaptic regions, but at synapses, the presence of BoNT/E led to a faster recovery (Fig 7A). More precisely recovery was 39% vs 44% at 6s ($p=0.1$) 59% and 69% at 28s ($p=0.02$), and then 80% and 87% at 150s ($p = 0.1$) without and with BoNT/E respectively (Fig 7B). The parameters of the biexponential fit were not significantly different (Fig 7C), but a biexponential fit is not appropriate for this type of recovery (see discussion).

Thus, preventing interaction between stx::pHGFP and SNAP-25 resulted in a faster recovery at synapses, being consistent with SPT data. Since SNAP-25 interacts with the SNARE domain of stx::pHGFP, these results are also consistent with the increased mobility observed after removal of the SNARE domain of stx::pHGFP.

Modelling diffusion and binding of stx::pHGFP based on SPT and FRAP experiments.

FRAP experiments usually provide information related to kinetics, obtained by averaging over a population of molecules in a specific region. The interpretation of FRAP curves requires assumptions about the underlying diffusive properties of the individual molecules and their

environment^[28,29]. In contrast, SPT gives a direct access to the lateral motion of individual molecules. In order to identify the diffusive properties, including the interactions, that underlie the recovery in FRAP experiments, we proposed a model for the diffusion and binding of stx::pHGFP based on SPT observations. This model allows us to use different parameters, some measured in SPT experiments and others estimated by fitting the FRAP curves. The strength of this approach is that it combines both SPT and FRAP data to construct, verify and constrain the model.

The proposed model relies on stx::pHGFP diffusion and binding events observed in SPT experiments. The observed pause events were attributed to binding interactions where stx::pHGFP was quasi-immobilised, as detailed in the discussion section. In addition, the distribution of the pause durations (short pauses lasting a few seconds and long pauses lasting from tens of seconds to minutes), suggested at least two binding reactions with different binding times. Therefore, the model consists of (i) the free diffusion of stx::pHGFP, (ii) a fast binding reaction (s), and (iii) a slow binding reaction (min). In addition, as detailed in the discussion section, these binding events are thought to reflect the formation of the exocytotic molecular complex, but we do not exclude that cluster may also be formed. In this process, syntaxin1A is expected to interact with SNAP-25 to form an “acceptor complex” which then allows for the formation of a more stable complex via binding to synaptobrevin2 for instance^[30]. More specifically, we proposed the following model:

- (i) S_0 , free stx::pHGFP, can diffuse freely.
- (ii) S_0 can bind to a first partner, M_1 , to form an immobilised “acceptor complex” S_1 . This reaction which accounts for the short pauses is described by the forward binding rate k_{01} and the backward rate k_{10} .
- (iii) S_1 can bind to a second partner, M_2 , to form the immobilised complex S_2 . S_2 is immobilised. This reaction accounts for the long pauses and is characterized by the forward binding rate k_{12} and the backward rate k_{21} .

In summary, we have the following chemical reactions:

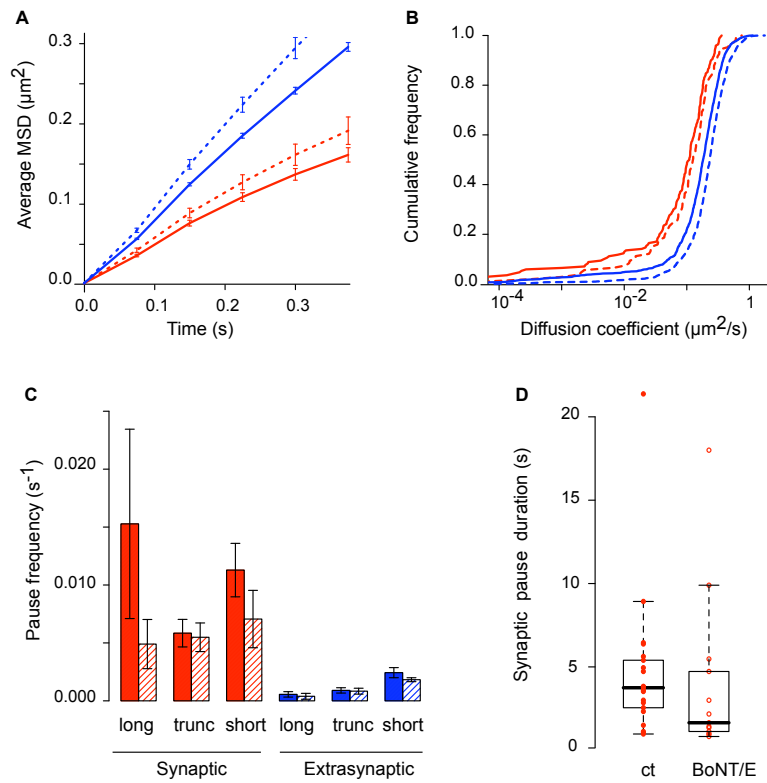


Figure 6 – Effects of SNAP25 cleavage on the lateral diffusion of QD-labelled stx:pHGFP.

Neurons were transfected either with stx::pHGFP alone or with both stx::pHGFP and the light chain of the botulinum neurotoxin E (BoNT/E), that specifically cleaves SNAP25. (A) Average MSD (\pm SEM) of trajectories of stx::pHGFP in control cells transfected with stx:pHGFP only (solid lines), and cells co-transfected with stx::pHGFP and BoNT/E (dotted lines), at synaptic (red) or extrasynaptic (blue) regions. (B) Cumulative frequencies of the diffusion coefficients. Same color and line codes as in (A). (C) Frequencies of the different kinds of pause events (mean \pm SEM): long truncated and short pauses, at synapses or extrasynaptic and for control (filled) and co-transfected cells (hatches). (D) Box and whiskers plot of the duration of synaptic pauses, for control (ct) and co-transfected (BoNT/E) cells. The thick line is the median, the box extends from the first to the third interquartile, and whiskers extend to 1.5 times the interquartile. Each point represents a pause event.

$$S_0 + M_1 \underset{k_{10}}{\overset{k_{01}}{=}} S_1$$

$$S_1 + M_2 \underset{k_{21}}{\overset{k_{12}}{=}} S_2$$

At a molecular level, the backward rate is the reciprocal of the mean binding duration [36]. For short pauses, i.e. for the first reaction, the parameter k_{10} was obtained directly from the duration of the short pauses measured in SPT. For long pauses (minutes), the parameter k_{21} could not be precisely estimated from the SPT data because the duration of the long pauses was longer than the recording time in most experiments (37.5s). Instead, we estimated k_{21} by fitting the FRAP curves. The forward rates k_{01} and k_{12} correspond to the frequency of the binding events. In principle, these frequencies can be measured in SPT experiments, but this estimation might be biased due to the undersampling which is inherent to SPT experiments. Another limitation is that pauses shorter than 1s could not be detected. We therefore estimated the forward rates by fitting the FRAP curves by reaction-diffusion equations described in the supplementary materials. The effective diffusion coefficient was measured in SPT experiments. Details of the model are described in the supplementary materials.

We assumed that the same model for the `stx::pHGFP` interactions holds in the synaptic and extrasynaptic regions; however, the values of the parameters are likely to depend on the regions. Since the synaptic region is surrounded by an extrasynaptic region, FRAP recovery measured at synaptic regions depended on both synaptic and extrasynaptic diffusive behaviours. In contrast, extrasynaptic FRAP experiments depended only on the extrasynaptic diffusive behaviour. We thus use our model for `stx::pHGFP` interactions in each region but with a priori different parameter values. Consequently, we first fitted extrasynaptic FRAP curves and obtained a first set of values for the extrasynaptic parameters. Then we used these values as inputs to fit the synaptic FRAP curves, where only the synaptic parameters were adjusted (Fig. 8A-B). The FRAP curves obtained in the conditions described in the

experimental approach (FL, SNARE and TMR construct, and control and BoNT/E conditions) were fitted using the numerical simulations of the reaction-diffusion equations of the model.

Extrasynaptic curves were fitted properly under the hypotheses of the model. In particular, we verified the assumption that the same model applies in the synaptic and extrasynaptic regions, but with different values of the parameters (table 1 and S1). Since the extrasynaptic curves were not significantly different, we do not discuss the slight differences between the fitted parameter values for the different conditions. At synapses, we first focused on the affinity constant (the ratio of the forward to the backward binding rates, which is equal to the ratio of bound to free molecules at equilibrium). For all conditions, the affinity constants of both binding reactions were higher at synaptic than extrasynaptic sites (by roughly a factor 2). This indicated that the proportion of bound molecules is higher at the synapse compared to the extrasynaptic region (table 1). Deletion of the Habc domain increased the affinity constant of the first reaction but left the affinity constant of the second reaction unchanged (Fig. 8A, dotted red line compared to dotted black line, and table 1). Removing the Habc domain reinforced the affinity of the first reaction. This effect is detailed in the discussion section. Further deletion of the SNARE domain led to a decrease of both affinity constants (Fig. 8A, dotted blue line and table 1). We conclude that the SNARE domain was therefore involved in both the short and the long binding. Noticeably, the TMR construct that contains only of the transmembrane region of syntaxin1A was still involved in some binding as indicated by the affinity constants. Finally, cleavage of SNAP25 resulted in a smaller affinity constant for the second reaction (Fig. 8B and table 1). The long binding reaction was therefore “destabilised” in the absence of SNAP25. The affinity constant of the first reaction remained almost unchanged.

In addition, the first (s) and the second (min) reactions are coupled: the second one relies on the formation of a complex by the first one. To study the implications of this coupling in the kinetics of recovery, we compared the recovery

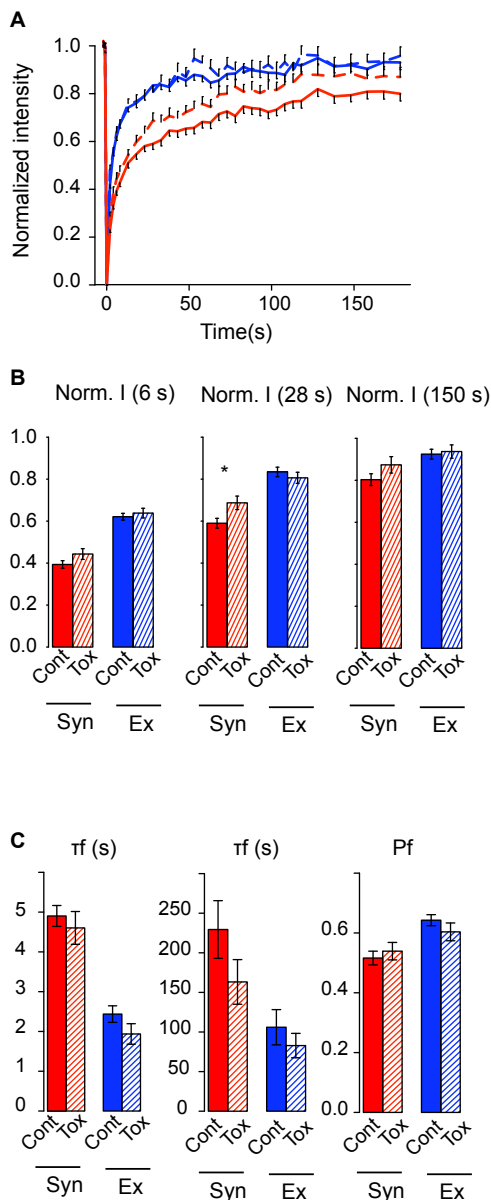


Figure 7 – Effects of deletions of SNAP 25 cleavage on the FRAP rates.

(A) Averaged normalized fluorescence recovery (\pm SEM) of stx::pHGFP in control cells (solid line) and in cells co-transfected with BoNT/E (dotted line) versus time, at synaptic (red) and extrasynaptic (blue) locations. (B) Averaged normalized intensity of fluorescence recovery (\pm SEM) of stx::pHGFP after 6s, 28s and 150s), in control cells (filled) and cells co-transfected with BoNT/E (hatches), at synaptic (red) and extrasynaptic (blue) regions. * $p < 0.05$. (C) Parameters from the biexponential fit of the experimental curves (see Material and Methods): short characteristic time τ_f , long characteristic time τ_s , and fast fraction Pf (mean \pm SEM), in control cells (filled) and cells co-transfected with BoNT/E (hatches), at synaptic (red) and extrasynaptic (blue) regions.

curves for different values of the affinity constant of the first reaction (Figure 8C). Interestingly, varying the affinity constant for the first reaction impacts the recovery up to minutes, which is longer than the characteristic time of the first reaction (few seconds). The higher this affinity constant is, the slower the fluorescence recovers. The explanation is that if the amount of bound molecules in the first reaction increases, the amount of bound molecules in the second reaction will also increase, leading to a slower recovery at long time scale. This effect was also observed after the N-terminal deletion of stx::pHGFP: the first affinity constant was increased, and the late recovery was slower, compared to those of the full-length construct. As expected, varying the second affinity constant also affected the late recovery (Fig S3).

Looking more specifically at all the fitted binding rates, it was notable that, in all conditions, the fitted values of the forward binding rate (that corresponds to the frequency of short binding) were higher than the measured frequency of short pauses (by at least one order of magnitude, table 1 and Fig 4D and 6C). Briefly, hypotheses to account for this discrepancy include (i) the non-detection of very short pauses (<1s) and (ii) a labelling bias (see discussion). The rates of the second reaction could not be accessed directly with SPT experiments. However the fits indicated that the backward binding rate ranged from 50s for the TMR construct to 2min for the FL construct (table 1).

In conclusion, combining the modelling of FRAP recovery with SPT data allowed us to identify two coupled kinetics of interactions, associated with different domains of stx::pHGFP: (i) a long binding reaction (about 2min), that involved the SNARE domain and more specifically its binding to SNAP25 and (ii) a short binding reaction (a few seconds), that involved the N-terminal, SNARE and indirectly the transmembrane domains of stx::pHGFP.

DISCUSSION

We have studied the motion of stx::pHGFP by using FRAP and SPT, two complementary techniques which give access to different characteristics of diffusion at different scales. We have shown that stx::pHGFP rapidly moved in and out of synapses and was slowed down at synapses, where they exhibited frequent pauses. In addition, deletions of some domains of syntaxin or cleavage of SNAP25 affected the lateral diffusion of stx::pHGFP. Finally, we have proposed a model that combines FRAP and SPT data and provides a qualitative and quantitative characterization of these interactions. Below we discuss how these interactions, that modulate the lateral mobility of stx::pHGFP, are related to the formation of the exocytotic complex, and how they lead to the transient stabilisation of stx::pHGFP at the active zone.

Different behaviours at synaptic and extrasynaptic regions

FRAP revealed that stx::pHGFP was exchanged between the synaptic and extrasynaptic regions at a fast rate: the characteristic time was in the range of a few seconds, to be compared with many minutes for Munc13, a cytoplasmic protein accumulated in the presynaptic terminal that interacts with many partners^[12]. FRAP recovery curves had at least two components, which may reflect different molecular interactions. At short time scales (few seconds), the recovery was slower at synaptic than at extrasynaptic regions, indicating fast and reversible interactions at synapses. At a longer time scale (2-3min), the recovery was also lower at synaptic than at extrasynaptic regions, suggesting the existence of interactions with long characteristic time at synapses.

The diffusion coefficient of individual molecules could be measured directly in SPT experiments. The diffusion coefficients were smaller at synaptic than at extrasynaptic regions. It should be noticed that labelling of stx::pHGFP with a quantum dot did not limit its diffusion, since it could still be accelerated in some conditions (e.g. under SNAP25 cleavage). The slowdown of stx::pHGFP could be due to

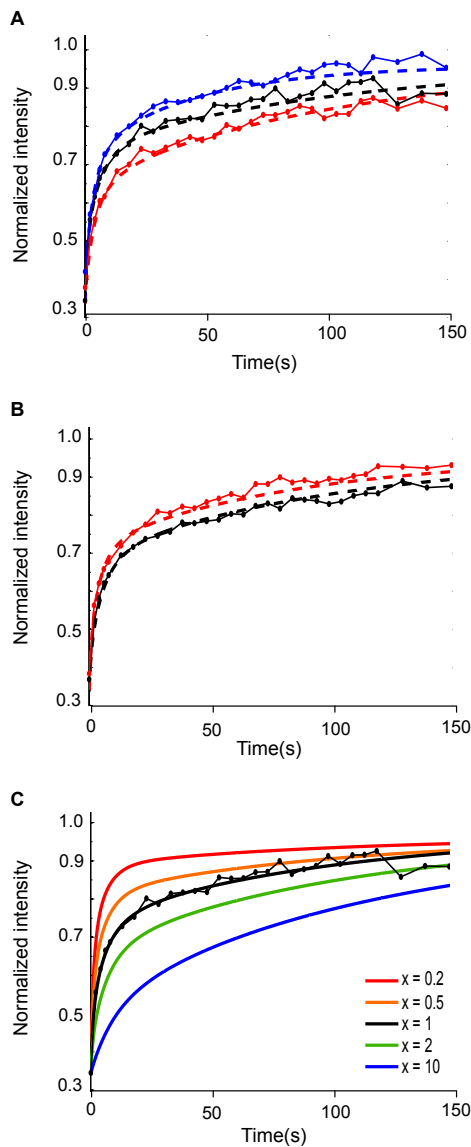


Figure 8 – Simulations of FRAP with a model of two coupled binding reactions based on SPT data.

(A) Simulation of FRAP for the three different constructs (stx::pHGFP, black - SNARE::pHGFP, red - TMR::pHGFP, blue) at synaptic regions. Experimental data are shown in solid line, simulated data in dashed line. (B) Simulation of FRAP for conditions with and without BoNT/E (control, black - BoNT/E, red) at synaptic regions. Experimental data are shown in solid line, simulated data in dashed line. (C) Sensibility of the recovery to the kinetics of the first (fast) reaction. The recovery is simulated for varying values of k_{01} . The values of k_{10} , k_{12} , and k_{21} are equal to those that fit the recovery of the full-length construct (black curve in (A)). The different values of k_{01} are equal to the x times the value that fit the recovery of the full-length construct ($x = 0.2$, red - $x = 0.5$, orange - $x = 1$, black - $x = 2$, green - $x = 10$, blue). The full circles are experimental data points of the recovery of the full-length construct. Note that even if only the rate of the fast reaction is affected (s), the recovery is altered at long time scale (min).

fast and reversible interactions with obstacles or partners^[37-39], as suggested by FRAP experiments (see above). Indeed, electron microscopy shows that the presynaptic active zone is crowded, as suggested by the presence of electron dense material^[40]. Many molecules which may contribute to the crowding are present in this area, including membrane proteins such as calcium channels, adhesion proteins (neurexins, cadherins) and SNAP-25, as well as submembrane proteins such as Bassoon^[40,41] and Cast/Erc^[40]. This crowding may also be at the origin of the confinement observed in some trajectories. At synapses, about 75% of the trajectories were confined (as opposed to Brownian). The confinement diameter – a characteristic size of the region in which the motion is hindered by interactions – was of about 330nm. This size was comparable to that of the synaptic zone^[40]. Catenin and cadherin, which are localised at the border of the active zone^[42], may constitute obstacles to diffusion. Other membrane proteins anchored to the cytoskeleton could also account for such a subdiffusive behaviour^[43]. However, the confined trajectories did not have a significantly longer dwell time at synapses compared to the Brownian trajectories (data not shown). This suggests that the confinement was not a major determinant of the recovery observed in FRAP experiments. At extrasynaptic regions, 50% of the trajectories were confined, and the confinement size was about 660nm. This confinement may result from the presence of obstacles in the extrasynaptic plasma membrane^[43].

One of the most striking features of the diffusion of stx::pHGFP was the occurrence of pauses, which are periods during which the molecule appeared to be quasi-immobilized. These pauses were more frequently observed at synaptic than at extrasynaptic regions. Some pauses detected extrasynaptically could have occurred at unlabelled synapses: FM 4-64 used in this study only labelled active synapses, and could miss nascent or silent synapses; in experiments performed on neurons from mRFP::gephyrin-KI mice neurones, excitatory synapses were unlabelled (they represent 30% of the total number of synapses^[35]). During

pauses, the surface area explored by stx::pHGFP had a diameter of about 120nm, notably smaller than that of the synaptic area. This value is comparable to that of the “caging diameter” of docked synaptic vesicles (100nm) as measured by Westphal, *et al.*^[44] (in hippocampal neurons) or by Nofal, *et al.*^[45] (in chromaffin cells). The duration of the pause could be either short in the range of a few seconds, or longer than that of the recording session (37.5s). Interestingly the duration of vesicle docking at the membrane has been shown to be variable and within the same range of magnitude^[46,47]. The simpler hypothesis accounting for these pauses is that stx::pHGFP was involved in interactions being responsible for this quasi-immobilization. Since syntaxin1A is at the core of the exocytotic complex, these pauses could be related to the formation of this exocytotic complex. It can also be noticed that extrasynaptic pauses could also correspond to loci for extrasynaptic exocytosis^[48].

Interactions reflected in the motion of stx::pHGFP

In order to identify the interactions responsible for the characteristics of the motion of stx::pHGFP, we first used truncated versions of stx::pHGFP, and then targeted specifically one of its partners, namely SNAP-25. First, at synapses, the deletion of the Habc domain resulted in an increased frequency of short pauses, and a slower fluorescence recovery, as compared to the full-length construct. This suggests that the Habc domain somehow inhibited interactions between stx::pHGFP and some partners. The binding of Munc18 to the closed conformation of syntaxin1A *via* the Habc domain is known to inhibit binding of the SNARE domain of syntaxin1A to other molecules^[49,50]. This suggests that the pauses observed and the slowdown of FRAP could be partly related to binding of stx::pHGFP *via* its SNARE domain. Indeed, removal of the SNARE increased the diffusion coefficient at synapses, reduced the frequency of short pauses, and was associated with a faster fluorescence recovery in FRAP experiments. These data further support the possibility that the pause events and the slow synaptic recovery in FRAP

experiments were partly due to interactions *via* the SNARE domain. Partners that interact with the SNARE domain of syntaxin1A include SNAP-25 and synaptobrevin2^[19,21], synaptotagmin, complexin^[51] and tomosyn^[52], all of which are involved in the formation of the exocytotic complex. Noticeably, this construct (TMR) that lacks the SNARE domain still exhibited few pauses. The transmembrane region is known to interact with itself to form homodimers^[53], and is also involved in the binding to calcium channels^[54]. The TMR construct could therefore bind to endogenous syntaxin1A molecules already immobilized by interactions *via* its SNARE domain, within the exocytotic complex. Binding to calcium channels in the presynaptic active zone could also lead to long pauses. The exocytotic complex has already been described as a super-assembly of SNARE complexes possibly involving other proteins such as calcium channels^[55]. To further characterize the implication of molecular components of the exocytotic complex in stx::pHGFP motion, we specifically targeted SNAP-25, the other t-SNARE. When SNAP-25 was cleaved, a slight increase in the diffusion coefficient was observed at synapses. No significant difference in the number of pauses was noticed, but short pauses had a shorter duration. This indicated a destabilisation of the bound state of stx::pHGFP. In FRAP experiments, cleavage of SNAP-25 by BoNT/E resulted in a faster recovery at synapses, which further suggested that interactions were shortened and/or less likely to occur. Therefore SNAP-25 also contributing to the pause behaviour of stx::pHGFP.

In summary, both the bulk FRAP approach and the molecular description obtained in SPT experiments indicate that pauses correspond to binding events related to the formation of the exocytotic complex: (i) pauses were mostly synaptic; (ii) the explored region had a size comparable to that of the caging diameter of synaptic vesicles; (iii) the frequency of short pauses depended on interactions *via* the N-terminal domain consistently with the role of Munc proteins in the exocytotic complex formation; (iv) the SNARE domain was

involved in the pause behaviour; (v) the duration of short pauses depended on interactions with SNAP-25.

Modelling diffusion and binding of stx::pHGFP based on SPT and FRAP.

The combination of FRAP and SPT data allowed us to propose a scenario for the diffusion and binding of stx::pHGFP. Indeed, classical FRAP analysis using biexponential fits relies on specific assumptions about the diffusive properties of the molecule that were not verified for the diffusive behaviour of syntaxin at synapses^[28,29] due to local heterogeneities as seen with SPT. Indeed, the FRAP recovery curves could not be fitted by simulations based only on free diffusion (data not shown). We built our model based on SPT observations, in which stx::pHGFP is involved in two coupled binding reactions, the first corresponding to short pauses (s), and the second to long pauses (min). We showed that the experimental FRAP curves obtained in all the conditions mentioned above (3 constructs and control and BoNT/E conditions) were fitted within this model. The sensitivity of the model to the parameters was illustrated by the fact that 2 fold change in the first or second affinity constants resulted in a noticeable discrepancy between the simulated and the experimental recoveries.

The kinetic parameters obtained contributed to characterize the interactions that modulate the motion of stx::pHGFP. First, deletion of the N-terminal domain resulted in a higher affinity constant of the first reaction. This is consistent with the experimental data, and also suggests that the presence of the N-terminal domain inhibits interactions, possibly *via* binding to Munc18. The affinity constant of the second reaction remained unchanged, suggesting that once the first reaction has taken place, the second reaction does not depend on the N-terminal domain. Second, the model revealed that the affinity constants of the two reactions were decreased in the absence of the SNARE domain. This indicated that the SNARE domain was involved in both binding reactions. Third, when SNAP-25 was cleaved by BoNT/E, the affinity constant of the second reaction was

decreased. This suggested that the long interactions in which stx::pHGFP was engaged were destabilised in the absence of SNAP-25. Surprisingly, the equilibrium constant of the first reaction was unchanged, with a shorter duration of this short binding compensated by a higher forward binding rate. In summary, the computational model provided orders of magnitude of the kinetic parameters of stx::pHGFP, and showed how they were modified under the different conditions, although it could not capture all the complexity of the interactions of syntaxin1A in a mechanistic way. Incidentally, it should be noticed that the forward rate of the first reaction was higher than the measured frequency of short pauses measured in SPT. This discrepancy could be accounted for by (i) the fact that pauses shorter than 1s were not identified experimentally, by (ii) a labelling bias, and/or by (iii) an overestimation of the residence time at synapses (due to an overestimation of the size of the synapse). Finally, Sieber *et al* observed and modelled the diffusion of syntaxin1A in neuroendocrine cells^[56]. In their model, the dynamics of syntaxin was accounted for only by diffusion and homologous interactions with a backward reaction rate $25,000 \text{ s}^{-1}$. Nevertheless, comparison with our results remains difficult, since the membrane organisation and composition and the exocytosis mechanism differ between neuroendocrine cells and neurons. However, our computational model which is based on the minimal assumption of two different kinetics associated with two different chemical reactions, is compatible with the fact that SNARE molecules can form clusters of various sizes: the binding partners M_1 and M_2 could be small clusters involving different SNARE proteins.

Dynamics of syntaxin1A and synaptic activity

The fact that syntaxin1A is involved in the formation of the exocytotic complex raises the question of the relationship between its diffusive motion and synaptic activity. The mobility characteristics of stx::pHGFP did not depend on the presence of calcium (Fig. S4), and were not significantly modified under tetrodotoxin or 4-aminopyridin bath

applications (data not shown). In addition, preventing the motion of stx::pHGFP by crosslinking did not show any significant effect on the rate of exocytosis (FM unloading rate, data not shown).

The issue of the time scale is critical to investigate the relationship between the motion and the synaptic activity: our experiments only allow to probe the motion at the time scale of a few seconds to a few minutes but the exocytosis occurs at a very short time scale, a fraction of a second^[2]. In particular, when the membrane of a vesicle – that is devoid of syntaxin^[23] – is integrated in the plasma membrane, the spatial organisation of syntaxin is likely to be disrupted rapidly and locally. The time required for the organisation to recover depends on the motion of syntaxin. The time to recover half of the initial concentration was numerically estimated to 0.002s, after the fusion of a 50nm vesicle, for molecules diffusing with $D = 0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (See Supplementary Materials and Fig. S5), which corresponds to a limit frequency of 500Hz. It is therefore unlikely that diffusion would limit the rate of exocytosis.

In conclusion, the lateral diffusion of stx::pHGFP was characterized by a fast diffusive motion, with periods where interactions that correspond to the formation of the exocytotic complex dramatically slow down its motion at precise locations. In particular, transient heterogeneities of the motion were accounted for by local interactions involving the SNARE domain and SNAP-25. Further characterization of the specific interactions involved in the motion of syntaxin1A might help to confirm this scenario. It is also worth noting that full abolishment of the exocytotic complex may be hard to observe: for instance, neither the absence of SNAP25 nor synaptobrevin2 prevents the occurrence of minis^[32,57]. Finally, the use of FRAP and SPT, two complementary methods, allowed to characterize the motion of stx::pHGFP both at the molecular and population levels. Combination of these data led to the identification of two different kinetics of interactions involved in the formation of the exocytotic complex. Consequently, despite its

globally rapid motion, syntaxin is involved in stable and localised interactions related to the exocytotic complex. The combination of rapid diffusion with transient pauses alleviates the paradox of the structured but dynamic membrane.

Materials and Methods

Cell culture and transfection. Rat spinal cord neurons were prepared from 14 day old Sprague-Dawley rat embryos. Cells were plated at a density of 10^4 cells/cm² onto 18mm² glass coverslips precoated with 70ug/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 X), glutamine (2 mM), and antibiotics (Invitrogen) at 36°C in a 5% CO₂ atmosphere for 9 days. The medium was changed at 5 then 7 days in vitro (DIV). Mouse spinal cord neurons were prepared from 13 day old mouse embryo, from the gephyrin-mRFP knock-in mice raised in the laboratory. Same protocol as for rat neurons was used for the culture. Neurons were transfected at 8 DIV using Lipofectamine2000, according to the manufacturer's protocol, with 1.5ug DNA per coverslip. Cells were imaged 24 hours after transfection.

Plasmids. The plasmid for expression of syntaxin1A fused to pHGFP was a gift from T. A. Ryan, and is described in Mitchell and Ryan^[23]. The SNARE and TMR constructs were derived from this plasmid, and encoded Stx1A, SNARE motif-TMR-GFP [Sx1A-(1-28 + 183-288) + pHGFP] and Stx1A, TMR-GFP [Sx1A-(1-28 + 259-288) + pHGFP], respectively. Coding sequences of all constructs have been verified by sequencing using the stx1A rat sequence as reference. The plasmid for expression of the light chain of botulinum toxin E (BoNT/E) was a gift from T. Galli.

Immunofluorescence labelling of fixed cells. Cells were fixed for 15 min at room temperature in 4% (w/v) paraformaldehyde (Serva Feinbio-chemica, 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 0.25% (w/v) gelatin (Sigma) in PBS to block nonspecific staining and incubated for 1 h at 37°C with primary antibodies in 0.1% gelatin. 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-syntaxin1A (monoclonal; Synaptic System, Germany), mouse anti-synapsin I (clone 3C5, Millipore, US), and rabbit anti-synapsin I (Millipore, US). Secondary antibodies were Cy3-conjugated goat anti-mouse (Cy3-conjugated goat anti-rabbit and FITC-conjugated goat anti-rabbit from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA).

Live imaging. The 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 (1X) from Invitrogen. Active presynaptic terminal were stained with FM4-64 (2μM, Invitrogen) in the presence of KCl (40mM) for 30s to stimulate vesicle recycling.

Acidic bath application. Acidic solution at pH 5.5 contained 150mM NaCl and 15mM MES (2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid, pK 6.1) in water. This solution was bath applied for less than one minute before incubating back with the recording medium.

Fluorescence Recovery After Photobleaching. Experiments were conducted on a FRAP microscope system (FRAP L5D, Roper Scientific, France) controlled through Metamorph (Universal Imaging, USA). It consisted of an inverted microscope (Eclipse TE2000-E; Nikon, France) equipped with an autofocus system (Nikon), a DG-4 illumination system (Sutter Instruments, USA) and appropriate filter sets (Semrock; Optoprim, France). Coverslips were mounted on a chamber containing the recording medium, and observed with a 100x objective (Nikon). Chamber and objective were heated at 36°C.

Circular regions (diameter = 1.5μm), either at extrasynaptic or synaptic sites (identified by FM 4-64 staining, see above), were bleached by high-intensity 488-nm laser (ERROL, France) for 8ms at 60 mW. Fluorescence intensity was reduced by 60% after bleach. Fluorescence recovery was monitored by timelapse acquisitions with a CCD camera (QuantEM 512SC, Roper Scientific) at 0.5 Hz for 10s, 0.2 Hz for the next 110s, and 0.1 Hz for an additional 120s. Data were normalized to the fluorescence before bleach and corrected for ongoing photobleaching with: $F_{corr} = (F_t/F_0)/(F_{nbt}/F_{nb0})$; where F_t is the fluorescence at time t , F_0 is the fluorescence before bleaching, F_{nbt} is the average fluorescence intensity of three non-bleached spots at time t , and F_{nb0} is the average fluorescence intensity of the same non-bleached spots before bleaching [58]. Data were then further normalized to the initial fluorescence after bleach F_i : $F_{norm}(t) = (F_{corr}(t) - F_{corr}(bleach))/(F_{corr}(before\ bleach) - F_{corr}(bleach))$.

Fits of FRAP recovery curves were made according to the following equation:

$$F_t = Pf [1 - \exp(-t/\tau_f)] + (1 - Pf) [1 - \exp(-t/\tau_s)]$$

where Pf is the relative size of the fast pool (expressed as a fraction of 1), and τ_f and τ_s are the recovery time constants for the fast and slow pools, respectively. The leastSquareFit function implemented in Python was used to calculate the best fits. As explained in the text, most of the full curves could not be properly fitted with a biexponential fit, therefore the fit was performed on the first portion of the recovery, between 0 and 50s. The optimization was not done under constraints, however, fits that gave "non-realistic" parameters ($Pf > 1$ or < 0 , and $\tau > 1000$) were discarded.

Single Particle Tracking. QD labelling for single particle imaging. QDs emitting at 605 conjugated with Goat F(ab')₂ anti-Rabbit IgG (Invitrogen) were first coupled

with an anti-GFP antibody (Synaptic Systems, Germany) : QDs (30 nM) were incubated firstly with the antibody (5 nM, 30 min) and then for additional 15 min with casein to block unspecific binding. Cells were incubated for 7min with these precoupled QD (0.06nM), and rinsed. Active synapses were then labelled with FM4-64.

Single particle imaging. Neurons were imaged in the recording medium at 37°C in an open chamber mounted onto a IX70 inverted microscope (Olympus) equipped with a 60X objective (NA 1.45; Olympus). Fluorescence was detected using an Hg+ lamp, appropriate filters (QD: D455/70x, HQ605/20m; DsRed and FM4-64: D535/50x, E590lpv2; GFP and Venus: HQ500/20, HQ535/30m; Chroma Technology) and a CCD camera (Cascade 512BFT, Roper Scientific). QDs were recorded during 500 consecutive frames with an exposure time of 75ms. Cells were imaged for about 30-40 min after labelling.

Tracking and analysis. Single QDs were identified by their blinking[8]. Synaptic stain images were filtered using a multidimensional image analysis interface running in MetaMorph[59]. QD location (synaptic or extrasynaptic) was identified by comparison with the filtered FM4-64 image[8]. Tracking was performed with homemade software (Matlab; The Mathworks, USA). The center of the spot fluorescence was determined by Gaussian fit. Spatial resolution was ~10-20 nm. The spots in a given frame were associated to the most-likely of the trajectories estimated on previous frames of the image sequence assuming free Brownian diffusion. For QDs, only trajectories with at least 15 consecutive frames were considered. The mean square displacement (MSD) was calculated using $MSD(\tau) = \sum_{i=1}^{N-n} [(x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2]$; 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 and τ is the time interval over which displacement is averaged. The diffusion coefficient D was calculated by fitting the first 2 to 5 points of MSD plot versus time with

the equation $MSD(t) = 4D^2 - 5t + 4\sigma x^2$; with σx the spot localization accuracy in one direction (refs. in Ehrensperger *et al.*[60]). Trajectories with $D < 10^4 \mu m^2/s$ for QDs were classified as immobile. The size of the average confinement area was calculated fitting the average MSD plot with the equation proposed by Kusumi *et al.*[43] (refs. in Ehrensperger *et al.*[60]). A pause event was identified by a portion of the trajectory where the instantaneous diffusion coefficient (calculated over 10 frames) was below $5 \cdot 10^{-2} \mu m^2/s$. Only pause events longer than 12 frames (about 1s) were considered. Dwell time was calculated as in Charrier *et al.*[61], except that it was not averaged by recording, but all the individual passages at synapses were considered.

Treatment with BAPTA-AM. BAPTA-AM was used at final concentration of 30 μM , in the medium used for live imaging. Stock solution was diluted in DMSO, so control conditions were performed with equal volume of DMSO. Cells were incubated with BAPTA-AM for ~1hour including labeling procedure. Imaging was done extra 30 min in the presence of BAPTA-AM.

Statistical analysis. Each set of experiments was performed on 4-7 different neuron cultures. Data from different cultures were pooled together, since intra-culture variability was greater than inter-culture variability. Two-tailed student t-tests were used, except for the non-normal distribution of diffusion coefficients, where Kolmogorov-Smirnov (KS) or wilcoxon tests were used, as indicated in the text.

Acknowledgments:

The authors wish to acknowledge the assistance of Shlomo Tsurriel and Michal Stern.

References

1. Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27: 509-47. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412
2. Lisman JE, Raghavachari S, Tsien RW (2007) The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nat Rev Neurosci* 8: 597-609. doi:10.1038/nrn2191
3. Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
4. Vereb G, Szöllösi J, Matkó J, Nagy P, Farkas T, et al. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 8053-8058. doi:10.1073/pnas.1332550100
5. Edidin M, Zagyansky Y, Lardner TJ (1976) Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* 191: 466-468.
6. Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 444-456. doi:10.1038/35073068
7. Saxton MJ, Jacobson K (1997) Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26: 373-399. doi:10.1146/annurev.biophys.26.1.373
8. Dahan M, Lévi S, Luccardini C, Rostaing P, Riveau B, et al. (2003) Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* 302: 442-5. doi:10.1126/science.1088525
9. Choquet D, Triller A (2003) The role of receptor

- diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci* 4: 251-65. doi:10.1038/nrn1077
10. Hanus C, Ehrensperger M, Triller A (2006) Activity-Dependent Movements of Postsynaptic Scaffolds at Inhibitory Synapses. *J. Neurosci.* 26: 4586-4595. doi:10.1523/JNEUROSCI.5123-05.2006
 11. Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* 5: 239-246. doi:10.1038/nrn811
 12. Kalla S, Stern M, Basu J, Varoqueaux F, Reim K, et al. (2006) Molecular dynamics of a presynaptic active zone protein studied in Munc13-1-enhanced yellow fluorescent protein knock-in mutant mice. *J Neurosci* 26: 13054-66. doi:10.1523/JNEUROSCI.4330-06.2006
 13. Tsuriel S, Fisher A, Wittenmayer N, Dresbach T, Garner CC, et al. (2009) Exchange and Redistribution Dynamics of the Cytoskeleton of the Active Zone Molecule Bassoon. *J. Neurosci.* 29: 351-358. doi:10.1523/JNEUROSCI.4777-08.2009
 14. Gómez-Varela D, Kohl T, Schmidt M, Rubio ME, Kawabe H, et al. (2010) Characterization of Eag1 channel lateral mobility in rat hippocampal cultures by single-particle-tracking with quantum dots. *PLoS ONE* 5: e8858. doi:10.1371/journal.pone.0008858
 15. Triller A, Choquet D (2008) New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. *Neuron* 59: 359-74. doi:10.1016/j.neuron.2008.06.022
 16. Bannai H, Lévi S, Schweizer C, Inoue T, Launey T, et al. (2009) Activity-Dependent Tuning of Inhibitory Neurotransmission Based on GABAAR Diffusion Dynamics. *Neuron* 62: 670-682. doi:10.1016/j.neuron.2009.04.023
 17. Lévi S, Schweizer C, Bannai H, Pascual O, Charrier C, et al. (2008) Homeostatic Regulation of Synaptic GlyR Numbers Driven by Lateral Diffusion. *Neuron* 59: 261-273. doi:10.1016/j.neuron.2008.05.030
 18. Heine M, Groc L, Frischknecht R, Béique J, Lounis B, et al. (2008) Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 320: 201-5. doi:10.1126/science.1152089
 19. Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 631-43. doi:10.1038/nrm2002
 20. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, et al. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318-324. doi:10.1038/362318a0
 21. Rizo J, Sudhof TC (2002) Snares and munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 3: 641-653. doi:10.1038/nrn898
 22. Wu MN, Fergestad T, Lloyd TE, He Y, Broadie K, et al. (1999) Syntaxin 1A interacts with multiple exocytic proteins to regulate neurotransmitter release in vivo. *Neuron* 23: 593-605.
 23. Mitchell SJ, Ryan TA (2004) Syntaxin-1A is excluded from recycling synaptic vesicles at nerve terminals. *J Neurosci* 24: 4884-8. doi:10.1523/JNEUROSCI.0174-04.2004
 24. Dumoulin A, Lévi 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.
 25. Garcia EP, McPherson PS, Chilcote TJ, Takei K, De Camilli P (1995) rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin. *J Cell Biol* 129: 105-20.
 26. Hagiwara A, Fukazawa Y, Deguchi-Tawarada M, Ohtsuka T, Shigemoto R (2005) Differential distribution of release-related proteins in the hippocampal CA3 area as revealed by freeze-fracture replica labeling. *J Comp Neurol* 489: 195-216.
 27. Mitchell SJ, Ryan TA (2005) Munc18-dependent regulation of synaptic vesicle exocytosis by syntaxin-1A in hippocampal neurons. *Neuropharmacology* 48: 372-80. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.10.017
 28. Sprague BL, Pego RL, Stavreva DA, McNally JG (2004) Analysis of Binding Reactions by Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Biophysical Journal* 86: 3473-3495. doi:10.1529/biophysj.103.026765
 29. Sprague BL, Müller F, Pego RL, Bungay PM, Stavreva DA, et al. (2006) Analysis of Binding at a Single Spatially Localized Cluster of Binding Sites by Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Biophys J* 91: 1169-1191. doi:10.1529/biophysj.105.073676
 30. Weninger K, Bowen ME, Choi UB, Chu S, Brunger AT (2008) Accessory proteins stabilize the acceptor complex for synaptobrevin, the 1:1 syntaxin/SNAP-25 complex. *Structure* 16: 308-20. doi:10.1016/j.str.2007.12.010
 31. Rickman C, Meunier FA, Binz T, Davletov B (2004) High affinity interaction of syntaxin and SNAP-25

- on the plasma membrane is abolished by botulinum toxin E. *J Biol Chem* 279: 644-51. doi:10.1074/jbc.M310879200
32. Washbourne P, Thompson PM, Carta M, Costa ET, Mathews JR, et al. (2002) Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci* 5: 19-26. doi:10.1038/nn783
 33. Sørensen JB, Nagy G, Varoquaux F, Nehring RB, Brose N, et al. (2003) Differential Control of the Releasable Vesicle Pools by SNAP-25 Splice Variants and SNAP-23. *Cell* 114: 75-86. doi:10.1016/S0092-8674(03)00477-X
 34. Fritschy J, Harvey RJ, Schwarz G (2008) Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends in Neurosciences* 31: 257-264. doi:10.1016/j.tins.2008.02.006
 35. Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Lévi S, Isambert MF, et al. (1999) Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci* 112 (Pt 6): 811-23.
 36. Schuss, Z (1980) *Theory and Applications of Stochastic Differential Equations*. Wiley. New York.
 37. Deverall M, Gindl E, Sinner E, Besir H, Ruehe J, et al. (2005) Membrane Lateral Mobility Obstructed by Polymer-Tethered Lipids Studied at the Single Molecule Level. *Biophysical Journal* 88: 1875-1886. doi:10.1529/biophysj.104.050559
 38. Saxton M (1994) Anomalous diffusion due to obstacles: a Monte Carlo study. *Biophysical Journal* 66: 394-401. doi:10.1016/S0006-3495(94)80789-1
 39. Saxton M (1996) Anomalous diffusion due to binding: a Monte Carlo study. *Biophysical Journal* 70: 1250-1262. doi:10.1016/S0006-3495(96)79682-0
 40. Siksou L, Rostaing P, Lechaire J, Boudier T, Ohtsuka T, et al. (2007) Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *J Neurosci* 27: 6868-77. doi:10.1523/JNEUROSCI.1773-07.2007
 41. Dresbach T, Qualmann B, Kessels MM, Garner CC, Gundelfinger ED (2001) The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell Mol Life Sci* 58: 94-116.
 42. Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol* 135: 767-779.
 43. 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. doi:10.1016/S0006-3495(93)81253-0
 44. Westphal V, Rizzoli SO, Lauterbach MA, Kamin D, Jahn R, et al. (2008) Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science* 320: 246-9. doi:10.1126/science.1154228
 45. Nofal S, Becherer U, Hof D, Matti U, Rettig J (2007) Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *J Neurosci* 27: 1386-95. doi:10.1523/JNEUROSCI.4714-06.2007
 46. Lemke EA, Klingauf J (2005) Single synaptic vesicle tracking in individual hippocampal boutons at rest and during synaptic activity. *J Neurosci* 25: 11034-44. doi:10.1523/JNEUROSCI.2971-05.2005
 47. Zhang Q, Li Y, Tsien RW (2009) The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles. *Science* 323: 1448-1453. doi:10.1126/science.1167373
 48. Coggan JS, Bartol TM, Esquenazi E, Stiles JR, Lamont S, et al. (2005) Evidence for Ectopic Neurotransmission at a Neuronal Synapse. *Science* 309: 446-451. doi:10.1126/science.1108239
 49. Gerber SH, Rah J, Min S, Liu X, de Wit H, et al. (2008) Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science* 321: 1507-10. doi:10.1126/science.1163174
 50. Dulubova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, et al. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J* 18: 4372-82. doi:10.1093/emboj/18.16.4372
 51. Bowen ME, Weninger K, Ernst J, Chu S, Brunger AT (2005) Single-Molecule Studies of Synaptotagmin and Complexin Binding to the SNARE Complex. *Biophysical Journal* 89: 690-702. doi:10.1529/biophysj.104.054064
 52. Ashery U, Bielopolski N, Barak B, Yizhar O (2009) Friends and foes in synaptic transmission: the role of tomosyn in vesicle priming. *Trends in Neurosciences* 32: 275-282. doi:10.1016/j.tins.2009.01.004
 53. Laage R, Rohde J, Brosig B, Langosch D (2000) A conserved membrane-spanning amino acid motif drives homomeric and supports heteromeric assembly of presynaptic SNARE proteins. *J Biol Chem* 275: 17481-7. doi:10.1074/jbc.M910092199
 54. Cohen R, Marom M, Atlas D (2007) Depolarization-evoked secretion requires two vicinal transmembrane

cysteines of syntaxin 1A. PLoS ONE 2: e1273.
doi:10.1371/journal.pone.0001273

55. Lu X, Zhang Y, Shin Y (2008) Supramolecular SNARE assembly precedes hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol* 15: 700-706. doi:10.1038/nsmb.1433
56. Sieber JJ, Willig KI, Kutzner C, Gerding-Reimers C, Harke B, et al. (2007) Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* 317: 1072-6. doi:10.1126/science.1141727
57. Schoch S, Deak F, Konigstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, et al. (2001) SNARE Function Analyzed in Synaptobrevin/VAMP Knockout Mice. *Science* 294: 1117-1122. doi:10.1126/science.1064335
58. Tsuriel S, Geva R, Zamorano P, Dresbach T, Boeckers T, et al. (2006) Local sharing as a predominant determinant of synaptic matrix molecular dynamics. *PLoS Biol* 4: e271. doi:10.1371/journal.pbio.0040271
59. Racine V, Sachse M, Salameo J, Fraisier V, Trubuil A, et al. (2007) Visualization and quantification of vesicle trafficking on a three-dimensional cytoskeleton network in living cells. *J Microsc* 225: 214-228. doi:10.1111/j.1365-2818.2007.01723.x
60. Ehrensperger M, Hanus C, Vannier C, Triller A, Dahan M (2007) Multiple Association States between Glycine Receptors and Gephyrin Identified by SPT Analysis. *Biophys. J.* 92: 3706-3718. doi:10.1529/biophysj.106.095596
61. Charrier C, Ehrensperger M, Dahan M, Levi S, Triller A (2006) Cytoskeleton Regulation of Glycine Receptor Number at Synapses and Diffusion in the Plasma Membrane. *J. Neurosci.* 26: 8502-8511. doi:10.1523/JNEUROSCI.1758-06.2006

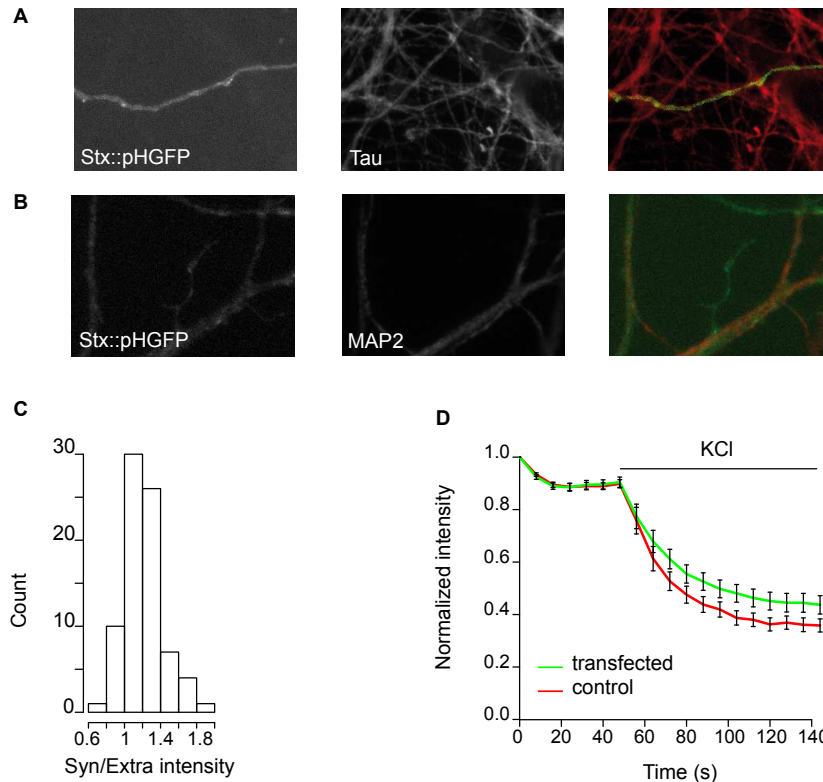


Figure S1 – Stx::pHGFP is present in axons and dendrites with little synaptic accumulation and mild effect on synaptic activity.

(A) Stx::pHGFP (StxpHGFP; green) and the axonal marker Tau (Tau;red). IF labelling in cultured spinal cord neurons (9 DIV). (B) Stx::pHGFP (StxpHGFP; green) and the dendritic marker MAP2 (MAP2;red). IF labelling in cultured spinal cord neurons (9 DIV). Note the thin morphology of axons compared to dendrites. (C) Histogram of the ratio of synaptic to extrasynaptic intensity. Fluorescence was measured on adjacent circular regions to account for variability between cells, in live neurons (9DIV). Mean ratio is 1.2 indicating a slight accumulation of stx::pHGFP at synapses. (D) Simultaneous destaining of FM 4-64 from synaptic vesicles of non-transfected control cells (red) and stx::pHGFP expressing cells (green) in the same culture dishes, during 40mM KCl application. The destaining rate is slightly higher in transfected cells.

Supporting information

Description of the computational model

Geometry

We used a planar geometry as follows (see table S2):

Extrasynaptic region. The extrasynaptic region was modelled as a 3µm radius disk. The radius was chosen such that it is sufficiently large to avoid strong depletion after bleaching.

Synaptic region. The synaptic region was represented as a circular active zone 0.1µm in diameter, surrounded by a perisynaptic region of radius 0.4µm. The extrasynaptic region begins after the synaptic region, and with a radius of 3µm.

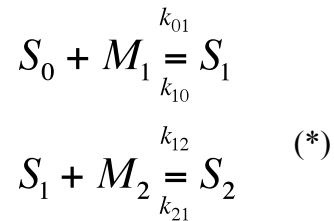
Bleaching profile. We used a Gaussian distribution to fit the bleaching profile. Roughly speaking, bleaching affected a circular region with a radius up to 1µm. The recovery was measured in a circular spot with radius 0.5µm. In the synaptic FRAP simulations, we assumed that the synaptic area was located at the centre of the bleached area.

Motion Dynamics

In the model, the motion of molecules results from free diffusion and bindings.

Free diffusion. When a molecule is not bound, it undergoes a Brownian motion with an effective diffusion coefficient that depends on its location (see below, section parameters).

Binding. Syntaxin undergoes the following chemical reactions leading to complete immobilization:



where S_0 is the free syntaxin molecule, S_1 is the first bound state, S_2 is the second bound state. M_1 and M_2 are abundant binding partners. The second reaction requires the syntaxin to be in the first bound state associated to the first reaction. The chemical reactions are described by the forward k_{10} , k_{12} and backward k_{01} , k_{21} , binding rate constants.

The first reaction accounts for the short pauses observed in SPT experiments and thus is fast compared to the second one, which accounts for the long pauses. The rates may depend on the region (synaptic and extrasynaptic) and on the experimental conditions, as described in the paragraph below.

Parameters

The binding rates and the diffusion coefficients vary between the synaptic and extrasynaptic region, separated by a transition region, extending between a circle of radius 0.3µm up to 0.5 µm, where the parameters change smoothly. Such transition might due to a change in the density of obstacles and interacting molecules .

Diffusion coefficients. The values for the diffusion coefficient in the synaptic and extrasynaptic regions are extracted from the SPT (median of the distribution).

Reaction rates 1. The forward binding rate is the reciprocal of the mean time to bind M_1 . The forward binding rate could in principle be estimated from the frequency of short pause events, however, since the binding events shorter than 1s could not be properly detected, the experimental estimation of this parameter is likely to contain severe imprecision. Therefore the forward binding rate remains a free parameter and is fitted using the FRAP experiments.

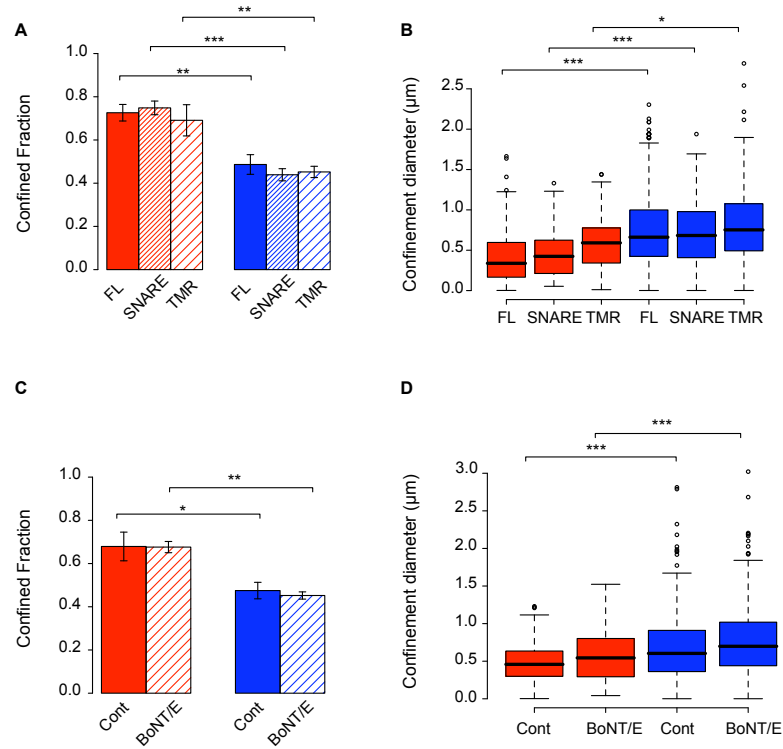


Figure S2 – Confinement parameters are not affected in different conditions.

(A) and (C) Fraction of confined trajectories (mean ± SEM), for the different constructs (A) and in the presence/absence of botulinum toxin (B). Two-tailed t-test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) and (D) Box and whiskers plot of the diameter of confinement for the confined trajectories. The thick line is the median, the box extends from the first to the third interquartile, and whiskers extend to 1.5 times the interquartile. Kolmogorov-Smirnov test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

The backward binding rate corresponds to the inverse of the mean duration of binding, and therefore can be estimated from the duration of short pause events.

Reaction rates 2. Proper estimation of the frequency and duration of the long pauses cannot be achieved due to the limited recording time. The forward and backward rates of this reaction are therefore also considered as free parameters.

The backward rate was taken to be consistent with SPT data (that is with a duration longer than 37.5s).

Reaction-diffusion equations: fitting the FRAP data

To fit the FRAP, we numerically simulated the system of reaction-diffusion equations associated with the reactions (*). This system of equations for the concentration $C_0(r, t)$ of free syntaxin (S_0), $C_1(r, t)$ syntaxin in state S_1 , and $C_2(r, t)$ in state S_2 satisfies:

$$\frac{\partial}{\partial t} C_0(r, t) = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r D(r) \frac{\partial}{\partial r} C_0(r, t) \right) - k_{01}(r) C_0(r, t) + k_{10} C_1(r, t)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} C_1(r, t) = -(k_{10}(r) + k_{12}(r)) C_1(r, t) + k_{01}(r) C_0(r, t) + k_{21}(r) C_2(r, t)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} C_2(r, t) = -k_{21}(r) C_2(r, t) + k_{12}(r) C_1(r, t)$$

We solved this system of equations in each of the regions mentioned above, by fitting the different rate constants to the FRAP data. The radius dependency of the parameters accounts for the possible crowding density changes, occurring between the synaptic and extrasynaptic areas.

At steady state, the diffusional flux is zero and the steady state concentration C_0 of unbound syntaxin has to be independent of r . The steady state concentrations of bound syntaxin C_1 and C_2 are:

$$C_1(r) = \frac{k_{01}(r)}{k_{10}(r)} C_0$$

$$C_2(r) = \frac{k_{12}(r)}{k_{21}(r)} C_1(r) = \frac{k_{12}(r) k_{01}(r)}{k_{21}(r) k_{10}(r)} C_0$$

and the total syntaxin concentration is:

$$C = C_0 + C_1(r) + C_2(r) = C_0 \left(1 + \frac{k_{01}(r)}{k_{10}(r)} + \frac{k_{12}(r) k_{01}(r)}{k_{21}(r) k_{10}(r)} \right)$$

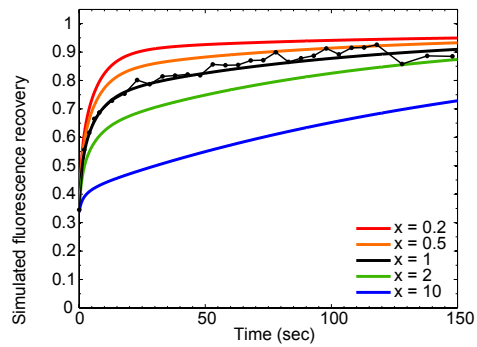


Figure S3 - Sensibility of the simulated fluorescence recovery to the second (slow) affinity constant. The recovery was simulated for varying values of k_{12} . The values of k_{10} , k_{01} , and k_{21} are equal to those that fit the synaptic recovery of the full-length construct. The different values of k_{12} are equal to the x times the value that fit the recovery of the full-length construct ($x = 0.2$, red – $x = 0.5$, orange – $x = 1$, black – $x = 2$, green – $x = 10$, blue). The full circles are experimental data points of the recovery of the full-length construct.

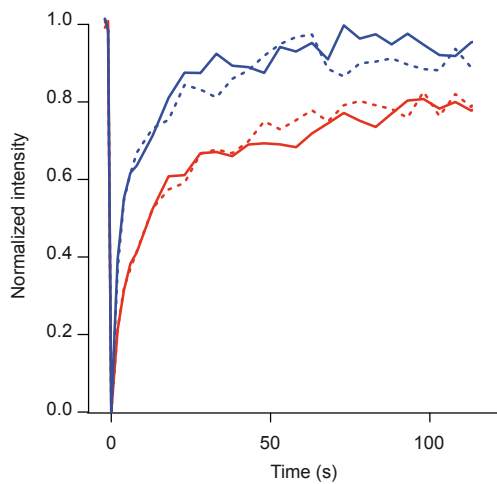


Figure S4 – Calcium chelation with the membrane permeant agent BAPTA-AM has no effect on the FRAP recovery. Averaged normalized fluorescence recovery (\pm SEM) of $stx::pHGFP$ in control conditions with only DMSO (solid line) and in the presence of BAPTA (dotted line) versus time, at synaptic (red) and extrasynaptic (blue) locations.

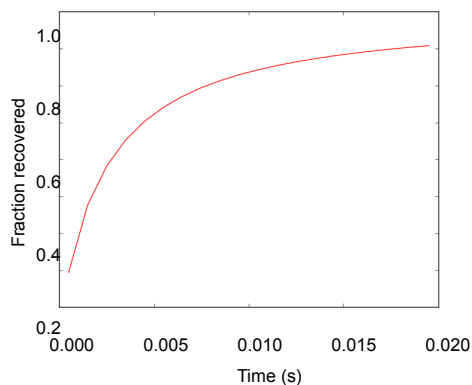


Figure S5. Fraction of syntaxin molecules that are exchanged from a given area as a function of time. This fraction was analytically calculated from the expression used by Heine et al [18]:

$$\eta = 1 - \left(\frac{\sqrt{4Dt}}{d} \int_0^{d/\sqrt{4Dt}} \text{Erf}(x) dx \right)^2$$

Where η is the percentage of exchanged syntaxin
 D the diffusion coefficient : $0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$
 d the size region considered : 50nm
 Note that for an area of 50 nm diameter (approximately the size of a synaptic vesicle) 50% syntaxin molecules are exchanged in 0.002 ms .

A.3 REVUE EN PRÉPARATION : FROM THE STOCHASTICITY OF MOLECULAR PROCESSES TO THE VARIABILITY OF SYNAPTIC TRANSMISSION

Le manuscrit présenté ci-après est une revue en préparation. Vous trouverez d'abord un résumé et un plan récents, que nous venons de soumettre à *Nature Reviews Neurosciences*, puis un texte plus développé mais incomplet, qui présente quelques points que nous souhaitons développer, et qui correspond à une version écrite à l'automne 2009. Voici un résumé de la problématique :

À une synapse donnée, la réponse à un stimulus est variable : la libération de neurotransmetteurs est probabiliste (avec une probabilité d'environ 0.5), et lorsqu'une exocytose a lieu, l'amplitude du potentiel postsynaptique est également variable. Le coefficient de variation de la réponse postsynaptique varie de 0.2 à 0.7 (Branco and Staras 2009; Hanse and Gustafsson 2001).

À l'échelle de la synapse, les processus moléculaires de diffusion, de liaison ou de changement de conformation peuvent être décrits comme des processus stochastiques. Étant donné la petite taille de la synapse et le petit nombre de molécules présentes, la stochasticité des processus peut ne pas être négligeable et être à l'origine (en partie) de la variabilité dans la transmission synaptique (Bhalla 2004).

Dans plusieurs systèmes, comme celui de l'expression génétique (Kaern et al. 2005), la prise en compte du caractère stochastique des processus a conduit à de nouvelles descriptions des phénomènes. Dans cette revue, nous proposons de présenter les différents processus stochastiques en jeu dans la transmission synaptique en se focalisant sur les réactions biochimiques et la diffusion. Ensuite, nous nous interrogeons sur la contribution du caractère stochastique de ces processus à la variabilité de la transmission synaptique, ainsi que sur les implications fonctionnelles de cette variabilité, pour identifier les défis expérimentaux et conceptuels en jeu.

From the stochasticity of molecular processes to the variability of synaptic transmission

Claire Ribault, Antoine Triller

Biologie Cellulaire de la Synapse, INSERM U789, Ecole Normale Supérieure, Paris, France.

In the central nervous system, at a given synapse, the variability of the postsynaptic response generated by a single action potential is twofold: the release of neurotransmitter is probabilistic, and the postsynaptic potential generated by the release is variable.

Synaptic transmission consists of a sequence of molecular events, each being probabilistic and conditioned by the one upstream. Single-molecule technologies have revealed that many molecular processes display stochastic properties. At the scale of the synapse (200nm), stochastic aspects of molecular processes such as diffusion and reactions cannot be neglected. To what extent does the stochasticity of molecular processes contribute to the variability of synaptic transmission?

Here we propose to review the most recent experimental data and theoretical models that describe the contribution of the stochasticity of molecular events to the variability in synaptic transmission. In this review, we aim to identify the experimental and theoretical challenges ahead in reconciling the stochastic aspects of molecular processes with functional synaptic properties.

1. Synaptic transmission as a sequence of reactive processes coupled by diffusion

1.1 Variability in synaptic transmission

- A “synapse”: a spatially defined contact with specific ultrastructural characteristics.
- The sequence of molecular events involved in synaptic transmission, and their time scales: from the opening of calcium channels to the postsynaptic potential.¹
- Coupling between the molecular events: reactive processes (binding, conformational changes) occur at specific places and are coupled by diffusive processes (involving calcium ions, neurotransmitters). The characteristic times of reactive and diffusive processes determine the time scale of synaptic transmission.

FIGURE 1: Characteristic time and length scales of diffusive and reactive processes at the synapse.

1.2 Some stochastic aspects of molecular events involved in synaptic transmission

- The release of neurotransmitters is probabilistic.²
- Variability of synaptic transmission at a single synapse: measurements of release probability and coefficient of variation of the postsynaptic response.³

- Sources of variability: structural variability (size of synaptic vesicles, organization and composition of the presynaptic active zone and postsynaptic differentiation) and stochasticity of molecular processes (diffusion, reactions).

FIGURE 2: Different sources of variability in synaptic transmission.

- All the molecular events of synaptic transmission, at the molecular level, are stochastic.

BOX 1: Definitions of stochastic, probabilistic, random processes – Brief introduction to stochastic descriptions.

- System size and amplitude of the stochastic fluctuations: the small number of copies of some molecules involved in synaptic transmission (e.g. tens of receptors) implies that the stochastic aspects of molecular events are non-negligible.

BOX 2: Orders of magnitude at the synapse: number of molecules, sizes of the different elements.

2. Contribution of the stochastic aspects of the diffusive and reactive processes to the variability of synaptic transmission

2.1 Reactions and biochemical processes

- Experimental data describing the stochasticity of molecular events: binding reactions, conformational changes.⁴
- Stochastic description of a reaction - Example of the allosteric model of neurotransmitter receptors.⁵

FIGURE 3: Binding reactions and conformational changes of neurotransmitter receptors: a stochastic description.

- Implications at the level of a population of molecules: characteristic time of a population vs distribution of the duration of individual events.
- Contribution of the stochasticity of reactive processes to the variability of synaptic transmission.^{6,7}

2.2 Diffusive processes

- General characteristics of diffusion: Brownian motion and the probabilistic properties of displacement.
- Fast-diffusing species: ions, neurotransmitters. Measurements and models of diffusion, and contribution of diffusion to the variability of synaptic transmission.^{8,9}
- Slow-diffusing species: membrane and cytoplasmic proteins. Measurements and models of diffusion, and contribution of diffusion to the variability of synaptic transmission.¹⁰

FIGURE 4: Diffusive processes at the synapse.

- Diffusion and the probability of molecular collisions.

- Diffusion and the variability of the relative positions of molecules and of their number at the synapse.

2.3 Coupling between the reactive and diffusive molecular processes

- Molecular reactions are coupled to each other, spatially and temporally. Due to morphological constraints, reactive processes occur at different places. Diffusion of fast-diffusing species plays a significant role in this coupling.

FIGURE 5: Synaptic transmission as a sequence of conditioned probabilistic reactions.

- How does the stochasticity of a given molecular event impact on the downstream event, and what are the consequences for the variability of synaptic transmission? This may depend on the number of molecules involved, and the characteristic time of each step.¹¹⁻¹³

BOX 3: Example of how stochasticity in the different steps of gene expression (replication, transcription, translation) generates noise in gene expression (*Summing up the noise in gene networks*, by J. Paulsson¹¹). How can this model be transposed to synaptic transmission?

3. Implications of the stochasticity of molecular events for synaptic function

3.1 What are the implications of the stochasticity of diffusive and reactive processes for synaptic function?

- The notions of sensitivity, robustness and plasticity have been well described in other stochastic systems such as gene expression and signaling networks.¹⁴⁻¹⁶ How can these notions be formulated in the context of the synapse?

- How does the plasticity of the synapse relate to the stochasticity of molecular events? For instance, does stochasticity favor the shift from one functional “state” to another?^{12,13}

- To what extent does the spatial organization of the synapse reduce the effects of the stochasticity of diffusive and reactive processes?¹⁷ (The cases of dendritic spines, channel localization, ...)

BOX 4: Robustness: definition and specific features that may enhance robustness to some perturbations.¹⁸

3.2 What are the experimental and conceptual challenges ahead?

- What measurements are required to further characterize the contribution of the stochasticity of molecular processes to the variability of synaptic transmission? In particular, how can such phenomena be investigated in integrated systems?

- To this aim, what technological developments are required?

- Which theoretical tools are needed to develop an adequate descriptive framework?
- How can this view of the synapse as a diffusion-reaction system be reconciled with the classic concepts of synaptic transmission?

References

1. Lisman, J.E., Raghavachari, S. & Tsien, R.W. The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nat Rev Neurosci* **8**, 597-609 (2007).
2. Branco, T. & Staras, K. The probability of neurotransmitter release: variability and feedback control at single synapses. *Nat. Rev. Neurosci* **10**, 373-383 (2009).
3. Hanse, E. & Gustafsson, B. Quantal variability at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus. *J Physiol* **531**, 467-80 (2001).
4. Weninger, K., Bowen, M.E., Choi, U.B., Chu, S. & Brunger, A.T. Accessory proteins stabilize the acceptor complex for synaptobrevin, the 1:1 syntaxin/SNAP-25 complex. *Structure* **16**, 308-20 (2008).
5. Changeux, J. & Edelstein, S.J. Allosteric Mechanisms of Signal Transduction. *Science* **308**, 1424-1428 (2005).
6. Franks, K.M., Stevens, C.F. & Sejnowski, T.J. Independent sources of quantal variability at single glutamatergic synapses. *J Neurosci* **23**, 3186-95 (2003).
7. Zeng, S. & Holmes, W.R. The Effect of Noise on CaMKII Activation in a Dendritic Spine During LTP Induction. *Journal of Neurophysiology* **103**, 1798-1808 (2010).
8. Hake, J. & Lines, G.T. Stochastic binding of Ca²⁺ ions in the dyadic cleft; continuous versus random walk description of diffusion. *Biophys. J* **94**, 4184-4201 (2008).
9. Demuro, A. & Parker, I. Imaging single-channel calcium microdomains. *CELL CALCIUM* **40**, 413-422 (2006).
10. Triller, A. & Choquet, D. New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. *Neuron* **59**, 359-74 (2008).
11. Paulsson, J. Summing up the noise in gene networks. *Nature* **427**, 415-418 (2004).
12. Bhalla, U.S. Signaling in small subcellular volumes. I. Stochastic and diffusion effects on individual pathways. *Biophys J* **87**, 733-44 (2004).
13. Bhalla, U.S. Signaling in small subcellular volumes. II. Stochastic and diffusion effects on synaptic network properties. *Biophys J* **87**, 745-53 (2004).
14. Kholodenko, B. Cell-signalling dynamics in time and space. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 165-176 (2006).
15. Shahrezaei, V. & Swain, P.S. The stochastic nature of biochemical networks. *Curr Opin Biotechnol* **19**, 369-74 (2008).
16. Wilkinson, D.J. Stochastic modelling for quantitative description of heterogeneous biological systems. *Nat Rev Genet* **10**, 122-133 (2009).
17. Shahrezaei, V. & Delaney, K.R. Consequences of Molecular-Level Ca²⁺ Channel and Synaptic Vesicle Colocalization for the Ca²⁺ Microdomain and Neurotransmitter Exocytosis: A Monte Carlo Study. *Biophysical Journal* **87**, 2352-2364 (2004).
18. Barkai, N. & Shilo, B. Variability and Robustness in Biomolecular Systems. *Molecular Cell* **28**, 755-760 (2007).

From the stochasticity of molecular processes to the variability of synaptic transmission

Claire Ribault Damien Alcor Ken Sekimoto
Antoine Triller

version préliminaire, Automne 2009

1 Introduction

1.1 Definition of a synapse

The connection between two neurons can consist of several synaptic contacts, which contains several release sites, offering as many sources of variability in the response to a single stimulus. An unequivocal definition of a synaptic contact may rely on ultrastructural characteristics: a spatially defined contact, a presynaptic compartment containing synaptic vesicles, and a postsynaptic density (Branco and Staras 2009; Siksou et al. 2007).

Recent advances allow to describe the properties of synaptic transmission at single release sites [REF] as well as the composition of the pre- and the post-synaptic compartments [REF]. Such studies reveal a large variability, both in the transmission and in the composition.

In this review, we focus on the transmission of information at a synapse, containing a single release site, and address the issue of variability at a single synaptic contact.

1.2 Variability in the synaptic response

Studies at the neuromuscular junction have indicated that the postsynaptic response is composed of “stereotyped quanta” [REF], which have been rapidly associated to the synaptic vesicles [REF]. However, the size of the quantal response varies, leading to a distribution in amplitude of the EPSC associated with the release of a single SV. This variability observed is sometimes so high (Hanse and Gustafsson 2001) that it questions the quantal transmission hypothesis (Lisman et al. 2007).

In particular, at a single synapse, variability in the postsynaptic response to a presynaptic action potential has been investigated (Hanse and Gustafsson 2001). The difficulty of this analysis is to ascertain that a single release event is described. Using neonatal rat hippocampus slice preparations where the density of synaptic contacts is low, and using stringent experimental and statistical criteria, the coefficient of variation averaged to 0.39 for the AMPA quantal response. This large value of the coefficient of variation quantifies a large variability between responses of the same synapse to a single stimulus. This variability does not seem to arise from any depression or sensitization effect. In addition, this coefficient of variation varies between synapses, from 0.2 to 0.7 for the above-mentioned example of the AMPA response, suggesting that this variability can be regulated. Coefficient of variation focuses on the variability of the amplitude, but variability in the time course of the EPSC can also be observed (Nielsen et al. 2004).

The coefficient of variation describes variability of the response in case there is a response. But in many cases, stimulus does not lead to any postsynaptic response. Indeed, release of neurotransmitters in the synaptic cleft is probabilistic: the release probability at hippocampal synapses varies between 0.25 and 0.7 (Branco et al. 2008). In addition, the release probability can be regulated (Branco and Staras 2009).

Before considering what can underlie this variability, below we present the different steps of synaptic transmission.

1.3 Synaptic transmission

Synaptic transmission follows a defined sequence of events (Lisman et al. 2007). In summary, this sequence is triggered by the arrival of an action potential and consists of: opening of voltage gated calcium channels, diffusion of calcium through these channels, binding of calcium ions to synaptotagmin, conformational change of synaptotagmin, release of neurotransmitters into the synaptic cleft (via different modes of synaptic vesicle fusion), diffusion of neurotransmitters through the synaptic cleft, binding of neurotransmitters to receptors, opening of receptors, diffusion of ions through receptors, leading to a postsynaptic depolarisation.

The number of molecules (at the synapse, in a given state) and their position are critical parameters that affect each step of the synaptic transmission, and can result in variation in both the amplitude and time course of the EPSC).

For instance, in the case of voltage-gated calcium channels, their number will impact on the quantity of calcium that will enter the presynaptic termi-

nal. Since, as developed below, calcium diffuses fast, their localisation closed to the calcium sensor is also important (Neher and Sakaba 2008, Becherer et al. 2003, Chapman 2008).

Two kinds of sources for the variability in synaptic transmission can be considered (figure 1). In one hand, there is some structural variability among the elements that constitute the synaptic assembly : variability in the number and size of the synaptic vesicles, in their neurotransmitter content for instance. On the other hand, synaptic transmission consists of a sequence of biochemical processes (binding, conformational changes) coupled by diffusion processes. At the molecular level, both biochemical reactions and diffusion processes are random, intrinsically stochastic. Here we propose to review how this stochasticity can be described, and to which extent it can impact on synaptic transmission.

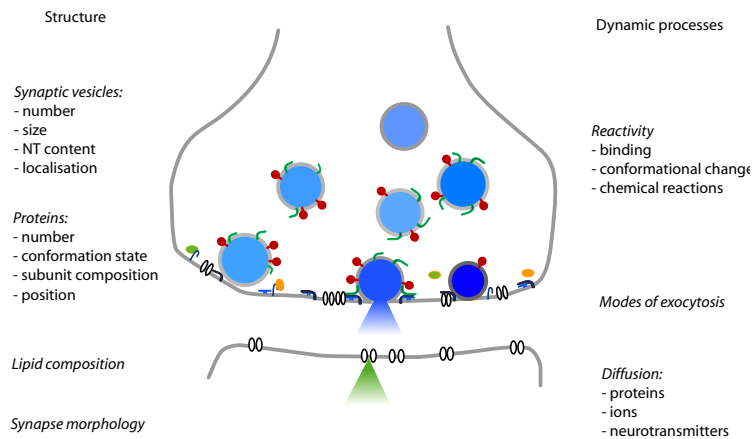


Figure 1: Different sources of variability in synaptic transmission. Variability in synaptic transmission can arise from structural elements or dynamic processes. From the structural point of view, the number and position of the different elements (proteins, vesicles) can vary between synapses and accross time. From the dynamic point of view, the stochasticity of biochemical and physical processes (reactions, diffusion) can contribute to the variability of the timing of synaptic transmission. Structural and dynamic sources of variability are not independent : for instance, the number of proteins can change by lateral diffusion of these proteins.

2 Stochastic processes in synaptic transmission

The synaptic transmission results from a coupling between biochemical reactions (binding reactions and conformational changes) and diffusion (figure ??). Synaptic transmission occurs on a time scale close to that of these molecular processes. The stochasticity of these processes may therefore contribute to the variability of the postsynaptic response.

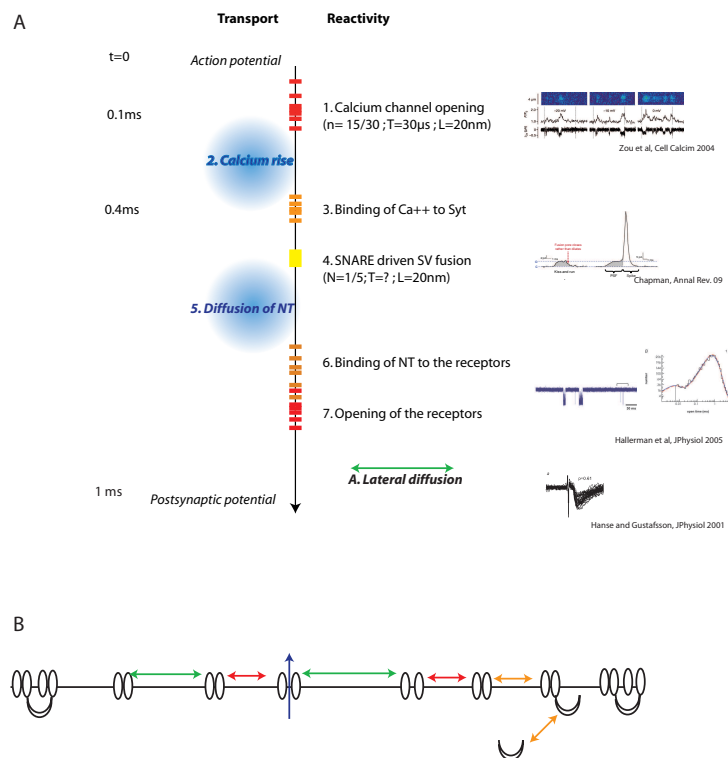


Figure 2: Orders of magnitude in synaptic transmission. **(A)** The different steps of synaptic transmission occurs within 1 ms. They consist of an alternation between biochemical (binding and conformational changes) and physical (diffusion) processes. Each of these processes is stochastic at the molecular level, as indicated by the data presented on the right side of the figure [sources]. **(B)** More generally, dynamic processes at the synapse occur at different time scales. Lateral diffusion of membrane proteins (green) $\sim 0.05 \mu m^2/s$; binding reactions (orange) $\sim s, min$; conformational changes (red) $< ms$; diffusion of small molecules such as ions, neurotransmitters (blue) $\sim 0.5 \mu m^2/s$.

2.1 Stochasticity in molecular processes at the molecular level

2.1.1 Definitions

Define properly: stochastic, probabilistic, random.

A mode of description: as noted by Lenormand *et al* “this representation [as a stochastic process] has nothing to do with the claim that the natural world is, in fine, deterministic or not. The latter question seems empirically unanswerable anyway, because a deterministic process might easily appear random (e.g. deterministic chaos) and a stochastic process might easily appear deterministic (e.g. statistic regularity with large numbers, as in thermodynamics” (Lenormand et al. 2009).

Box. Stochastic description.

“in a model, a process is deterministic when variables take a unique and nonvariable value at each step, a process is stochastic when variables follow a distribution with a non-zero variance”. The matter here is not to say that a process is stochastic or deterministic, but whether the more relevant way to describe our system is deterministic or stochastic. Rather we aim at taking into account the inherent stochastic property of molecular behaviours in the description of synaptic transmission. We think that given the scale of the synapse, taking into account these stochastic property is necessary to describe synaptic transmission. Stochastic modeling/description is more adapted than deterministic description in some cases. [COMMENT KS : Yes, if the underlying processes causing the stochasticity has no other consequences. e.g. if two observable quantities y and z are modulated by the same microscopic process x , the stochasticity of x causes correlation between that of y and z .] In particular, when numbers (of molecules) are small, sizes are small, or rates are low. (Kaern et al. 2005, Bhalla 2004a,

If a system contains a high number of molecules, the parameter of interest is no longer the fate of each molecule but a macroscopic parameter that characterizes the system. The state of the system reflects the distribution of the different states of all individual molecules. In such a case, the contribution of the state of a molecule to the global state of the system is very small, negligible. The system can then be described by a parameter

without taking into account the stochasticity of the individual components.

[[Figure showing stochastic vs deterministic simulations to illustrate that noise increases when the size of the system decreases".]] (Shahrezaei and Swain 2008)

2.1.2 Fluctuations and system size

At the molecular level, diffusion by Brownian motion or biochemical reactions can be described as stochastic processes, and may result in fluctuations of the number of molecules of a given type in a given region. Yet, the importance of these fluctuations depend on the time and length scale considered.

In a system with 1000 molecules, any change of 1 molecule represent a 0.1% change in the system, whereas in a system with 10 molecules, it represents a 10% change, which can have major consequences on the system. Synapses in the central nervous system are 200 nm in diameter (Siksoo et al. 2007, and the number of each species of proteins can be very small (number of receptors is on the order of tens - e.g. \sim 3-140 AMPA receptors depending on the cell types, see Nusser et al. 1998). If we consider the conformational change reaction between open and closed AMPAR, a variation of ± 1 will lead to roughly a 25 % change in the amount of ions entering the cell.

In addition, membrane proteins such as receptors move with a diffusion coefficient of 0.01-0.05 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (Choquet and Triller 2003). In 1 ms, the duration of synaptic transmission (Lisman et al. 2007), the displacement of a protein is 6-14 nm, and it takes 10 ms to go across 50 nm, so the number of proteins can change on a short timescale. Therefore, at such as scale, the randomness (probabilistic aspect) of molecular interactions, conformational changes, and diffusion becomes significant (Shahrezaei and Swain 2008, Bhalla 2004a).

Box. Orders of magnitude at the synapse.

- Timing of the synaptic transmission: “the synaptic delay between the arrival of an action potential at the presynaptic terminal and the onset of the excitatory postsynaptic current (EPSC) is 0.6 ms (\sim 1 ms to EPSC midpoint)” (Lisman et al. 2007)
 - Calcium channels open within 0.1 ms during the peak of the action potential

- The time that it takes to load the sensors can be calculated to be approximately 0.2-0.3 ms (assuming that binding takes place near the diffusion limit ($10^8 M^{-1} \cdot s^{-1}$) and that the Ca^{2+} concentration equals $30 \mu M$).
 - The SNARE complex produces release within ~ 0.1 s.
 - Peak glutamate elevation in the cleft occurs with a latency of ~ 0.08 ms
 - Binding of glutamate to the channel occurs in ~ 0.01 ms.
 - The conformational transition of the channel to the open state requires ~ 0.1 ms.
- Size of the synaptic active zone: 200nm in diameter
 - Volume of a dendritic spine: 0.1 fl ($450nm^3$)
 - Diffusion coefficient of a membrane protein at the synapse: $0.01-0.05 \mu m^2/s$
 - Distance diffused by a membrane protein in 1 ms: 6-14 nm
 - Number of molecules: from ~ 4 AMPA receptors to ~ 300 PSD-95 to >1000 CAMKII.
 - Size of a receptor: ~ 10 nm
 - Lipid/protein ratio in the membrane: Lipids represent about 40% of the membrane surface, the rest of the surface being occupied by proteins. (Choquet and Triller 2003)

2.2 Biochemical processes: conformational changes, binding reactions

2.2.1 Example of receptor opening upon neurotransmitter binding

What evidence for stochasticity? What is a stochastic description of biochemical process/reaction? What does it imply?

There are several lines of evidence for the stochasticity of transitions at the molecular level. The stochastic opening of ion channels can be observed by analysis of the macroscopic current fluctuations or by single channel recording (Hallermann et al. 2005; Sine and Engel 2006; Traynelis and Jaramillo 1998; White et al. 2000). For instance, the probability of opening of an acetylcholine receptor was estimated to $2 \cdot 10^{-3} s^{-1}$ while it is increased about 10^7 fold upon ligand binding (Jackson 1986). In addition, the

stochastic nature of interactions and conformational changes can be probed by FRET experiments for instance (Weninger et al. 2008).

How to describe these probabilistic transitions? Let's take the example of neurotransmitter binding induced opening of receptors. The receptor can be either in an open or a closed state, each of them being able to bind one or two neurotransmitter: this makes 6 possible states (figure ??). Transition between these steps occurs with a certain probability, described by the forward and backward binding rates, which depend on the presence of the ligand. Such a process can either be described in a deterministic or stochastic way.

In a deterministic approach, an equation can describe the concentration of the receptor in each state as a function of the concentration of neurotransmitter. The concentration at a given time is completely determined by the parameters of the system (reaction rate, concentrations....).

In a stochastic approach, the concentration at a given time also depends on a random variable. No analytical expression of the concentration over time can be obtained, however, its mean and its variance can be calculated.

In the limit of large numbers, both approaches would give the same result, because fluctuations in the stochastic model would be negligible compared to the total number of molecules. However, in the limit of small numbers, a stochastic description reveals fluctuations, the amplitude of which can have an impact on the properties/function of the system. These aspects are well reviewed in the case of gene expression (Kaern et al. 2005; Wilkinson 2009).

2.2.2 Implications

The number of receptors open, and the time during which they stay open fluctuate (Nimchinsky et al. 2004). How does this impact on the characteristics of the ion influx in the cell?

The variability of the EPSC due to some "channel noise", *ie* due to the probabilistic nature of receptors, has been estimated using simulations (Franks et al. 2003). In this model it accounts for 8 % of the total variability observed. The variability of the EPSC in relationship with the stochasticity of the interaction between acetylcholine and its receptors has also been investigated (Bennett et al. 1997), but not quantified as clearly as in the former study. The variability due to probabilistic nature of receptors is similarly be applicable to voltage dependent ion channels (White et al. 2000).

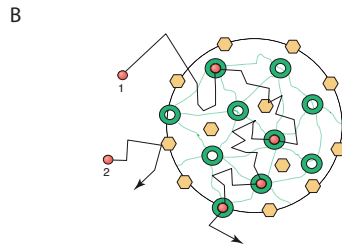
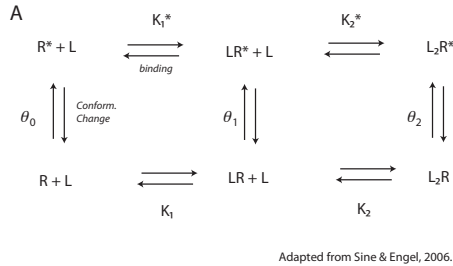


Figure 3: Stochastic processes. **A.** Example of the transitions between the different states of a receptor. R is a receptor in the closed state, R^* in the open state, L is a ligand. The transitions between the different states (open-closed, free-bound) occur *via* binding and conformational changes which are probabilistic events. **B.** Representation of the diffusion of receptors (red, 1 and 2) in the postsynaptic membrane. Receptors can hit obstacles (yellow) or be trapped at binding sites (green). The lateral diffusion of the receptor is also a stochastic process, both the length and the direction of the displacement at a given time are probabilistic.

2.3 Diffusion

2.3.1 Fluctuations in the number and position of molecules

In synaptic transmission, the number of molecules at the synapse (a local concentration), and their individual position within the synapse are important.

The synapse is a spatially defined system, which is open. Diffusion of species does not only occur within or across the synapse but also between the synapse and the extrasynaptic cellular space. In particular, in the neuronal membrane, molecules diffuse with a Brownian motion, and interact with binding sites and obstacles, within a structured environment. *Define*

Brownian motion. Brownian motion is by definition a stochastic process: given a position of the molecule at time t , its position at time $t + dt$ is given by a probability distribution that depends on its diffusion coefficient. (...) Therefore, diffusion can contribute to stochastic changes of the precise position of molecules but also of their local concentration.

In addition, as mentioned above, diffusion occurs on a length scale close to the size of the synapse even on a short time scale, ranging from submillisecons for ions and neurotransmitters to tens of milliseconds for membrane proteins.

Finally, beyond its stochastic aspect, diffusion couples biochemical reactions to each other. Diffusion timing is critical in that it sets the timing of synaptic transmission: when presynaptic calcium channels open, calcium flows into and diffuses within the presynaptic bouton, where it will bind synaptotagmin. Diffusion couples reactive events at different places.

2.3.2 Calcium ions

Upon the membrane depolarization, voltage gated channels open, and calcium flows into the presynaptic terminal. The dynamics of the calcium influx depends on the open time of the channel, and of its conductance. For example, when only a calcium channel is open at a time, for about 0.15ms and with 14pS conductance, the flux is estimated to be 200 ions (Stanley 1993). Then calcium diffuse in the cytoplasm, and bind to buffers : there is a washout effect.

Due to this washout effect, calcium rise occurs in calcium nanodomains, defined as the immediate vicinity of a few Ca^{2+} channels, where Ca^{2+} is not in equilibrium with fast buffers. This is typically in the range 10-100 nm (Neher and Sakaba 2008, Becherer et al. 2003). Since the probability of vesicle fusion in part depends on calcium binding to the calcium sensor, synaptotagmin (Chapman 2008), the distance between the site of calcium entry and the calcium sensor is critical (Becherer et al. 2003; Schneggenburger and Neher 2005).

The influence of the stochastic characteristic of diffusion of calcium does not seem to have been investigated. Measuring the amplitude and time course of calcium remains difficult : it requires the use of fluorescent calcium indicator, which might induce a bias because of the kinetics of binding/unbinding of the chelator, and spatial resolution limited by the light wavelength (Schneggenburger and Neher 2005).

2.3.3 Neurotransmitters

A synaptic vesicle contains about 2000 neurotransmitter molecules (Takamori et al. 2006). This corresponds to a concentration of ~ 5 mM. Neurotransmitters are small molecules (a few nm), and their diffusion coefficient in the synaptic cleft is on the order of magnitude of $0.1\mu\text{m}^2/\text{s}$ (Nielsen et al. 2004). They can be released in the synaptic cleft with different kinetics, depending on the mode of exocytosis (He and Wu 2007). Then, the postsynaptic response will depend on the amount and kinetics of binding of neurotransmitters to receptors.

In particular, modulating diffusion coefficient (with the macromolecule dextran) has been shown to affect the peak amplitude and time course of EPSC (Nielsen et al. 2004). Diffusion in the cleft can be modeled deterministically (continuously) or with a stochastic random walk method. These two models have been compared for the dyadic cleft (in ventricular myocytes), and it was concluded that a deterministic model for Ca^{2+} diffusion together with a stochastic model of the binding events is sufficient to describe Ca^{2+} signalling (Hake and Lines 2008).

At the synapse, such a comparison has not been made. The variation of the concentration of neurotransmitter in a sampling volume in the synaptic cleft, due to random walk of neurotransmitter, has been estimated to $91 \pm 4 \mu\text{M}$, that is about 25 ± 1 molecules (Franks et al. 2003). However, the impact of this fluctuation upon the number of open receptors was not estimated.

These studies suggest that the stochastic nature of the motion of neurotransmitter does not account for variability of the EPSC, though needs to be confirmed. However, it might be asked if the diffusion in the synaptic cleft is really Brownian.

In addition, some variability can arise at the release step, from the release location of neurotransmitters. Though neurotransmitters diffuse, they diffuse radially from the release site. If the release site is located on the border of the synapse, a large part of the receptors will diffuse out of the synapse before they bind to synaptic receptors, resulting in a smaller number of open receptors, whereas if the release site is right in the middle of the synapse, more neurotransmitters will bind to receptors. This point is also developed in section 3.1 (Franks et al. 2003).

2.3.4 Membrane proteins

Synaptic membrane proteins include presynaptic voltage gated calcium channels and t-snares, pre- and postsynaptic adhesion proteins, post-synaptic receptors. These proteins are a few nanometers in diameter and diffuse within the plasma membrane. The lateral diffusion of neurotransmitter receptors has been extensively investigated (Triller and Choquet 2008, Choquet and Triller 2003). Their diffusion coefficient ranges from 10^{-4} to $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Number of proteins at the synapse. The exchange of membrane proteins between the synapse and the extrasynaptic space by lateral diffusion can occur on the time scale of 10-100 ms which is closed to the characteristic time of reaction and/or synaptic transmission. The number of receptors at the synapse is on the order of tens of molecules. This means that, by lateral diffusion, the number of receptors at the synapse can significantly vary in a stochastic way on a very short time scale. In this respect, Heine et al. 2008 have shown that part of the recovery of synaptic depression under long stimulus is due to the influx of fully-sensitized receptors balanced by the outflux of desensitized receptors. The stochasticity of diffusion can thereby contribute to the variability in the evoked postsynaptic potentials, in a certain range of time scale.

Position of the proteins within the synapse. The position of membrane proteins relative to each other is also critical in synaptic transmission. For instance, the stochasticity of the motion can generate some variability in the position of calcium channels, which as mentioned above should be close to the exocytotic site. This variability in the position can result in variability in the release probability (Shahrezaei and Swain 2008). The positioning of receptors to neurotransmitters in front of the release site might also be important. However, simulation showed little effect of the distribution of receptors on the EPSC variability, much less important than the variability in the number of receptors (Trommershäuser et al. 1999).

2.4 Synaptic transmission as a sequence of coupled events

2.4.1 Spatio-temporal coupling between the steps in synaptic transmission

The facts that the different steps of synaptic transmission occur in sequence reflect the fact that they are actually coupled to each other. Though each of the steps of synaptic transmission is stochastic, it occurs with a probability which depends on the previous step. In the previous example, receptor

opening rarely occurs in the absence of neurotransmitters, whereas opening is highly probable if it is bound to a neurotransmitter. In this sense, the different steps are coupled to each other: each step involves a factor that influences the probability of the following event to occur (??).

As mentioned above diffusion has a role in coupling steps occurring at different places. In particular, diffusion of small molecules is rapid at this length scale, and allow to tightly couple the reactions. The relationship between diffusion and noise, whether diffusion increases or decreases noise, has been investigated by Bhalla *et al* (Bhalla 2004a).

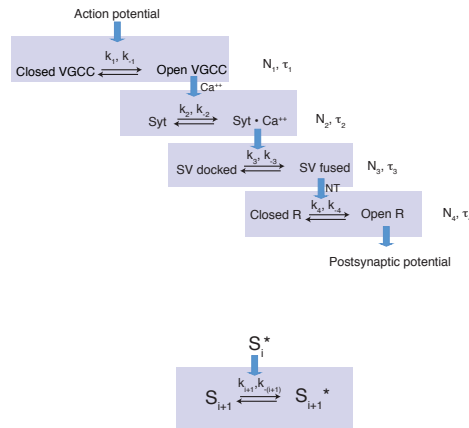


Figure 4: Coupling between the different events. The different steps in synaptic transmission are coupled to each other : the probability for one step to occur highly depends on the occurrence of the previous step. This raises the question of how the variability of one step affects the following one. N refers to the number of the synaptic elements involved in each step, τ to the characteristic time of each step, and $k_{i,-i}$ the transition rates for each step. The scheme at the bottom sums up this picture, with S to S^* representing the “activation” of a given step. (*to be clarified*).

2.4.2 Spatial organisation

How does spatial structure affect stochasticity?

In signalling processes in general, the efficiency of signalling is highly dependent of the relative location of the different actors (Kholodenko 2006). At the synapse, the relative localisation of calcium channels, calcium sensor synaptic vesicle, release site and receptors indeed affects synaptic variability as described above.

A highly organised structure can constrain the position of the different actors and limit variability. Indeed, the motion of membrane proteins such as receptors has been observed to be slow and confined at synapses (Dahan et al. 2003). Binding to submembrane proteins is also likely to favor localised interactions (Bucurenciu et al. 2008; Kusumi et al. 2005).

At a higher level, morphology can also play a role: e.g. spine. [REF]

3 Biological implications of stochasticity

To be clarified. To which extent is a stochastic description of the molecular processes relevant at the synapse? What is the amplitude of fluctuations in the EPSC due to the stochasticity of molecular processes? What is the impact of such fluctuations on the synaptic function? What questions arise from this stochasticity? What properties cannot be described or explained without taking into account stochasticity?

3.1 From the stochasticity of molecular events to the variability in the EPSC

3.1.1 To which extent does the variability at one step affect the next one?

The fact each reaction affects the next one in a specific manner, means that the variability at a given step can also generate some variability in the next step. This has been well described in the case of gene expression, where variability in the transcription step affects the translation step (Paulsson 2004). How the variability of different steps are related to each other depend on the number of molecules and the amplitude and time scale of their fluctuation. If the frequency of fluctuation at step i is low, whereas step $i + 1$ is very fast, step $i + 1$ will not see any fluctuations. Similarly, the amplitude of the fluctuation at step i might be too small to be “detected” by step $i + 1$. In simulations of synaptic transmission, the output behaviours also depends on how steps are coupled to each other and on their characteristics (forward and backward rates of reaction, diffusion coefficient...) but there is no general framework describing this aspect (Bhalla 2004a).

3.1.2 How does molecular stochasticity relate to the mesoscopic variability of the EPSC?

However, some argue that the stochasticity of molecular processes cannot account for variability at a mesoscopic scale. Fluctuations rapidly dampen except if the molecular processes exhibits some particular properties, that put constraints on the system so that the stochasticity of molecular events can impact processes at a higher scale:

Lesne 2008: *“Only molecular degrees of freedom are inherently random insofar as they directly follow from thermal motion. Stochasticity at a supra-molecular level is of different nature. [...] Indeed, investigating anomalous statistical laws has shown that it requires very specific statistical features at the elementary level to escape the law of large numbers and central limit theorem: in order to maintain a stochastic behaviour at the level of an assembly, the elementary events should either have an infinite variance, exhibit strong correlations, the underlying medium should have a fractal-like structure, or the emergent features should exert feedbacks on the elements enhancing their variability. For instance, observing a random switch in a macromolecule conformation or random spiking activity in a neuron cannot be explained as a mere consequence of thermal fluctuations; it requires a specific regulatory architecture or dynamics (e.g. positive circuits or long-range correlations) channeling thermal fluctuations into a higher level stochasticity (Kholodenko 2006). Another mechanism invoked to account for apparent randomness in some biological processes (neuron spiking, brain activity, heart beats) is chaotic dynamics and associated exponential amplification of initial errors and perturbations (Lesne 2006). In fact, it is not so different since chaos is a feature of a deterministic dynamics, that is, of an effective mesoscopic process also resulting from a non-trivial collective effect. Here again, the resulting large-scale stochasticity also drastically differs in nature from thermal noise. In any case, the non-trivial origin of mesoscopic stochasticity hints at a selected functional role.”*

Remark: does the fact that the release is quantal has specific implications regarding the variability? What would happen if release was not quantal but gradual, as if neurotransmitters were released in the cleft through channels for instance?

3.2 Properties specific to stochastic systems: how relevant are they to the synapse?

3.2.1 Sensitivity

3.2.2 Robustness

“Robustness is a property that allows a system to maintain its functions despite external and internal perturbations [and uncertainty].” (Kitano 2004, Stelling et al. 2004)

“Discussion of robustness only makes sense if we specify what feature and with respect to what class of perturbations this feature is robust.” (Lesne 2008) It is also necessary to identify “the tolerance with which the feature reproducibility is to be appreciated”.

Lesne 2008: Molecular noise is central in all intra-cellular processes due to inescapable Brownian motion of the molecules and inherent thermal stochasticity of molecular events like binding, chemical reactions or conformational transitions. Molecular noise should not be seen as a perturbation, since it is built-in: living systems have been obliged to manage with it since the very beginning. It has been part of the evolution process and adaptation of the system, and belongs essentially to its reference setting and functional dynamics. [...]

3.2.3 Plasticity

Many studies that have considered stochasticity have focused on the plastic properties of the synapse, see for instance the description of the bistability of a molecular switch involving CAMKII (Miller et al. 2005). Another interesting study (Bhalla 2004b) compares deterministic and stochastic description of network of interactions involved in plasticity at the synapse (but this is on a longer term, several action potentials).

3.3 Biological relevance

3.4 Experimental and conceptual challenges

3.4.1 Quantification of variability

To further characterize the effects of stochasticity, various technical challenges have to be met. Description of biochemical and biophysical processes *in vivo* will require access to diffusion, counting molecules, identification of their states (binding, phosphorylation, conformation), access to the kinetics of interactions... with appropriate time and space resolutions.

3.4.2 Contribution of stochasticity to EPSC variability

What is the relative importance of fluctuations at each step? Some have asked about the extent to which different sources of variability affect synaptic transmission, comparing for instance, the stochasticity of postsynaptic receptors (channel noise), variation of glutamate concentration in the synaptic cleft, and differences in the potency of synaptic vesicles released from different locations on the active zone (Franks et al. 2003). In a different approach, it was shown that “the differential distribution of calcium channels did not correlate with differences in release efficacy” (Reid et al. 1997).

3.4.3 Integration of all stochastic events

There is also a need for a theoretical framework, to integrate all this information, a systemic approach (networks, simulation...).

3.4.4 What modulates variability?

References

- U. Becherer, T. Moser, W. Stühmer, and M. Oheim. 2003. Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nature Neuroscience*, 6(8):846–53.
- M. Bennett, L. Farnell, W. Gibson, and N. Lavidis. 1997. Synaptic transmission at visualized sympathetic boutons: stochastic interaction between acetylcholine and its receptors. *Biophysical Journal*, 72(4):1595–1606.
- U. S. Bhalla. 2004. Signaling in small subcellular volumes. i. stochastic and diffusion effects on individual pathways. *Biophysical Journal*, 87(2):733–44.
- U. S. Bhalla. 2004. Signaling in small subcellular volumes. II. stochastic and diffusion effects on synaptic network properties. *Biophysical Journal*, 87(2):745–53.
- T. Branco and K. Staras. 2009. The probability of neurotransmitter release: variability and feedback control at single synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(5):373–383.
- T. Branco, K. Staras, K. J. Darcy, and Y. Goda. 2008. Local dendritic activity sets release probability at hippocampal synapses. *Neuron*, 59(3):475–85.
- I. Bucurenciu, A. Kulik, B. Schwaller, M. Frotscher, and P. Jonas. 2008. Nanodomain coupling between ca^{2+} channels and ca^{2+} sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse. *Neuron*, 57(4):536–545.
- E. R. Chapman. 2008. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annual Review of Biochemistry*, 77:615–41.
- D. Choquet and A. Triller. 2003. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(4):251–65.

- M. Dahan, S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, and A. Triller. 2003. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5644):442–5.
- K. M. Franks, C. F. Stevens, and T. J. Sejnowski. 2003. Independent sources of quantal variability at single glutamatergic synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(8):3186–95.
- J. Hake and G. T. Lines. 2008. Stochastic binding of ca^{2+} ions in the dyadic cleft; continuous versus random walk description of diffusion. *Biophysical Journal*, 94(11):4184–4201.
- S. Hallermann, S. Heckmann, J. Dudel, and M. Heckmann. 2005. Short openings in high resolution single channel recordings of mouse nicotinic receptors. *The Journal of Physiology*, 563(Pt 3):645–662.
- E. Hanse and B. Gustafsson. 2001. Quantal variability at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus. *The Journal of Physiology*, 531(Pt 2):467–80.
- L. He and L. Wu. 2007. The debate on the kiss-and-run fusion at synapses. *Trends in Neurosciences*, 30(9):447–455.
- M. Heine, L. Groc, R. Frischknecht, J. Béïque, B. Lounis, G. Rumbaugh, R. L. Huganir, L. Cognet, and D. Choquet. 2008. Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5873):201–5.
- M. B. Jackson. 1986. Kinetics of unliganded acetylcholine receptor channel gating. *Biophysical Journal*, 49(3):663–672.
- M. Kaern, T. C. Elston, W. J. Blake, and J. J. Collins. 2005. Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nature Reviews. Genetics*, 6(6):451–64.
- B. Kholodenko. 2006. Cell-signalling dynamics in time and space. *NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY*, 7(3):165–176.
- H. Kitano. 2004. Biological robustness. *Nature Reviews. Genetics*, 5(11):826–37.
- A. Kusumi, C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R. S. Kasai, J. Kondo, and T. Fujiwara. 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. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 34:351–78.
- T. Lenormand, D. Roze, and F. Rousset. 2009. Stochasticity in evolution. *Trends in Ecology & Evolution (Personal Edition)*, 24(3):157–165.
- A. Lesne. 2006. Chaos in biology. *RIVISTA DI BIOLOGIA-BIOLOGY FORUM*, 99(3):467–481.
- A. Lesne. 2008. Robustness: confronting lessons from physics and biology. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 83(4):509–532.

- J. E. Lisman, S. Raghavachari, and R. W. Tsien. 2007. The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(8):597–609.
- P. Miller, A. M. Zhabotinsky, J. E. Lisman, and X. Wang. 2005. The stability of a stochastic CaMKII switch: Dependence on the number of enzyme molecules and protein turnover. *PLoS Biology*, 3(4):e107 EP –.
- E. Neher and T. Sakaba. 2008. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron*, 59(6):861–72.
- T. A. Nielsen, D. A. DiGregorio, and R. A. Silver. 2004. Modulation of glutamate mobility reveals the mechanism underlying slow-rising AMPAR EPSCs and the diffusion coefficient in the synaptic cleft. *Neuron*, 42(5):757–71.
- E. A. Nimchinsky, R. Yasuda, T. G. Oertner, and K. Svoboda. 2004. The number of glutamate receptors opened by synaptic stimulation in single hippocampal spines. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(8):2054–2064.
- Z. Nusser, R. Lujan, G. Laube, J. D. Roberts, E. Molnar, and P. Somogyi. 1998. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron*, 21(3):545–559.
- J. Paulsson. 2004. Summing up the noise in gene networks. *Nature*, 427(6973):415–418.
- C. A. Reid, J. D. Clements, and J. M. Bekkers. 1997. Nonuniform distribution of ca2+ channel subtypes on presynaptic terminals of excitatory synapses in hippocampal cultures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(8):2738–45.
- R. Schneggenburger and E. Neher. 2005. Presynaptic calcium and control of vesicle fusion. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(3):266–274.
- V. Shahrezaei and P. S. Swain. 2008. The stochastic nature of biochemical networks. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(4):369–74.
- L. Siksou, P. Rostaing, J. Lechère, T. Boudier, T. Ohtsuka, A. Fejtová, H. Kao, P. Greengard, E. D. Gundelfinger, A. Triller, and S. Marty. 2007. Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(26):6868–77.
- S. M. Sine and A. G. Engel. 2006. Recent advances in cys-loop receptor structure and function. *Nature*, 440(7083):448–455.
- E. F. Stanley. 1993. Single calcium channels and acetylcholine release at a presynaptic nerve terminal. *Neuron*, 11(6):1007–1011.
- J. Stelling, U. Sauer, Z. Szallasi, F. J. Doyle, and J. Doyle. 2004. Robustness of cellular functions. *Cell*, 118(6):675–85.