



HAL
open science

Micropatterning subcellulaire pour étudier la connectivité neuronale

Nathalie Piette

► **To cite this version:**

Nathalie Piette. Micropatterning subcellulaire pour étudier la connectivité neuronale. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0034 . tel-04573512

HAL Id: tel-04573512

<https://theses.hal.science/tel-04573512>

Submitted on 13 May 2024

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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Nathalie PIETTE

**Micropatterning subcellulaire pour étudier la
connectivité neuronale**

Sous la direction de Vincent Studer

Soutenue le 18 Mars 2024

Membres du jury

Mr. STUDER, Vincent
Mme. RENNER, Marianne
Mr. GABRIELE, Sylvain
Mme. TOMBA, Caterina
Mr. THERY, Manuel
Mr. DUBOIN, Aurélien
Mr. THOUMINE, Olivier

Directeur de recherche
Professeur des universités
Directeur de recherche
Chargée de recherche
Directeur de recherche
Ingénieur Alvéole Paris
Directeur de recherche

Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Président du Jury
Membre invité
Membre invité

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers les membres du jury qui ont investi de leur temps et de leur expertise pour évaluer mon manuscrit et mon travail. Vincent et Olivier, merci de m'avoir proposé ce projet et de m'avoir fait confiance pour le mener à bien. Merci à Alvéole d'avoir accepté un projet si biologique et d'avoir valorisé mon travail. Merci à Vincent d'avoir accepté de diriger cette thèse.

À ma famille, même si nous ne sommes pas toujours les plus communicatifs, je veux vous dire merci. À mes parents, merci de m'apporter votre soutien, même lorsque vous ne comprenez pas toujours la nature de mes projets. Votre présence dans les moments difficiles ces derniers temps m'est précieux. À mon frère, qui a toujours été un pilier solide et un modèle, je sais que je peux compter sur toi et Stéphanie pour une session thérapie en voiture à tout moment. À ma sœur, à mes nièces et à mon neveu, même si nos vies nous éloignent parfois, je veux que vous sachiez que la famille demeure une constante dans ma vie, et que je serai toujours là pour vous. À l'ensemble de ma famille élargie, tantes, oncles, cousines, cousins, à tous ceux qui ont pris des nouvelles, se sont inquiétés et m'ont apporté leur soutien, je vous en suis profondément reconnaissante.

À mes deux piliers, mes meilleurs amis, ma famille choisie. Joanne, nous avons évolué ensemble depuis 15 ans, et tu es bien plus qu'essentielle à ma vie. Sans toi, cette thèse n'aurait sûrement jamais vu le jour. J'attends avec impatience de continuer à nager à tes côtés, jusqu'à nos vieux jours. À Manu, mon ami d'armée, malgré la distance, tu es toujours présent. Nous avons créé des souvenirs inoubliables lors de nos nuits au village du monde. Merci à vous deux d'être toujours là, à l'écoute, et je suis comblé par les magnifiques familles que vous avez construites. Je n'oublie pas la fine équipe de la Belette : Thilo, Léo, Nicolas, Mathieu et Alexandra. Même si la distance réduit nos réunions et nos échanges, vous comptez beaucoup pour moi.

À ma deuxième vie, ma vie associative, j'ai appris à sauver des vies et j'ai gagné en confiance à la protection civile. À l'équipage solidaire et à l'équipe de Delivraide, merci de m'avoir accompagné dans ce projet audacieux, qui m'a permis de maintenir le cap et de rester motivé au cours de cette dernière année. À la meilleure équipe de bénévoles, la Sécurité Nocturne, qui m'a permis de faire de merveilleuses rencontres entre musique et courtes nuits. À ma suisse préférée, Joannie, qui rend cet événement encore plus spécial chaque année.

À mes collègues actuels et passés, à ceux qui sont devenus plus que ça, Marine, PO, Grégoire, Caroline, Mathieu, Julie, Charles et Konstantina, je vous adresse mes remerciements pour votre soutien et votre bonne humeur. Je suis reconnaissante envers toutes les autres personnes qui ont contribué à ce projet de près ou de loin, car vous faites tous partie de cette histoire. Je remercie du fond du cœur toutes les personnes qui m'ont soutenu lorsque la situation est devenue compliquée et qui ont consacré de leur temps pour m'aider à avancer, avec une pensée particulière pour mon tuteur Daniel Voisin.

Enfin, je souhaite dédier ce mémoire à ceux qui m'ont quitté ces dernières années. À ma grand-mère paternelle, partie trop tôt, qui, bien qu'elle ne comprît pas tous les détails de mes études, en était toujours fière. Merci de m'avoir enseigné, à travers les jeux de cartes, la curiosité et l'importance de prendre le temps de réfléchir et d'observer. À Night, mon compagnon de vie, mon soutien émotionnel le plus précieux, merci de m'avoir choisi.

« Asking for help isn't giving up, it's refusing to give up » Charlie Mackesy, The Boy, the Mole, the Fox and the Horse

« Pour chaque fin il y a toujours un nouveau départ » Le petit prince d'Antoine de St-Exupéry

TABLE DES MATIERES

INDEX DES FIGURES.....	1
INDEX DES TABLEAUX.....	3
INDEX DES ANNEXES	3
ABREVIATIONS.....	5
RESUME.....	7
ABSTRACT	8
PUBLICATIONS ET COMMUNICATION.....	9
INTRODUCTION	11
I Impression protéique micrométrique	12
1.1 Histoire.....	12
1.2 Impression protéique : intérêts et défis.....	13
1.3 Technologies d'impression protéique	14
1.3.1 Impression mécanique	14
1.3.1.1 Impression par écriture.....	15
1.3.1.2 Impression par contact	18
1.3.2 Impression par Photolithographie	21
1.3.2.1 Photolithographie : masque physique.....	21
1.3.2.2 Photolithographie sans masque et sans contact	22
1.3.3 Evolution de l'impression protéique	24
1.3.3.1 Micropatterning en neuroscience	26
II Connectivité synaptique et formation des synapses.....	27
2.1 Synapse.....	28
2.1.1 Structure et fonction	28
2.1.2 Formation synaptique	31
2.1 Protéines d'adhésion synaptique et synaptogenèse.....	34
2.1.1 Neurexines.....	36
2.1.2 Neuroligines	38
2.1.3 LRRTMs.....	40
2.1.4 SynCAMs.....	41
2.1.5 Cadhérines.....	42
2.2 Synapse et protéines d'adhésion synaptique : un puzzle incomplet	43

III	Etude du rôle des protéines d'adhésion dans la connectivité synaptique	45
3.1	Technique d'études des interactions protéine-protéine	45
3.1.1	Techniques d'études des interactions protéine-protéine <i>in vitro</i>	46
3.1.1.1	Identifier des interactions.....	46
3.1.1.2	Structure de l'interaction.....	49
3.1.1.3	Caractérisation biophysique	50
3.1.2	Microscopie : Diffusion, interactions protéiques <i>in cellulo</i> et impact de l'environnement cellulaire.....	52
3.1.2.1	Interaction et diffusion protéique : impact de l'environnement cellulaire	54
3.1.2.2	Microscopie : Mesure de diffusion et d'interactions.....	55
3.2	Rôle des protéines d'adhésion synaptique : Modèle d'hémi-synapse.....	60
3.2.1	Interaction Bille-Neurone.....	61
3.2.2	Coculture	62
3.2.3	Cluster d'anticorps	62
3.3	Micropatterning subcellulaire : interactions protéiques et hémi-synapse.....	63
	OBJECTIFS DE LA THESE.....	67
	MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE	69
I	Résultats.....	69
1.1	Dissection des interactions protéiques	69
1.1.1	Détails des analyses cinétiques	90
1.1.1.1	Analyse des trajectoires de SPT-PALM	90
1.1.1.2	Analyse des retours de FRAP	92
1.2	Développement futur pour l'étude des interactions protéiques.....	99
1.2.1	Criblage d'interaction.....	99
1.2.2	Modèle de compétition.....	102
1.2.2.1	Efficacité du couplage Fibrinogène SNAPligand	106
1.2.2.2	Activité de la Neurexine-SNAPtag.....	107
1.2.3	Etude de la zone membrane-motif protéique par EM.....	109
II	Conclusion.....	115
III	Matériels et méthodes.....	119
3.1	Plasmides d'ADN.....	119
3.1.1	Plasmide pour mesure d'enrichissement, SPT-PALM et FRAP.....	119
3.1.2	Plasmide pour production de protéines recombinante.....	119
3.2	Electroporation.....	119

3.3	Protéines.....	120
3.3.1	Protéines recombinantes	120
3.3.2	Couplage protéique.....	121
3.3.2.1	Neuroligine1-HaloTag	121
3.3.2.2	Fibrinogène SNAPligand.....	121
3.3.3	Activité de la protéine recombinante Neurexine1 β -SNAPtag	122
3.3.3.1	Western blot	122
3.3.3.2	Marquage live et immunomarquage	123
3.4	Micro-impression de biomolécule en PLPP liquide	123
3.5	Imagerie.....	125
3.5.1	Epifluorescence et TIRF	125
3.5.2	Système d'imagerie optique	126
3.5.2.1	FRAP	126
3.5.2.2	SPT PALM	127
3.5.3	Microscopie Electronique.....	127
3.5.3.1	Microscopie électronique à balayage.....	127
3.5.3.2	Microscopie électronique à transmission.....	128
3.6	Analyse.....	129
3.6.1	Mesure de l'enrichissement.....	129
3.6.2	Analyse du suivi de molécule unique	130
3.6.2.1	SPT-PALM	130
3.6.2.2	Extraction des coefficients cinétiques	130
3.6.2.3	Simulation de trajectoires via FluoSIM	131
3.6.3	Correction et normalisation des données de FRAP	132
	MODELE D'HEMI-SYNAPSE.....	135
I	Résultats.....	136
1.1	Culture de neurones primaires sur substrat micro imprimés	136
1.1.1	Augmenter la vitesse d'impression surfacique	136
1.1.1.1	Caractérisation du PLPP gel	137
1.1.2	Culture de neurone sur le long terme.....	138
1.1.2.1	Stabilité des patterns	140
1.1.2.2	Culture Banker	141
1.2	Formation et caractérisation d'hémi-synapse.....	143

1.2.1	Recrutement spécifique de marqueur pré-synaptique	144
1.2.2	Recrutement spécifique de structure pré-synaptique.....	146
1.2.3	Plurihéli-synapse, tripartite et activité synaptique.....	148
1.2.3.1	Plurihéli synapse et complexe tripartite.....	148
1.2.3.2	Activité synaptique	150
1.2.1	Morphologie des synapses.....	151
1.2.2	Héli-postsynapse	153
1.3	Décorrélér l'adhésion de la formation des synapses	154
1.3.1	Impression multiprotéique.....	155
1.3.2	Impression sur revêtement adhésif	157
II	Conclusion.....	161
III	Matériels et Méthodes	165
3.1	Culture de neurones primaires hippocampiques.....	165
3.2	Plasmides d'ADN.....	165
3.3	Electroporation.....	166
3.3.1	Electroporation COS-7.....	166
3.3.2	Transfection Neurones.....	166
3.4	Protéines.....	167
3.5	Impression protéique	167
3.5.1	Impression en PLPP gel.....	167
3.5.2	Impression sur coating homogène.....	169
3.6	Imagerie.....	169
3.6.1	Microscopie optique	169
3.6.1.1	Système optique	169
3.6.1.2	Immunomarquage	169
3.6.2	Microscopie Electronique.....	170
3.6.2.1	Microscopie électronique à balayage.....	170
3.6.2.2	Microscopie électronique à transmission.....	170
3.7	Analyse.....	171
3.7.1	Analyse de l'enrichissement héli-synaptique	171
3.7.2	Analyse des héli-synapses et des vésicules en MET	173
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	175
I	Dissection des interactions protéine-protéine	175

II	Hémi-synapse et induction synaptique médié par la présynapse	176
III	Impact industriel	180
	ANNEXES.....	183
	BIBLIOGRAPHIE.....	217

INDEX DES FIGURES

Figure 1. L'art précurseur du micropatterning.....	12
Figure 2. Les premiers essais de micropatterning cellulaire	13
Figure 3. Impact de l'adsorption sur l'activité protéique.....	14
Figure 4. Technique d'écriture : Les micro-îlots.....	15
Figure 5. Technique d'écriture : Les spotters.....	16
Figure 6. Technique d'écriture : Impression par jet d'encre.....	17
Figure 7. Technique d'écriture : Deep Pen Nanolithography	17
Figure 8. Impression par contact.....	18
Figure 9. Impression par contact : îlot de neurone.....	19
Figure 10. Combinaison de techniques : Polymer Pen Lithographie	20
Figure 11. Photolithographie par masque	22
Figure 12. Photolithographie sans contact et sans masque	23
Figure 13. Morphologie du Neurone.....	27
Figure 14. Répartition des synapses le long du neurone	28
Figure 15. Morphologie de la synapse	29
Figure 16. Les différentes vésicules pré-synaptiques	30
Figure 17. Etapes du développement des neurones hippocampiques.....	32
Figure 18. Formation des synapses : Les filopodes dendritiques	32
Figure 19. Etapes de la formation des synapses	33
Figure 20. Les protéines d'adhésions synaptiques	35
Figure 21. Neurexine structure et interaction	36
Figure 22. Structure de Neuroligine1	38
Figure 23. Structure et interaction de LRRTM	40
Figure 24. Structure de SynCAM	41
Figure 25. Cadhérine structure et fonction.....	42
Figure 26. Méthodes d'étude des interactions protéine-protéine.....	46
Figure 27. Techniques d'identification d'interaction protéiques	47
Figure 28. Criblage d'interaction protéique par micropatterning	49
Figure 29. Cristallographie	50
Figure 30. Résonance plasmonique de surface.....	51
Figure 31. Schéma des différents types de diffusion	53
Figure 32. Spectroscopie de corrélation de fluorescence.....	56
Figure 33. Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes	57
Figure 34. Retour de fluorescence après photoblanchiment	58
Figure 35. Suivi de particule unique par photo-activation.....	60
Figure 36. Modèle d'hémi-synapse.....	61
Figure 37. Interaction bille -Neurone.....	61
Figure 38. Coculture	62
Figure 39. Cluster d'anticorps	63
Figure 40. Impression subcellulaire : Etude des interactions protéine-protéine	64
Figure 41. Modèle d'hémi-synapse par impression protéique.....	65
Figure 42. Modèle schématisé d'interaction protéine-protéine par micropatterning.....	67

Figure 43. Modèle schématisé d'hémi-synapse par micropatterning	68
Figure 44. MSD et coefficient de diffusion	90
Figure 45. Effet des taux de transition sur la distribution des coefficients de diffusion	91
Figure 46. Equation de réaction-diffusion générique par transformé de Laplace.....	93
Figure 47. Graphique des différents régimes d'interaction et de leurs frontières.....	94
Figure 48. Schéma explicatif du modèle de FRAP non couplé à la diffusion	95
Figure 49. Courbe en épaule pour des modèles a simple état versus double états.....	96
Figure 50. Schéma explicatif du modèle de FRAP couplé à la diffusion	97
Figure 51. Impression de protéines non purifiées	101
Figure 52. Modèle de compétition.....	102
Figure 53. Chaines d'amplification	103
Figure 54. Facteurs d'améliorations de l'impression multiple.....	105
Figure 55. Efficacité du couplage Fibrinogène et SNAPligand	107
Figure 56. Activité de la Neurexine1 β -SNAPtag recombinante	108
Figure 57. Microscopie électronique à balayage sur des COS-7 sur des impressions protéiques linéaires.....	110
Figure 58. Impression protéique sur de l'Aclar pour la microscopie électronique à transmission	112
Figure 59. Impact de l'orientation et de l'adressage des miroirs sur des impressions micrométriques	114
Figure 60. Réaction de couplage pour le fibrinogène-SNAPligand	121
Figure 61. Epifluorescence et TIRF	125
Figure 62. Protocole de préparation des coupes longitudinales pour l'imagerie MET	128
Figure 63. Mesure d'enrichissement en COS-7	129
Figure 64. Distribution de $D_{instant}$ le long de trajectoires à l'extérieure et à l'intérieure du motif protéique	131
Figure 65. Correction et normalisation des données de FRAP	133
Figure 66. Modèle d'hémi-synapse	135
Figure 67. Impact de la densité neuronale et de la surface de motif	136
Figure 68. Caractérisation du PLPP gel.....	139
Figure 69. Stabilité des patterns	141
Figure 70. Culture de neurones micro-imprimés	142
Figure 71. Formation d'hémi-présynapse	145
Figure 72. Recrutement de vésicules pré-synaptique.....	147
Figure 73. Plurihémi-synapse et tripartite complexe.....	149
Figure 74. Différence d'activité synaptique entre les hémi-présynapses simples et les complexes tripartites.....	150
Figure 75. Morphologie membranaire des hémi-présynapses.....	152
Figure 76. Neurone sur impression de Neurexine	153
Figure 77. Multiprotéique impression en PLPP gel	156
Figure 78. Impression sur recouvrement adhésif	159
Figure 79. Protocole d'impression protéique en PLPP gel	168
Figure 80. Protocole de préparation des coupes de neurones pour l'imagerie MET	171
Figure 81. Analyse haut-débit des hémi-synapses.....	172

Figure 82. Analyse manuelle des vésicules sur les images de MET d'hémi-synapse.....	174
Figure 83. Image du réseau d'actine par STORM sur des neurones adhérents sur des micro-motifs.....	179

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Tableau comparatif des techniques d'impressions protéiques	24
Tableau 2. Synthèse des interactions protéiques testées	100
Tableau 3. Séquence de FRAP	127
Tableau 4. Comparatif du PLPP liquide versus PLPP gel	137
Tableau 5. Valeurs d'enrichissement sur les hémi présynapse	144
Tableau 6. Synthèse formation d'hémi postsynapse avec Neurexine1	154
Tableau 7. Synthèse formation d'hémi présynapse avec Neuroligine.....	154

INDEX DES ANNEXES

Annexe 1. Macro d'analyse de l'enrichissement.....	183
Annexe 2. Macro d'analyse des hémi-synapses.....	183
Annexe 3. Note d'application Alvéole "Micropatterning of primary neurons with PRIMO".	184
Annexe 4. Chapitre « Synaptic development ».....	189

ABREVIATIONS

2D : Deux dimensions

3D : Trois dimensions

- ABC -

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFM : Microscope à force atomique

B4F : Biotin-4-fluorescein

BIC : Bordeaux Imaging Center

BLI : Interférométrie biocouche

BSA : Bovine serum albumin

CLEM : Microscopie électronique
lumineuse corrélative

-DEF-

DIV : Days in vitro

DMD : Matrice de micro-miroirs

DPN : Dip pen nanolithography

EM : Microscopie électronique

Fc : Fragment cristallisable

FCS : Spectroscopie de Corrélation de
Fluorescence

FRAP : Retour de Fluorescence après
Photoblanchiment

FRET : Transfert d'énergie entre molécules
fluorescentes

-GI-

GFP : Protéine fluorescente verte

iPSCs : Cellules souches pluripotentes
induites

-K-

K_a : Constante d'équilibre d'association

K_d : Constante de dissociation à l'équilibre

kDa : Kilodalton

K_{off} : Constante cinétique de dissociation

K_{on} : Constante cinétique d'association

-L-

LAPAP : Laser-assisted protein
micropatterning

LCD : Ecran à cristaux liquides

LIMAP : Light-induced molecular
adsorption of proteins

LNS : Laminin-neurexin-sex hormone
binding globulin

LRRTM : Leucine-rich repeat

transmembrane neuronal proteins

LTD : Dépression synaptique à long terme

LTP : Potentialisation à long terme

-MN-

MDGA : MAM Domain Containing

Glycosylphosphatidylinositol Anchor 1

MEB : Microscopie électronique à
balayage

MSD : Déplacement quadratique moyen

NA : Ouverture numérique

Ncadh : Ncadherine

Nlg : Neuroligine

Nrx : Neurexine

-P-

PA : Photo-activation

PALM : Microscopie par localisation
photoactivée

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PEG : Polyéthylène glycol

PLL : Poly-L-lysine

PPIs : Protéine-protéine interactions

PSD : Densité postsynaptique

-QR-

QDs : Quantum dots

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROI : Région d'intérêt

-STUV-

SDS-PAGE : Électrophorèse sur gel de
polyacrylamide en présence de
dodécylsulfate de sodium

SPR : Résonance plasmonique de surface

SPT : Suivi de particule unique

SS4 : Site d'épissage 4

STED : Déplétion par émission stimulée

MET : Microscopie électronique à
transmission

TIRF : Réflexion totale interne

UV : Ultraviolet

vGLUT1 : Transporteur vésiculaire du
glutamate 1

RESUME

L'impression protéique a initialement été utilisée pour reproduire et comprendre l'influence de la matrice extracellulaire sur les cellules et certains de leurs composants. Au cours de la dernière décennie, l'impression subcellulaire s'est développée, permettant d'étudier les interactions protéiques et leur rôle dans les voies de signalisation ainsi que dans la formation de synapses, immunologiques ou neuronales.

La connexion synaptique est médiée par les protéines d'adhésion synaptique présentes de chaque côté de la synapse. En raison de la complexité de l'environnement synaptique mais également du manque de modèle *in vitro* permettant d'étudier la connexion synaptique dans un environnement biomimétique et contrôlé, les rôles exacts de ces protéines dans la synaptogénèse restent encore incertains. L'impression protéique subcellulaire est une solution potentielle pour combler ce manque. Pour cela, nous avons développé deux modèles biomimétiques basés sur l'impression protéique : un premier, utilisant des cellules hétérologues, permettant d'obtenir des informations sur la cinétique d'interaction des couples protéiques et ainsi de lier cela à leur fonction potentielle. Et un deuxième, utilisant des neurones primaires hippocampique, permettant de former des synapses artificielles pour étudier la nano-organisation de la synapse au cours du développement. Le système d'impression protéique PRIMO, commercialisé par Alvéole, qui co-finance cette thèse, est peu utilisé par les neuroscientifiques. En plus des objectifs biologiques, l'objectif industriel de cette thèse est de développer des méthodologies et des preuves de concept afin de démontrer les avantages et la faisabilité de la technologie PRIMO en neuroscience.

En couplant notre premier modèle avec des techniques d'imagerie sur cellules vivantes (sptPALM et FRAP), nous avons pu différencier des cinétiques d'interaction entre différents couples de protéines d'adhésion synaptique mais également pour des interactions avec des protéines d'échafaudage. Une interaction labile pour SynCAM1, qui est connue pour son rôle dans la morphologie synaptique. Une forte et stable interaction pour Neuroligine1- Neurexine1 β , due à la dimérisation de Neuroligine1, qui est indispensable pour la fonctionnalité de la synapse.

Avec le second modèle, nous avons démontré, en présence de LRRTM2, la formation spécifique de synapses artificielles. Ces héli-synapses présentent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles proches de synapses natives, avec la présence de vésicules et d'une activité calcique spontanée. Cependant, nous n'avons pas réussi à former de postsynapses artificielles avec Neurexine1 β . Basés sur nos observations et une analyse bibliographique, nous avons formulé l'hypothèse que la postsynapse pourrait être le compartiment initiateur de la synaptogénèse.

En conclusion, cette étude démontre : (1) que l'impression subcellulaire est un excellent modèle pour étudier la connectivité synaptique et l'adhésion de manière générale, aussi bien d'un point de vue fonctionnel qu'organisationnel. (2) Que les modèles d'héli-synapses utilisant l'impression protéique sont plus spécifiques que les anciens modèles. (3) Que le système PRIMO ouvre de nombreuses perspectives en neurosciences via ses capacités d'impressions quantitatives.

Mots Clés

Impression Protéique – Synapses – Héli-synapses – Protéines d'adhésion synaptique
Diffusion-piégeage – Imagerie cellulaire – Imagerie de Fluorescence – Suivi de Molécules Individuelles (SPT) – Retour de Fluorescence après Photoblanchiment (FRAP) – Microscopie Electronique

ABSTRACT

Micropatterning was initially employed to replicate and understand the influence of the extracellular matrix on cells and some of their components. Over the past decade, subcellular printing has emerged, enabling the study of protein interactions and their role in signaling pathways as well as in the formation of synaptic, immunological, or neuronal pathways.

The synaptic connection is mediated by synaptic adhesion proteins present on each side of the synapse. Due to the complexity of the synaptic environment and the lack of *in vitro* models to study synaptic connection in a biomimetic and controlled environment, the exact roles of these proteins in synaptogenesis remain uncertain. Subcellular protein printing presents a potential solution to address this gap. For this purpose, we have developed two biomimetic models based on protein printing: a first one using heterologous cells, providing insights into the interaction kinetics of protein pairs and linking them to their potential function. And a second one using primary neurons, allowing the formation of artificial synapses to study synaptic nano-organization during development.

The protein printing system PRIMO, commercialized by Alvéole, which is co-funding this thesis, is underutilized by neuroscientists. Besides these biological objectives, the industrial aim of this thesis is to develop methodologies and proofs of concept to demonstrate the advantages and feasibility of the PRIMO technology in neuroscience.

By coupling our first model, based on heterologous cells, with live-cell imaging techniques (sptPALM and FRAP), we differentiated interaction kinetics among various synaptic adhesion protein pairs and also for interactions with scaffold proteins. A labile interaction was observed for SynCAM1, known for its role in synaptic morphology. A strong and stable interaction was evident for Neuroligin1/Neurexine1 β due to Neuroligin1's dimerization, which is essential for synaptic functionality.

With the second model using primary hippocampal neurons, we demonstrated, in the presence of LRRTM2, the specific formation of artificial synapses. These hemi-synapses exhibited morphological and functional characteristics close to native synapses, including the presence of vesicles and spontaneous calcium activity. However, we were unable to form artificial postsynapses with Neurexine1 β . Based on our observations and bibliographic analysis, we hypothesize that the postsynapse could be the initiating compartment for synaptogenesis.

In conclusion, this study demonstrates: (1) that subcellular printing is an excellent model to study synaptic connectivity and adhesion from both a functional and organizational perspective. (2) That models of hemi-synapses using micropatterning are more specific than previous models. (3) That the PRIMO system opens numerous perspectives in neuroscience through its quantitative printing capabilities.

Key words

Protein micropatterning – Synapses – Hemisynapses – Synaptic adhesion proteins
Diffusion- Trapping – Cellular Imaging – Fluorescence Imaging – Single Particle Tracking (SPT) –
Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) – Electron microscopy

PUBLICATIONS ET COMMUNICATION

Communications Ecrites :

- **Note d'Application Alvéole:** Piette N., Bonnemay L., Thoumine O., Studer V., Micropatterning of primary neurons with PRIMO
- Czöndör K., Piette N., Tessier B., Studer V., Thoumine O., Synaptogenic assays using primary neurons cultured on micropatterned substrates (En presse) – Synapse Development
- Piette N., Lagardère M., Saphy C., Reissner C., Strale O., Chamma., Munier M., Sainlos M., Missler M., Thoumine O., Studer V., Dissecting the binding mechanisms of synaptic membrane adhesion complexes by micropatterning and live-cell imaging (En cours)

Communications Affichées :

- **Brain Conf : Synaptic plasticity, Université de Bordeaux - France -2022 :**
Piette N., Strale O., Munier M., Chamma I., Sainlos M., Thoumine O., Studer V., “Investigating synapse formation and nanoscale organization with advanced 2D in vitro models”
- **CELL BIO - Washington DC - 2022 :**
Piette N., Chamma I., Sainlos M., Studer V.,” Engineered in vitro models based on selective neuronal adhesion to study synapse formation”

Communications Orales :

- **Journée du Neurocampus, Université de Bordeaux, France - 2023 :** “synapse on a chip : « a quantitative model to investigate synaptogenesis »”
- **Journée de l'école doctorale, Université de Bordeaux, France - 2023 :** “Micropatterning to study synaptic connectivity”

Formation :

- ImageJ Automatisation de tâches : les macros
- Appicateur de procédures expérimentales Rongeurs et Lagomorphes
- Ethique de la recherche & Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche
- Rédigez votre thèse du chaos des idées à la thèse réussie

Vulgarisation scientifique :

- Nuits des chercheurs - Cap science Bordeaux – 2022 - Immersion microscopique dans le monde cellulaire
- Semaine du cerveau – IINS -2022 – Intervention auprès de Lycéen sur les métiers de la recherche
- Exposition Cell Immersion par Explorers - Bassin des lumières Bordeaux - 2023 - réalisation d'un alphabet de cellules par impression protéique
- Hello Tomorrow – 2023, réalisation du logo en cellule par impression protéique

INTRODUCTION

Ce projet de thèse CIFRE découle d'une collaboration entre l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS) et la société Alvéole. L'IINS se consacre à l'étude du fonctionnement du cerveau, en se penchant particulièrement sur la physiologie des systèmes neuronaux et la biologie des synapses. L'IINS est structuré autour de plusieurs axes de recherche interdisciplinaire, parmi lesquels figure le développement d'outils et de technologies d'investigation innovants. L'équipe "Cell Organ-izers", dirigée par Vincent Studer, au sein de laquelle s'inscrit ma thèse, joue un rôle central dans cet axe. Elle se distingue notamment par ses contributions au développement de nouvelles technologies de bio-ingénierie, dont la méthode LIMAP (Strale et al., 2016) qui, depuis 2016, est commercialisée par la société Alvéole sous le nom de PRIMO. Cette méthode de photolithographie sans contact ni masque permet de maîtriser la chimie et la topographie du microenvironnement cellulaire. Elle sert à influencer la morphologie, le développement et la prolifération des cellules en culture, et elle est déjà utilisée dans plus de 125 laboratoires de recherche dans le monde. L'application phare du système PRIMO est l'impression de biomolécules ou le *micropatterning*. Alvéole cherche à étendre sa technologie à divers domaines d'application en biologie afin de renforcer sa présence sur le marché. Les neurosciences sont l'un des domaines où le système PRIMO est peu répandu, malgré l'existence de plus de 327 articles scientifiques utilisant d'autres techniques d'impression protéique, dont 128 ont été publiés depuis 2016. De plus, ces dernières années, il y a une demande croissante de la part des utilisateurs et des potentiels acheteurs pour des preuves concrètes de l'efficacité de nos protocoles en neurosciences, en particulier pour la culture de neurones. Dans le but de démontrer la faisabilité et les avantages du système PRIMO, un projet de recherche en collaboration avec l'équipe "Cell Adhesion Molecules in Synapse Assembly" dirigée par Olivier Thoumine à l'IINS a été mis en place. L'objectif de ce projet est de caractériser l'interaction de protéines d'adhésion impliquées dans la formation des synapses, un phénomène encore insuffisamment documenté, en utilisant des modèles *in vitro* basés sur l'impression protéique. Mon rôle dans ce projet a été de développer et de valider deux modèles complémentaires. Le premier vise à répondre au besoin de caractériser biophysiquement des interactions protéine-protéine spécifiques et individuelles dans un environnement membranaire. Le second ambitionne de surpasser les modèles existants d'hémi-synapse actuellement utilisés pour étudier la capacité des protéines d'adhésion synaptique à induire la formation et la spécification synaptique. Avant d'entrer dans les détails des objectifs de ces modèles, il convient d'examiner les différents sujets couverts par ce projet. Tout d'abord, pour situer la technologie PRIMO dans le contexte de l'impression protéique, la première partie de cette introduction se concentrera sur les diverses solutions de *micropatterning* existantes et leurs applications en neurosciences. Pour comprendre l'origine de ce projet et l'importance de l'étude des protéines d'adhésion synaptique, la deuxième partie de l'introduction se penchera sur la connectivité synaptique et le rôle des protéines d'adhésion dans la formation des synapses. Enfin, la dernière partie établira un lien entre les deux premières en présentant les techniques traditionnelles d'étude des interactions protéiques, y compris les modèles d'hémi-synapse, et les premières expérimentations d'impression protéique dans ce domaine, mettant en lumière l'apport de cette technique.

I Impression protéique micrométrique

1.1 Histoire

Il est fascinant de constater que les procédés que j'utilise aujourd'hui dans mes travaux de recherche sont similaires à ceux que mon arrière-arrière-grand-père, Gustave Pierre, utilisait pour ses œuvres (Figure 1). En effet, les procédés d'impression de motifs micrométriques également appelé *micropatterning* trouvent leurs racines dans une technique qui été employée depuis l'Antiquité dans l'art, puis plus tard dans l'impression : la lithogravure. Cette technique consiste à graver un motif dans une pierre, qui, une fois encrée, peut être imprimé sur un autre support, tel que le papier, créant ainsi une estampe. Cette technique a été précurseur d'autres procédés, comme l'eau-forte, où la gravure est réalisée chimiquement sur une plaque de métal, et la lithographie qui utilise des procédés chimiques basés sur la répulsion entre l'eau et les corps gras pour imprimer des motifs, plutôt que de s'appuyer sur le relief.



Figure 1. L'art précurseur du micropatterning

Eau Forte de Gustave Pierre Homme aux lunettes Autoportrait 1920

Au cours du XXe siècle, les avancées technologiques sur les matériaux, notamment le développement des premières techniques informatiques, ont conduit à la miniaturisation des composants et aux premières avancées en micro-électronique. Cela a entraîné l'optimisation des procédés de lithogravure pour aboutir à un procédé appelé photolithographie, ou lithogravure optique, qui utilise des photons, c'est-à-dire la lumière pour projeter un motif. Il est également possible d'utiliser des faisceaux d'électrons, permettant d'atteindre des résolutions nanométriques, avec la lithographie électronique. Ces techniques sont encore couramment utilisées dans l'industrie des semi-conducteurs, par exemple. L'objectif principal est le transfert d'un motif sur un autre support, quel que soit le vecteur utilisé à cet effet.

En raison de la miniaturisation de ces procédés pour l'industrie des matériaux, il a été possible de les adapter à la recherche et à la biologie cellulaire. L'impression de motifs micrométriques s'est développée initialement pour obtenir des cellules individuelles ou des populations cellulaires confinées sur une géométrie spécifique, afin d'évaluer leur impact sur la différenciation (Warmflash et al., 2014), la prolifération (O'Neil et al., 1986), la migration ou encore l'organisation architecturale (Théry et al., 2006). Dans cette introduction sur les

techniques d'impression, je vais me concentrer sur les applications permettant l'impression de biomolécules en deux dimensions et plus particulièrement l'impression de protéines.

1.2 Impression protéique : intérêts et défis

Les premières techniques d'impression avaient pour objectif de créer des zones adhésives versus non adhésives pour les cellules. Pour cela, elles se fondaient sur des propriétés physico-chimiques telles que les forces d'adhésion et la mouillabilité de composés biologiquement inertes. Dans les premières publications sur le *micropatterning*, on découvre l'utilisation de motifs de palladium réalisés à l'aide d'un pochoir, permettant l'adhésion des cellules (Figure 2), sur une couche non adhésive (Carter, 1967). De nombreuses molécules biologiquement inertes ont ensuite été utilisées, mais elles ont été délaissées afin de rendre ces techniques plus accessibles, moins dangereuses et plus adaptées également à l'évolution des technologies d'imagerie, en n'utilisant plus de matériaux opaques tels que les métaux. Cependant, la principale raison en est la nécessité d'ajouter une bio-activité aux motifs en imprimant des biomolécules, principalement de l'ADN et des protéines. Ceci a permis de développer de nouvelles applications biologiques telles que les biocapteurs (Thibault et al., 2005) et les systèmes de diagnostic, ainsi que l'étude des interactions protéiques régissant les contacts cellule-cellule (Schwarzenbacher et al., 2008), cellule-matrice ou la signalisation (Mossman, 2005).



Figure 2. Les premiers essais de micropatterning cellulaire

Cellules gliales confinées sur des micro-patterns de palladium entourés d'acétate de cellulose ($7200\mu\text{m}^2$).

Source : Westermarck, 1978

L'adaptation des techniques pour l'impression de biomolécules présente de nombreux défis. En effet, les biomolécules sont des composants fragiles et il est donc nécessaire d'avoir des protocoles permettant d'éviter leur dénaturation et de conserver leurs propriétés fonctionnelles et structurelles. De nombreux paramètres doivent donc être pris en compte lorsqu'on parle d'interaction protéine-substrats : le type de solvants, le pH, la température, la force ionique, l'exposition interface air-eau (Czeslik, s. d.; Oscarsson, 1997). C'est d'autant plus vrai lorsqu'on travaille avec des protéines qui ont une structure tridimensionnelle bien définie et dont l'adsorption et l'orientation sur la surface ont un impact sur leurs activités (Thyparambil et al., 2015) (Figure 3). En plus des défis liés à l'utilisation de biomolécules, ces

INTRODUCTION

techniques doivent, également, être biocompatibles pour pouvoir cultiver des cellules sur ces substrats, surtout dans notre cas où l'on souhaite travailler avec des neurones qui sont parmi les types cellulaires les plus sensibles à leur environnement.

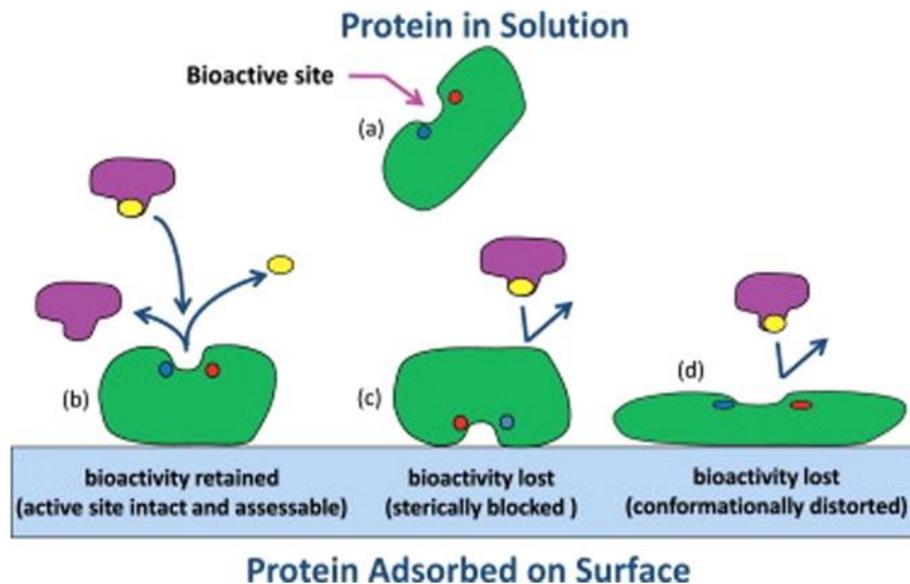


Figure 3. Impact de l'adsorption sur l'activité protéique

(a) Protéine native en solution (b) Adsorption de la protéine dans la bonne orientation, sans obstruction de son site actif et sans altération de sa conformation (c) Mauvaise orientation de la protéine adsorbée, entraînant le blocage de son activité (d) Protéine adsorbée mais ayant perdu sa conformation et, par conséquent, son activité.

Sources : Thyparambil et al., 2015 Reproduit à partir de R. A. Latour, *Colloids Surf, B* 124, 25 (2014).

Il existe de nombreuses techniques d'impression de protéines. Pour comprendre pourquoi certaines sont privilégiées dans les études en neuroscience, il est nécessaire de connaître l'historique de ces techniques, leurs principes, avantages et inconvénients. On peut classer les techniques de *micropatterning* de différentes manières. Nous avons choisi de les regrouper en deux catégories : les impressions mécaniques et la photolithographie. Nous présenterons les caractéristiques, les avantages et les inconvénients de chaque technique, en mettant l'accent sur leur utilisation en Neuroscience.

1.3 Technologies d'impression protéique

1.3.1 Impression mécanique

Les techniques d'impression dites mécaniques sont les premières méthodes développées pour les biomolécules. Dans cette première catégorie, on trouve exclusivement des technologies classées comme additives, car elles consistent à ajouter des composés sur un substrat. Nous allons détailler deux principes d'impression mécanique : le premier est un ensemble de techniques basées sur l'impression par écriture tandis que le second concerne l'impression par contact ou *microcontact printing* (μ CP), qui est l'une des techniques de micro-impression les plus couramment utilisées.

1.3.1.1 Impression par écriture

L'impression protéique par écriture regroupe un ensemble de techniques qui sont basées sur le dépôt d'une « encre » sur le support, principalement sous forme de gouttes, à partir d'une source externe. Différentes sources externes peuvent être utilisées. Ces techniques d'écritures sont caractérisées comme étant relativement lentes, car elles sont réalisées en série, c'est-à-dire au point par point. Cependant, elles offrent, pour certaines, la meilleure résolution d'impression de biomolécules et surtout, elles permettent, pour la plupart, un excellent contrôle de la localisation du dépôt.

L'une des techniques très utilisées en neuroscience est la technique des micro-îlots. Elle a été développée en 1976 pour des applications en électrophysiologie (Furshpan et al., 1976), dans le but d'obtenir des îlots de neurones individuels. La technique initiale consiste à déposer manuellement des gouttes de biomolécules (par exemple, du collagène) à intervalles réguliers sur une surface non mouillante (par exemple, du polystyrène) à l'aide d'une pipette. Après le séchage des gouttes, cela permet le dépôt de cellules supportrices pouvant accueillir des neurones (Figure 4.B). La taille des îlots est d'environ 300 à 500 μm de diamètre. Cette technique a ensuite été améliorée et s'est éloignée des technologies d'écriture en automatisant le dépôt de goutte grâce à l'utilisation d'un micro-atomiseur (Figure 4.A) pour pulvériser une solution de collagène sur un revêtement d'agarose (Bekkers & Stevens, 1991).

Cette adaptation permet d'obtenir des spots aléatoirement distribués et de taille allant de 20 à 1000 μm de diamètre. Bien qu'initialement utilisé pour le dépôt de collagène, cette technique a également été adaptée à d'autres protéines, telles que la laminine et la Poly-D-lysine (Henderson et al., 2019). Elle est principalement utilisée en neuroscience pour isoler des neurones (Figure 4. B et C), ce qui facilite l'étude des synapses via la formation d'autapses, c'est-à-dire des synapses formées par un neurone avec lui-même, par rapport à des cultures denses.

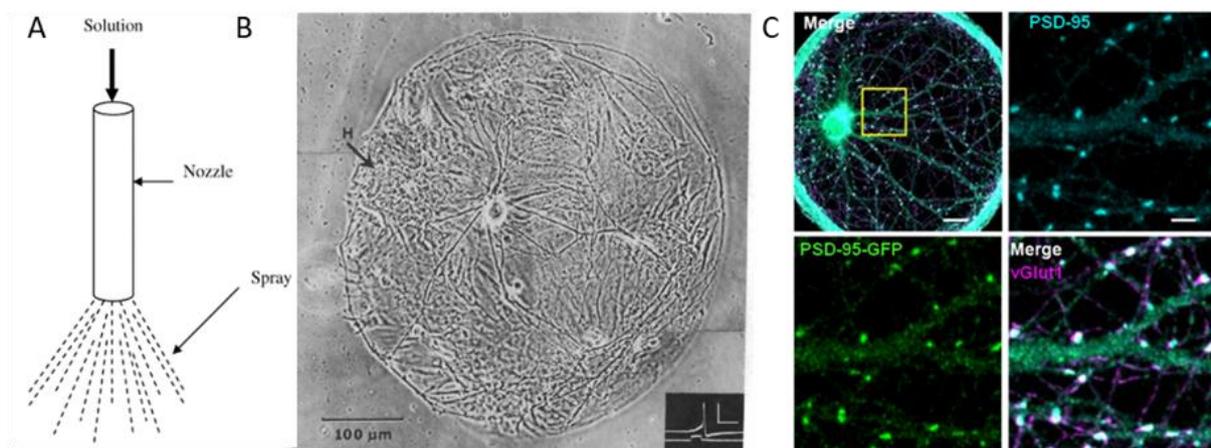


Figure 4. Technique d'écriture : Les micro-îlots

A) Schéma d'un micro-atomiseur. B) Neurone isolé en culture pendant 19 jours sur une couche de cellules cardiaques sur un micro-îlot de collagène. C) Neurone individuel sur micro-îlot de poly-D-lysine et laminine avec un immunomarquage de la pré- et de la postsynapse (vGLUT1 et PSD-95).

Sources : Burey et al., 2008 ; Furshpan et al., 1976 ; Henderson et al., 2019

INTRODUCTION

Son utilisation a permis d'étudier de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires de la synapse, comme le rôle des protéines synaptiques dans la formation des synapses (Tarsa & Goda, 2002) ou dans l'exocytose au cours de la plasticité (Schlüter et al., 2006). La technique des micro-îlots est relativement simple à mettre en œuvre et ne requiert que très peu de matériel, ce qui la rend très accessible. Cependant, elle ne permet pas de contrôler de manière précise la taille des spots ni leur localisation, et est limitée à une géométrie de motif circulaire.

Dans le cadre du développement des micro-réseaux de protéines et d'ADN, des techniques similaires aux premières expérimentations en micro-îlots se sont développées avec l'utilisation d'épingle (*pin* en anglais) pour déposer des micro-goulettes de biomolécules (Tse-Wen Chang, 1983). Ce type d'approches a rapidement été industrialisé avec le développement des robots automatisés, appelés « *spotters* » (utilisant des *pins*, capillaires...) avec des vitesses de dépôts élevées (plusieurs milliers de gouttes par secondes), une standardisation et un contrôle très précis des dépôts avec des gouttes de l'ordre de quelques dizaines de picolitres. Parallèlement, des outils moins coûteux ont été développés, notamment l'utilisation d'aiguilles en dioxyde de silicium (Figure 5) fabriquées grâce à des techniques de lithographie (J. Xu et al., 2004) permettant le dépôt de gouttes par contact. Le dépôt peut être contrôlé électriquement en couplant les aiguilles avec un système micro-électrique (Leichlé et al., 2006). Les gouttes sont formées en amenant les aiguilles en contact avec le substrat, et par capillarité, elles prennent forme. Le temps et l'angle de contact jouent un rôle sur la taille des spots, qui peut varier de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres de diamètre. L'utilisation de ces aiguilles à un rendement surfacique plus faible, bien qu'il soit possible de multiplier les dépôts en parallélisant les aiguilles, ce qui augmente le débit.

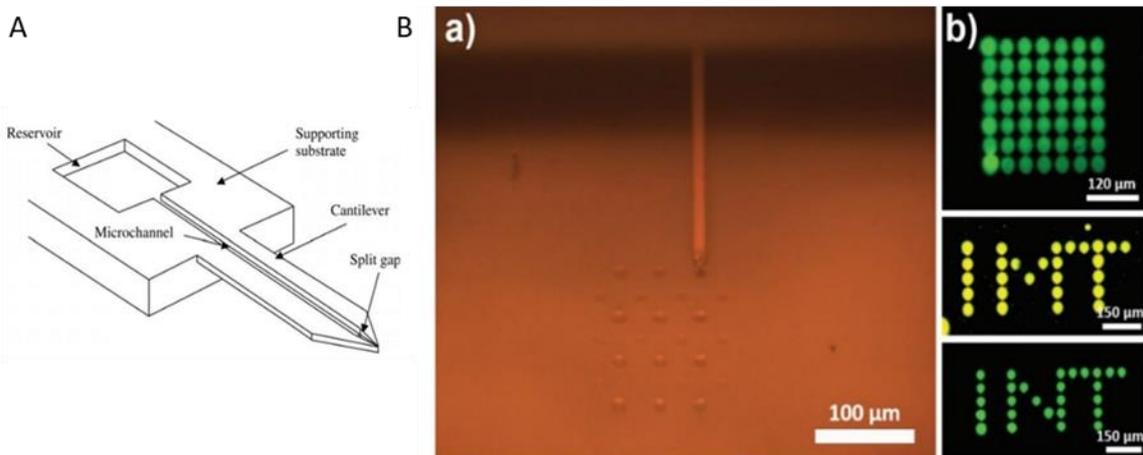


Figure 5. Technique d'écriture : Les spotters

A) Schéma d'une aiguille micro-fabriquée pour l'impression micrométrique. B) a. Image du dépôt de biomolécules. b. Exemple de motifs obtenus avec des molécules fluorescentes grâce à l'utilisation d'une aiguille.

Sources : Xu et al., 2004 ; Atwater et al., 2018

Parmi les autres automates développés, on retrouve les techniques d'impression à jet d'encre qui utilisent des buses pour pulvériser la solution protéique sans contact avec le substrat (Figure 6.A). La pulvérisation est continue si le liquide est pompé à travers la buse, mais il peut être discontinu via des impulsions acoustiques, électriques ou thermiques qui permettent de former des gouttelettes. La pulvérisation en continu permet de réaliser des motifs plus complexes, qui ne sont plus réalisés en pointillisme. Les buses permettent d'atteindre une

taille de spot d'une dizaine de micromètres (Derby, 2010). Cette technologie a été brevetée au 19ème siècle (Lord Willian Kelvin) mais n'a été utilisée seulement que depuis les années 1950 par Siemens. Cependant, il a fallu attendre le début du 21ème siècle pour son adaptation au domaine de la biologie. On trouve quelques applications en Neurosciences (Figure 6.B), par exemple la réalisation de motifs en laminine pour étudier l'adhésion neuronale (Turcu et al., 2003). Cependant, cette technologie a surtout évolué vers l'impression directe de cellules (Park et al., 2017) puis vers l'intégration de la 3D pour l'impression de tissus.

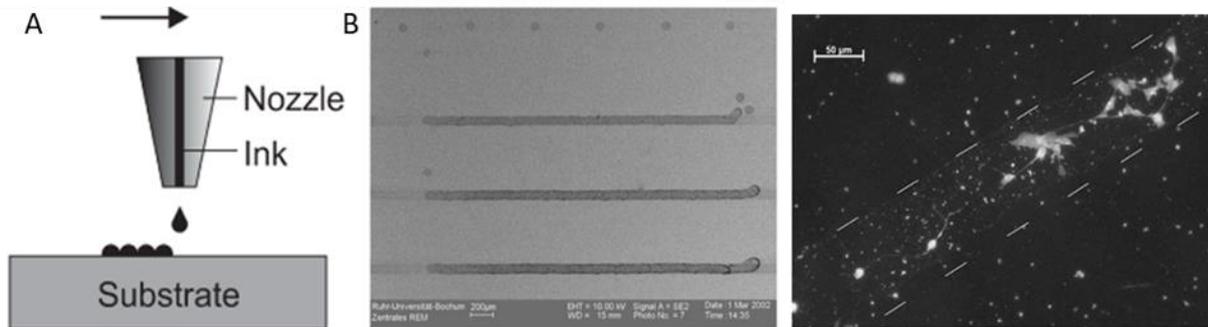


Figure 6. Technique d'écriture : Impression par jet d'encre

A) Schéma explicatif de l'impression à jet d'encre B) Exemple de motif de laminine réalisé par impression à jet d'encre et croissance de neurones isolés le long de ces lignes.

Sources : Geissler & Xia, 2004 ; Turcu et al., 2003

Pour réaliser des motifs de l'ordre du nanomètre, il est nécessaire de se tourner vers une autre technologie, la nano-lithographie à stylo profond (*Deep Pen Nanolithography DPN*). Cette technique repose sur un concept utilisé depuis des millénaires dans l'écriture : l'utilisation d'un objet pointu (comme une plume ou un morceau de bois) pour transporter de l'encre et le déposer par capillarité sur du papier, à une échelle macroscopique. Il a fallu attendre le développement de la microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy AFM*) pour mettre au point le DPN en 1999 (Hong et al., 1999; Piner et al., 1999). Ce développement est le résultat d'un problème rencontré en AFM, où la condensation de l'eau entre le substrat et la pointe de l'AFM réduit les capacités de résolution de la technique. Cependant, cette formation d'un ménisque d'eau permet, en fonction de la mouillabilité et l'humidité, un

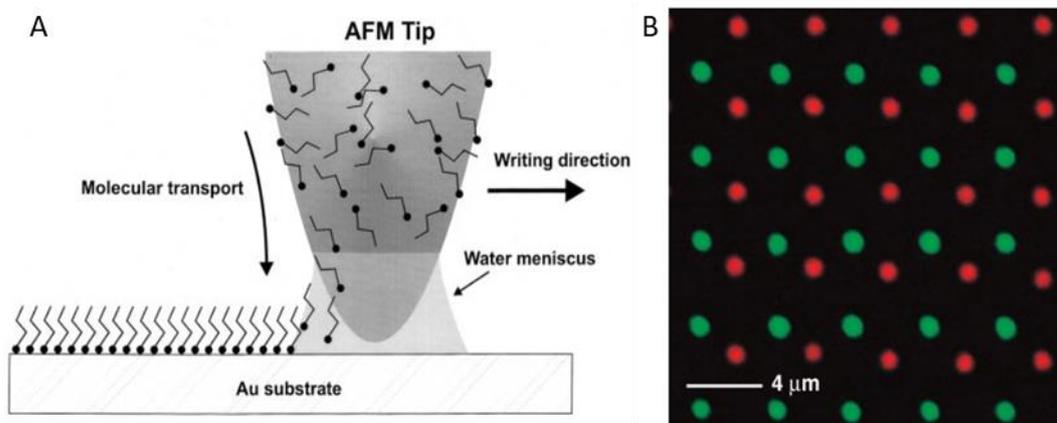


Figure 7. Technique d'écriture : Deep Pen Nanolithography

A) Schéma de principe de la nano lithographie à stylo profond B) Exemple d'impression multiprotéique réalisée en DPN.

Sources : Piner et al., 1999 ; Demers et al., 2002

INTRODUCTION

transport de molécules de la pointe vers le substrat, ce qui permet de réaliser un dépôt de molécules sur le substrat (Figure 7.A). Les résolutions minimales de cette technique sont environ 10 à 100 nm (Ginger et al., 2004). Il s'agit de la technique d'écriture offrant la meilleure résolution d'impression, mais elle est assez chronophage à mettre en œuvre. Cette technique, comme les précédentes, a principalement été utilisée pour la création de bio-réseaux d'ADN (Demers et al., 2002) et de petites molécules, principalement pour des systèmes de détection, et moins pour des applications en biologie cellulaire.

1.3.1.2 Impression par contact

Le *microcontact printing* est une technique d'impression de biomolécules basée sur des procédés d'imprimerie. Pour la mettre en œuvre, on fait appel à des techniques de lithographie douce. La lithographie classique est un procédé « *top down* » consistant en un ensemble de processus visant à éliminer de la matière indésirable afin de créer une géométrie spécifique. Ces techniques sont relativement coûteuses et difficiles à mettre en place, ce qui les rend peu accessibles. C'est dans cette optique que des approches de lithographie douce ont été développées. Dans la lithographie douce, on peut identifier trois catégories (Gates et al., 2005) : le modelage par réplcation (E. Kim et al., 1995), l'embossage (Kuo et al., 2003) et l'impression. Ces trois catégories reposent sur un principe identique : l'utilisation d'un moule généralement en silicium, dont les reliefs sont réalisés par des techniques de lithographie classique (photolithographie, lithographie électronique...). Ce moule est ensuite utilisé pour déformer ou structurer un substrat. Le moule est réutilisable, ce qui rend ces approches moins coûteuses et donc plus abordables pour les biologistes. De plus, ces techniques conviennent davantage aux composés fragiles, notamment pour l'utilisation de biomolécules.

L'impression par contact en biologie est donc intégralement basée sur ces approches de lithographie douce. Le moule sert à fabriquer un timbre (Figure 8.A), généralement constitué

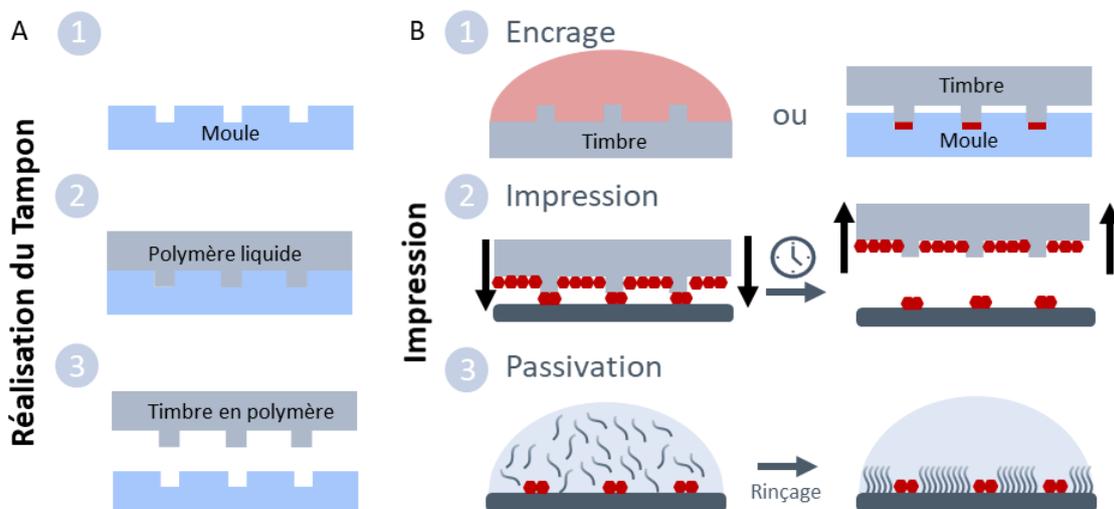


Figure 8. Impression par contact

A) Etapes de fabrication du tampon en PDMS : Dépôt du polymère liquide (2) sur le moule solide (1). Après polymérisation, le timbre est moulé à la forme du moule (3). B) Etapes de l'impression par contact : Encrage du timbre, soit par dépôt d'une goutte de solution, soit par trempage des motifs (1). Contact entre le timbre encré et le substrat induisant le dépôt de biomolécules (2). Passivation du substrat pour rendre non adhésives les parties non imprimées (3).

à partir d'un précurseur liquide, un mélange de polymères qui se solidifie par réticulation thermique ou grâce aux ultraviolet (UV). Ensuite, le timbre est démoulé. Une fois le moule prêt, il n'est plus nécessaire de travailler dans une salle blanche (Théry & Piel, 2009). La première impression micrométrique utilisant ce procédé a été réalisée en 1993 en utilisant un timbre de polydiméthylsiloxane (PDMS) souple (Kumar & Whitesides, 1993). Cependant, pour chaque nouvelle géométrie, un nouveau moule doit être créé, ce qui limite la versatilité de cette technique. Pour effectuer l'impression, la première étape est l'encreage du timbre de PDMS, une étape clé pour obtenir une impression uniforme et de qualité. Le plus souvent, la solution de biomolécule est déposée en goutte sur la surface du timbre pour l'encreage. Il est également possible de remplir le moule utilisé pour fabriquer le timbre avec une solution protéique, permettant de déposer différentes protéines sur un même tampon (Zheng et al., 2009). Après un temps d'incubation variable en fonction du type de biomolécule, la solution est retirée et séchée à l'aide d'un flux d'azote ou sous hotte. Selon la nature de la biomolécule, le séchage peut entraîner une perte d'activité. Ensuite, le timbre est utilisé comme un tampon encreur, mis en contact avec le substrat. Si l'affinité de la biomolécule pour le substrat est plus forte que pour le timbre, les biomolécules sont adsorbées à la surface du substrat (Figure 8.B).

L'impression des biomolécules peut-être réalisée de manière directe, impliquant que la protéine d'intérêt est imprimée directement, comme dans l'impression de disques de Poly-D-lysine pour créer des îlots de neurones (Figure 9) sur un revêtement d'agarose (Meijer et al., 2019). Toutefois, l'impression peut également être indirecte, en utilisant des liaisons covalentes ou des interactions de fortes affinités entre deux composés (Pereiro et al., 2019). L'impression indirecte garantit une meilleure stabilité du motif dans le temps, réduit la perte d'activité de la protéine en limitant l'impact mécanique du tampon ou de l'adsorption sur la structure tridimensionnelle, et en favorisant une bonne orientation du site actif.

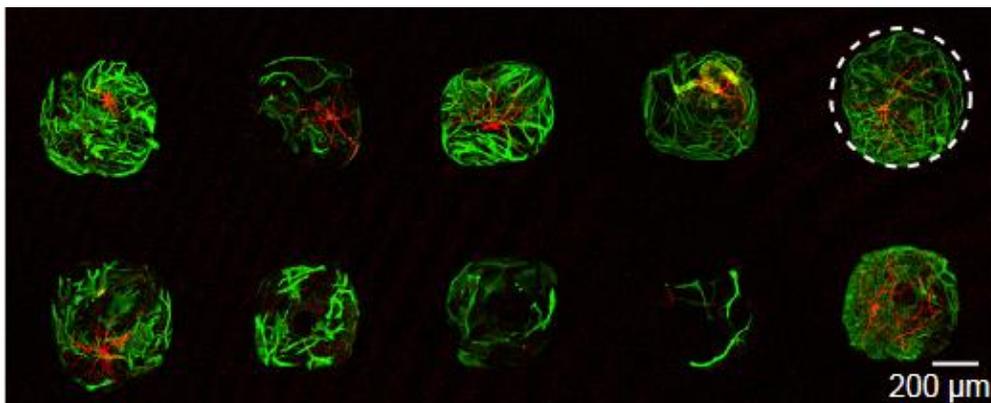


Figure 9. Impression par contact : îlot de neurone

Neurones humains dérivés d'iPSC par induction NGN2 sur des motifs circulaires de poly-D-lysine, collagène et acide citrique, recouverts d'astrocytes de rat. Immunomarquage GFAP (vert) et MAP2 (rouge).

Source : Meijer et al., 2019

En neuroscience, l'impression par contact a été utilisée pour créer des réseaux neuronaux (Hardelauf et al., 2014), étudier l'impact sur la croissance axonale en imprimant des molécules répulsives pour le cône de croissance (Ryu et al., 2019) ou étudier les différentes phases de migration du soma dans le cortex au cours du développement (Zhao et al., 2018). Si le substrat sur lequel le motif est réalisé est adhésif, il peut être nécessaire de réaliser une dernière étape

INTRODUCTION

de passivation pour limiter l'adhérence des cellules et, dans le cadre d'une impression indirecte, pour limiter l'adsorption non spécifique en dehors des zones de patterns. Plusieurs solutions ont été publiées, mais celle la plus utilisée pour l'impression protéique est le polyéthylène glycol (PEG), un polymère synthétique très hydrophile. Il est utilisé sous sa forme linéaire pour saturer des sites d'adhésion. L'efficacité de cette passivation, comparée à d'autres, a été démontrée pour une utilisation sur des neurones primaires, réduisant l'attachement des neurites (Wheeler et al., 1999). Une variante du PEG, le PLL-g-PEG (Csucs et al., 2003) un copolymère constitué d'une chaîne de PEG greffé à de la Poly-L-lysine (PLL), présente des propriétés d'adsorption rapide et forte, ce qui rend la passivation plus efficace (Ning-Ping Huang et al., 2000).

Initialement, cette technologie était limitée à des impressions micrométriques, d'où le nom *microcontact printing*. Cependant, avec l'amélioration des techniques de lithographie et l'optimisation des étapes d'encrage pour limiter les effets de diffusion lors de l'impression, il est désormais possible d'atteindre des tailles nanométriques avec des motifs de 100 nm (H. Li et al., 2002). Comparé aux techniques de *spotting*, il est possible de réaliser des formes beaucoup plus complexes et personnalisées. Cependant, cela implique de créer un nouveau moule à chaque changement de géométrie, ce qui a un coût, et surtout cela requiert un temps de réalisation conséquent. Il est donc nécessaire de bien réfléchir au motif souhaité en amont et d'en disposer plusieurs par tampon.

Il est possible de combiner les principes des différentes techniques présentées afin de contourner certains inconvénients en tirant parti de leurs avantages. Par exemple, le *polymer pen lithographie* (Brinkmann et al., 2013) fusionne les concepts du DPN et de l'impression par contact. La pointe AFM est remplacée par un timbre en PDMS comportant un réseau de pointes dont les mouvements sont contrôlés avec un système piézoélectrique (Figure 10). Ce modèle permet de multiplexer les dépôts de protéines. Cette technique est plus accessible que le DPN et permet, avec un seul tampon, de varier les motifs et les dispositions.

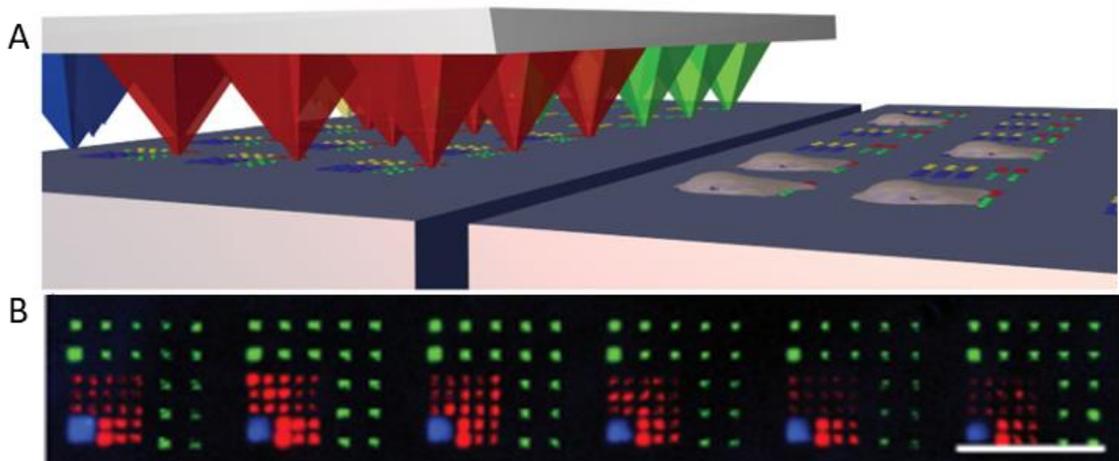


Figure 10. Combinaison de techniques : Polymer Pen Lithographie

Schéma de principe du polymer pen lithographie utilisé pour imprimer différentes protéines simultanément, représentés par les quatre couleurs primaires. B) Exemple de motif réalisé avec le PPL et trois différents fluorophores. Bar d'échelle : 20 μm

Source : Brinkmann et al., 2013

1.3.2 Impression par Photolithographie

Les techniques d'impressions de biomolécules utilisant la lumière, notamment les photons, reposent sur les protocoles de lithographie optique employés dans l'industrie. Le principe de ces techniques consiste à structurer la lumière, principalement l'UV proche (400-300nm), selon le motif souhaité. La lumière UV peut être utilisée de deux manières : dans un processus additif, elle permet de fixer directement ou indirectement une protéine en activant des groupes fonctionnels, tandis que dans un processus soustractif, elle permet de retirer localement une couche antiadhésive là où l'on souhaite déposer la protéine. Les processus soustractifs sont plus énergivores à mettre en œuvre que les processus additifs, mais ils offrent l'avantage d'une adhésion plus spécifique. Pour réussir à mettre en œuvre des applications soustractives, les chercheurs se sont tournés vers l'utilisation de l'UV lointain (<200nm), qui fournit une énergie suffisante. Toutefois, le développement de la chimie basée sur les UV proches a permis d'accéder à des applications soustractives en utilisant de l'UV proche. Cela a été rendu possible grâce à l'utilisation de photo-initiateurs réactifs à ces longueurs d'ondes, qui catalysent la réaction. Néanmoins, ces réactions génèrent des dérivés réactifs de l'oxygène, lesquels peuvent induire du stress oxydatif pour les cellules si le substrat n'est pas correctement rincé. Pour moduler la lumière et ainsi imprimer le motif souhaité, il est nécessaire d'utiliser un masque. Ce masque peut être physique ou virtuel. Dans cette nouvelle section, nous allons explorer les différentes solutions de structuration de la lumière.

1.3.2.1 *Photolithographie : masque physique*

Pour structurer la lumière, la première solution consiste à utiliser un masque physique photorésistant transparent soit en quartz, recouverts de motifs opaques en métal, tels que le chrome ou l'oxyde de fer (Figure 11.A), soit en plastique imprimé. Sous une illumination homogène, la lumière ne passera que par les zones transparentes du masque. Pour effectuer l'impression, le masque doit être en contact avec la surface d'impression, bien que cela puisse être inadapté si le substrat est fragile. Ces masques sont généralement fabriqués par lithographie à faisceaux d'électrons, la technique de lithographie offrant la meilleure résolution, car l'utilisation d'électrons permet de réduire la diffraction de la lumière. Bien que les procédés de lithographie soient adaptés à l'impression de protéines, la lithographie électronique a été utilisée de manière limitée pour l'impression de biomolécules (Palankar et al., 2013). Cette technique exige des équipements extrêmement coûteux, et l'impression est très lente, limitant son développement dans ce domaine.

La création de masques, en particulier avec des motifs personnalisés, est donc relativement longue. Bien qu'il soit possible d'avoir plusieurs géométries sur un même masque, la polyvalence de cette technique en termes de motifs demeure assez limitée. Des solutions commerciales existent pour l'achat de masques, mais ils sont coûteux, en particulier lorsqu'on travaille avec de l'UV lointain, nécessitant des masques en quartz synthétique adaptés à ces longueurs d'onde. La résolution des motifs dépend fortement de la qualité et du matériau des masques, ce qui influence le prix, et la qualité peut se détériorer au fil du temps. Il est possible

INTRODUCTION

d'atteindre des résolutions de 0.5 μm , mais en moyenne les masques offrent une résolution d'environ 1 μm .

Pour l'impression additive de biomolécules, il est nécessaire de travailler avec des substrats ou des groupes fonctionnels (Dillmore et al., 2004) réagissant à l'UV proche, permettant la fixation des biomolécules d'intérêt. On trouve, par exemple, l'utilisation de substrats fonctionnalisés avec de la benzophénone, qui, une fois exposée à la lumière, permet par estérification la fixation des biomolécules d'intérêt (Balakirev et al., 2005; Martin et al., 2011) (Figure 11.B). La benzophénone, un photo-initiateur, a également été utilisée directement en solution mélangée avec de la fibronectine, permettant de greffer directement la protéine au PEG (Fink et al., 2007).

La photolithographie en mode soustractif est réalisable en utilisant des UV lointains (Figure 11.B) pour dégrader un revêtement non adhésif, créant ainsi de la place pour l'adsorption ultérieure de la protéine. Les UV lointains permettent de dégrader différents polymères non adhésifs tels que le polystyrène (Welle & Gottwald, 2002) ou des polycarbonates, ainsi que le PEG (Azioune et al., 2009). Quelques études ont utilisé la photolithographie par masque pour explorer des phénomènes en neuroscience, comme l'étude moléculaire de la dynamique de l'actine au niveau du cône de croissance (Garcia et al., 2015) ou l'arborisation des neurones de sangsue (Fromherz & Schaden, 1994).

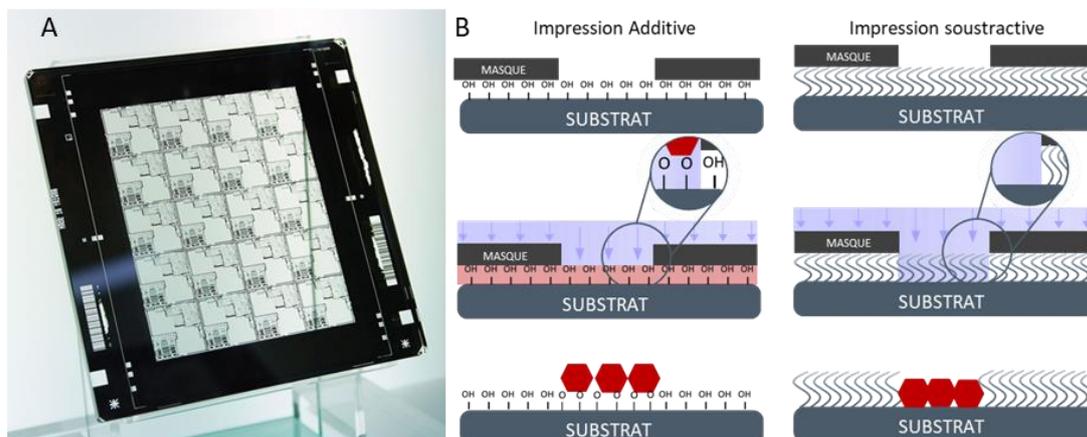


Figure 11. Photolithographie par masque

A) Image d'un photo-masque B) Schéma explicatif de la différence entre impression additive et soustractive en photolithographie. Additive : Fixation de la protéine d'intérêt (rouge) par estérification d'un substrat ou de groupement fonctionnel (OH) par exposition à (violet). Soustractive : Dégradation d'un revêtement non adhésif (vague bleue) par l'UV, permettant l'adsorption de la protéine.

Source : adapté de <https://www.texaspowerfulsmart.com/>

1.3.2.2 Photolithographie sans masque et sans contact

Pour se défaire de l'utilisation de masques physiques, deux approches sont possibles pour créer des motifs de lumière. La première consiste à utiliser un laser pour dessiner le motif point par point, tandis que la deuxième utilise un modulateur spatial pour donner directement à l'illumination la forme du motif. Pour cela, un système d'illumination, couplé avec un microscope et un logiciel dédié, est nécessaire pour contrôler les paramètres de projection, tels que la dose UV, les coordonnées spatiales et la géométrie du motif. Cet ensemble permet

de créer un « masque virtuel ». L'avantage majeur de ces systèmes est leur versatilité, car le motif est défini sous forme d'image numérique, facilitant ainsi sa variation par rapport à la fabrication de masques physiques ou de tampons.

L'un des premiers protocoles utilisant les masques virtuels est le LAPAP (*laser-assisted adsorption by photobleaching*), qui utilise un système d'illumination laser (473 nm) collimaté par un objectif (Bélisle et al., 2008) avec une résolution d'environ 1µm. Ce protocole additif permet l'impression indirecte de protéines biotinylées. Pour ce faire, une solution de fluorescéine-4-biotin (B4F) est exposée à la lumière, ce qui, par un phénomène de photoblanchiment et d'activation, induit la fixation de la fluorescéine sur le substrat recouvert d'albumine de sérum bovin (BSA). La streptavidine est ensuite utilisée en tant qu'intermédiaire entre la B4F et la molécule d'intérêt biotinylée. L'utilisation d'un laser collimaté nécessite le balayage du substrat pour créer l'ensemble du motif, ce qui entraîne une vitesse d'impression relativement lente. Pour augmenter la résolution de cette technique et la rapidité d'impression, l'illumination laser peut-être remplacée par une illumination multiphotonique plus énergétique (Scott et al., 2012). Ceci permet d'imprimer des surfaces de 20 mm² en 50 minutes, soit 30 fois plus rapidement que le protocole initial. De plus, l'augmentation de la puissance permet d'imprimer sur du PEG, réduisant l'adhésion non spécifique des neurones en dehors des zones d'impression, ce qui est favorable pour l'étude de la croissance des neurites (Wissner-Gross et al., 2011) par rapport au protocole LAPAP classique.

L'impression utilisant un laser a ensuite été détrônée par des méthodes permettant de structurer directement l'illumination en insérant dans le trajet optique un modulateur spatial, tel qu'un écran à cristaux liquides (LCD, Bélisle et al., 2009) ou une matrice de micro-miroirs (*Digital micromirror Device* (DMD) (Waldbaur et al., 2012) afin d'envoyer ou non la lumière vers l'échantillon avec un contrôle micrométrique (Figure 12). Le DMD est devenu plus populaire que le LCD, car il permet de travailler avec une plus grande gamme de longueurs d'onde. L'avantage de ces systèmes est que l'illumination n'est plus limitée à un seul point

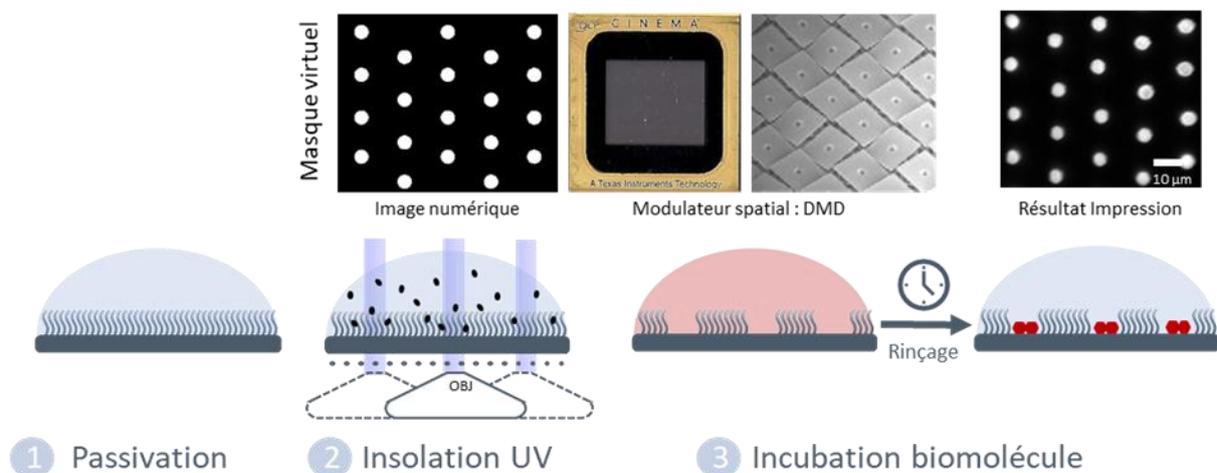


Figure 12. Photolithographie sans contact et sans masque

Schéma présentant les grandes étapes du protocole LIMAP 1) Passivation du substrat pour le rendre non adhésif 2) Insolation aux UV avec structuration de la lumière selon un motif grâce à un modulateur spatial 3) Incubation des protéines, suivie d'un rinçage la protéine est imprimée suivant le motif préétabli.

INTRODUCTION

laser, ce qui permet d'illuminer l'ensemble du champ de l'objectif, autorisant ainsi une impression d'un motif complet direct avec une résolution d'environ un micromètre sur une surface d'environ 0.15 mm² (Objectif 20X). Cependant, si on prend en compte uniquement le temps d'impression, sans tenir compte du temps de fabrication du masque et du timbre, ces techniques demeurent quand même plus lentes par rapport aux techniques de photolithographie par masque et d'impression par contact, qui permettent une impression directe sur des surfaces de plusieurs dizaines de millimètres carrés.

Les modulateurs et les lentilles optiques classiques ne sont pas compatibles avec l'UV profond, et les systèmes optiques adaptés à ces longueurs d'onde sont extrêmement coûteux. Pour imprimer en mode soustractif, il est donc indispensable de travailler avec des photo-initiateurs. Le protocole LIMAP (Strale et al., 2016), développé dans notre laboratoire, est le premier à coupler l'utilisation de micro-miroirs avec ce type de composé afin de dégrader du PEG et d'imprimer des protéines en utilisant l'UV proche (375 nm). Les applications de la technique LIMAP en neurosciences sont peu nombreuses et assez récentes. L'une d'elles est la coculture de neurones et de cellules de glioblastome, pour étudier la migration de ces dernières (Guyon et al., 2021). Les études les plus récentes se concentrent sur des applications spécifiques, avec la réalisation de pattern sur des grilles de microscopie électronique afin d'étudier des structures neuronales telles que les microtubules (Chakraborty et al., 2022). Ces applications mettent en avant l'un des avantages de l'utilisation de masques virtuels, à savoir l'absence de contact avec le substrat, permettant ainsi d'imprimer des protéines sur des supports fragiles.

1.3.3 Evolution de l'impression protéique

Si l'on établit un comparatif des techniques (Tableau 1), on s'aperçoit que la plupart ont réussi à se développer pour atteindre une résolution de l'ordre de 1 µm. Cependant, les technologies permettant d'atteindre des résolutions nanométriques, telles que le DPN, ne sont finalement que peu développées pour des applications en biologie cellulaire en raison de leur lenteur. Concernant les autres techniques d'écriture, elles se sont majoritairement développées pour la création de réseaux de protéines ou d'ADN. Les trois techniques les plus représentées en *micropatterning* de protéines pour des applications en biologie cellulaire sont l'impression par contact, la photolithographie par masque et la lithographie basée sur l'utilisation de DMD. Ce

Technique d'impression	Direct / Réplication	Résolution	Série / Parallélisé	Versatilité des motifs	Impression quantitative	Impression multiple	Vitesse surfacique	Solution Commerciale	Références
Mécanique									
Spotting	Direct	1-1000µm	Série	++	NA	+++	-	M2-automation	Derby, 2010
DPN	Direct	10-100 nm	Série	++	NA	+++	--	/	Ginger et al., 2004
µCP nCP	Réplication	1 µm 100 nm	Parallélisé	- -	+ -	++ NA	+++ +++		Li et al., 2002
Photolithographie									
Masque	Réplication	1 µm	Parallélisé	-	++	+	+++	CYTOO, 4D cell Masque et pattern	Azioune et al., 2009
Laser (LAPAP) Multiphoton	Direct	1 µm < 1µm	Série	+++ +++	+++ +++	+ +	-- -	/ /	Bélisle et al., 2008 Scott et al., 2012
DMD	Direct	1 µm	Parallélisé	+++	+++	+	++	PRIMO Alvéole Système	Strale et al., 2016

Tableau 1. Tableau comparatif des techniques d'impressions protéiques

qui différencie ces techniques est la vitesse d'impression surfacique, très rapide, sauf pour la photolithographie en DMD. Cependant, cette technique présente l'avantage d'offrir une versatilité de motif que ne peuvent fournir les techniques de *microcontact printing* et de photolithographie par masque physique.

Afin de reproduire au mieux les contraintes que subissent les cellules *in vivo*, les techniques d'impression se sont développées pour offrir de nouvelles applications, permettant un contrôle plus précis, tant au niveau quantitatif que qualitatif, des impressions. L'environnement physiologique est très complexe, donc, si l'on veut pouvoir réaliser des études biomimétiques, il est nécessaire de pouvoir proposer de nouvelles options d'impressions. Si l'on regarde l'environnement cellulaire, les phénomènes qui régissent les activités cellulaires, tels que l'adhésion ou la migration, sont rarement dus à une seule protéine, mais à une action combinée de plusieurs. Par exemple, la migration cellulaire est rendue possible par l'action combinée de protéines ayant soit un pouvoir attractif ou répulsif, agissant sous formes de gradient de concentration. Basée sur l'idée de pouvoir au mieux reproduire l'environnement cellulaire, les techniques d'impression de biomolécules se sont améliorées en permettant de contrôler la quantité de protéines déposées afin de tester l'impact de différentes densités protéiques. Mais également sur les aspects d'impression multiples, permettant de disposer de façon contrôlée plusieurs protéines sur une même surface. Les aspects de reproductibilité sont également importants si l'on veut standardiser des essais et envisager des applications pharmaceutiques.

Si l'on compare les techniques les plus appropriées pour réaliser des impressions multiples, les techniques mécaniques ont l'avantage de limiter les contaminations croisées lors de l'impression en raison de leur nature additive, permettant ainsi un meilleur contrôle. Pour les techniques d'écriture, il est facile de paralléliser les dépôts et d'imprimer en simultanément différentes protéines, ce qui représente un gain de temps par rapport à une impression séquentielle. En ce qui concerne l'impression par contact, il est possible d'imprimer plusieurs protéines différentes, si l'encrage du timbre est contrôlé (Zheng et al., 2009). Cependant, la plupart du temps, l'impression est réalisée séquentiellement, même s'il est beaucoup plus complexe de gérer l'alignement. Cependant, des solutions basées sur l'utilisation de platine microscopique existent (Eichinger et al., 2012). Pour les techniques de photolithographie, les impressions sont nécessairement séquentielles, ce qui oblige à répéter le protocole d'impression pour chaque protéine. De plus, pour ces techniques non mécaniques, l'incubation de protéines est non localisée, c'est uniquement l'adsorption ou la fixation de la protéine qui est favorisée dans les zones illuminées. Or, l'adsorption est un phénomène non spécifique et chaque protéine a des capacités d'adsorption différentes pouvant être liées à leur caractéristique conformationnelle (Norde, 1986). Cependant, concernant les techniques utilisant des modulateurs spatiaux, les systèmes sont toujours couplés à un microscope, ce qui permet de gérer l'alignement des motifs en utilisant directement la résolution de la platine. Ce qui distingue les techniques utilisant des masques virtuels, c'est leur capacité à réaliser une impression quantitative. Il est possible, via ces techniques, de contrôler informatiquement la dose d'UV envoyée localement sur le substrat, et il a été démontré que la dégradation du PEG varie en fonction de la dose d'UV, ce qui permet de faire varier la quantité de protéines adsorbées (Das & Gupta, 2005).

INTRODUCTION

Pendant longtemps, ces techniques ont semblé inaccessibles aux biologistes sans expertise dans ce domaine. Pour répondre à cette demande, plusieurs entreprises ont développé des solutions commerciales, avec des consommables prêts à l'emploi, tels que les masques pour l'impression par contact (Ex : Delta mask, Netherlands), ainsi que des substrats déjà imprimés avec ou sans la biomolécule déjà incubée (4Dcell, CYTOO, Ividi). En ce qui concerne les techniques d'impression utilisant des masques virtuels, la société Alvéole est la seule entreprise à proposer un système, basé sur un DMD, à brancher sur un microscope. Dédié principalement à l'impression protéique, il permet de réaliser ses propres impressions. Les avantages du PRIMO résident dans sa versatilité, son accès facile à l'impression quantitative et ses potentiels en termes d'impression multiprotéique.

1.3.3.1 *Micropatterning en neuroscience*

En neuroscience, les modèles d'îlots synaptiques ont permis des études sur la synapse et certains mécanismes synaptiques, tels que l'exocytose, car l'isolement de neurones sur ces îlots induit la formation de contacts appelés autapses, plus faciles à étudier qu'en culture classique. Dans ces expériences, le motif ne sert qu'à isoler les cellules en fonction de la taille des zones d'adhésion. La protéine imprimée, le plus souvent du collagène ou de la polylysine, est utilisée principalement pour ses propriétés adhésives. L'impression protéique a été largement utilisée pour étudier le guidage et la croissance axonale, en imprimant des molécules attractives ou répulsives pour le cône de croissance (Ryu et al., 2019), ou des molécules affectant la croissance neuronale (Belkaid et al., 2013). Dans ces modèles, les protéines imprimées sont utilisées pour leur action biologique et pour étudier leurs impacts sur un élément neuronal. Cependant, ce type d'étude reste minoritaire.

La technique principalement utilisée dans ces essais est l'impression par contact. Un des facteurs favorisant cette technique est sa rapidité et sa surface d'impression (Azioune et al., 2009). C'est en effet un avantage lorsque l'on souhaite travailler avec des neurones, car ces cellules ont des caractéristiques structurelles nécessitant des zones d'étalement plus importantes que les autres cellules (*II. Connectivité synaptique et formation des synapses*).

Cependant, ces dernières années, l'impression protéique s'est ouverte à de nouvelles applications, avec l'impression de protéines à une échelle subcellulaire afin de créer des interactions spécifiques qui régissent principalement les contacts entre cellules et d'étudier le rôle et les impacts moléculaires de cette interaction. Parmi les applications, quelques travaux ont permis d'étudier le rôle de certaines protéines d'adhésion synaptique (*III. Etude du rôle des protéines d'adhésion dans la connectivité synaptique*). Dans la partie qui suit nous détaillerons les spécificités des cellules neuronales et pourquoi il est intéressant d'étudier les protéines d'adhésion synaptique. Ensuite, nous développerons les différentes techniques et modèles *in vitro* existant pour étudier ces protéines synaptiques et leur rôle dans la formation des synapses. Nous aborderons également comment et pourquoi le *micropatterning* commence à trouver sa place dans l'étude des interactions protéine-protéine de manière générale, ainsi que l'intérêt de ces techniques pour l'étude de la connectivité synaptique.

II Connectivité synaptique et formation des synapses

La principale cellule constitutive du système nerveux est : le neurone. La première observation de ce que l'on appelle maintenant neurone a été réalisée par Otto Deiters (1865) qui observa des motoneurons de la moelle épinière de vache, il décrit une cellule avec un soma central avec deux types d'excroissance irradiante, une avec des prolongements très arborisés, qui déclarât comme des excroissances protoplasmiques et une autre décrite comme un axe cylindrique. L'organisation du système nerveux fut débattue avec d'abord la théorie réticulaire (Joseph von Gerlach 1871) suggérant que le système nerveux était un ensemble continu, une fusion de plein d'éléments. La première description fondée de l'organisation cellulaire du système nerveux fût faite par Santiago Ramon y Cajal (1852-1934). Il observa pour la première fois l'organisation des neurones par observation microscopique de tissus neuronaux colorés au nitrate d'argent, d'après la technique de Camillo Golgi développé en 1873. Ramon y Caja, décrit des cellules indépendantes avec de nombreuses et très longues ramifications pouvant faire plusieurs mètres (Figure 13.A). Cette théorie du neurone fut complétée en 1891, par Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz, qui proposa le premier l'appellation neurone pour ces cellules.

Le neurone présente une morphologie qui se distingue des cellules des autres systèmes. Le corps cellulaire du neurone, le soma, est la partie qui se rapproche le plus d'une cellule classique avec la présence du noyau, de l'essentiel du cytoplasme et des organites communs (Figure 13.B-C). Le neurone est une cellule polarisée. On retrouve d'une part un ensemble de ramifications courtes et nombreuses qui sont les dendrites. Le diamètre de la dendrite décroît en s'éloignant du corps cellulaire et on y retrouve des petites protrusions qui sont les épines dendritiques. Et d'autre part, un unique prolongement de diamètre constant pouvant être très long, l'axone. A l'extrémité de ce prolongement, on retrouve le cône de croissance (Cajal, 1890). L'axone peut se diviser en plusieurs prolongements, les collatérales, afin d'établir des contacts avec d'autres cellules, neuronales ou non. La zone de contact axonal est appelée bouton synaptique. La caractéristique de ces différents prolongements est la présence importante de structure du cytosquelette qui donne sa forme au neurone, on distingue trois

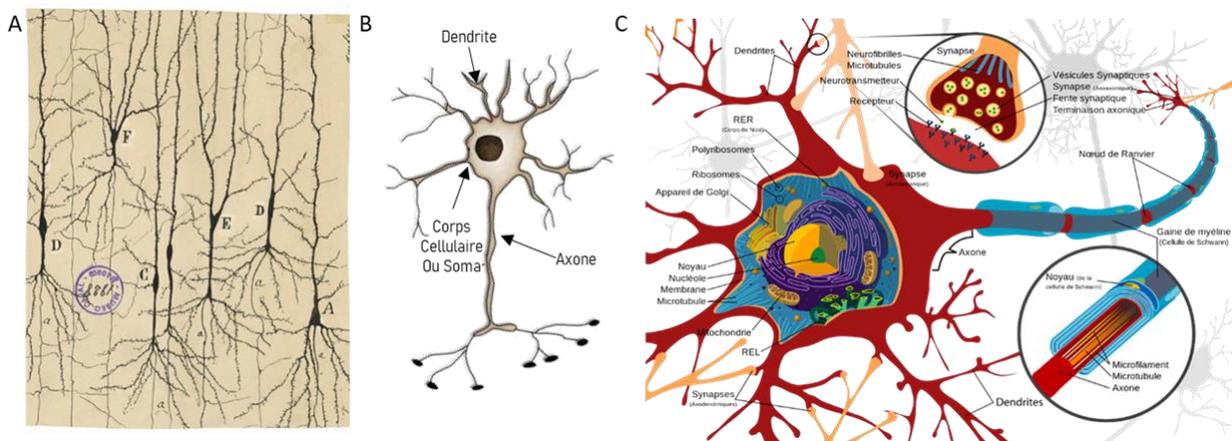


Figure 13. Morphologie du Neurone

(A) Dessin d'observation de neurones (B) Schéma simplifié d'un neurone (C) Schéma anatomique détaillé d'un neurone et de ses différents compartiments structurels. **Source** : Santiago Ramón Instituto Cajal CSIC

INTRODUCTION

types de structures : les microtubules, les microfilaments d'actine et les neurofilaments qui sont tous composés de polymères protéiques (Figure 13.C).

Le transfert de l'information au niveau du cerveau est médié par la communication entre les neurones via des signaux électriques et chimiques. La connexion entre les neurones est médiée par la formation de synapses qui permettent de former un réseau neuronal, connectant les épines dendritiques et les boutons synaptiques. Au sein du neurone, l'information est reçue au niveau de l'épine dendritique, transite par le soma et se propage jusqu'au bouton synaptique au niveau de l'axone. Cela permet de transmettre cette information à une autre cellule neuronale ou non (Cajal.,1899). Dans cette thèse, je vais me focaliser sur la synapse chimique, qui est la catégorie de synapses majoritaires du système nerveux central, comparé aux synapses électriques. Je vais brièvement présenter la structure et la fonction de la synapse chimique et les étapes de formation de la synapse au cours du développement. Dans une deuxième partie, je m'attarderais sur un des principaux acteurs de la synapse, les protéines d'adhésion synaptique et leur rôle dans la synaptogenèse.

2.1 Synapse

2.1.1 Structure et fonction

Le terme synapse fut défini pour la première fois par Charles Scott Sherrington pour décrire la zone de contact entre deux neurones. Le cerveau est composé de billions de neurones et de trillions de synapses. Ce contact a lieu la plupart du temps entre un bouton au niveau de l'axone, que ça soit à une extrémité axonale ou le long de l'axone avec la formation de synapses « *en passant* », et une épine dendritique, présente le long de la dendrite. Suivant les zones du cerveau ou les types de synapses, on trouve également des contacts entre axone et soma (axo-somatique), entre un axone et le segment initial d'un autre (axo-axonique) ou encore entre deux dendrites (dendrodendritique).

Nous allons nous concentrer sur les synapses axodendritiques et leurs composants. Les épines dendritiques présentent des morphologies et des tailles assez disparates (Figure 14) allant de 0,2 à 1 μm (Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020; Sorra & Harris, 2000). Ces morphologies sont changeantes dû à une forte relation structure-fonction des synapses. L'état des synapses fixe leurs propriétés plastiques et l'activité neuronale module la morphologie synaptique

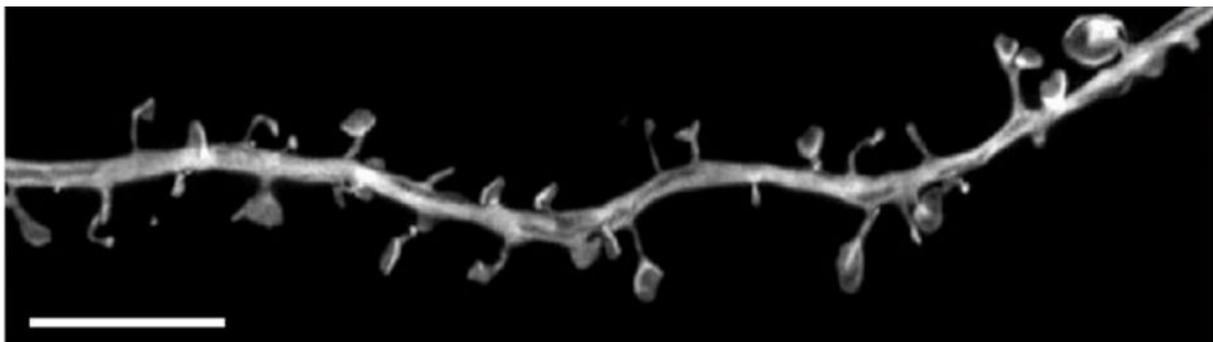


Figure 14. Répartition des synapses le long du neurone

Imagerie 3D-ISM d'un neurone de l'hippocampe exprimant la GFP. Bar d'échelle : 5 μm .

Source: Kashiwagi & Okabe., 2021

(Matsuzaki et al., 2004; Tønnesen & Nägerl, 2016). Il y a des milliers de synapses qui peuvent se former le long d'un axone, avec environ une spécialisation en présynapse tous les 2 μm (Takács et al., 2018).

La morphologie plus précise de la synapse fût accessible avec le développement de la microscopie électronique en 1931 (Ruska, 1987) (Figure 15.A), qui a permis d'observer des structures qui n'étaient jusqu'alors que théoriques, car difficiles à marquer et à observer en microscopie photonique. Ces observations, ont permis de montrer que la synapse est composée de deux éléments, un post-synaptique et un pré-synaptique chacun limité par une membrane, qui sont séparés par un espace de 15-20 nm de diamètre, la fente synaptique (Palay et al., 1962).

La synapse est un élément asymétrique, en raison de la composition structurelle distincte des différents compartiments de la pré- et de la postsynapse. Ces différences sont liées à la fonction de ces compartiments au cours de la transmission de l'information. La transmission de l'information neuronale est liée à la circulation d'un potentiel d'action (Bois-Reymond, 1884), quand ce potentiel arrive au niveau de la présynapse, cela induit une dépolarisation de la membrane et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant présents au niveau de la membrane du bouton synaptique, entraînant une entrée importante de calcium dans la zone pré-synaptique. Ce calcium va induire le relargage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Lisman et al., 2007). Ces neurotransmetteurs sont stockés dans un grand nombre de vésicules présynaptiques, qui représentent l'élément synaptique le plus caractéristique (Figure 15.A). L'entrée de calcium va induire la fusion de ces vésicules avec la membrane au niveau de la zone active.

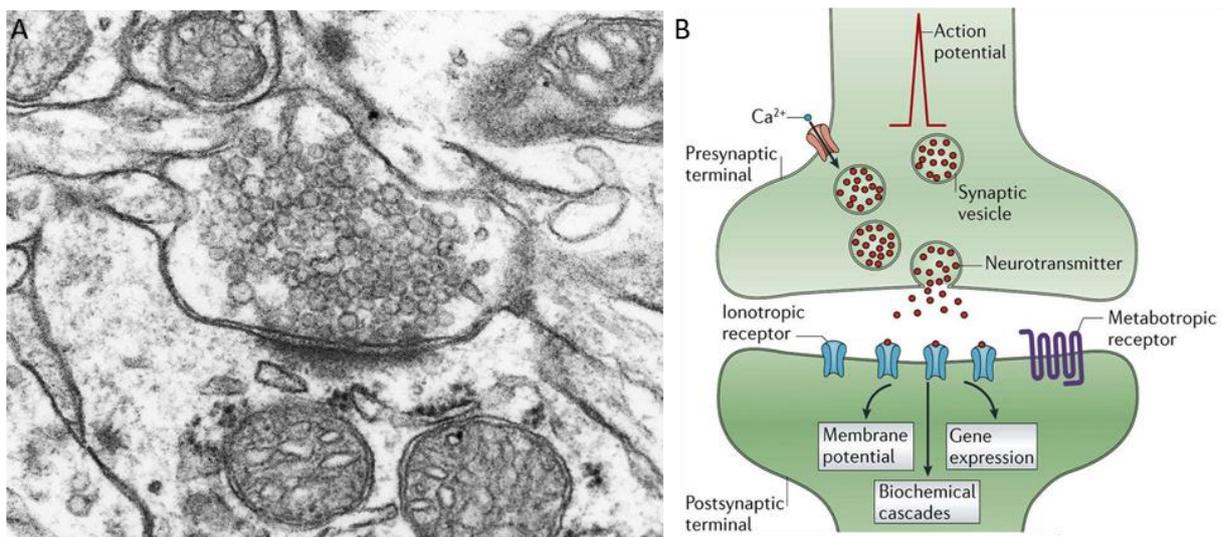


Figure 15. Morphologie de la synapse

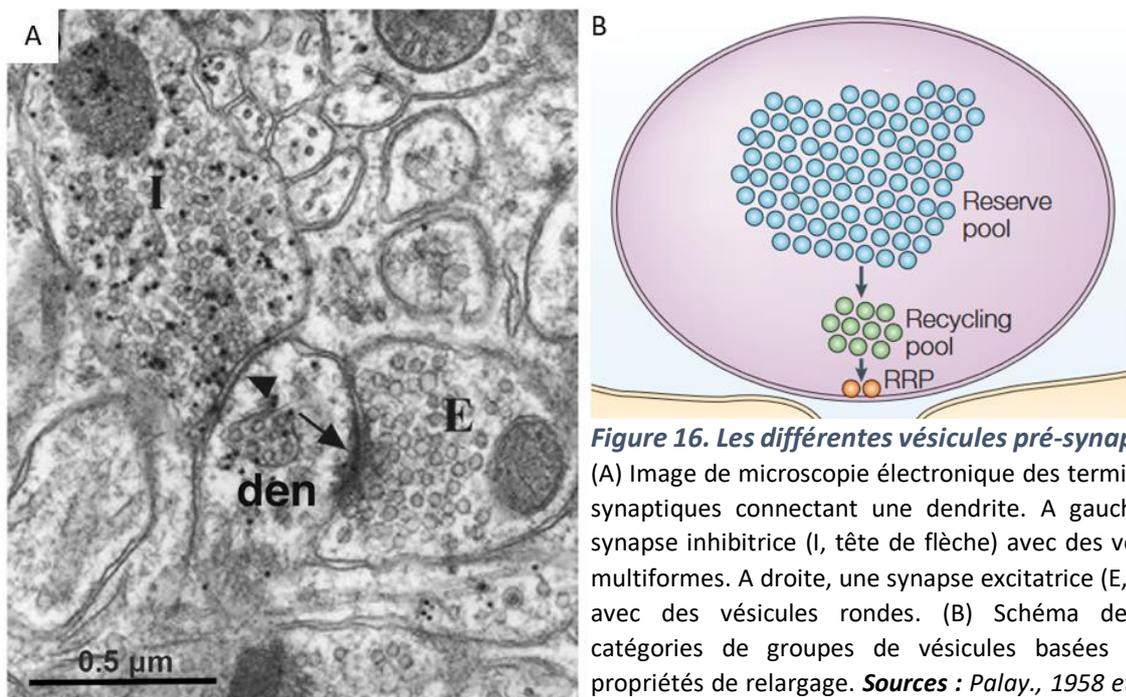
(A) Image d'une synapse chimique excitatrice par microscopie électronique à transmission (B) Schéma d'une synapse chimique, avec les étapes de la transmission de l'information. L'arrivée d'un potentiel d'action entraîne l'ouverture des canaux calciques et la libération des neurotransmetteurs contenus dans les vésicules présynaptiques au niveau de la fente synaptique. Par la suite, les neurotransmetteurs activent les récepteurs au niveau de la postsynapse.

Sources : aquaportail.com, sciencephoto.com

INTRODUCTION

Deux types de vésicules ont été morphologiquement identifiées dans les synapses : des petites (30-50nm) vésicules lisses qui sont les plus représentées et des vésicules pléomorphes, avec des tailles et caractéristiques (densité, granulosité...) variables (Figure 16.A). Il a été démontré que ces différents types de vésicules sont associés à des caractéristiques fonctionnelles qui permettent de dissocier les synapses excitatrices, qui transmettent l'information sous forme de potentiel d'action, des synapses inhibitrices, qui inhibent la formation du message nerveux (Van Der Want & Nunes Cardozo, 1988). Les synapses inhibitrices contiennent des vésicules de morphologies variables (Bodian, 1966; Uchizono, 1965) contenant du GABA (Acide γ -aminobutyrique) comme neurotransmetteur. Les synapses excitatrices, qui libèrent principalement du glutamate, sont principalement caractérisées par de petites vésicules claires et homogènes

Les vésicules, lorsque observées en microscopie électronique, semblent faire partie d'une même population. Cependant, des études ont montré l'existence de différents groupes de vésicules ayant des fonctions différentes (Figure 16.B). Il est donc nécessaire de distinguer trois types de vésicules : celles du groupe de réserve, représentant 80 % des vésicules de la présynapse et libérées uniquement en cas de forte stimulation ; les vésicules recyclées, constituant environ 10-20 % des vésicules totales ; enfin, les vésicules prêtes à être libérées, situées au plus près de ce que l'on appelle la zone active de la présynapse et déjà amarrées à la membrane (Rizzoli & Betz, 2005).



Concernant la morphologie de la postsynapse, on peut observer la présence d'un élément dense (de Robertis, 1961) localisé juste en dessous de la membrane plasmique de l'épine dendritique, appelé densité postsynaptique (PSD). Cette zone est un disque de 200 à 500 nm de diamètre et avec une épaisseur de 30 à 60 nm (K. M. Harris et al., 1992; Spacek & Harris, 1997). Cette zone dense est due à la formation d'un complexe macromoléculaire protéique qui contient les récepteurs transmembranaires permettant la fixation des

neurotransmetteurs et le transfert de l'information. Les récepteurs sont spécifiques des types de synapse. Au niveau des synapses inhibitrices, on retrouve les récepteurs GABA et pour les synapses excitatrices le récepteur métabotrope au glutamate et les récepteurs ionotropiques AMPA et kaïnate. La PSD est difficilement observable dans les synapses inhibitrices alors qu'elle est très prédominante dans les synapses excitatrices (Gray, 1963). Cette différence permet de caractériser les synapses inhibitrices de symétrique et les synapses excitatrices d'asymétrique.

Les récepteurs ne sont pas les seules protéines présentes dans la densité post-synaptique. On y retrouve également des protéines d'échafaudage, qui sont intracellulaires et qui interagissent avec les récepteurs ainsi qu'avec les protéines d'adhésion synaptique. Elles permettent de regrouper en clusters ces différents éléments. Les protéines d'échafaudage ont d'autres rôles comme la régulation des éléments du cytosquelette (Vessey & Karra, 2007). Les protéines d'adhésion synaptique sont des protéines transmembranaires qui assurent la liaison entre les membranes post et présynaptique. Des études ont démontré que ces protéines semblent déterminer la taille de la fente synaptique (Phillips et al., 2001; Tanaka et al., 2000; Zuber et al., 2005).

La structure de la synapse telle que décrit correspond à une synapse mature. Avant d'arriver à cet état, il y a plusieurs étapes permettant l'initiation, la formation et la maturation d'une synapse au cours du développement. Dans une première partie, nous décrirons de façon générale ces différentes étapes en nous concentrant sur les synapses axo-dendritiques, formées entre un axone et une épine dendrite. Dans une seconde partie, nous présenterons quelques protéines d'adhésion synaptique sur lesquels j'ai travaillé durant ma thèse en insistant sur leur rôle dans la formation synaptique.

2.1.2 Formation synaptique

La formation des synapses est la dernière étape du développement neuronal, cette étape est importante car des anomalies de connexion sont retrouvées dans des maladies neurodéveloppementales : telles qu'une hyper connectivité synaptique dans le cadre de l'autisme (Pagani et al., 2021) ou un nombre de synapses trop faible dans des cas de schizophrénie (Howes & Onwordi, 2023). La stabilisation des synapses et la capacité à moduler le réseau au cours de la plasticité synaptique sont aussi importantes. En effet, il a été montré que les personnes souffrant de maladies neurodégénératives perdent plus de synapses (Wishart et al., 2006). Il est donc nécessaire de comprendre les étapes qui mènent à la formation de la synapse et à sa stabilisation. Cependant, il reste encore beaucoup à comprendre sur les étapes de ce processus, leur chronologie et leur importance, la plupart des études soulignent le fait que ce procédé n'est potentiellement pas régi par un seul facteur (activité, environnement, protéine...) mais est multiparamétrique, ce qui le rend complexe à étudier et ne permet pas de statuer sur ce qu'il se passe réellement *in vivo*.

Si on revient un peu en arrière, sur les étapes qui précèdent la formation de la synapse, tout commence par la détermination du destin neuronal (Taverna et al., 2014), qui va définir la fonction, la position, la morphologie, la trajectoire des interactions ce qui va influencer les propriétés synaptiques du neurone dans le réseau. Ces événements sont régis par des

INTRODUCTION

morphogènes produits par le tissu environnant sous forme de molécules solubles qui agissent en gradient, et qui vont induire l'expression de facteurs de transcription précis. Après migration des précurseurs neuronaux vers la région d'intérêt (Kay, 2016), la polarisation de la cellule se produit, avec d'un côté la migration de l'axone et de l'autre la formation de l'arborisation dendritique (Figure 17). Cette migration axonale, qui est restreinte au développement, est induite par le cône de croissance qui va pouvoir sentir via des récepteurs membranaires des signaux attractifs ou répulsifs sur des courtes et longues distances afin de déterminer la trajectoire à emprunter (Seiradake et al., 2016).

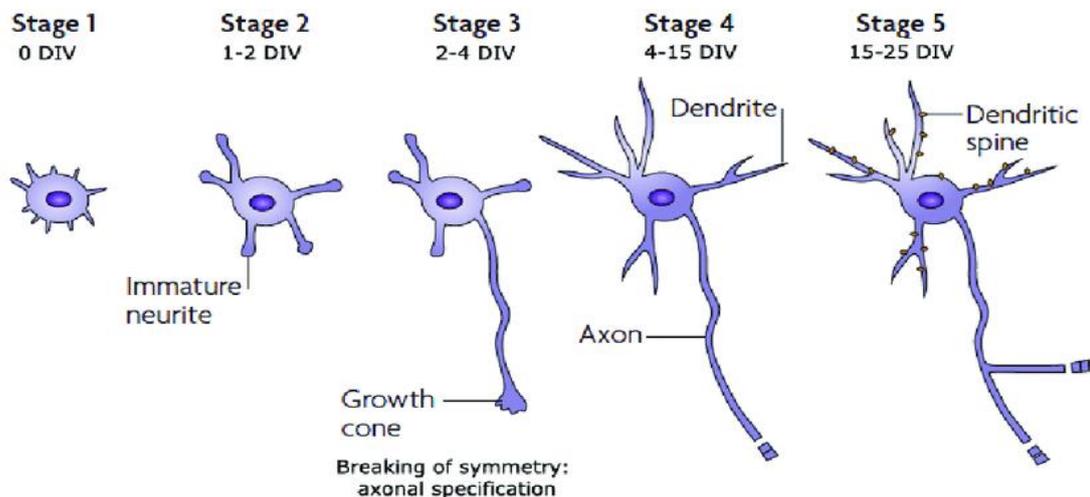


Figure 17. Etapes du développement des neurones hippocampiques

Etapes du développement, comprenant la formation des neurites (stade 2) et le début de la polarisation (stade 3) avec le développement de l'axone. Les autres neurites deviennent ensuite des dendrites (Stade 4). Plus tard, des contacts synaptiques se forment (Stade 5) permettant la création du réseau neuronal.

Source : Arimura et Kaibuchi., 2007

Pour que l'axone se spécialise en zone pré-synaptique et que la dendrite se spécialise en postsynapse, il y a plusieurs étapes nécessaires : la reconnaissance de la cible et l'initiation du contact, l'assemblage de la synapse et sa maturation. Bien que de nombreux avancements ont été réalisés sur la compréhension fonctionnelle des synapses, leurs mécanismes de formation au niveau moléculaire et structurel demeurent encore peu clairs.

Le modèle le plus accepté par la communauté sur l'initiation de la synapse est le modèle basé sur des structures motiles appelées les filopodes et qui sont présentes en nombre le long de la membrane dendritique dans les premiers temps de la synaptogénèse (Figure 18). La

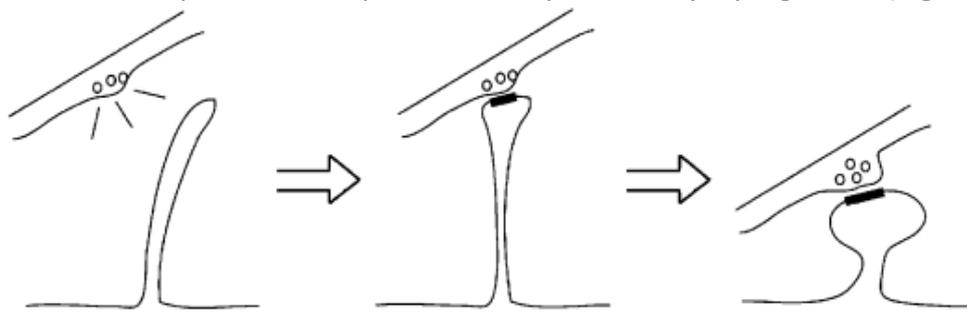


Figure 18. Formation des synapses : Les filopodes dendritiques

Etapes de la formation d'un filopode comme précurseur des épines dendritiques

Source: Ethell & Pasquale 2005

formation de ces filopodes de quelques dizaines de microns de long est possible grâce au cytosquelette d'actine (Hotulainen & Hoogenraad, 2010; Miermans et al., 2017) qui va induire la déformation de la membrane dendritique. Le filopode va ensuite pouvoir explorer son environnement proche et contacter des structures axonales qui se différencieront alors en présynapse. Le temps de vie d'un filopode est relativement court, environ 10 min en moyenne (Ziv & Smith, 1996), nécessitant d'établir un contact rapidement. Le nombre de filopodes présents le long de la dendrite diminue avec l'augmentation du nombre de boutons présynaptiques formés (Ziv & Smith, 1996).

Les autres structures motiles décrites comme jouant potentiellement un rôle dans l'initiation du contact synaptique sont axonales : ce sont les filopodes axonaux qui, sur le même principe que leurs homologues dendritiques, forment des contacts directement avec la dendrite (Dailey & Smith, 1996). Le cône de croissance est aussi décrit comme un potentiel médiateur de l'initiation synaptique. Le cône serait réceptif à des zones spécifiques présentes à la surface dendritique pour initier un contact (Cooper & Smith, 1992), et ainsi changer morphologiquement pour former un bouton synaptique (Figure 19. A-C).

La sélection des zones de contacts de ces structures n'est pas du tout définie, plusieurs pistes sont proposées en voici quelques exemples. La croissance du filopode dendritique est stimulée par la libération de glutamate par un axone à proximité. Le cône de croissance pourrait être lui attiré par la présence de charges négatives à la membrane dendritique (Burry, 1980), il a en effet été montré avec des modèles *in vitro* que des protéines de la matrice chargées négativement pouvaient induire la formation de présynapses (*III.2 Rôle des protéines d'adhésion synaptique : Modèle d'hémi-synapse*).

Ce premier contact, qu'il soit induit par la formation de filopode dendritique ou par le cône de croissance va ensuite être stabilisé. Cette stabilisation est induite par des interactions trans-

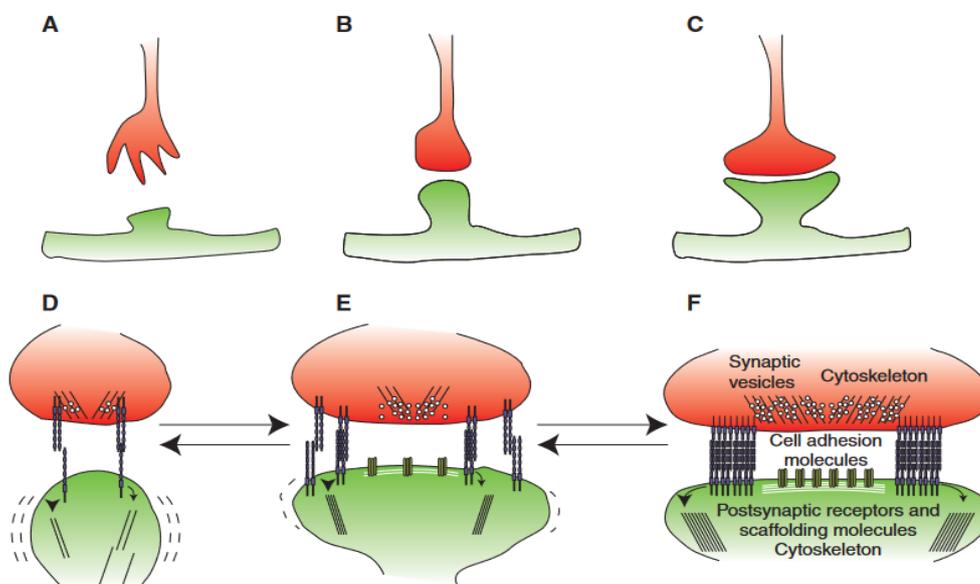


Figure 19. Etapes de la formation des synapses

(A-C) Sélection, assemblage et maturation des synapses basés sur le modèle du cône de croissance. (D-F) Zoom sur le rôle des protéines d'adhésions synaptiques et le recrutement des différentes protéines

Source : Giagtzoglou et al., 2009

INTRODUCTION

synaptiques via les protéines d'adhésion synaptiques, qui pour la grande majorité ont leur pic de niveau d'expression autour de cette étape (Filova et al., 2020; Linhoff et al., 2009). Cette interaction va permettre la différenciation et la maturation des contacts en synapses fonctionnelles. Cette stabilisation va induire le recrutement des premiers composants synaptiques avec au niveau du bouton pré-synaptique l'agrégation de vésicules, qui commencent à former la zone active, en s'amarrant à des éléments du cytosquelette (Figure 19.D). Au niveau post-synaptique la formation de la PSD va induire l'agrégation et la localisation des premiers composants dont principalement les récepteurs (Figure 19.E).

Ensuite, une phase assez longue de maturation et stabilisation va se dérouler, avec une évolution du nombre et des types de récepteurs ainsi qu'une augmentation du nombre de vésicules pré-synaptiques (Figure 19.F). La morphologie du filopode va également évoluer grâce principalement à la modulation du cytosquelette d'actine, avec plusieurs stades morphologiques afin de donner ensuite des épines dendritiques (Ethell & Pasquale, 2005). Une découverte plus récente en neuroscience a fait évoluer les connaissances sur la stabilisation et la maturation des synapses, en étudiant l'implication des cellules gliales (Van Horn & Ruthazer, 2019) suite à l'observation de la synapse tripartite (Araque et al., 1999). Les cellules gliales interagiraient avec les compartiments synaptiques via des protéines d'adhésion synaptique contenues dans leur membrane (Tan & Eroglu, 2021) qui sont similaires à celles liant la pré et la postsynapse. Ces protéines d'adhésion synaptique sont impliquées dans la plupart des étapes de la formation et stabilisation des synapses, la plupart voyant leur pic d'expression autour de cet instant.

2.1 Protéines d'adhésion synaptique et synaptogenèse

Les protéines d'adhésion synaptique sont des protéines transmembranaires de type I (Partie N-terminale en extracellulaire et C-terminale en intracellulaire) qui permettent d'établir un lien physique entre les éléments pré et postsynaptiques. Ces protéines interagissent par paires homophiliques ou hétérophiliques. En cohésion avec l'asymétrie structurelle et fonctionnelle, on retrouve également une disparité de diversité et de fonctions de ces protéines entre les deux compartiments. Si l'on regarde leur distribution connue (Figure 20), on constate effectivement que la postsynapse présente plus de variétés que la présynapse. Cette diversité permet de moduler l'activité synaptique, en effet certaines protéines de la postsynapse sont présentes uniquement dans les synapses inhibitrices ou excitatrices. A l'opposé, pour la présynapse le nombre de protéines d'adhésion est beaucoup plus faible et elles sont omniprésentes dans toutes les synapses. De par leurs faibles nombres, les protéines de la présynapse présentent pour la plupart de nombreux interacteurs au niveau post-synaptique, ce qui induit des compétitions protéiques au niveau postsynaptique qui peuvent également influencer les fonctions synaptiques. Cette différence de quantités de protéines entre les deux compartiments, suggère que la majorité des interactions sont hétérophiliques.

Le cerveau est composé de trillions de synapses, chacune ayant ses propres fonctions et spécificités. Ces fonctions sont régies par une multitude de protéines, variants et isoformes, qui interagissent de manière spécifique et se localisent différemment. La plupart de ces protéines jouent un rôle dans l'organisation des synapses, qu'il s'agisse de la formation des

connexions naissantes, de la maturation, de la stabilisation, de la fonction, de la plasticité synaptique ou de la disruption des synapses. Cependant, aucune protéine seule ne gère toutes ces actions. La formation du réseau neuronal nécessite une synergie entre plusieurs protéines d'adhésion synaptique et leurs partenaires. Certaines de ces protéines, appelées organisateurs de synapse, ont la capacité d'induire une différenciation fonctionnelle pré ou postsynaptique *in vitro*. Dans cette partie, nous présenterons des protéines d'adhésion synaptique parmi les plus étudiées, et celles avec lesquelles notre étude a été réalisée, ainsi que les rôles connus qu'elles jouent dans la formation des synapses.

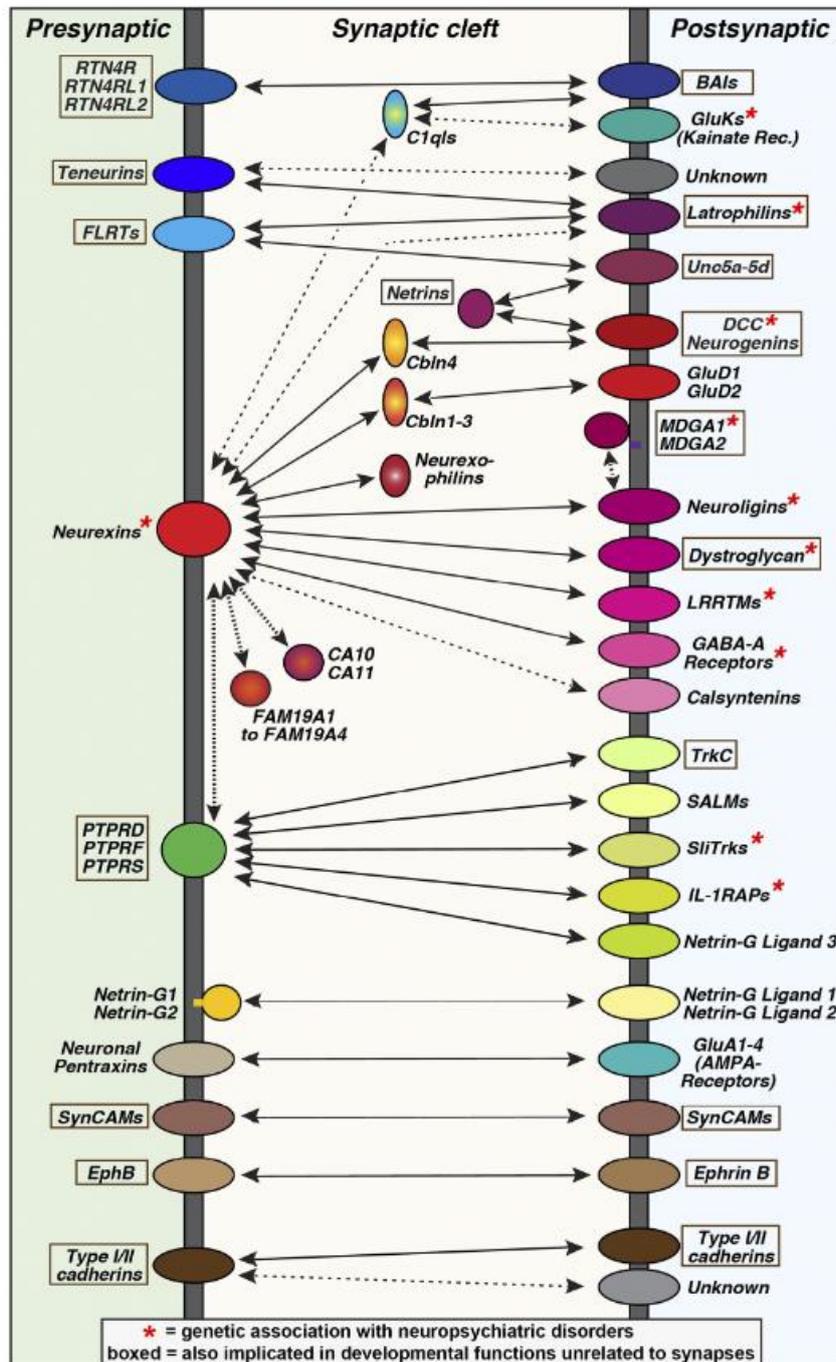


Figure 20. Les protéines d'adhésions synaptiques

Schéma hypothétique des complexes trans-synaptiques régissant l'assemblage des synapses.

Source : Südhof, 2021

INTRODUCTION

2.1.1 Neurexines

Les Neurexines (Nrx) sont une famille de protéines de la présynapse spécifique du cerveau, la première Neurexine a été découverte comme récepteur de l' α -latrotoxiphrin (Ushkaryov et al., 1992), qui est un composé du venin de la veuve noire connue pour induire un relargage massif de neurotransmetteurs. Il existe trois isoformes de la Neurexine chez les vertébrés, codés par trois gènes (Nrx1-3), chaque isoforme possède deux formes, la forme α et β (Tabuchi & Südhof, 2002) (Figure 21), liées à la présence de deux promoteurs de transcription indépendants. Ces six isoformes de Neurexine sont coexprimés dans des zones du cerveau, certaines formes telles que la Neurexine-1 α sont exprimées dans toutes les régions, avec des variations du niveau d'expression, alors que d'autres ont des zones d'expressions plus restreintes, tels que la Neurexine-1 β principalement exprimé dans le thalamus, certaines zones de l'hippocampe et les couches 2 et 3 du cortex. Tout cela montre que ces différentes formes peuvent être coexprimées dans les neurones et agir de façon combinée, pour moduler l'activité synaptique (Ullrich et al., 1995).

Au niveau structurel (Figure 21), les formes α et β , se distinguent par un domaine extracellulaire différent qui est constitué de domaine LNS (*laminin, neurexin, sex-hormone-binding globulin*). La forme β ne contient qu'un domaine, alors que la forme α en contient 6 qui sont séparés par des domaines EGF (*epidermal growth factor like*) au nombre de trois. Au niveau de certains domaines LNS on retrouve chez les vertébrés des sites canoniques d'épissage alternatifs, avec 5 sites pour la forme α et 2 pour la forme β . Sur le site d'épissage 4 (SS4), communs aux deux formes, deux variants d'insertion sont possibles : un négatif et un positif. Si on prend en compte les différents isoformes, les différentes formes et les variants d'épissage on peut obtenir des milliers de variants de Neurexine (Tabuchi & Südhof, 2002; Ullrich et al., 1995).

La Neurexine est engagée dans des interactions avec de nombreux partenaires transmembranaires présentant des caractéristiques structurales très différentes :

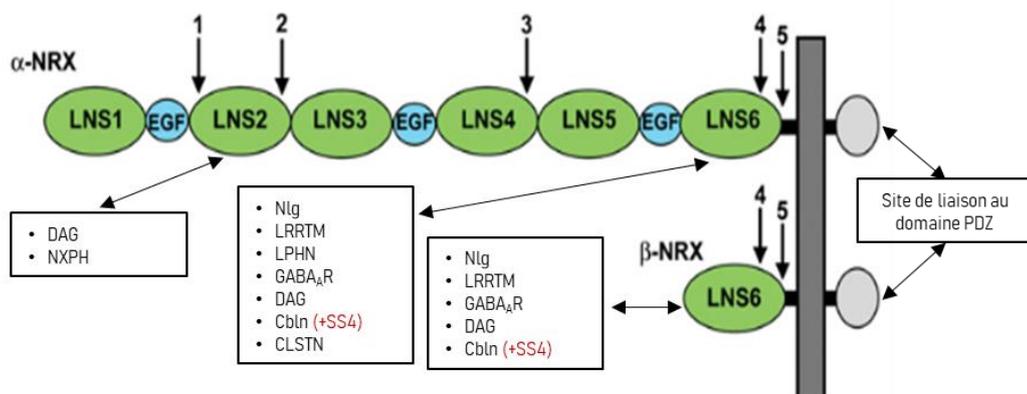


Figure 21. Neurexine structure et interaction

Schéma de la structure et des interactions de la forme α et β de la Neurexine. Au niveau extracellulaire, la majorité des protéines interagissent avec le domaine LNS6 (Nlg, LRRTM), latrophiline (LPN), Dystroglycan (DAG), Cerebelins (Cbln), Calsyntenins (CLSTN)). Les dystroglycans et les Neurexophilins (NXPH), interagissent eux avec le domaine LNS2. **Sources** : Modifié de Südhof., 2017 et Chamma and Thoumine., 2018

Neuroligine 1-4 (Ichtchenko et 1995), Dystroglycan (DAG) (Sugita et al., 2001), *Leucine-rich repeat transmembrane proteins* (LRRTM1-4) (de Wit et al., 2009; Fuccillo et al., 2015). La plupart de ces partenaires interagissent via le domaine LNS6, commun aux formes α et β , la modulation du SS4 permet de réguler finement les différentes interactions (Rudenko et al., s. d.). LRRTM se fixe uniquement à la Neurexine sans insertion au niveau du site 4 (-SS4) (Siddiqui et al., 2010). Pour Neuroligine (Nlg) l'insertion des 30 acides aminés au niveau du site 4 (+SS4) de Neurexine1 β réduit la formation de clusters des Neuroligines 1,3 et 4 et l'affinité pour la Neuroligine 1 et 4. Concernant Le Neuroligine 2 l'interaction avec la Neurexine1 β n'est pas impacté par le variant SS4+ (Graf et al., 2006). La Neuroligine peut donc interagir avec les différents variants d'épissage de la Neurexine, mais avec une plus forte affinité pour la forme -SS4 (Comoletti et al., 2007).

Des mutations génétiques ponctuelles sur les trois gènes de Neurexine ont été identifiés chez des personnes atteintes de schizophrénie et de troubles du spectre autistique. (Tromp et al., 2021). Mais l'impact de ces mutations sur l'activité des Neurexines et sur la fonction synaptique n'est pas encore déterminé.

Une délétion totale des isoformes de Neurexine- α chez des souris est létale à la naissance. Cependant, les souris mutantes pour Neurexine- α présentent une ultrastructure synaptique normale, avec une zone active, un nombre et une taille de vésicules identique à la condition non mutée (Missler et al., 2003). Ce qui sous-entend que ces isoformes ne sont pas indispensables à la formation des synapses. Des expériences *in vitro* de coculture entre une cellule hétérologue et un neurone (*III. Etude du rôle des protéines d'adhésion dans la connectivité synaptique*), ont cependant déterminé que Neurexine seul permet d'induire une différenciation en postsynapse (Nam & Chen, 2005). En absences des Neurexines, un déficit de libération de neurotransmetteurs a été identifié, et des analyses plus poussées suggèrent que les Neurexines, au niveau pré-synaptique, sont indispensables pour obtenir un couplage efficace de la machinerie d'exocytose des vésicules et l'activation des canaux calciques au niveau de la zone active, permettant un transfert d'information correct (Missler et al., 2003). Neurexine semble être indispensable pour la maturation et l'obtention de synapses fonctionnelles, ce rôle étant lié aux interactions cytosoliques établit par Neurexine via son domaine intracellulaire, qui est identique pour les différentes formes, où on retrouve un site de liaison au motif PDZ. Ce domaine permet l'interaction avec des protéines d'échafaudages tels que CASK (Hata et al., 1996) potentiel interacteur entre la Neurexine et les canaux calciques. Neurexine interagit également avec la synaptotagmine (Hata et al., 1993), molécule de la membrane vésiculaire qui participent à la fusion vésiculaire au niveau pré-synaptique.

Synthèse :

- Principales protéines de la présynapse ayant de nombreux partenaires
- Létalité en cas de suppression des Neurexines
- Rôle dans la différenciation post-synaptique et maturation des synapses, mais pas dans la formation initiale de la synapse.

INTRODUCTION

2.1.2 Neuroligines

Les Neuroligines présentes au niveau post-synaptique sont au nombre de quatre isoformes (Nlg 1 à 4), codés par quatre gènes différents. Au niveau structurel, la partie extracellulaire est composée d'un unique domaine estérase, ne présentant pas d'activité enzymatique. Ce domaine présente une forte homologie avec la séquence de l'acétylcholinestérase. L'interaction avec la Neurexine s'effectue en trans via ce domaine extracellulaire, cette interaction est dépendante du calcium (Araç et al., 2007). Sur ce domaine, on retrouve deux sites d'épissages : le site A (Figure 22), commun à toutes les Neuroligines, et le site B (Figure 22) uniquement présent chez la Neuroligine1 (Ichtchenko et al., 1995, 1996). Ce site d'insertion B module l'interaction avec les formes α et β de la Neurexine, en présence de l'insert la Neuroligine1 ne se lie plus à la Neurexine- β (Comoletti et al., 2006). Au niveau extracellulaire on retrouve une interface de dimérisation (Araç et al., 2007) (Figure 22), la

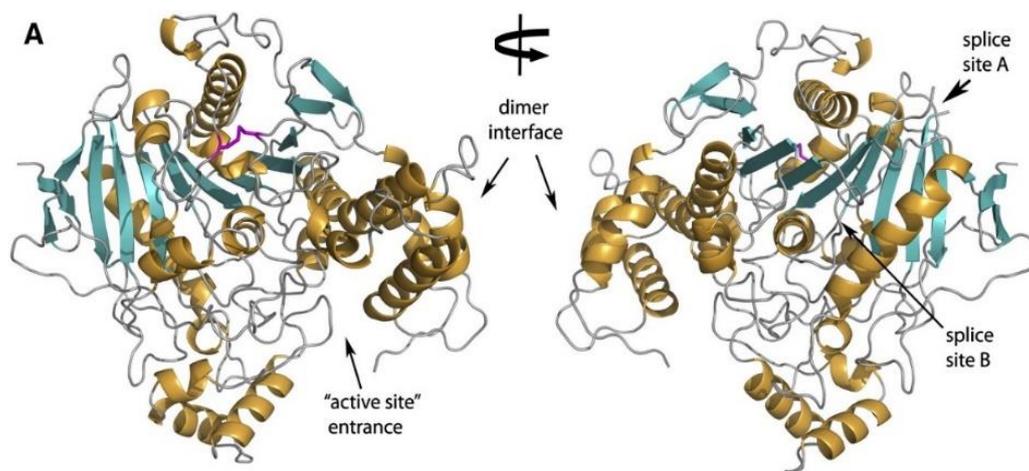


Figure 22. Structure de Neuroligine1

Représentation structurale d'un protomère de Neuroligine1 avec deux angles de rotation de 180°C suivant l'axe. Les hélices α sont colorées en orange, les feuillets β sont colorés en cyan et l'unique liaison disulfure est colorée en magenta. Les zones de variants d'épissage et de dimérisation sont notées.

Source : Araç et al., 2007

Neuroligine est constitutivement retrouvée sous forme dimérique (Comoletti et al., 2003) (Figure 22). L'utilisation de mutant monomérique de la Neuroligine a permis de démontrer que cette dimérisation était indispensable pour l'agrégation et le recrutement de Neurexine, qui est monomérique, et permettre la différenciation présynaptique (Shipman & Nicoll, 2012). Dans les neurones, la forme monomérique de Neuroligine est retenue dans le réticulum démontrant son instabilité conformationnelle (Poulopoulos et al., 2012). Des mutations de Neuroligine 3 et 4, liés à des troubles du spectre autistique (Jamain et al., 2003), présentent le même phénotype, suggérant également un impact structurel. (Chih et al., 2004; De Jaco et al., 2006). *In vitro*, la dimérisation entre différentes formes de Neuroligine a été démontrée, la Neuroligine peut donc former des homo- ou hétérodimères (Poulopoulos et al., 2012), les dimères de Neuroligine peuvent également oligomériser (Dean et al., 2003), favorisant la clustérisations du complexe Neurexine/Neuroligine.

Au niveau de la queue cytosolique, il y a un motif commun à toutes les isoformes qui en se liant aux domaines PDZ, permet l'interaction avec la protéine d'échafaudage PSD-95 et de

nombreuses autres protéines avec des domaines PDZ-like (Hirao et al., 1998; Irie, 1997; Meyer et al., 2004), tels que SPAR, une protéine impliquée dans la morphologie de l'épine dendritique par sa capacité à remodeler l'actine (Pak et al., 2001). On retrouve également la présence de motif tyrosine régulant la liaison à la géphyrine (Giannone et al., 2013; Letellier et al., 2018), une protéine d'échafaudage permettant le recrutement sélectif des récepteurs GABA aux synapses inhibitrices (Poulopoulos et al., 2009). *In vitro*, les différents isoformes se lient à des protéines d'échafaudage des synapses excitatrices et inhibitrices. (Graf et al., 2004; Nam & Chen, 2005; Scheiffele et al., 2000). La présence de motif tyrosine permet de réguler le recrutement spécifique des isoformes et dans la spécification synaptique. En effet, la Neuroligine-1 est retrouvée uniquement dans les synapses excitatrices (Song et al., 1999), alors que la Neuroligine-2 et 4 sont dans les synapses inhibitrices (Hoon et al., 2011; Varoqueaux et al., 2004), tandis que la Neuroligine-3 est localisée dans les deux types de synapses (Budreck & Scheiffele, 2007). L'ensemble de ces combinaisons entre les isoformes et les variants d'épissage de Neurexine et Neuroligine, a été décrit comme un code moléculaire (Südhof, 2017) permettant de réguler les fonctions et les réponses synaptiques.

Tout comme pour la Neurexine, la délétion constitutive des différentes isoformes de Neuroligine est létale à la naissance, due à un problème respiratoire. Les observations montrent une diminution du nombre de synapses inhibitrices et une réduction de l'activité GABAergique, mais un nombre de synapses global stable. Les synapses excitatrices sont, elles structurellement stables et leur activité n'est que modérément affectée. (Varoqueaux et al., 2006). Cela confirme que le complexe Neurexine/Neuroligine est indispensable pour la maturation, la stabilisation et la fonctionnalisation des synapses, mais qu'il n'est pas nécessaire pour la formation de ces dernières. La présence de Neuroligine permet pourtant seul d'induire une différenciation pré-synaptique *in vitro* dans le système de coculture décrit plus haut (Chubykin et al., 2005).

En effet, Neuroligine est capable d'immobiliser les récepteurs AMPA par l'intermédiaire de PSD-95 (Mondin et al., 2011) et de recruter les récepteurs NMDA via son domaine intracellulaire (Barrow et al., 2009; Budreck et al., 2013), cette interaction est d'ailleurs régulée par la phosphorylation de Neuroligine (Letellier et al., 2018, 2018). Plus récemment un modulateur de l'interaction du complexe Neurexine/Neuroligine a été découvert, les protéines MDGA (*MAM domain GPIanchored molecules*), qui interagissent avec les Neuroligines en cis et rentre en compétition avec Neurexine pour le site d'interaction (Elegheert et al., 2017), permettant de moduler fortement les interactions synaptiques en déstabilisant le complexe Neurexine/Neuroligine.

Synthèse :

- Partenaire le plus étudié de Neurexine
- Létalité en cas d'absence des Neuroligines
- Rôle dans la différenciation pré-synaptique et maturation des synapses, mais pas dans la formation initiale de la synapse.

INTRODUCTION

2.1.3 LRRTMs

Les protéines LRRTMs appartiennent à la grande famille des *leucine rich repeat* (LRR) qui contient différents types de protéines : récepteur, protéine d'adhésion, enzyme, protéine de la matrice extracellulaire avec des fonctions très variées (adhésion cellulaire, transduction signalisation, apoptose ...). Il existe quatre isoformes de LRRTM, codés par quatre gènes différents, présents uniquement chez les vertébrés et essentiellement exprimé dans le cerveau dès le développement (Laurén et al., 2003). LRRTM2 est la seule forme retrouvée dans d'autres tissus.

Structuellement, la partie extracellulaire de la protéine est composée d'une succession de domaines LRR et de feuillet β , ce qui induit une courbure formant une crosse entourée par des séquences riches en cystéine (Figure 23). La zone concave de la crosse est une zone très conservée, c'est dans cette zone qu'initialement l'interaction entre LRRTM et les différents isoformes de Neurexine a été décrite (Paatero et al., 2016). Cependant, il a été démontré depuis par cristallographie que Neurexine interagit au niveau de l'extrémité C-terminale de la crosse (A. Yamagata et al., 2018). LRRTM et Neuroligine sont en compétition pour le même site d'adhésion avec la Neurexine (Ko et al., 2009a), la formation du complexe Neurexine/LRRTM est-elle aussi calcium dépendante. Il a été démontré qu'un excès de LRRTM2 pouvait inhiber le complexe Neurexine/Neuroligine (A. Yamagata et al., 2018), ce qui est un moyen potentiel de contrôle de l'activité synaptique. LRRTM contrairement à la Neuroligine est retrouvé uniquement au niveau des synapses excitatrices (Linhoff et al., 2009) et principalement dans l'épine dendritique où elles s'organisent en nano-domaines denses (Chamma et al., 2016).

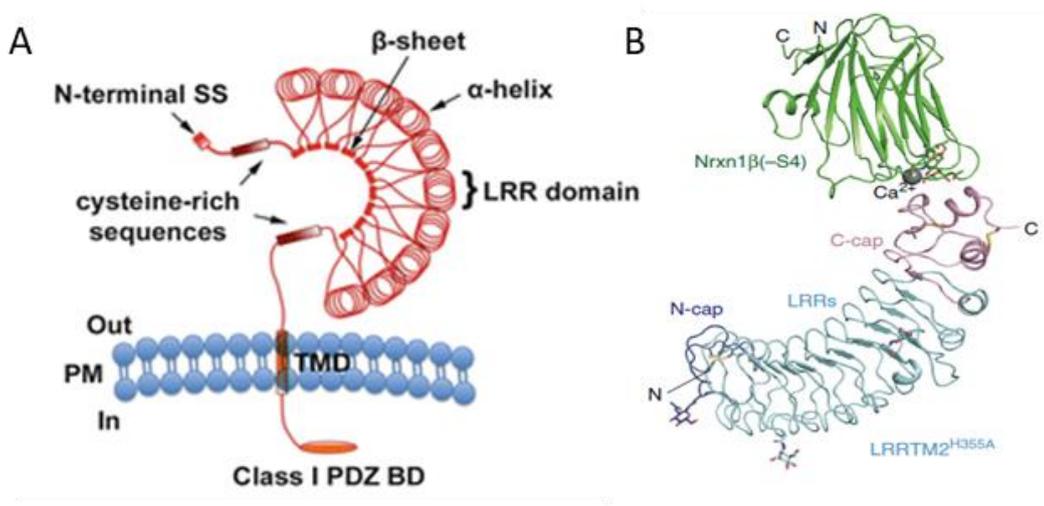


Figure 23. Structure et interaction de LRRTM

(A) Schéma de la structure de LRRTM, basé sur l'étude cristallographique de Kobe et Deisenhofer (1995) (B) Structure du complexe Neurexine1 β (SS4-) (vert) et LRRTM2 au niveau de la crosse du côté C-terminal (rose).

Source : Chipman et Goda., 2016 ; Yamagata et al., 2018

Au niveau cytoplasmique, le court domaine intracellulaire permet d'interagir avec des domaines PDZ, permettant de recruter PSD-95 et des sous-unités des récepteurs AMPA (de Wit et al., 2009), permettant potentiellement de réguler l'adressage membranaire de ces derniers. LRRTM seul est suffisant pour induire in vitro une différenciation pré-synaptique via

son interaction avec Neurexine (Ko et al., 2009a; Linhoff et al., 2009), LRRTM2 est la forme qui induit la plus forte activité d'initiation synaptique. Son effet est même plus important que celui de Neuroligine-1 *in vitro*. (Siddiqui et al., 2010). Le rôle et les activités de LRRTM durant le développement synaptique semblent redondant avec ceux de Neuroligine, ce qui laisse suggérer que LRRTM intervient également dans la maturation et la stabilisation synaptique (Roppongi et al., 2017).

Synthèse :

- Compétiteur de Neuroligine pour l'interaction avec Neurexine
- Rôle dans la différenciation pré-synaptique et la maturation des synapses

2.1.4 SynCAMs

Les SynCAMs, également appelés CADM, font partie de la super famille des immunoglobulines (N-CAM, Nectin ...). Ces molécules sont rassemblées dans cette famille car elles présentent au niveau extracellulaire un ou plusieurs domaine immunoglobuline (Ig). Quatre isoformes de SynCAM, codées par les gènes CADM1-4 ont été décrites. Elles sont localisées à la pré et à la postsynapse (Biederer et al., 2002) lors d'immunomarquages. Les quatre isoformes possèdent des structures similaires avec trois domaines Ig au niveau extracellulaire (Figure 24). Les domaines Ig peuvent former des liaisons entre eux en cis via les domaines Ig2 et 3 et en trans, on retrouve donc des interactions homophiliques et des interactions hétérophiliques (Fogel et al., 2007) entre les différentes isoformes, induisant la formation d'oligomères. La perte de l'association latérale, réduit la formation de cluster de SynCAM et impacte la synaptogenèse et la structure synaptique en modulant la taille des synapses formées (Fogel et al., 2011). Ce qui laisse suggérer que SynCAM a un rôle dans la structuration et l'organisation des synapses. Concernant la partie intracellulaire des SynCAM, c'est un domaine très court conservé entre les différentes isoformes avec des sites de liaisons aux domaines FERM et PDZ (Biederer, 2006). Permettant, respectivement, l'interaction avec des protéines d'échafaudage de la présynapse telle que CASK et la synténine (Biederer et al., 2002) et la protéine intracellulaire 4.1B au niveau post-synaptique. La protéine 4.1B induisant le recrutement des récepteurs NMDA et AMPA (Hoy et al., 2009)

SynCAM-1 est majoritairement exprimée dans le cerveau, principalement au niveau hippocampique et très tôt dans le développement embryonnaire (Thomas et al., 2008). Elle est retrouvée aussi dans d'autres organes comme le foie (Fogel et al., 2007). Les autres isoformes de SynCAM (2 à 4) sont présentes uniquement au niveau du système nerveux

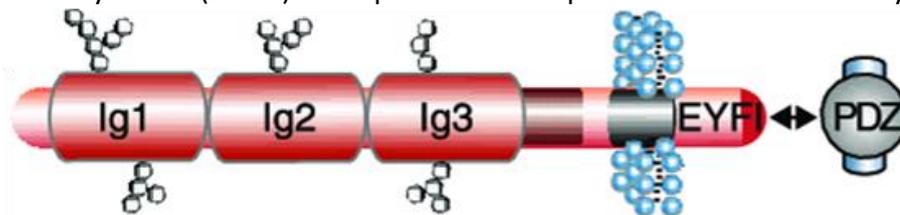


Figure 24. Structure de SynCAM

Schéma structurel de SynCAM avec les domaines immunoglobulines (Ig) et leurs sites de glycosylation. Le domaine intracellulaire EYFI permet la liaison au domaine PDZ de différentes protéines, dont CASK et synténine.

Source : Biederer et al., 2002

INTRODUCTION

central et ont un pic d'expression au cours de la synaptogenèse. Cela suggère un rôle de SynCAM-1 dans des étapes en amont de la formation des synapses, en effet des études ont déterminé la présence de cette protéine au niveau du cône de croissance. Cette localisation serait liée à une fonction dans la morphologie du cône de croissance au cours de la croissance axonale, via l'interaction avec une kinase (FAK : *focal adhesion kinase*) des adhésions focales (Stagi et al., 2010). Ce rôle morphologique se poursuivrait lors de la formation de la synapse en intervenant dans le changement de conformation du cône de croissance en bouton pré-synaptique (Stagi et al., 2010). Cette idée est renforcée par une forte présence de SynCAM-1 au niveau péri synaptique des postsynapses qui permet de conserver une intégrité structurelle (Perez de Arce et al., 2015). SynCAM semble donc intervenir dès les premières étapes de la formation synaptique, avec un rôle fort dans l'organisation structurelle de la synapse. En effet, la perte du domaine extracellulaire de SynCAM, qui régit l'adhésion, induit une diminution drastique de la formation de synapses (Biederer et al., 2002).

Synthèse :

- Interaction homophile
- Rôle dans la structure et l'initiation synaptique

2.1.5 Cadhérines

Les cadhérines (*calcium-dependent adhesion*) appartiennent à une super famille de 80 membres contenant plusieurs groupes basés sur la similitude de leurs domaines cytoplasmiques (Cadhérines classiques, Protocadhérines, Tcadherine, desmosomales), présentant tous des domaines cadherine, en nombre variable, qui permettent de fixer le calcium indispensable pour la fonction d'adhésion de ces protéines. Nous allons nous focaliser sur les cadhérines classiques qui sont présentes dans de nombreux tissus et qui ont un rôle dans l'adhésion, la transmission des signaux extracellulaire, la morphologie cellulaire via une

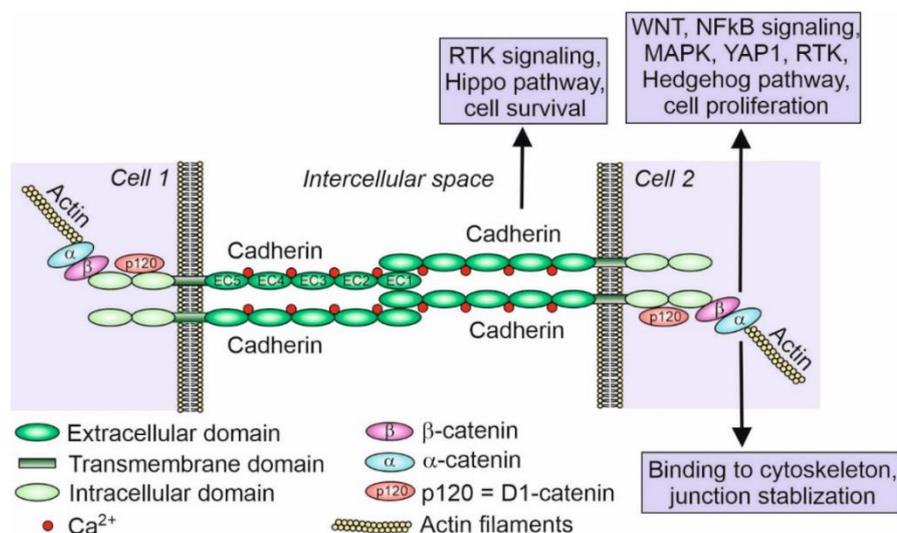


Figure 25. Cadherine structure et fonction

Schéma de l'interaction des cadhérines classiques au niveau de domaine EC1 entre deux cellules. Annotation des différentes voies de signalisation et fonctions activables lors de l'interaction en cis ou en trans, ainsi que via des intermédiaires tels que la caténine.

Source : Piprek et al., 2020

interaction indirecte avec le cytosquelette (Figure 25). Les différentes cadhérines sont nommées suivant les tissus où on les a identifiées, nous allons donc nous intéresser à la Ncadhérine (Ncadh), qui est une cadhérine de type 1, présente dans le tissu neuronal et abondamment au niveau synaptique. Elle est constituée de 5 domaines cadhérine extracellulaires permettant l'interaction en trans et en cis via le domaine EC1, Ncadhérine peut être sous forme dimérique ou monomérique à la membrane (Shapiro et al., 1995; Shirayoshi et al., 1986), ce qui permettrait de moduler l'adhésion et l'activité synaptique (Tanaka et al., 2000). Les N-cadhérines sont présentes de manière ubiquitaire et en abondance dans les synapses, et elles sont localisées au niveau péri synaptique durant les premiers temps de l'initiation et de la formation des synapses et leur nombre décline ensuite (Uchida et al., 1996). Le principal rôle des cadhérines de manière générale est l'adhésion cellule-cellule et de ce fait les cadhérines jouent un rôle très tôt dans le développement au cours de la morphogenèse, il est donc difficile d'étudier leur rôle spécifique dans la synaptogenèse. L'implication de la Ncadhérine dans l'initiation du contact synaptique semble évidente, cependant Ncadhérine a également un rôle structurel et organisationnel, de par ses interactions au niveau de sa queue cytosolique avec des protéines comme la caténine et des enzymes tels que des kinases et des phosphatases (Figure 25), qui permettent de faire le lien avec des éléments du cytosquelette tels que l'actine (Nikitczuk et al., 2014). Sa localisation au niveau péri synaptique (Fannon & Colman, 1996) accentue son implication dans la morphologie de l'épine dendritique. Ncadhérine seule, n'est pas suffisante pour induire une différenciation synaptique, même si pourtant Ncadhérine participe également au recrutement de récepteurs (Silverman et al., 2007).

Synthèse :

- Interaction homophilique
- Rôle adhésif dans l'initiation synaptique

2.2 Synapse et protéines d'adhésion synaptique : un puzzle incomplet

Malgré des récentes découvertes les connaissances concernant la formation des synapses et le rôle des protéines d'adhésion synaptique dans ce domaine ainsi que sur les voies de signalisation en aval et en amont sont loin d'être complètes. C'est également le cas pour la spécification (inhibitrice/excitatrice) et la plasticité synaptique. Il est difficile de rattacher l'ensemble des pièces du puzzle pour comprendre la mécanique dans son intégralité. Il reste donc encore énormément à apprendre, comprendre et redécouvrir concernant les protéines d'adhésion synaptique, qui sont un élément central de la synapse et de sa fonction.

Le Dr Südhof, un des grands experts du domaine, décrit très bien son point de vue sur les enjeux liés à l'étude de ces protéines dans ses différentes revues afin d'expliquer pourquoi il manque autant de pièces du puzzle (Südhof, 2017, 2018, 2021) :

- **Localisation des protéines à la synapse** : La taille et l'encombrement de la synapse rend difficile l'observation de la localisation de ces constituants. Même si cela a beaucoup progressé avec l'apparition des techniques de super-résolution et le développement de l'immunomarquage en microscopie électronique. Cependant, il n'est pas toujours évident

INTRODUCTION

d'avoir des anticorps spécifiques des protéines d'intérêt. De plus, lorsque les protéines sont présentes à la fois à la post et à la présynapse, il est plus difficile de distinguer la localisation entre les deux compartiments.

- **Identification sur des interactions :** Il existe de nombreuses techniques permettant l'étude interactions protéine-protéine que l'on détaillera dans la partie suivante (*III. Etude du rôle des protéines d'adhésion dans la connectivité synaptique*). La plupart de ces techniques seules ne sont pas suffisantes pour conclure la présence d'une interaction à cause de taux élevés de faux positifs. Il est donc nécessaire de coupler ces techniques avec des études cinétiques et structurales.
- **Fonction des protéines :** Les modèles de gains ou de perte de fonction (RNAi, surexpression) qui sont couramment utilisés pour déterminer la fonction d'une protéine peuvent induire des modifications non spécifiques ou favoriser des interactions faibles non présentes physiologiquement. Ce qui peut biaiser l'étude fonctionnelle de la protéine.

Les modèles d'hémi-synapse sont largement utilisés pour étudier la capacité des protéines d'adhésion synaptique, appelées protéines organisatrices de synapse, à induire la formation de synapses (*III.2. Rôle des protéines d'adhésion synaptique : Modèle d'hémi-synapse*). Bien que ces techniques aient considérablement contribué aux avancées, il est important de noter qu'un nombre excessif de protéines d'adhésion synaptique ont été identifiées comme capables d'induire des synapses artificielles. Cependant, il est évident qu'une seule protéine ne suffit pas à elle seule pour cet effet. Par conséquent, ces méthodes seules ne sont pas suffisantes pour une étude complète de la fonction synaptique.

III Etude du rôle des protéines d'adhésion dans la connectivité synaptique

Pour étudier les interactions protéine-protéine régissant la connectivité synaptique au niveau trans-synaptique, de nombreuses techniques ont été développées en vue d'identifier et de caractériser ces interactions par des approches biophysiques et structurales. Dans la première partie, seront présentées les techniques les plus couramment utilisées pour analyser ces interactions protéine-protéine. Mais également, les techniques plus récentes, liées aux avancées en microscopie, qui permettent de caractériser ces interactions dans un environnement synaptique *in cellulo*. De plus, l'impact de l'environnement cellulaire et membranaire sur ces interactions protéiques sera également discuté.

Dans la deuxième partie, seront explorés les modèles *in vitro* développés pour étudier le rôle des protéines d'adhésion synaptique dans la formation des synapses, en mettant l'accent sur les modèles d'hémi-synapse. Ces modèles fournissent des informations précieuses sur les mécanismes impliqués dans ce processus clé. Enfin, dans la dernière partie, l'intérêt du *micropatterning* sera mis en avant. Cette approche permet non seulement de caractériser les interactions protéiques d'un point de vue biophysique dans un environnement contrôlé, mais aussi de former des hémi-synapses pour étudier le rôle des protéines d'adhésion synaptique tout au long du développement. Grâce à cette approche innovante, il est possible d'obtenir des données plus précises sur les interactions moléculaires, tout en recréant un environnement biomimétique qui simule des conditions physiologiques pertinentes. Cela ouvre de nouvelles perspectives pour approfondir la compréhension du rôle des protéines d'adhésion synaptique et de leur influence dans le développement synaptique.

3.1 Technique d'études des interactions protéine-protéine

La plupart des événements biologiques, tels que l'établissement des contacts cellule-cellule et le développement synaptique sont dépendants des interactions protéine-protéine (PPIs). La caractérisation de ces interactions permet de comprendre la fonction de ces protéines, mais également de les déstabiliser ou de les stabiliser au moyen d'approches pharmaceutiques et moléculaires (von Eichborn et al., 2012). Les PPIs peuvent être classifiées suivant plusieurs critères (Nooren & Thornton, 2003) :

- La surface de l'interaction, avec les interactions homophiliques lorsque l'ensemble des protéines du complexe sont identiques, et les complexes hétérophilique composés de sous-unités différentes.
- Le temps de l'interaction, distinguant les interactions transitoires, lorsque les interactions peuvent s'associer et se dissocier *in vivo*, des interactions permanentes, lorsque le complexe est stable.
- Diversité fonctionnelle, soit lorsque l'interaction est obligatoire pour que la protéine soit stable ou pour qu'elle ait une activité, soit lorsque l'interaction n'est pas obligatoire.

INTRODUCTION

Un grand nombre de techniques sont disponibles pour étudier les PPIs, et nous nous pencherons sur les détails des techniques les plus courantes, ainsi que sur certaines plus récentes. Cependant, de nombreuses revues détaillent l'ensemble des techniques existantes pour étudier les PPIs (Byron & Vestergaard, 2015; Miernyk & Thelen, 2008; Perrakis et al., 2011; Podobnik et al., 2016; Rao et al., 2014).

3.1.1 Techniques d'études des interactions protéine-protéine *in vitro*

De nombreuses approches pour étudier les PPIs ont été développées dans différents domaines, tels que la protéomique, la biochimie, la biophysique et les approches structurales. Toutes ces approches offrent un accès à différents niveaux d'informations concernant l'interaction, notamment le criblage des interactions, la cinétique, et la structure (Figure 26). Pour mieux appréhender la réalité physiologique d'une interaction, ces techniques sont souvent combinées afin de décrire l'interaction de manière plus complète.

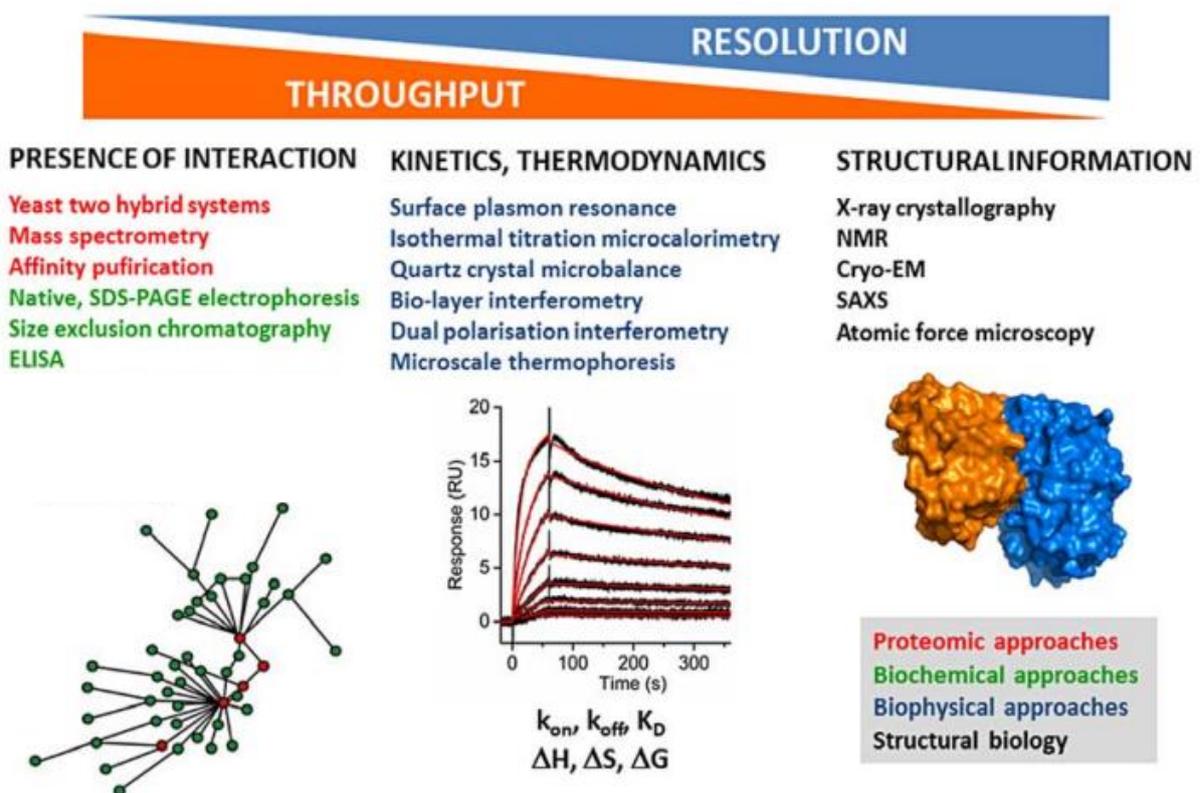


Figure 26. Méthodes d'étude des interactions protéine-protéine

Synthèse et classification non exhaustive des principales méthodes d'étude des interactions protéiques en fonction de leur résolution et de leur capacité de criblage.

Source : Modifié de Podobnik et al., 2016

3.1.1.1 Identifier des interactions

Au niveau synaptique, de nombreuses paires de protéines sont présentes, et on continue de découvrir de nouvelles protéines et donc de nouvelles interactions, comme récemment la découverte de la protéine MDGA (Díaz-López et al., 2005) qui module l'interaction entre Neurologine et Neurexine (Elegheert et al., 2017). Pour cela, différentes méthodes,

principalement *in vitro*, permettent de déterminer l'interactome d'une protéine donnée (Rao et al., 2014). Les principales approches utilisées sont la biochimie et la protéomique, mais il est crucial de noter que l'évolution des capacités informatiques a ouvert la voie au développement d'analyses computationnelles, permettant d'émettre des hypothèses sur des interactions encore inconnues (Hosur et al., 2012; Xenarios, 2002).

Les premières techniques qui se sont développées sont les techniques de purification par affinité (Figure 27.A). L'idée est de récupérer et de concentrer une protéine d'intérêt et ses partenaires, formant un complexe protéique, à partir de lysats de cellules ou de tissus. Plusieurs méthodes permettent d'y parvenir. Le complexe peut être capté par un anticorps, fixé sur une colonne ou sur des billes, reconnaissant la protéine dont on cherche les partenaires. C'est ce qu'on appelle la technique de co-immunoprécipitation (Kessler, 1975). Cependant, il n'existe pas toujours un anticorps de haute affinité pour la protéine d'intérêt. Dans ce cas, le complexe peut également être capté par un anticorps ou un ligand reconnaissant une étiquette peptidique ou protéique fusionnée à la protéine d'intérêt par transgénèse. L'utilisation de cette étiquette améliore la purification, et il est possible de procéder à une double purification afin d'augmenter la spécificité, ce qui est la méthode TAP (*Tandem affinity purification*) (Rigaut et al., 1999). Après la capture des partenaires protéiques d'intérêt, une phase d'élution permet de récupérer les composants du complexe en vue de les

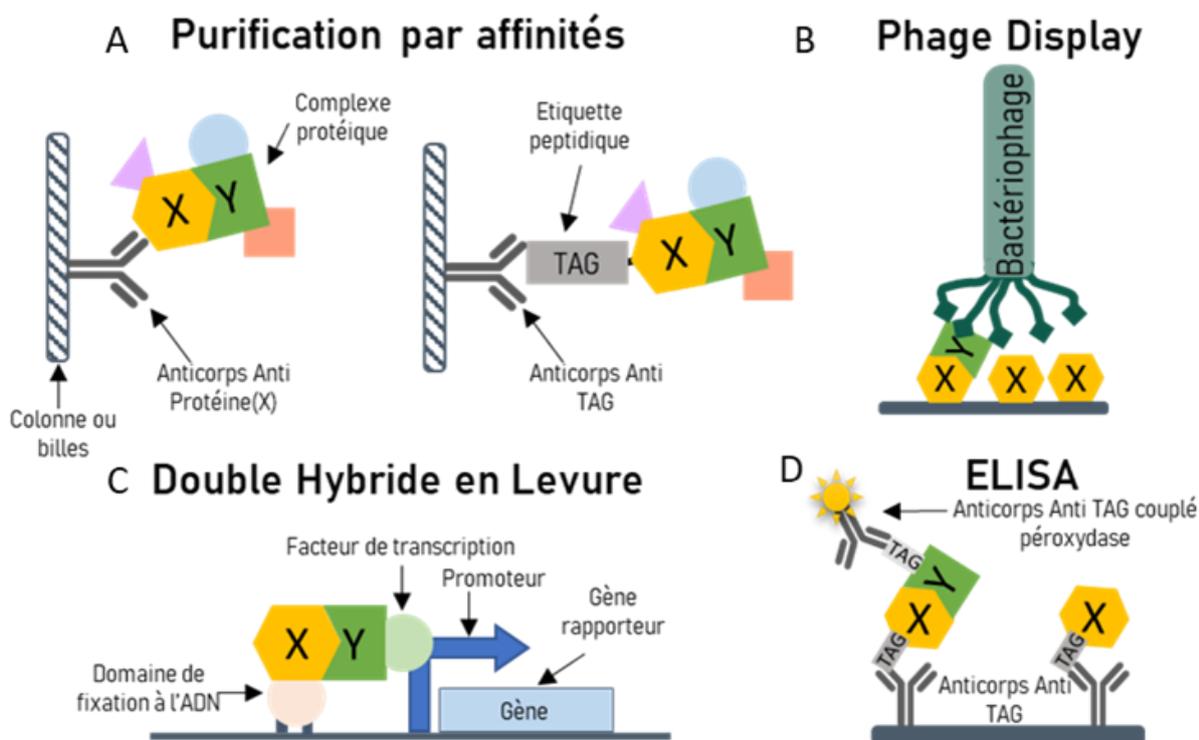


Figure 27. Techniques d'identification d'interactions protéiques

Représentation schématique de techniques d'identification d'interactions protéiques. L'objectif de ces techniques est de déterminer l'interactome (Y) de la protéine d'intérêt (X). Pour cela, il est possible de purifier ses partenaires (A) ou de cribler des interactions en utilisant des bactériophages génétiquement modifiés pour exprimer des interacteurs (B), des interacteurs couplés à des facteurs de transcription (C) ou de détecter des interactions par des réactions enzymatiques (D). **Source** : Inspiré de Béganton et al., 2019

INTRODUCTION

analyser et de les identifier. Le complexe protéique peut être soumis à une électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE) pour isoler les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Cependant, le plus souvent, la spectrométrie de masse (Paul et al., 2011) est utilisée, permettant de mesurer avec plus de précision la masse et d'accéder à la structure chimique des protéines présentes dans le complexe pour les identifier. Ces techniques de purification par affinités, ont permis d'isoler Neurologine-1 (Ichtchenko et al., 1995) et LRRTM2 (Ko et al., 2009b) en tant que partenaire de Neurexine1 β .

D'autres techniques utilisant des approches génétiques emploient des « vaisseaux » pour exprimer des protéines d'intérêt et observer des interactions. Deux principales techniques se distinguent. La technique d'exposition sur phage (Figure 27.B) (*Phage display*) est une technique relativement récente qui permet de cribler rapidement des interactions protéiques (Sidhu et al., 2003). Elle repose sur l'utilisation de bactériophages génétiquement modifiés pour fusionner une protéine du manteau protéique du phage avec une protéine d'intérêt (G. P. Smith, 1985). Des bibliothèques de phages exprimant différentes protéines peuvent ainsi être soumises à des tests. En mettant en contact ces bactériophages avec une protéine cible immobilisée, les phages seront retenus en cas d'interaction. Ensuite, les phages immobilisés sont élués, amplifiés et séquencés pour identifier les partenaires protéiques de la protéine immobilisée. La technique de double hybride en levure (Fields & Song, 1989) est une seconde alternative basée sur la modification génétique (Figure 27.C). Cette technique consiste à activer, chez la levure, la transcription d'un gène rapporteur (B-galactosidase) en reconstituant la fonction d'un facteur de transcription par l'interaction de deux protéines d'intérêt. La versatilité et la facilité de mise en œuvre de cette technique sont des avantages, mais elle présente des taux significatifs de faux positifs et négatifs. Cette technique a permis de déterminer que la Neurologine interagissait principalement avec le domaine PDZ3 de la Neurologine (Irie, 1997).

D'autres techniques de criblage à haut débit, basées sur l'utilisation de protéines purifiées, se sont développées. Par exemple, une méthode basée sur la technique ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) consistant à réaliser un « sandwich » entre une protéine appât fixée par un anticorps via une étiquette (Figure 27.D). Cet appât est mis en contact avec différentes protéines. Si une interaction se produit, le partenaire sera reconnu par son étiquette spécifique grâce à un anticorps couplé à une enzyme, la peroxydase (Figure 27.D). L'enzyme entraîne une coloration du milieu en présence de son ligand. Cette technique a été utilisée pour cribler des interactions entre protéines d'adhésion synaptique (Ozgul et al., 2019). Enfin, les micros-réseaux de protéines ont été utilisés pour tester des interactions protéiques et leurs activités (Figure 28). Différentes solutions permettent de créer ces micros-réseaux (H. Zhu & Snyder, 2001). Parmi ces techniques, on retrouve l'impression protéique et plus particulièrement les techniques d'écriture (MacBeath & Schreiber, 2000). L'interaction avec la protéine imprimée sur le support est déterminée grâce à l'utilisation de fluorophores couplés aux ligands déposés.

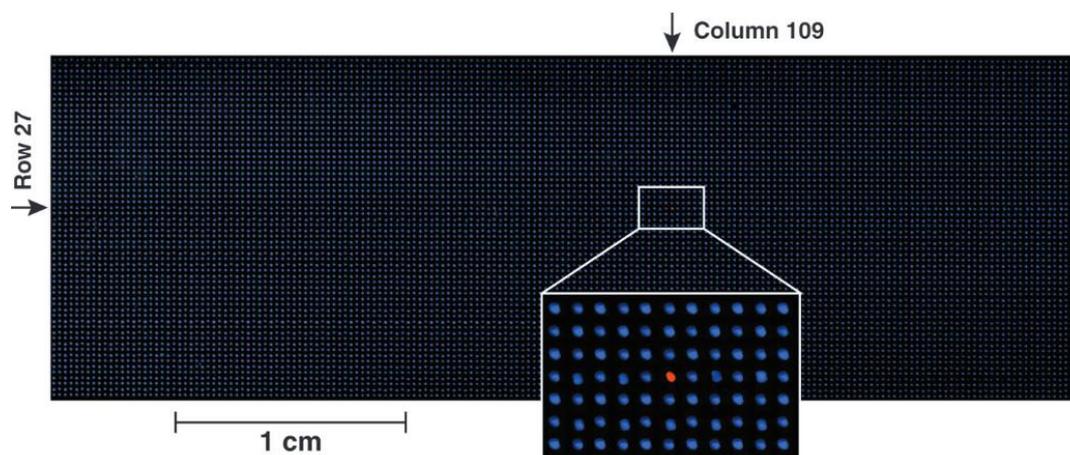


Figure 28. Criblage d'interaction protéique par micropatterning

Révélation par immunomarquage (BODIPY-FL-IgG (0,5 mg/ml) en bleu, Cy5-FKBP12 (0,5 mg/ml) en rouge et 100 nM de rapamycine) d'une lamelle de points imprimés par un automate de haute précision (150-200 nm diamètre des points) Sur tous les points de la protéine G a été déposés, sauf sur un (ligne 27, colonne 109), où du FRB a été imprimé. L'immunomarquage démontre la spécificité du dépôt et de la détection.

Source : MacBeath & Schreiber, 2000

3.1.1.2 Structure de l'interaction

La détermination de la structure tridimensionnelle d'un complexe protéique et des régions spécifiquement impliquées dans une interaction revêt une grande importance pour comprendre le rôle de ce complexe. Cela permet ensuite d'identifier les éventuelles zones de mutation qui pourraient déstabiliser l'interaction, perturber la fonction induite par l'interaction et ainsi déterminer les effets physiologiques qui en découlent.

La technique la plus couramment utilisée pour déterminer la structure d'une protéine est la cristallographie par rayons X (Friedrich et al., 1913 ; Bragg et al., 1913). Les premières structures protéiques déterminées par cette technique étaient celles de l'hémoglobine (Perutz et al., 1960) et de la myoglobine (Kendrew et al., 1958). Depuis lors, environ 90 % des structures protéiques disponibles dans les bases de données ont été résolues par cristallographie par rayons X. La cristallographie est l'étude des cristaux et de leur structure atomique. Les cristaux (Figure 29.A) présentent des arrangements atomiques spécifiques et périodiques qui forment un réseau cristallin. En cristallisant des macromolécules complexes, telles que les protéines, il est possible de reconstruire leur structure atomique tridimensionnelle en combinant des données de diffraction (angles et intensité) des rayons X diffractés par les atomes de la protéine. Cependant, la cristallisation des protéines est un processus très complexe, et il n'est pas toujours possible d'obtenir des cristaux de la protéine d'intérêt, en particulier pour les protéines membranaires, qui représentent pourtant 30% des protéines totales. Pour ces raisons, seules quelques structures de protéines membranaires ont été résolues à une résolution atomique (Bill et al., 2011). Les difficultés de cristallisation des protéines membranaires sont multifactorielles, l'une des principales raisons étant la faible stabilité de ces protéines, qui se dénaturent rapidement lors des étapes du processus. L'étude du complexe Neuroligine1/Neurexine1 β (Figure 29.B) par cette méthode a permis de déterminer l'organisation de l'interaction entre deux monomères de Neurexine et un dimère

INTRODUCTION

de Neuroligine, et ainsi pouvoir déterminer les sites d'interaction précis ainsi que les sites actifs pour le calcium (Araç et al., 2007).

Cependant, ces dernières années ont vu l'émergence de la Cryo-microscopie électronique (Cryo-EM) (Cheng, 2018) en tant que technique révolutionnaire pour l'étude des protéines membranaires. Cette méthode permet d'imager des molécules dans leur environnement membranaire lipidique sans nécessiter une étape complexe de cristallisation. En utilisant la Cryo-EM, il est possible de résoudre les structures protéines membranaires, en moyennant des images prises sous des orientations aléatoires de protéines incorporées dans une fine couche de glace vitrifiée. Bien que ces développements soient récents, la Cryo-EM va surement révolutionner l'étude des interactions protéiques membranaires au cours des prochaines décennies. Quelques publications ont d'ailleurs déjà décrit des structures à résolution atomique de récepteurs membranaires, tels que les récepteurs synaptiques (S. Zhu et al., 2018).

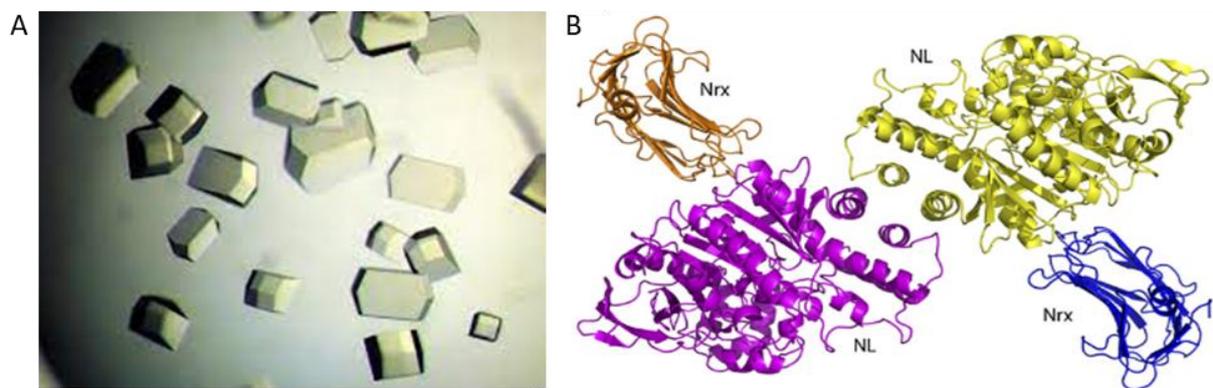


Figure 29. Cristallographie

(A) Exemple de cristaux protéiques (B) Structure de l'hétérotétramère Neuroligine1/Neurexine1 β obtenue après cristallographie

Source : Araç et al., 2007

La deuxième technique la plus couramment utilisée après la cristallographie par rayons X est la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Hall, 1964). La RMN est utilisée lorsque la cristallisation des protéines est impossible ou pour étudier des interactions faibles ou transitoires. Cette technique peut également être utilisée en complément de la cristallographie car elle permet d'obtenir des informations dynamiques sur la structure et l'interaction des protéines. Cependant, la RMN est limitée à l'étude de protéines de faibles poids moléculaires (>50Kda). La RMN utilise des champs magnétiques pour aligner les spins nucléaires des atomes d'un échantillon en solution, puis envoie des ondes radio pour exciter et détecter les signaux résultants, permettant ainsi de créer des images détaillées de la structure et de la composition de l'échantillon.

3.1.1.3 Caractérisation biophysique

Lors de la caractérisation biophysique des interactions protéine-protéine, l'objectif est de déterminer quantitativement les paramètres de l'interaction protéique. La plupart des approches biophysiques reposent sur des techniques optiques mesurant des phénomènes physiques surfaciques. Ces techniques peuvent être classifiées en deux catégories, en fonction

de l'état du ligand, qui peut soit être fixé à la surface, soit en solution lors de la mise en contact avec un partenaire potentiel, appelé analyte, qui lui est en solution.

La résonance plasmonique de surface (SPR) exploite la formation d'ondes évanescentes, appelées plasmons de surface, liées à une oscillation d'électrons libres à la surface d'un métal, le plus souvent de l'or. Ces ondes sont créées lors de l'envoi d'une lumière avec un angle de réflexion interne totale (Kretschmann, s. d.) sur une surface métallique (Figure 30). Cet angle de réflexion interne totale est obtenu en envoyant un faisceau lumineux avec un angle d'incident critique sur une surface ayant un indice optique plus faible (interface verre/air par exemple).

Pendant la phase d'association, l'analyte en solution se lie au ligand immobilisé à la surface du capteur (Liedberg et al., 1983) (Figure 30.A). Cela induit une variation de l'indice de réfraction. La détection de cette variation d'indice au cours des phases d'association (Figure 30), puis de dissociation lors du rinçage de l'analyte, permet d'extraire des paramètres cinétiques spécifiques de l'interaction. Lorsque deux espèces A et B interagissent pour former un complexe AB (Figure 30.B), plusieurs paramètres régissent cette interaction (Corzo, 2006). Tout d'abord, le taux d'association (*on-rate*), noté k_{on} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$), qui est une constante de second ordre car influencé par la concentration des protéines individuelles. Deuxièmement le taux de dissociation (*off-rate*), noté k_{off} (s^{-1}), qui est une constante du premier ordre directement liée au temps de vie du complexe protéine-protéine. Une valeur élevée de K_{off} signifie un temps de vie du complexe très court, le temps de demi vie ($2 / K_{off}$) représente le temps pour que 50% des complexes initiaux se dissocient. A l'équilibre de la réaction, les vitesses d'apparition et de disparition sont équivalentes ($dA/dt=dAB/dt=0$), donnant la constante d'équilibre K_d , exprimée en M, ($K_d = k_{on}/k_{off}$) qui est inversement proportionnelle à l'affinité K_a ($K_a = 1/K_d$).

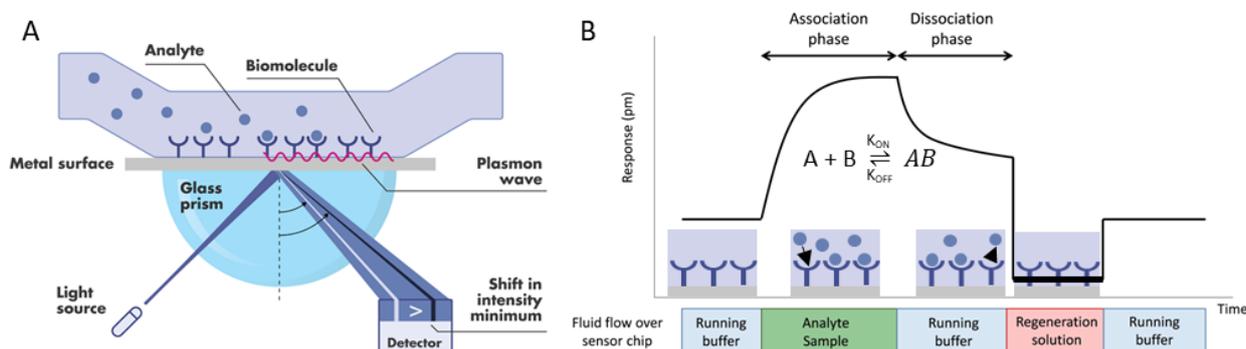


Figure 30. Résonance plasmonique de surface

(A) Représentation schématique du dispositif et du principe de résonance plasmonique de surface (B) Courbe de réponse (variation de l'indice de réfraction) et présentation des différentes phases d'association et de dissociation de l'analyte sur la molécule d'intérêt fixée à la surface du dispositif. Formule d'association de deux composés A et B ainsi que les constantes qui influencent cette équation.

Source : Modifié de reactionbiology.com et Nicoya.com

Le SPR est une technique permettant d'obtenir des données cinétiques précises, ce qui en a fait la méthode de choix dans l'industrie pharmaceutique. Le premier automate a été lancé au début des années 90 (BIAcore®), ce qui en fait aujourd'hui la technique de référence en matière de mesures biophysiques. La plupart des mesures cinétiques des protéines

INTRODUCTION

d'adhésion synaptique utilisent cette technique. Par exemple, elle a été utilisée pour mesurer la cinétique d'interaction entre différentes formes, plus ou moins tronquées, de Neuroligine et Neurexin-1 β afin d'identifier dans quel domaine se situe l'interaction entre ces deux partenaires (Comoletti et al., 2003). Bien que le rendement du SPR ait été faible à ses débuts, il s'est amélioré avec l'évolution des instruments. Le SPR couplé à de l'imagerie (SPRi) s'est développé pour permettre le criblage de nombreux analytes (Kodoyianni, 2011). Par exemple, le criblage de SynCAM1 avec différentes protéines de la famille des immunoglobulines a été réalisé avec cette technique, démontrant ainsi une interaction entre SynCAM 1 et 4 (Ito et al., 2018).

Même si le SPR est la technique de référence, d'autres techniques se sont développées. L'interférométrie de bio-couches (Shah & Duncan, 2014) (BLI, *Bio-layers interferometry*), relativement similaire au SPR, permet d'extraire les mêmes paramètres, mais elle est plus adaptée au criblage des interactions. Dans cette technique, le ligand est immobilisé à la pointe d'un biosenseur proche d'une fibre optique. La mesure des variations d'interférence lumineuse permet de caractériser l'interaction avec l'analyte en solution dans lequel la pointe est immergée. En utilisant plusieurs pointes, il est possible de réaliser plusieurs mesures d'interactions simultanément, et l'interférence due à la solution est moins importante par rapport au SPR. Cette technique a permis de démontrer le rôle de compétiteur de MDGA1, qui bloque les sites d'interaction de Neuroligine2 avec Neurexine1 β , entre autres (J. A. Kim et al., 2017).

Une autre technique permet de travailler avec le ligand en solution : la titration calorimétrique isotherme. Elle mesure les échanges de chaleur qui se produisent lorsqu'un ligand est ajouté à une macromolécule (protéine, acide nucléique, etc.) à température constante. Cette méthode permet de déterminer les constantes d'affinité, les stœchiométries et des paramètres thermodynamiques tels que l'enthalpie, l'entropie et l'énergie libre. Son utilisation a permis de démontrer que l'insertion du site B d'épissage de Neuroligine1 perturbe l'interaction avec la Neurexine1 β , en bloquant structurellement la formation d'une liaison (X. Chen et al., 2008).

Ces approches biophysiques offrent l'avantage de la précision et de la reproductibilité des expériences, grâce au contrôle important de l'environnement dans lequel les mesures sont effectuées. Cependant, un défi majeur évoqué par les biologistes est le manque de physiologie de l'environnement dans lequel ces mesures sont réalisées. C'est pourquoi de nouvelles techniques basées sur la microscopie se sont développées pour étudier ces interactions protéiques dans leur environnement natif.

3.1.2 Microscopie : Diffusion, interactions protéiques *in cellulo* et impact de l'environnement cellulaire

La mesure des paramètres biophysiques *in cellulo*, notamment au niveau de la synapse, est devenue possible grâce au développement des techniques de microscopie à fluorescence du vivant. Cela a permis de faire d'importantes avancées dans l'étude tout d'abord, de la diffusion des composés cytosoliques, puis des composés membranaires. Avant de plonger dans les détails des techniques, il est essentiel de définir la diffusion. Cependant, la définition de la

diffusion peut varier en fonction du contexte et de la molécule étudiée (Figure 31). Nous allons ici nous focaliser sur la diffusion des protéines au niveau membranaire.

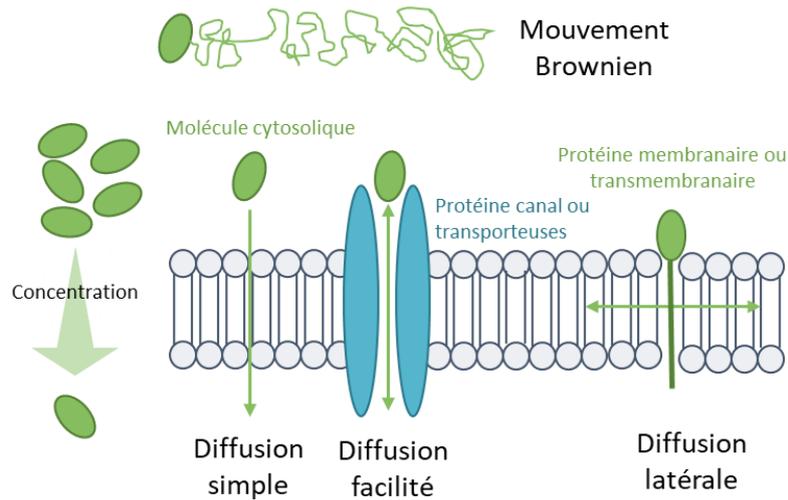


Figure 31. Schéma des différents types de diffusion

Les molécules (en vert) peuvent traverser les membranes, que ce soit en suivant le gradient de concentration par diffusion simple pour les petites molécules, ou en utilisant des canaux protéiques pour faciliter leur diffusion, dans le cas des protéines. Lorsqu'il est nécessaire de se déplacer à contre-courant du gradient de diffusion, on a recours à des protéines transporteuses qui consomment de l'énergie. En ce qui concerne les protéines membranaires, elles sont piégées dans la membrane et diffusent en 2D de manière latérale.

Il est important de noter que toutes les molécules indépendamment de l'environnement subissent un mouvement appelé mouvement brownien, dû à l'agitation des molécules dans un fluide, résultant des collisions constantes entre les petites molécules du fluide et les grosses molécules immergées (Einstein 1905 et Perrin 1913). Concernant les molécules en suspension, elles ont la capacité de traverser les membranes (plasmique, nucléaire...). Cela peut se faire par diffusion simple, suivant la loi de Fick, qui permet d'équilibrer les concentrations entre les compartiments. L'augmentation de la vitesse de déplacement des molécules résulte de collisions plus fréquentes dans les compartiments de forte concentration. Cependant, la diffusion simplifiée est principalement réservée aux molécules de petite taille (<40 à 50 kDa). Il y a ensuite la diffusion facilitée, qui utilise des canaux protéiques permettant le passage passif des molécules suivant le gradient de concentration, ou des protéines utilisant le transport actif, qui consomme de l'énergie à contre-courant du gradient. Le principal transport facilité de protéines est le passage du noyau vers le cytosol, et inversement, via les pores nucléaires. Dans le cas des protéines transmembranaires intégrées dans la membrane, on parle de diffusion latérale, car elle se limite à un environnement bidimensionnel. Cette diffusion est influencée par des interactions et des structures membranaires.

L'étude de la diffusion latérale des protéines transmembranaires a permis d'explorer l'impact de l'environnement cellulaire, en particulier de la membrane, sur les interactions des protéines. Dans une première section, nous présenterons les facteurs cellulaires qui influencent ces interactions. Ensuite, nous aborderons les techniques d'imagerie qui ont été initialement développées pour étudier la diffusion, mais dont les modèles d'analyse se sont élargis pour permettre de pouvoir également l'étude de la cinétique des interactions.

INTRODUCTION

3.1.2.1 Interaction et diffusion protéique : impact de l'environnement cellulaire

Les protéines d'adhésion synaptique jouent un rôle essentiel dans la médiation des interactions entre les neurones au niveau des synapses. L'étude de la diffusion latérale de ces protéines membranaires est importante et peut influencer la formation de ces interactions protéiques. Il a été observé que les protéines membranaires peuvent diffuser dans des régions spécifiques de la membrane et y rester piégées (Chow & Poo, 1982). Plusieurs facteurs cellulaires et membranaires contribuent à ce phénomène. Un facteur clé est la géométrie du compartiment, qui peut créer des effets barrières et concentrer les protéines membranaires, comme décrit au niveau du segment initial (Nakada et al., 2003) ou de la synapse (M. Renner et al., 2012). Ces zones à fortes concentrations de protéines favorisent les interactions en augmentant la probabilité de collisions entre protéines et peuvent ainsi augmenter la vitesse d'association de deux protéines (Northrup & Erickson, 1992). Les collisions augmentent le taux d'interaction en favorisant la rencontre des sites actifs des partenaires du complexe. En effet, une rotation entre deux protéines de quelques degrés ou d'ångström de différence entre deux protéines peut suffire pour rompre une interaction. La création de zones denses limite également la création de zones de contact parasites en dépeuplant les zones non spécifiques, ce qui peut jouer un rôle dans les zones de création des synapses.

Un autre moyen de concentrer localement les protéines membranaires est la membrane elle-même ou plus particulièrement les structures spécifiques qui la composent. Pendant longtemps, la membrane a été décrite comme homogène et fluide (Singer & Nicolson, 1972). Cependant, des nouveaux modèles ont démontré que la membrane est un environnement bien plus complexe et que le mouvement des lipides et protéines n'est pas aussi fluide (Dietrich et al., 2002), en raison de la présence de compartiments micro ou macro-métriques (Vereb et al., 2003). Ces structures sont liées à des interactions entre lipides, entre protéines ou entre ces deux composés. Parmi les structures macro-métriques les plus étudiées, on retrouve les radeaux lipidiques, qui sont décrits pour avoir un rôle dans la transduction, le transport membranaire, et la transmission synaptique (Allen et al., 2007). Concernant, les protéines transmembranaires, il a été montré qu'elles pouvaient également être entourées par un anneau de lipides et diffuser de manière cohésive avec ces lipides (Niemelä et al., 2010). De plus, la présence de lipides permettrait de favoriser une orientation protéique verticale, favorisant les interactions transmembranaires (Palsdottir & Hunte, 2004).

Dans ces zones denses en protéines et en contacts transmembranaires, il a été démontré que certaines protéines pouvaient être exclues. Cette éviction semble être liée à la taille de ces protéines, qui bloque l'accès des protéines ayant des petits domaines extracellulaires en les empêchant physiquement de créer des contacts transmembranaires (Schmid et al., 2016). En raison d'effets d'encombrement stérique, au niveau de la synapse, les petites protéines peuvent être rejetées des zones denses, telles que la densité post-synaptique (M. L. Renner et al., 2009). Des simulations entre des environnements en trois dimensions et un environnement membranaire limité à des mouvements en deux dimensions ont montré que la membrane favorise la formation d'interactions en trans et cis (Wu et al., 2013). En plus de

la membrane elle-même, des éléments extérieurs à la membrane tels que le cytosquelette, les protéines d'échafaudages à la synapse (Choquet & Triller, 2003; Triller & Choquet, 2005) ou la matrice extracellulaire par exemple, peuvent influencer le confinement des protéines et donc leur interaction.

Tous ces exemples démontrent l'importance d'étudier les interactions protéine-protéine dans un environnement membranaire. Des différences de cinétique ont pu être démontrées entre des mesures *in vitro* et *in cellulo*, avec, par exemple, pour Neurologine-Neurexine une cinétique relativement rapide en SPR (Comoletti et al., 2003) et pourtant une forte stabilisation, avec une cinétique lente de la Neurologine au niveau post-synaptique (Chamma et al., 2016).

3.1.2.2 Microscopie : Mesure de diffusion et d'interactions

La plupart des études sur la diffusion latérale et l'interaction des protéines *in cellulo* sont basées sur des techniques de microscopie de fluorescence du vivant. Ces techniques se sont développées dans les années 70 avec l'avènement des molécules fluorescentes, ce qui a permis d'obtenir une meilleure compréhension de l'impact de l'environnement cellulaire et membranaire sur les interactions protéiques et leur recrutement dans les zones de contact, telles que la synapse. Il est important de noter que la nécessité d'utiliser des marqueurs fluorescents dans ces techniques peut limiter les interactions en raison d'effets d'encombrement stérique.

3.1.2.2.1 Spectroscopie de corrélation de fluorescence

La technique de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS : *fluorescence correlation spectroscopy*) est une méthode de mesure quantitative de la mobilité et de l'interaction des molécules fluorescentes en solution ou dans des cellules vivantes. Cette technique permet une résolution de la molécule unique (Magde et al., 1972) et une résolution temporelle de l'ordre de la microseconde. Le principe de cette technique repose sur l'analyse des fluctuations rapides du signal de fluorescence dans un volume focal (Figure 32). Ce volume est généré soit par la présence d'un sténopé dans le chemin optique, soit par l'utilisation d'une illumination biphotonique, permettant d'illuminer avec un laser un petit volume (femtolitre) d'un échantillon biologique contenant des molécules fluorescentes.

Les molécules fluorescentes présentes dans cette petite région émettent de la lumière, collectée par un détecteur de photons. Ce signal est ensuite analysé par autocorrélation pour extraire différents paramètres notamment le coefficient de diffusion, en analysant le temps que met la molécule à traverser le volume focal. Pour étudier les interactions protéiques, une variante du FCS a été développée. Elle utilise deux protéines couplées avec des fluorophores distincts afin de déterminer si leur diffusion est identique (Rika & Binkert, 1989; Schwill et al., 1997). Cette variante est appelée spectroscopie de corrélation croisée (FCCS : *Fluorescence cross-correlation spectroscopy*). Il convient de noter que ces techniques sont peu compatibles avec un signal dense, ce qui réduit fortement la précision de la mesure (Figure 32.B). Il est donc préférable de travailler avec des marquages fortement dilués, bien que cela ne soit pas toujours compatible avec l'analyse des compartiments cellulaires. Cependant, il est possible

INTRODUCTION

de combiner FCS avec d'autres modalités d'imagerie, telles que le STED (Willig et al., 2006), pour réduire la taille de l'émission du fluorophore et améliorer la capacité à distinguer différentes molécules dans un environnement dense (Kastrup et al., 2005). Des analyses des interactions synaptiques ont été réalisées en solution, par exemple, avec l'étude de mutations impactant l'interaction de SynCAM1 chez des patients autistes (Fujita et al., 2010). De plus, ces techniques ont été employées dans un environnement membranaire pour examiner l'interaction de Syntaxin1 et munc18, qui sont impliquées dans l'amarrage des vésicules à la membrane présynaptique. (Kavanagh et al., 2014).

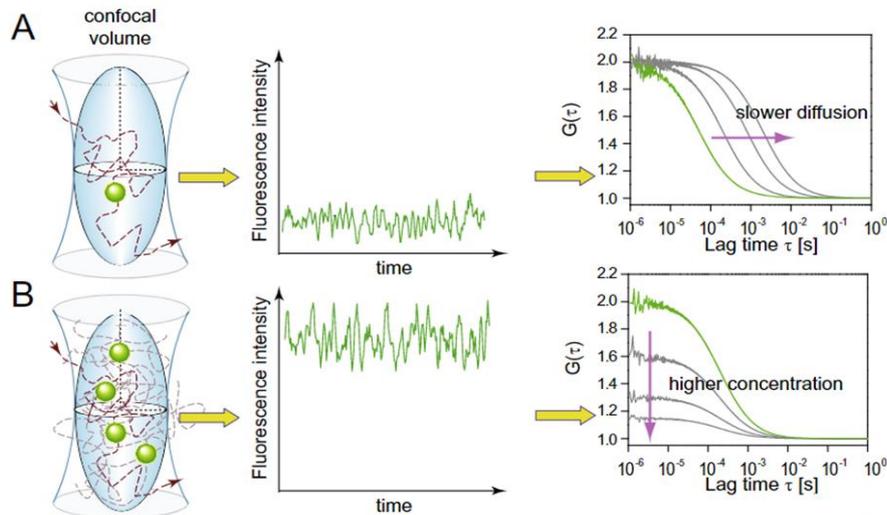


Figure 32. Spectroscopie de corrélation de fluorescence

Illustration du principe du FCS et de l'analyse des fluctuations du signal d'intensité de fluorescence, ainsi que de l'impact de la variation de diffusion (A) ou de concentration (B) sur la courbe d'autocorrélation.

Source : Machàn et Wholand, 2014

3.1.2.2.1 FRET : Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

La technique du transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET : *Förster resonance energy transfer*), comparée aux techniques présentées précédemment, n'a pas été initialement développée pour l'étude de la diffusion latérale des protéines, mais plutôt pour l'investigation des interactions protéiques (Clegg, 1995). Le FRET repose sur l'interaction entre deux molécules fluorescentes, appelées donneur et accepteur. Le donneur est excité par une source lumineuse et transfère son énergie d'excitation à l'accepteur par une interaction dipôle-dipôle (Figure 33.A). Si la distance entre les deux molécules est inférieure à la distance critique de FRET (environ 10 nm) (Figure 33.B), l'accepteur émettra une fluorescence à des longueurs d'onde plus élevées. La quantité de signal FRET, obtenue par mesure spectrale puis par la mesure des niveaux de fluorescence du donneur par rapport à celui du récepteur, peut également être influencée par la concentration relative des fluorophores et l'orientation des dipôles des molécules.

Le FRET présente une limitation importante due à la nécessité d'utiliser deux fluorophores ayant des spectres d'absorption et d'émission distincts, tout en assurant un chevauchement suffisant pour que l'énergie puisse être transférée (Figure 33.A). La position du fluorophore lors de son couplage génétique est un facteur important, car elle doit permettre, lors de l'interaction protéique, d'obtenir la proximité adéquate des fluorophores pour générer un

signal FRET. Quelques applications de cette technique ont été réalisées dans un environnement synaptique, avec l'étude des protéines impliquées dans l'exocytose (Degtyar et al., 2013) ou l'analyse de l'impact de la taille du domaine cytoplasmique de la protéine stargazin sur son interaction avec PDS-95 (Hafner et al., 2015). Cependant, à ma connaissance, aucune mesure n'a été effectuée à l'aide de cette technique sur les protéines d'adhésions synaptiques.

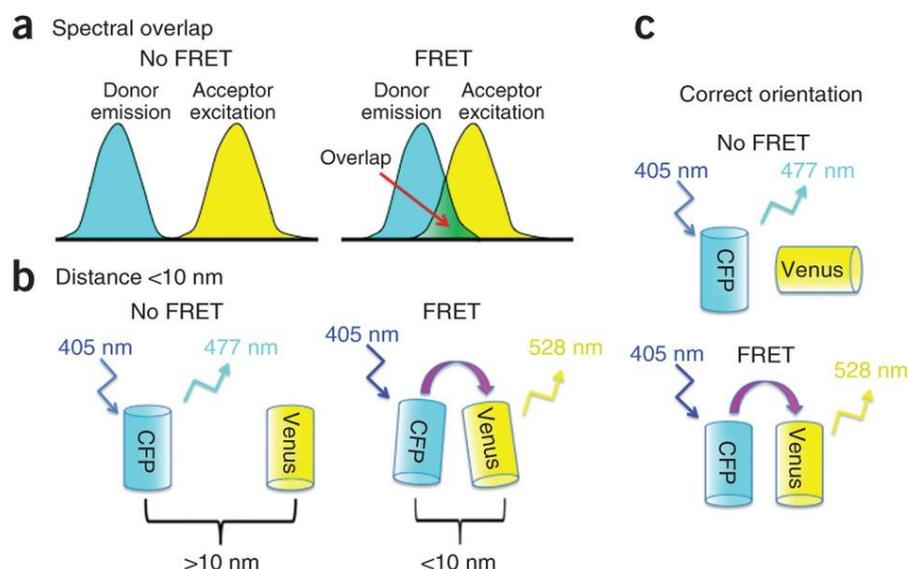


Figure 33. Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

(A) Schéma expliquant le recouvrement requis entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur pour avoir un transfert d'énergie. Impact de la distance (B) et de l'orientation (D) entre le récepteur et le donneur sur le FRET.

Source : Broussard et al. (2013).

3.1.2.2.2 FRAP : Retour de fluorescence après photoblanchiment

La technique de retour de fluorescence après photoblanchiment également appelée FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*) a été développée (Axelrod et al., 1976; Koppel et al., 1976) initialement pour l'étude de la diffusion des protéines dans la membrane. Cette technique permet de mesurer la vitesse de remplacement de la fluorescence après photoblanchiment dans une région donnée (Figure 34.A). Le photoblanchiment est effectué en exposant une région de taille et de géométrie contrôlée à une forte puissance laser, ce qui entraîne l'extinction de la fluorescence. Le FRAP est une technique couramment utilisée, initialement pour mesurer la diffusion des protéines entre compartiments, puis pour étudier la dynamique des protéines et leurs interactions. La photo-activation (PA) qui repose sur des fluorophores photo-activables est une alternative au FRAP qui ne nécessite que de faibles puissances laser. Sous excitation UV, ces fluorophores émettent de la fluorescence dans une longueur d'onde précise (Sawin & Nurse, 1997). Dans le cadre de la photo-activation, on observe la disparition d'un signal fluorescence, dû au détachement des molécules fluorescentes et à leur diffusion. Pour l'étude des protéines membranaires, le FRAP et la PA sont le plus souvent couplés avec de la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF : *Total Internal Reflection Fluorescence*). Ce type de microscopie permet, grâce à

INTRODUCTION

l'utilisation d'une onde évanescente, de n'exciter qu'une zone d'environ une centaine de nanomètres près de la surface (Sako & Uyemura, 2002). Ainsi, on peut observer uniquement la dynamique dans la zone membranaire.

La technique du FRAP semble relativement simple, mais son analyse est complexe, notamment si l'on souhaite extraire des valeurs de cinétique précises. Par conséquent, les analyses des données de FRAP sont le plus souvent qualitatives et permettent de déterminer si la protéine présente une mobilité rapide ou lente, si des interactions ont lieu ou non. Souvent, ces analyses comparent la protéine dans différentes conditions environnementales (telles que pH, viscosité, compétiteurs) ou avec différentes formes de la protéine (mutations) pour évaluer l'effet sur la dynamique par rapport à la condition de référence (Dou et al., 2002). Habituellement, des ajustements de courbe basés sur l'utilisation d'une ou deux exponentielles sont utilisés (Sakurai-Yageta et al., 2015). Parfois, des modèles plus complexes sont appliqués, admettant que la diffusion et l'interaction sont deux phénomènes temporellement distincts (Chamma et al., 2016), ou que la diffusion peut être négligée. Bien que le FRAP ait été largement utilisé par les biologistes, de nombreuses expérimentations ne font pas l'objet d'un traitement analytique détaillé et précis. Cependant, des lignes directrices sur les méthodes d'analyse et d'interprétation des données de FRAP existent dans la littérature (B. L. Sprague et al., 2004; B. Sprague & McNally, 2005). Ces lignes directrices démontrent qu'il existe de nombreuses combinaisons possibles entre diffusion et interaction et proposent des modèles adaptés pour une meilleure compréhension des données. Ces différents modèles seront présentés en détail dans la partie des résultats (I.1.1.2. Analyse des retours de FRAP).

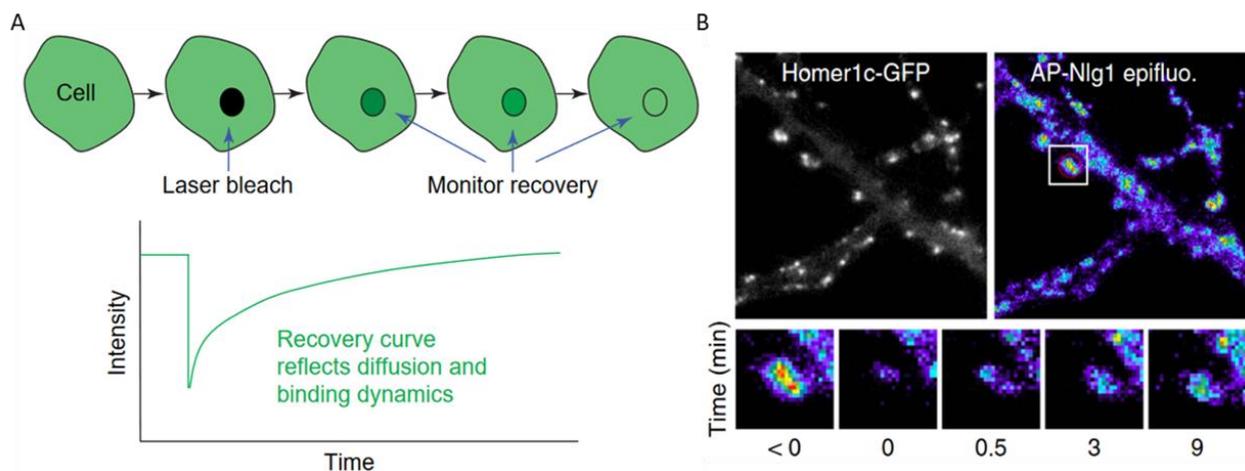


Figure 34. Retour de fluorescence après photoblanchiment

(A) Schéma explicatif du principe du FRAP (B) Photoblanchiment d'une synapse surexprimant AP-Neurologine1 dans des neurones primaires hippocampiques de rat à DIV15

Source : B. Sprague & McNally, 2005 et Chamma et al., 2016

3.1.2.2.3 Suivre de particule unique

Les techniques de FCS et de FRAP permettent d'étudier la dynamique de diffusion et d'interaction moyenne d'un ensemble de molécules. Pour une meilleure compréhension des mécanismes de diffusion et afin de potentiellement catégoriser des sous-populations, les chercheurs ont développé des techniques permettant de suivre le déplacement de molécules

individuelles (SPT : *single particle tracking*) dans l'espace et au fil du temps. Pour réussir cela, plusieurs facteurs sont nécessaires : une faible quantité de molécules observables simultanément pour pouvoir les isoler individuellement, une fréquence d'acquisition élevée (20ms) pour suivre les déplacements rapides des protéines, un niveau de signal suffisant pendant une durée adéquate pour pouvoir analyser les trajectoires.

Plusieurs solutions ont été développées pour marquer ou observer un faible nombre de molécules simultanément (Alcor et al., 2009) : marquage avec des fluorophores ou des anticorps à faible concentration (Tardin et al., 2003), utilisation de billes d'or ou de latex (Meier et al., 2001) recouvertes d'anticorps. Une technique de marquage largement utilisée pour étudier la dynamique des récepteurs (Charrier et al., 2006; Dahan et al., 2003; Lévi et al., 2008) et des protéines d'adhésion synaptique (Neupert et al., 2015; Thoumine et al., 2008) est l'utilisation de particules nanométriques de semi-conducteurs, les Quantum Dots (QDs) (Alivisatos, 1996). Les QDs, en raison de leur brillance et de leur photo-stabilité élevées, permettent de suivre des molécules sur des périodes beaucoup plus longues qu'avec des fluorophores classiques. Cependant, la taille des anticorps ou des QDs (10-30 nm) peut affecter la diffusion, et cela peut bloquer l'accès de la molécule d'intérêt si le compartiment est encombré et de petite taille, comme c'est le cas à la synapse (Groc et al., 2007). Les protéines fluorescentes, dont la taille est de l'ordre du nanomètre, sont plus adaptées, mais leur faible brillance est problématique, ce qui oblige à augmenter la puissance d'illumination, accélérant ainsi le photoblanchiment et réduisant la durée des trajectoires. Pour améliorer l'observation, des modalités d'imagerie spécifiques telles que l'illumination oblique (Tokunaga et al., 2008) ou la microscopie TIRF peuvent être utilisées en complément pour exciter uniquement la zone d'intérêt et réduire drastiquement l'impact des plans hors focus et du photoblanchiment global. Le développement des fluorophores photo-convertibles ou photo-activables (Fernández-Suárez & Ting, 2008) couplés génétiquement, et donc de la microscopie de super résolution, a ouvert de nouveaux horizons pour le SPT. Le développement de la microscopie de localisation photo-activée (PALM : *photo-activated localization microscopy*) (Betzig et al., 2006; Hess et al., 2006) et son utilisation au cours du temps avec le sptPALM (Manley et al., 2008) ont été des avancées majeures dans l'étude du rôle de la diffusion latérale des protéines synaptiques (Chamma et al., 2016; Hosity et al., 2014). Les fluorophores photo-convertibles (mEOS, Dendra, Dronpa...) subissent un décalage de leur spectre d'excitation et d'émission lors d'une exposition aux UV ou à la lumière bleue (Figure 35.A). Il est donc possible, en appliquant une faible quantité d'UV, de stochastiquement activer quelques molécules. L'imagerie en direct permet ainsi de suivre ces molécules activées au fil du temps. L'amélioration de la résolution de ces techniques est principalement liée à l'analyse. Un ajustement gaussien du signal émis par une molécule (Kechkar et al., 2013; C. S. Smith et al., 2010) permet de la localiser précisément et ainsi réduit la distance minimale pour distinguer deux molécules proches, ce qui permet d'imager une densité de molécules activées plus importantes (Sibarita, 2014) (Figure 35.B). Une fois la localisation des molécules effectuée, il est possible de les suivre au fil du temps pour obtenir les trajectoires. Pour déterminer les connexions temporelles, de nombreux modèles mathématiques (Kalaidzidis, 2009) et logiciels d'analyse ont été développés (Chenouard et al., 2014).

INTRODUCTION

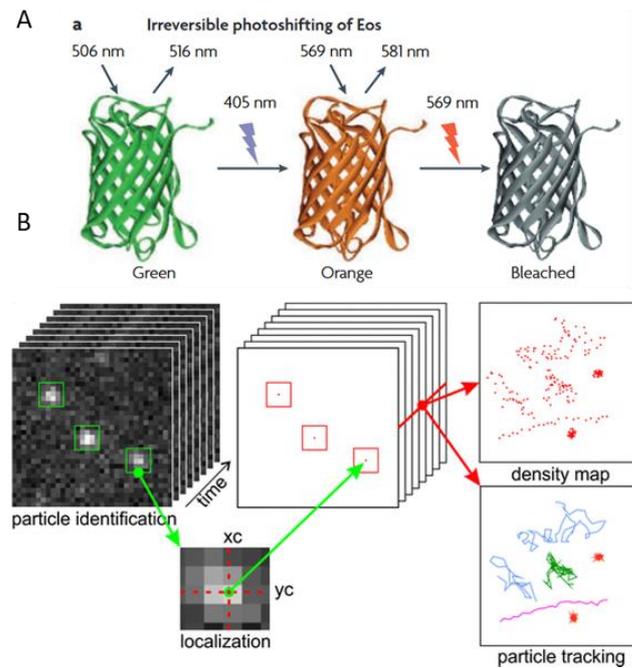


Figure 35. Suivre de particule unique par photo-activation

(A) Schéma de la photo-conversion de la protéine Eos. (B) Pipeline d'analyse permettant de localiser les particules uniques en extrayant leurs coordonnées, puis de les connecter au cours du temps pour obtenir des trajectoires
Source : Sibarita., 2014 ; Harvard et al., 2018 et Fernández-Suárez & Ting, 2008

3.2 Rôle des protéines d'adhésion synaptique : Modèle d'hémi-synapse

Le concept d'hémi-synapse a été introduit pour décrire des expériences d'interaction entre un neurone primaire et un environnement artificiel. L'objectif de ces expériences est d'étudier la capacité d'une molécule d'adhésion synaptique donnée à initier la formation d'une synapse et à induire une différenciation en compartiment pré- ou post-synaptique. L'un des avantages de ces modèles d'hémi-synapse, également connus sous le nom de synapse induite, réside dans le contrôle de la composition d'un des deux compartiments de la synapse. Cela représente un avantage par rapport aux techniques de perte ou de gain de fonction, qui ont été longtemps utilisées pour déterminer le rôle des protéines dans la formation des synapses, mais qui sont limitées en raison de la redondance d'activité des différentes protéines et leurs isoformes, pouvant entraîner des phénomènes de compensation. Ces modèles sont compatibles avec les techniques de microscopie du vivant, ce qui permet de mesurer une interaction induite par une protéine spécifique du compartiment pré ou post-synaptique. Ils constituent des modèles intermédiaires entre des mesures complètement *in vitro* avec des protéines purifiées et des mesures totalement *in cellulo*, où la compréhension des paramètres mesurés est difficile en raison de la présence de complexes macro-protéiques à la synapse et de la redondance des fonctions protéiques. Il existe plusieurs approches permettant de créer un compartiment artificiel synaptique (Figure 36) que nous détaillerons dans cette section.

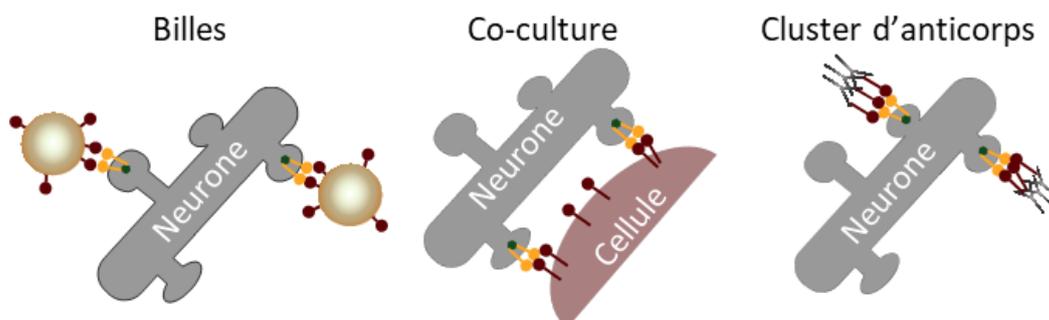


Figure 36. Modèle d'hémi-synapse

Schématisation de différents modèles d'hémi-synapse, représentant l'interaction entre un neurone et un compartiment artificiel.

3.2.1 Interaction Bille-Neurone

Les premières expérimentations basées sur l'utilisation de billes ont permis de démontrer que des molécules polyacides sont suffisantes pour induire la formation de présynapse lorsqu'elles sont mises en contact avec des neurones en utilisant des billes couvertes de polylysine (Burry, 1980, 1982; Burry & Hayes, 1986). En recouvrant ces billes de latex ou de silicate avec une protéine d'adhésion synaptique recombinante, il est possible d'étudier son rôle dans la synaptogenèse. Différentes solutions sont possibles pour fixer la protéine d'intérêt sur la bille sans la dénaturer, comme l'enrobage via des liposomes pour former une bicouche lipidique avec la protéine ancrée dans la membrane, grâce à sa fusion avec un glycolipide (Baksh et al., 2005) ou simplement avec l'utilisation d'un anticorps reconnaissant le fragment cristallisable (Fc), fragment qui est couplé à la protéine d'intérêt (Heine et al., 2008). Les billes fonctionnalisées sont ensuite déposées sur des neurones en culture, permettant d'induire la formation au temps de développement souhaité. Cependant, il est difficile d'observer l'évolution de la synapse au fil du temps sur un même échantillon, car les billes peuvent être phagocytées par les cellules gliales (Burry et al., 1985). L'utilisation de billes recouvertes de Neurexine ou de Neuroligine a permis de démontrer les rôles respectifs de ces molécules dans l'induction pré (Dean et al., 2003) ou post-synaptique (Graf et al., 2004), en recrutant des marqueurs spécifiques (Figure 37.B). Ce modèle a déjà été utilisé en combinaison avec la technique de FRAP afin d'étudier la dynamique de la Ncadhérine (Thoumine et al., 2006).

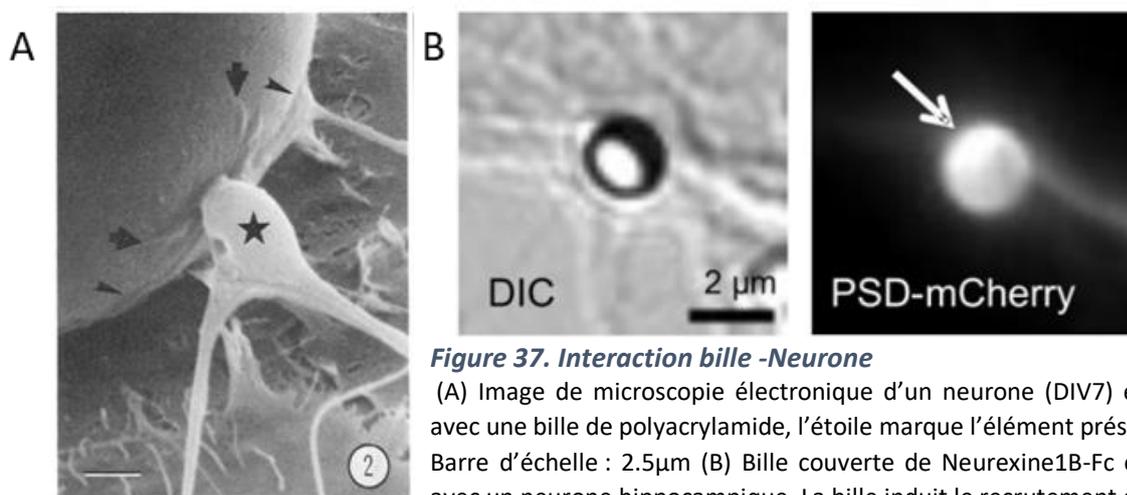


Figure 37. Interaction bille -Neurone

(A) Image de microscopie électronique d'un neurone (DIV7) en contact avec une bille de polyacrylamide, l'étoile marque l'élément présynaptique. Barre d'échelle : 2.5µm (B) Bille couverte de Neurexine1B-Fc en contact avec un neurone hippocampique. La bille induit le recrutement de PSD-95-mCherry. **Source** : Burry, 1982 ; Heine et al., 2008

INTRODUCTION

3.2.2 Coculture

Dans le modèle de coculture, des lignées cellulaires hétérologues sont transfectées pour surexprimer la protéine d'adhésion synaptique d'intérêt. Par la suite, des neurones primaires sont déposés sur ces cellules afin de déterminer si la protéine d'intérêt peut induire la formation de zones synaptiques au niveau de la zone de contact entre une cellule et un neurone (Scheiffele et al., 2000). L'avantage de cette technique réside dans la possibilité de travailler avec des protéines entourées d'un environnement membranaire dans les deux compartiments de la synapse. Cependant, il est important de noter que la présence de protéines d'adhésion nativement présentes dans ces lignées cellulaires telles que la cadhérine, peut favoriser la formation de pré et post synapse (M. Yamagata et al., 2018), ce qui peut conduire à des résultats faussement positifs. Cette technique relativement simple à mettre en œuvre, est devenue la méthode de référence pour l'étude du rôle des protéines dans la formation synaptique. Elle est largement utilisée pour étudier le rôle des protéines du complexe Neurexine/Neurologine (Chubykin et al., 2005; Nam & Chen, 2005), mais également d'autres protéines telles que SynCAM (Biederer et al., 2002) ou LRRTM (Roppongi et al., 2020).

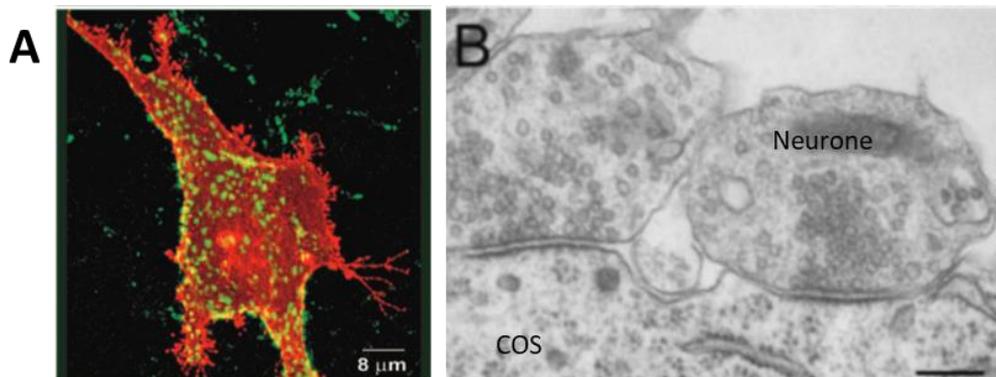


Figure 38. Coculture

(A) Cellule COS transfectées avec Neurologine1 (Rouge) en coculture avec des neurones. Marquage des terminaisons présynaptique avec la synaptophysin (vert) (B) Image de microscopie électronique d'une terminaison présynaptique entre un neurone et une cellule COS, avec le recrutement caractéristique de vésicules. Barre d'échelle : 200 nm. **Source** : Chubykin et al., 2005

3.2.3 Cluster d'anticorps

Des hypothèses sur le fonctionnement de Neurologine dans l'induction de la différenciation en présynapse ont conduit au développement d'un nouveau modèle permettant d'induire des héli-synapses. L'hypothèse avancée était que Neurologine recrute Neurexine par formation des clusters (Dean et al., 2003). Pour valider cette hypothèse, la formation de cluster de Neurexine1 β couplée avec une étiquette VSV (*vesicular stomatitis virus*), a été induite en utilisant des multimères d'anticorps anti-SVS par un anticorps secondaire, avant d'être déposée sur des neurones primaires. Cette formation de clusters de la Neurexine a induit des effets similaires à ceux observés avec les billes de Neurologine, en induisant le recrutement de marqueurs vésiculaires caractéristiques de la présynapse (Dean et al., 2003). Cette technique de cluster a été ensuite utilisée avec des protéines purifiées, telles que la Neurexine couplée à une étiquette permettant sa reconnaissance par un anticorps primaire puis secondaire, favorisant son agrégation et la formation de postsynapse (Giannone et al., 2013). La

réticulation des protéines transmembranaire par le biais de la formation de cluster a également permis de mettre en évidence l'impact des interactions sur la diffusion des molécules en combinant ce modèle avec le suivi de particules uniques (Mondin et al., 2011) (Figure 39). Cependant, à l'instar des billes, les agrégats formés sont susceptibles d'être phagocytés, ce qui limite la possibilité d'un suivi sur de longues périodes.

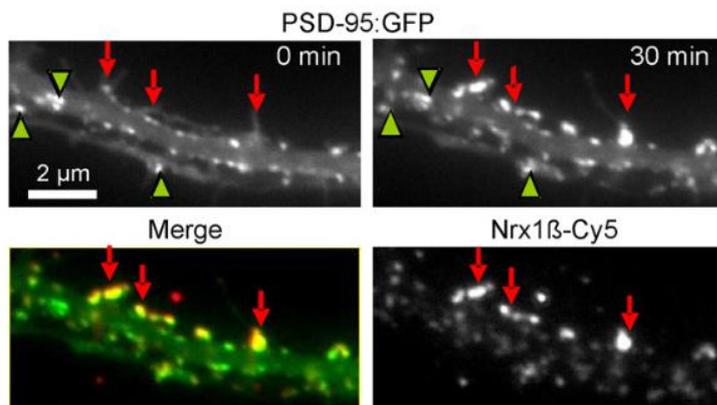


Figure 39. Cluster d'anticorps

Neurone hippocampique de rat exprimant la Neuroligine1 et PSD-95-GFP en contact avec un mélange réticulé de Neurexine1-Fc et d'anticorps. Les flèches vertes indiquent les synapses PSD-95 positives naturellement présentes, et les flèches rouge les accumulations de PSD-95 dues aux clusters de Neurexine1-Fc.

Source : Mondin et al. 2011

3.3 Micropatterning subcellulaire : interactions protéiques et héli-synapse

Ces dernières années, l'utilisation du *micropatterning* subcellulaire a connu une augmentation significative. Cette technique consiste en l'impression de motifs de quelques micromètres de taille inférieure à celles des cellules, permettant principalement l'étude des mécanismes moléculaires, en particulier les interactions protéine-protéine. L'objectif de ces nouveaux modèles est de contrôler l'un des compartiments de l'interaction en imprimant des protéines purifiées pour étudier leur rôle, tout en préservant les propriétés membranaires du second compartiment. Deux approches sont envisageables pour le compartiment cellulaire :

- L'utilisation de cellules hétérologues qui surexpriment la protéine d'intérêt, offrant un contrôle total sur les deux compartiments.
- L'utilisation de la cellule d'intérêt, telle que le neurone, pour travailler avec les protéines endogènes et l'environnement physiologique, afin d'étudier le réseau de partenaires induit par l'interaction.

L'impression de biomolécules présente des avantages dans l'étude des interactions protéine-protéine par rapport aux modèles précédemment utilisés, tels que les billes ou les cocultures. Tout d'abord, cette technique permet une imagerie facile des zones d'interaction, qui sont directement orientées dans le plan focal. De plus, grâce à la localisation de l'interaction près de la lamelle de verre, il est possible d'utiliser l'imagerie TIRF pour accéder uniquement à la membrane où l'interaction a lieu, ce qui améliore la sensibilité. Enfin, les zones d'interaction potentielles sont géométriquement et spatialement définies, et elles sont fluorescentes, ce qui permet une comparaison aisée entre les zones d'interaction et les zones de non-interaction au sein d'une même cellule. Cela facilite la caractérisation des interactions faibles.

INTRODUCTION

L'impression protéique subcellulaire a été largement utilisée pour étudier initialement les interactions protéiques qui régissent la formation des synapses immunologiques, puis pour l'étude des voies de signalisation. L'interaction des protéines induit le recrutement de la protéine membranaire sur les zones de motif, ce qui est observable par un niveau de fluorescence de la protéine membranaire plus élevé à l'intérieur qu'à l'extérieur des zones d'impression protéiques (Figure 40.A). En associant ces modèles cellulaires avec des modalités d'imagerie, comme que le FRAP, il est possible d'étudier quantitativement ces interactions (Figure 40). Par exemple, cela a été utilisé pour caractériser l'interaction entre un récepteur membranaire des lymphocytes T, recruté via un anticorps micro-imprimé, et une protéine intracellulaire, afin de comprendre la cinétique lors de l'activation des cellules immunitaires (Motsch et al., 2019). Il est également possible de combiner plusieurs modalités telles que le FRAP (Figure 40. B) et le suivi de molécules uniques pour étudier la dynamique des interactions, comme les complexes de signalisation formés par l'interféron de type I (Löchte et al., 2014) ou la reconnaissance immunologique du récepteur CD4 (Schwarzenbacher et al., 2008).

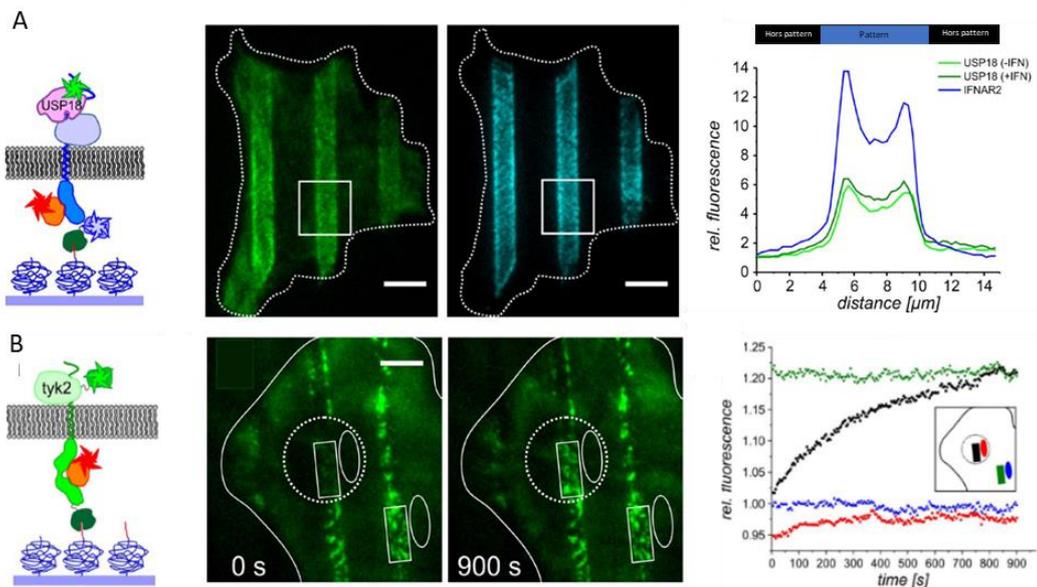


Figure 40. Impression subcellulaire : Etude des interactions protéine-protéine

(A) Cellule HeLa transfectée avec IFNAR2-HaloTag (Bleu) sur un motif d'HaloTag Ligand et EGFP-USP18 (Vert) un interacteur du récepteur. Graphique du niveau de fluorescence relative de ces deux composants montrant une accumulation au niveau des zones de motif. (B) Schéma explicatif du recrutement de tyk2 (vert) via le récepteur IFNAR1-HaloTag sur des impressions de HaloTag ligand. Image du recrutement de tyk2 et des zones de photoblanchiment (zones en pointillées). Graphique du retour de fluorescence pour les différentes zones. Barre d'échelle : 10 μ m. **Source** : Löchte et al., 2014

Pour le moment, il existe seulement quelques applications du *micropatterning* subcellulaire en neurosciences, et la majorité des publications proviennent de l'équipe d'Olivier Thoumine de l'institut interdisciplinaire de Neurosciences. Les premières applications visent à créer des héli-synapses afin de démontrer la possibilité d'induire des différenciations pré ou post-synaptiques (Figure 41) grâce à l'impression de protéines d'adhésion synaptiques telles que SynCAM, Neurexine (Czöndör et al., 2013) ou Neuroligine (Li Wei et al., 2013). Il est également possible de coupler ces techniques avec des méthodes de suivi des molécules pour observer

la diffusion de molécules synaptiques telles que les récepteurs AMPA, par exemple, ainsi que des techniques d'imagerie calcique pour valider l'activité des héli-synapses formées.

Le *micropatterning* subcellulaire a également été utilisé pour étudier les mouvements de l'actine au niveau du cône de croissance, en utilisant des impressions de Ncadherine (Garcia et al., 2015), grâce à des techniques telles que le SPT et le FRAP. Cela montre la compatibilité de l'impression protéique avec ces techniques d'imagerie du vivant. La Ncadherine est souvent utilisée comme contrôle dans les articles de formation d'héli-synapse par impression protéique, car elle n'induit pas de spécialisation synaptique, mais participe à la formation des adhésions focales. L'impression de protéines représente un modèle polyvalent pour étudier les interactions dans un environnement biomimétique contrôlé, facilitant ainsi l'analyse et la compréhension des données de microscopie du vivant en contrôlant l'un des compartiments. En résumé, par rapport aux modèles d'héli-synapse classiques, l'impression protéique offre plus d'opportunité en termes de :

- Impression quantitative avec la possibilité de varier les quantités de protéines imprimées
- Standardisation des zones de contact (taille, emplacement...)
- Analyse haut débit (orientation dans l'axe optique, localisation via les motifs...)
- Suivi dans le temps des synapses car le compartiment artificiel n'est pas phagocyté.

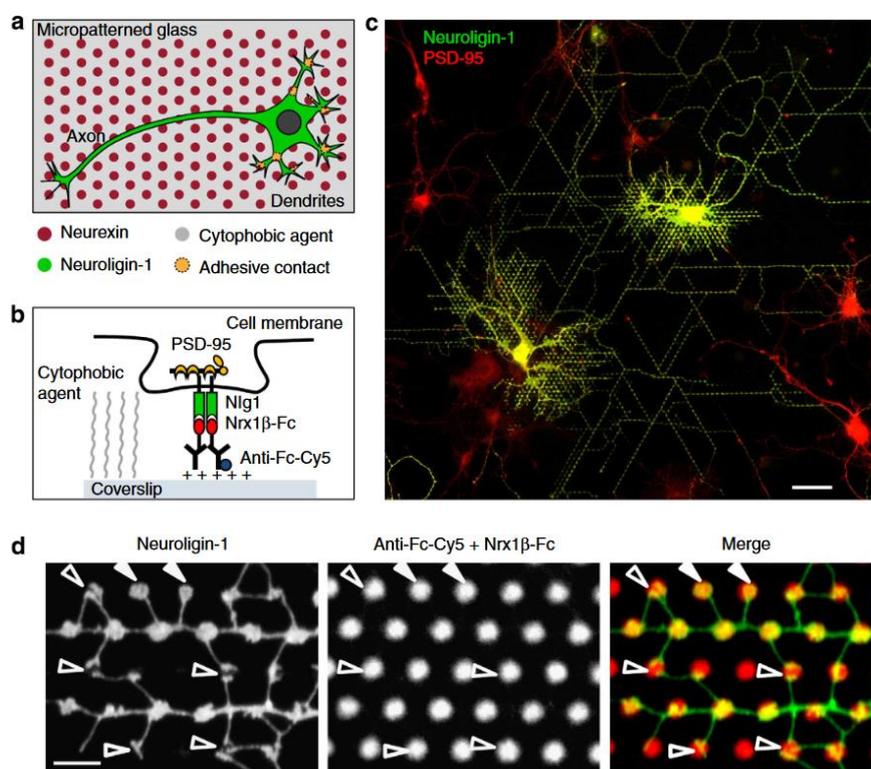


Figure 41. Modèle d'héli-synapse par impression protéique

(A) Schématisation d'une vue de dessus de l'adhésion des neurones et de la formation des synapses sur les motifs de Neurexine imprimés. (B) Vue zoomée sur le complexe formé lors de l'interaction et la formation de l'héli-synapse sur les patterns de Neurexine1β-Fc avec le recrutement de Neurologine1 et PSD-95. (C) Image de microscopie d'une mosaïque d'images de neurones formant des héli-synapses (jaune) sur le pattern. (D) Zoom sur le recrutement spécifique de Neurologine sur les patterns de Neurexine.

Source : Czöndör et al., 2013

OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif principal de cette thèse est de démontrer l'utilité de l'impression protéique dans l'étude de la connectivité synaptique, plus précisément les interactions protéine-protéine régissant la formation de synapses. Nous mettrons en avant les avantages de la technologie PRIMO, notamment l'impression quantitative et l'impression multiprotéique, tout en cherchant des solutions pour améliorer le rendement d'impression. Actuellement, parmi les nombreuses techniques d'analyse *in vitro* des interactions protéiques, peu permettent de caractériser ces interactions dans un environnement membranaire pertinent. À l'opposé, les techniques de microscopie *in cellulo* permettent d'extraire des informations cinétiques dans un environnement synaptique, mais leur complexité rend l'interprétation des résultats difficile. Il existe donc un besoin de modèles intermédiaires entre ces deux extrêmes. Des études récentes ont suggéré que l'impression protéique à une échelle subcellulaire pourrait être une solution pour créer de tels modèles. De plus, il existe un intérêt croissant pour l'impression protéique dans les modèles d'hémi-synapse, largement utilisés en neurosciences pour étudier les protéines d'adhésion synaptique.

La première partie de cette thèse sera dédiée au développement d'un modèle « biomimétique » permettant de disséquer les interactions protéine-protéine dans un environnement membranaire, en combinant des techniques de FRAP et de SPT. Pour cela, le couple de protéines d'adhésion synaptique le plus étudié, Neurexine/Neurologine, sera utilisé. Ce choix s'explique par la collaboration avec l'équipe d'Olivier Thoumine, dont ce complexe protéique est au centre des travaux. De plus, de nombreuses données dans la littérature sur la cinétique d'interaction de ce complexe, à la fois *in vitro* et *in cellulo* au niveau synaptique, seront utilisées comme points de comparaison. Ce couple sera également comparé à l'interaction homophile SynCAM1, moins caractérisée. L'idée de ce modèle est d'imprimer une protéine d'adhésion synaptique pour induire une interaction et le recrutement de son partenaire surexprimé dans des cellules hétérologues. L'utilisation de ces lignées cellulaires permettra d'obtenir une interaction individuelle et contrôlée. Une complexification du modèle peut être ensuite envisagée en exprimant d'autres protéines, telles que des protéines d'échafaudage. Les objectifs pour ce projet sont de réussir à obtenir des interactions et ainsi conserver la fonctionnalité de la protéine d'intérêt. Une fois la validation de la spécificité des interactions réalisée, ces interactions seront caractérisées en utilisant le sptPALM et le FRAP.

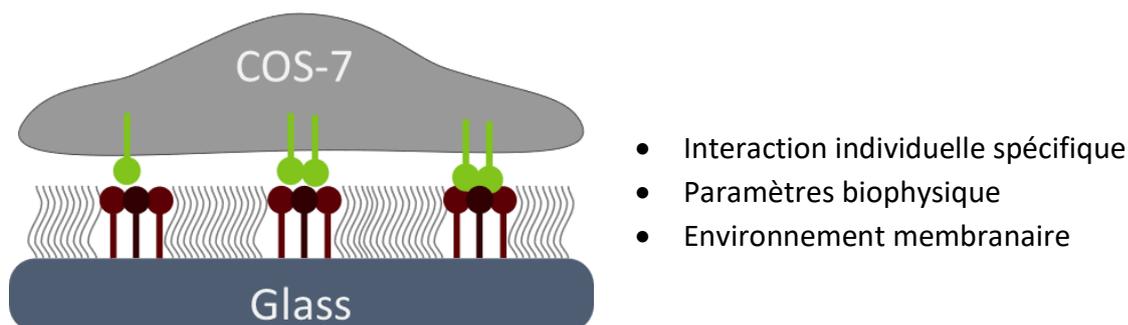


Figure 42. Modèle schématisé d'interaction protéine-protéine par micropatterning

Ces techniques permettront d'extraire la diffusion des protéines dans une zone d'interaction ou non au sein d'une même cellule, ainsi que les paramètres cinétiques de ces interactions. Ce modèle offre des perspectives de développement, notamment en ce qui concerne des modalités de compétition, nécessitant l'impression contrôlée et spécifique de plusieurs protéines, ainsi que des capacités de criblage pour caractériser de nombreuses interactions entre différentes protéines d'adhésion synaptique.

La seconde partie de la thèse est consacrée au développement d'hémi-synapses par l'impression protéique. Comparativement au modèle précédent, l'objectif est de travailler avec des neurones primaires pour étudier les protéines natives. L'un des principaux objectifs est de valider la formation d'hémi-synapses en observant le recrutement de marqueurs et de structures caractéristiques de la pré ou de la postsynapse. L'imagerie de fluorescence et la microscopie électronique seront utilisées. Cependant, il est nécessaire de développer un protocole de culture de neurones sur nos substrats imprimés, car cela constitue actuellement un obstacle majeur pour ce projet et pour les utilisateurs du système d'Alvéole. Une fois ces objectifs atteints, ce modèle nous permettra d'obtenir un grand nombre d'hémi-synapses, nous permettant ainsi de créer une représentation d'une synapse moyenne induite par une seule protéine d'adhésion synaptique. Nous pourrions ainsi étudier l'impact de cette protéine sur la morphologie, l'organisation et l'interactome à différents stades du développement de la synapse. Un suivi en *timelapse* au cours du développement serait une première avec les modèles d'hémi-synapses, qui ne sont pas compatibles avec un suivi sur le long terme. Ces études pourront être réalisées grâce à différentes techniques d'imagerie, y compris la microscopie de super-résolution. À plus long terme, l'utilisation de cellules souches permettrait de démontrer la possibilité d'étudier les défauts de formation de synapses chez des cellules issues de patients atteints de maladies neurodéveloppementales.

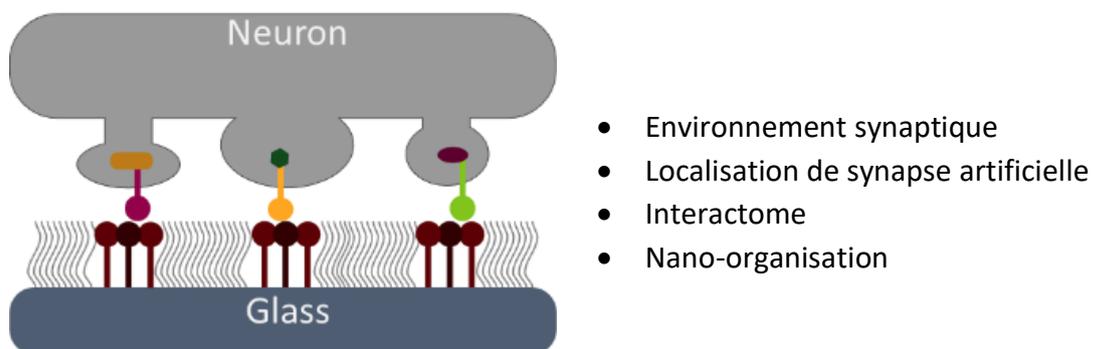


Figure 43. Modèle schématisé d'hémi-synapse par micropatterning

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

Depuis quelques années, l'utilisation de l'impression protéique ne se limite plus à l'imitation de la géométrie cellulaire. Les protéines imprimées ne sont plus seulement utilisées pour favoriser l'adhésion des cellules, mais aussi pour étudier le rôle de ces protéines dans des phénomènes biologiques, ce que l'on appelle le *micropatterning* subcellulaire. Ces applications se sont largement répandues en immunologie et pour l'étude des voies de signalisation, mais elles restent encore peu développées en neurosciences.

Les protéines d'adhésion synaptiques créent des interactions qui établissent un lien physique entre les compartiments synaptiques, mais elles ont également un rôle important dans la maturation et la morphologie des synapses. Cependant, l'étude de ces protéines est complexe, en particulier lorsqu'il s'agit d'examiner les paramètres cinétiques qui régissent ces interactions. Il y a un manque de solutions intermédiaires entre les mesures purement *in vivo* dans un environnement dense et complexe et les mesures *in vitro*, trop éloignées de la réalité physiologique.

La création d'interactions protéiques n'est pas une tâche aisée, car les protéines sont sensibles à leur environnement et peuvent perdre leur fonctionnalité. De plus, chaque technique d'impression protéique présente ses propres spécificités, ce qui rend difficile le transfert d'un protocole d'une technique à une autre. Lorsque nous avons commencé à travailler sur ce projet avant ma thèse, nous ne parvenions qu'à créer des interactions entre un anticorps anti-GFP et une protéine transmembranaire couplée à une GFP extracellulaire. Il était impossible de transposer avec notre technique les protocoles utilisant des protéines synaptiques réalisées en photolithographie par masque (Czöndör et al., 2013; Garcia et al., 2015). De nombreuses optimisations ont dû être réalisées pour ancrer la protéine d'intérêt et ainsi observer une interaction protéique. Cela démontre que les différentes techniques d'impression protéique ont des propriétés distinctes et que l'adsorption est un phénomène complexe.

Le développement de ce protocole, nous a permis de disséquer les mécanismes d'interaction de différents couples de protéines d'adhésion synaptique et de démontrer que ce modèle intermédiaire ouvre de nombreuses perspectives concernant la compréhension des interactions protéine-protéine. Ces résultats sont synthétisés sous la forme d'un article, qui sera prochainement soumis à une revue scientifique.

I Résultats

1.1 Dissection des interactions protéiques

Dissecting the binding mechanisms of synaptic membrane adhesion complexes by micropatterning and live-cell imaging

Nathalie Piette^{1,2}, Matthieu Lagardère¹, Camille Saphy¹, Carsten Reissner³, Matthieu Munier¹, Pierre-Olivier Strale^{1,2}, Ingrid Chamma¹, Markus Missler³, Matthieu Sainlos¹, Olivier Thoumine^{1*}, Vincent Studer^{1*}

* equally contributing senior and corresponding authors

Correspondence: vincent.studer@u-bordeaux.fr and olivier.thoumine@u-bordeaux.fr

¹ Univ. Bordeaux, CNRS, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, IINS, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France; ² Alveole, 30 rue de Campio Formio, 75013 Paris, France; ³ Institute of Anatomy and Molecular Neurobiology, University of Munster, Germany.

The formation of adhesive cell-cell contacts is based on the intrinsic binding properties between specific transmembrane ligand-receptor pairs. In neurons, synaptic adhesion molecules provide a physical linkage between pre- and post-synaptic compartments, but the dynamics of these complexes in their actual membrane environments remain essentially unknown. To access such information, we developed a versatile assay to measure the affinity and kinetics of synaptic ligand-receptor interactions, based on the immobilization of Fc-tagged ligands on micropatterned substrates combined with live-cell imaging of fluorescently-tagged counter receptors in heterologous cells. We applied this strategy to study the heterophilic complex formed between neurexin-1 β (Nrx1 β) and neuroligin-1 (Nlg1), compared to the homophilic SynCAM1 complex. First, the control of ligand density combined to the measurement of steady-state receptor enrichment at micropatterns demonstrates the high specificity of the matching molecular interactions. Second, long-term FRAP experiments performed on the two molecular complexes and fitted with analytical models, demonstrate a diffusion-limited regime for SynCAM1 and a reaction-limited regime for Nlg1. Third, the statistical analysis of the short-term sptPALM trajectories of single receptors on their respective ligands allows us to classify diffusive and bound states, and reveals fast binding kinetics for SynCAM1. This analysis provides a very long bond lifetime of the Nrx1 β -Nlg1 complex, which by comparison with a monomeric mutant of Nlg1, can be attributed to the constitutive dimerization of Nlg1. Fourth, we used the stable Nrx1 β -Nlg1 complex as a pseudo-synaptic platform to analyze the rapid binding kinetics between the scaffolding protein PSD-95 and the intracellular domain of Nlg1, dissecting the contribution of the different PDZ domains through the use of specific PSD-95 point mutants.

Micropatterning | synaptic adhesion molecule | Diffusion | Binding

Adhesion is a fundamental process in cell biology, that regulates many processes including cell shape, migration, and differentiation, and is mediated at the molecular level by a wide range of membrane-associated ligand-receptor pairs. In neurons, specific families of adhesion molecules mediate developmental processes such as guidance and synaptogenesis. The most well-known synaptogenic proteins are pre-synaptic neurexins (Nrxs) and their post-synaptic binding partners neuroligins (Nlgs), as well SynCAMs which can form both homophilic and heterophilic trans-synaptic interactions¹⁻⁴. Those

synaptogenic protein families contain multiple isoforms and splice variants, potentially generating thousands of combinations of binding partners¹. Moreover, genetic mutations in some of these molecules have been associated with autism spectrum disorders in humans, highlighting their importance in brain function⁵.

Despite advances in the identification of synaptic organizers, much remains to be learned about the multiple parallel or competing protein interactions that govern synapse assembly⁶⁻⁸. In particular, a quantitative comparison of the affinity and kinetics of the various synaptogenic complexes may provide a better understanding of their specific biological role. While performing these measurements in living brain tissue is currently out of reach, several synaptic adhesion complexes have already been isolated *in vitro* and characterized by a range of biophysical methods⁹⁻¹⁴. Although very informative, these techniques based on purified protein domains lack a critical membrane environment, and can lead to variable results, e.g. regarding the interaction rates of the Nrx1 β -Nlg1 complex^{10,14,15}. In fact, the presence of the lipid bilayer which embeds those proteins in living cells can have profound impact on molecular diffusion and interactions, which crucially influences the clustering of receptors¹⁶⁻¹⁸. Moreover, the reduced dimensionality imposed by the 2D membrane, the specific topography/curvature of the membrane, and the potential hindered receptor diffusion in contact zones, may overall introduce specific constraints to the ligand-receptor interaction rates that are not present in simplified freely moving 3D systems^{19,20}.

Thus, there is a pressing need to engineer reductionist systems allowing for the quantification of interactions between specific ligand-receptor pairs in a proper membrane environment. Several cell culture methods allowing one to mimic synaptic ligand-receptor interactions have been developed in the past years, including co-culture and microsphere binding assays²¹⁻²⁷. However, these methods lack a control of the parameters governing these interactions (ligand density, geometry of the contact, receptor

Author contributions: N.P. optimized the protocol for the micropatterning, produced the micropatterned substrates, carried out all SPT and FRAP experiments, data analysis, made the figures and wrote the manuscript. M.L. participated to initial SPT and FRAP experiments, provided the mathematical framework for FRAP data fitting, and generated the FluoSim program for computer simulations of sptPALM trajectories. C.C. carried out the SIMPull experiments. C.R. and M.M. provided purified Nlg1-Fc and Nlg1-HaloTag proteins. P.O.S. did the proof of concept for the micropatterning assay. I.C. helped with live cell imaging. M.S. provided PSD-95 plasmids and helped with dye conjugation. O.T. and V.S. came up with the original idea, supervised the work, and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

concentration) and thus prevent the proper quantitative analysis of specific adhesions. To circumvent these limitations, the micropatterning of proteins has recently been introduced to perform binding assays on living cells. In such assays, micron size patterns of ligands are printed on a glass cell culture substrate and fluorescently labelled counter-receptors are expressed in living cells²⁸⁻³¹.

Such approaches have already led for example to the characterization of the dynamics and signalling properties of adhesion complexes in immune cells³² and neurons²⁹.

Inspired by these earlier studies, we report here a biomimetic system in which recombinant Fc-tagged synaptogenic neuronal ligands are anchored to micropatterned substrates and presented to heterologous COS-7 cells expressing FP-tagged counter receptors, providing highly selective molecular recognition. Combining this system with single particle tracking (sptPALM) and Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) together with associated mathematical analysis in single cells, we are able to monitor the diffusion of individual receptors and characterize the kinetics of the different ligand-receptor complexes. By introducing well-chosen mutations in the receptor sequence, we also investigated the role of specific protein binding motifs in the adhesive interactions. We show that the Nlg1-Nrx1 β complex exhibits much slower binding kinetics than the SynCAM1 homophilic complex, most likely due to the dimerization of Nlg1. This property was further used to form a stable platform to dissect the intracellular binding kinetics of PSD-95 to Nlg1.

Results

Generating ligand-coated micropatterned substrates

To generate spatially controlled micropatterns onto which ligands can be coated, we exploited a technique called Light Induced Molecular Adsorption of Proteins, or LIMAP³³. This method uses UV light focused through a microscope objective, to locally ablate polyethylene glycol (PEG) covalently bound to glass coverslips. Based on a predefined greyscale image imposed to a Digital Micromirror Device (DMD), we can create patterns of arbitrary geometry with micrometer resolution. By varying the UV dose, we can also directly control the grafted protein density. In practice, we patterned 5- μ m wide stripes separated by 5- μ m wide bands coated with PEG (Fig. S1A). To ensure binding specificity and proper orientation of purified Fc-tagged synaptic adhesion proteins, i.e. Nrx1 β -Fc and SynCAM1-Fc (Fig. S1C), we used a robust chain of molecular interactions relying on the biotin-streptavidin pair (BSA-biotin, fluorophore-conjugated streptavidin, biotinylated anti-Fc antibody, and Fc-tagged ligand, sequentially) (Fig. 1A). This amplification system is commonly designed to provide high ligand density and better protein orientation^{30,34}. In this configuration, we measured the fluorescence intensity of streptavidin-A647 (SA-A647) and Fc-cy3 bound to the micropatterns at varying UV laser power (0-1000 mJ/mm²), and found that Fc-cy3 reached saturation at a power of 600 mJ/mm², a value which was kept thereafter (Fig. S1B-C). This corresponds to a density of ~4500 molecules per μ m².

Specific accumulation of cell-expressed receptors on ligand-coated micropatterns

We then used those micropatterned substrates to plate COS-7 cells electroporated with the putative counter-receptors bearing fluorescent protein (FP) tags, i.e. Nlg1-GFP and SynCAM1-GFP. To challenge the specificity of our model, we also performed the same assay with unpaired ligands and receptors. After several hours in culture, cells were observed by Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy (Fig.1B), allowing us to monitor membrane receptors present in a thin optical section at the cell-substrate interface (< 100 nm) (Fig. 1A). We quantified the receptor enrichment level (E), i.e. the fluorescence intensity on the ligand-coated stripes vs PEG lines. The enrichment level was high for cells expressing Nlg1-GFP plated on Nrx1 β -Fc (E = 2.3 \pm 0.15) and cells expressing SynCAM1-GFP plated on SynCAM1-Fc (E = 2.4 \pm 0.11) (Fig. 1B,C). In contrast, no enrichment (E \leq 1) was observed when cells were not expressing the appropriate counter receptor to the respective Fc-tagged ligand (e.g. Nlg1-GFP expressing cells on SynCAM1-Fc coated patterns, or SynCAM1-GFP on Nrx1 β -Fc coated patterns), together revealing specific ligand-receptor recognition. In the absence of appropriate ligand-receptor pairing, cells still spread on the substrate most likely through non-specific adhesion to the pattern area and/or to the PEG, e.g. through the adsorption of serum proteins, allowing us to perform control measurements. Based on these results, we can experimentally correlate a high enrichment (E > 2) with a specific ligand-receptor binding interaction. Importantly, by taking advantage of the subcellular scale of the micropatterns, we can get rid of cell-to-cell variations by comparing the concentration and the mobility of receptors between non-patterned and patterned areas of different densities within the membrane of the same cell.

Measuring affinities of ligand-receptor interactions in a cellular environment

We first exploited the steady-state values of receptor accumulation at ligand-coated micropatterns to estimate the 2D thermodynamic binding equilibrium between synaptic ligands and receptors. In a real biological system, knowing the free receptor and ligand concentrations is not straightforward. Here, the micropatterning system allowed us on one hand to control the ligand density [L_{total}] in mol/ μ m², and on the other hand to measure the corresponding accumulation of GFP-tagged receptors forming surface bound ligand-receptor complexes. Furthermore, by comparing GFP intensity values on and inside the micropatterns, we have access to the surface membrane concentration of free receptors [R] out of patterns and bound receptors on the pattern [RL] in the same cell.

For a simple one-to-one ligand-receptor interaction, at thermodynamic equilibrium the rates of association and dissociation of the molecular complex compensate each other:

$$k_{on} \times [R] \times [L] = k_{off} \times [RL] \quad [1]$$

Where k_{on} is the association rate of the complex in mol/ μ m²/s, k_{off} the dissociation rate of the complex in s⁻¹. [L] is the concentration in available surface bound ligand. We assume that we are in the linear fluorescence regime where the

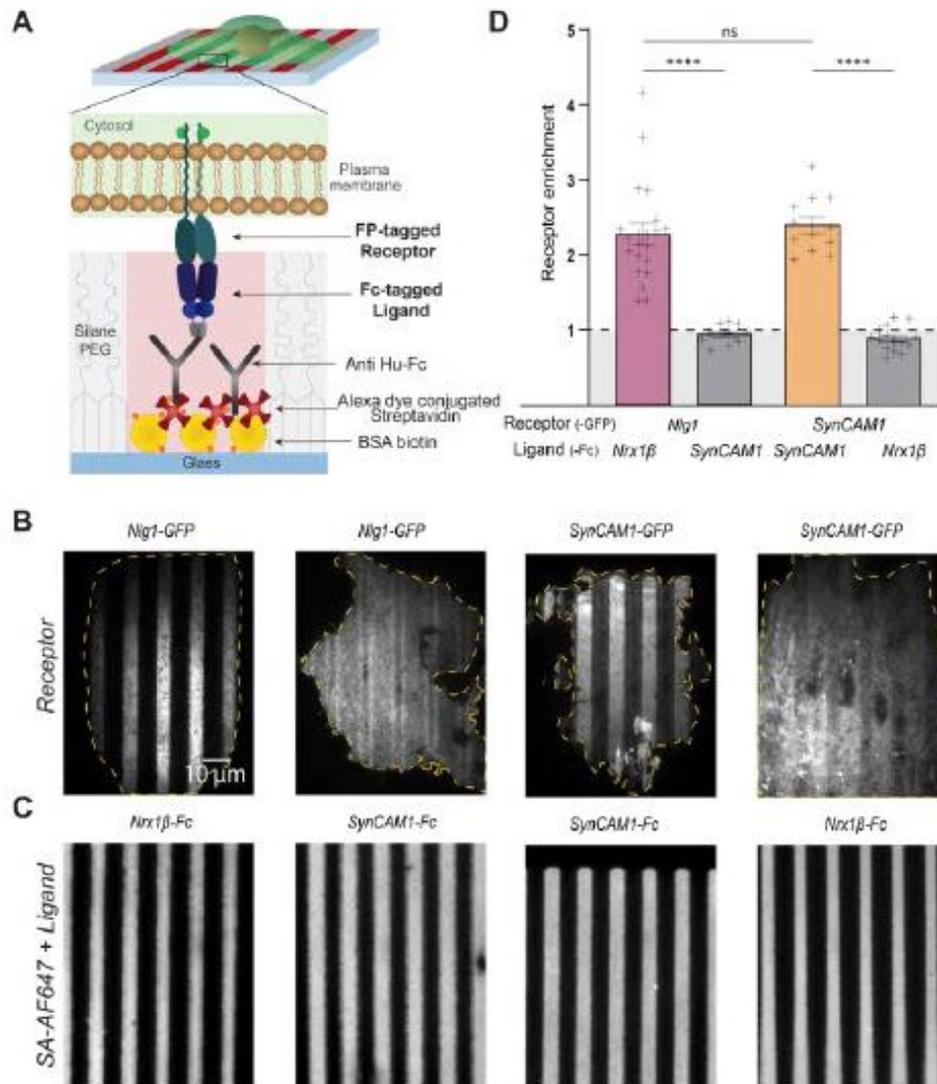


Figure 1. Micro-patterning assay to probe synaptic ligand-receptor interactions (A) Schematic view of the assay, with a focus on the molecular interactions at the interface between the cell membrane and the micropatterned substrate. (B) Representative TIRF images of COS-7 cells expressing either Nlg1-GFP or SynCAM1-GFP and plated on micro-patterned lines coated with Nrx1β-Fc or SynCAM1-Fc. (C) Corresponding images of the streptavidin-A647 signal. (D) Enrichment factor of Nlg1-GFP or SynCAM1-GFP on Nrx1β-Fc or SynCAM1-Fc coated lines, respectively. Statistics are given as (number of cells/experiments): Nlg1-GFP on Nrx1β-Fc (21/3); Nlg1-GFP on SynCAM1-Fc (11/2); SynCAM1-GFP on SynCAM1-Fc (12/2); SynCAM1-GFP on Nrx1β-Fc (15/2). **** P < 0.0001 *** P = 0,0002 ns > 0,999 by kruskal-Wallis test

measured fluorescence signal is proportional to the local density of fluorescent molecules. In turn we can write:

$$[R] = \epsilon_1 \times I_{OUT} \quad [2]$$

$$[RL] = \epsilon_1 \times (I_{ON} - I_{OUT}) \quad [3]$$

We also assume that in our experiments the density of Fc tagged ligands is proportional to the intensity of the surface bound fluorescent streptavidin.

$$[L] = [L_{total}] - [RL] = \epsilon_2 \times (I_{SA}) - \epsilon_1 \times (I_{ON} - I_{OUT}) \quad [4]$$

By combining equations [1] to [4], we can express the dissociation constant of the receptor- ligand pair $K_d = k_{off}/k_{on}$ as a function of I_{SA} , $E = I_{ON}/I_{OUT}$, and I_{OUT} .

$$K_d = \frac{\epsilon_2 \times (I_{SA})}{E - 1} - \epsilon_1 I_{OUT} \quad [5]$$

Which can also be written as:

$$E - 1 = \frac{\epsilon_2}{K_d + \epsilon_1 I_{OUT}} \times I_{SA} \quad [6]$$

We assume and show (sptPALM) that the surface concentration of free receptors is constant within a single cell at equilibrium. In turn for each cell, and for a given receptor-ligand pair we should observe a linear relationship between E-1 and I_{SA} . To verify this, we took advantage of the grayscale patterning capability of our micropatterning system to tune the local density of immobilized Fc ligands so that each adhering cell can interact simultaneously with micro-patterns of different ligand density (Fig. 2A-C). We then plotted E-1 as a function of I_{SA} for single cells and observe indeed the expected linear relation (Fig. 2D).

On top of that, electroporation gives rise to a wide range of receptor expression levels, as measured from the fluorescence intensity of the GFP reporter (especially true for SynCAM1-GFP). Interestingly we can take advantage of this variability

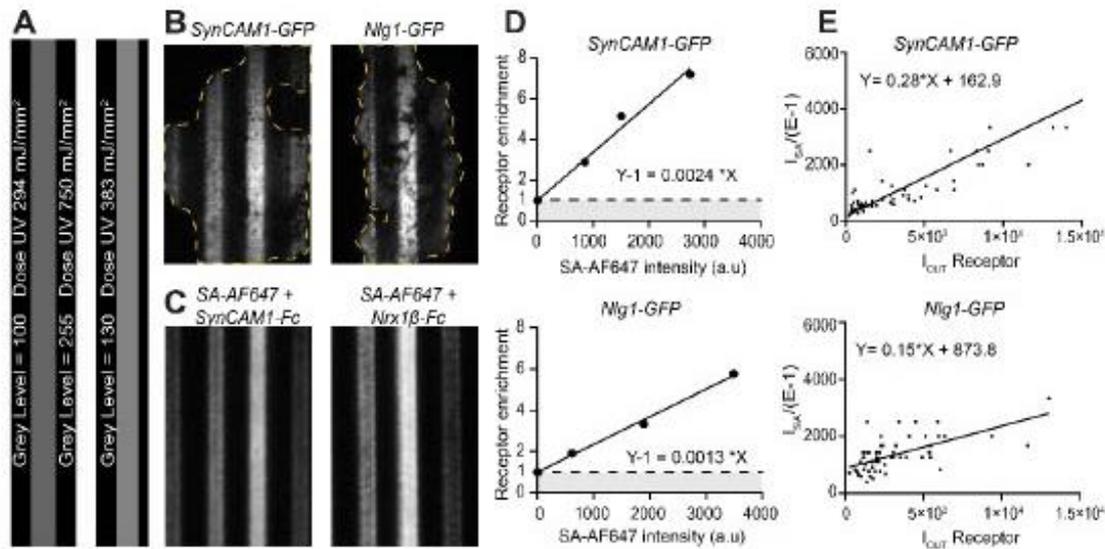


Figure 2. Dissociation constants computed from the surface density of ligands and receptors (A) Part of an 8-bit grayscale projected image, comprising three different patterned lines (from left to right: 100 grey levels, width 24 pixels, 255 grey levels, width 20 pixels and 130 grey levels, width 22 pixels). (B) Representative examples of COS-7 cells expressing Nlg1-GFP or SynCAM1-GFP on micropatterned stripes coated with Nrx1β-Fc or SynCAM1-Fc, respectively. Three different ligand concentrations were printed using varying UV doses. (C) Corresponding streptavidin-AF647 signal on the stripes. (D) Graphs showing the relationship between Nlg1-GFP or SynCAM1-GFP receptor enrichment and the respective ligand density in one cell, expressed as the streptavidin-AF647 fluorescence level. (E) Graphs showing the relationship between $I_{SA}/(E-1)$ as a function of I_{OUT} for all cells. Linear fitting gives the slope K_d/ϵ_1 and the intercept at origin ϵ_2/ϵ_1 . Statistics given as (number of cells/experiments): SynCAM1-GFP (58/1), Nlg1-GFP (54/2)

which leads to different concentration of free receptors for each cell.

By rewriting again equation [5] we obtain:

$$\frac{I_{SA}}{E-1} = \frac{\epsilon_2}{\epsilon_1} I_{OUT} + \frac{1}{\epsilon_1} K_d \quad [7]$$

For a given receptor ligand pair, K_d , ϵ_1 , ϵ_2 should be equal so that each measurement of E and I_{OUT} for each single cell should fall on the affine relation [7]. We thus plotted for each ligand/receptor pair, $\frac{I_{SA}}{E-1}$ as a function of I_{OUT} for all cells. By a simple affine fitting we obtain K_d/ϵ_1 and ϵ_2/ϵ_1 (Fig. 2E). In the case of SynCAM1, we obtain a nice agreement of our data with equation [7] ($R^2=0.77$). In the case of Nlg1-Nrx1β interaction, the data fit is not good ($R^2=0.40$). This can be explained by the fact that [7] holds only for a simple monomeric interaction which is not valid for Nlg1-Nrx1β. In addition, for Nlg1 the expression level of the cells is lower than for SynCAM1 which gives a lower range of variation. Finally, we performed a titration assay with known dilutions of a purified GFP solution in the same TIRF imaging conditions as our cell experiments in order to extract ϵ_1 . In the case of synCAM1 we obtained a numerical estimation of the surfacic $K_d=1,63.10^{-22}$ mol/ μm^2 .

FRAP experiments reveal long-lasting bonds between Nlg1 and Nrx1β compared to SynCAM1

To gain insight into the dynamic processes that underlie the continuous binding and unbinding of synaptic membrane complexes, we first performed Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) assays on our synaptogenic complexes. GFP-tagged synaptic receptors accumulated on their respective ligand-coated stripes were photo-bleached in less than a second on several areas of ~3 μm diameter with intense and focused 491 nm laser light, then fluorescence

recovery was monitored in TIRF mode for 5-20 min (Fig. 3A-B). We expected a progressive replacement of bound photobleached receptors in micropatterned areas by freely moving unbleached receptors from nearby zones, which would reflect the turnover of ligand-receptor interactions.

For Nlg1-GFP accumulated at stripes coated with Nrx1β-Fc, fluorescence recovery was biphasic, showing a rapid initial phase (< 2 min) up to 50%, followed by a much slower recovery phase up to 60% (Fig. 3E). In contrast, the fluorescence recovery for SynCAM1-GFP accumulated at SynCAM1-Fc coated stripes was monophasic and more rapid (up to 80% in 5 min), indicating the formation of more labile bonds (Fig. 3G).

As a control, we used a Nlg1-GFP construct bearing two extracellular point mutations (L399A/N400A) that impair binding to Nrx1β³⁵. As expected, this mutant did not accumulate at Nrx1β-coated stripes ($E \leq 1$), and showed very rapid fluorescence recovery (up to 100% in about 1 min), reflecting pure membrane diffusion (Fig. 3F).

To quantitatively interpret our FRAP data, we used a comprehensive diffusion-reaction model described previously^{36,37}. The general solution is complex and solved only numerically, but it can be described by analytical functions in several simplified cases and can allow to estimate the dissociation k_{off} (s^{-1}) and association k_{on}^* (s^{-1}) rate (k_{on}^* is the product of the actual 2D k_{on} in units of $\mu m^2/s$ divided by the ligand density in $1/\mu m^2$):

1/ Pure diffusion when binding is negligible ($k_{on}^*/k_{off} \ll 1$) with an equation [8] based on free diffusion (D_f) modified with Bessel function for circular bleach area³⁸.

$$frap(t) = e^{-\frac{\tau_D}{2t}} \left[I_0 \left(\frac{\tau_D}{2t} \right) + I_1 \left(\frac{\tau_D}{2t} \right) \right] \text{ with } \tau_D = \frac{w^2}{D_f} \quad [8]$$

2/ Effective diffusion when reaction is fast compared to diffusion ($(k_{on}^* \times w^2/D_f) \gg 1$), the same equation [8] is used

for this model but with an effective instead of a pure diffusion ($\tau_D = w^2/D_{eff}$). This apparent diffusion coefficient can be related to a ratio k_{on}^*/k_{off} [9].

$$D_{eff} = \frac{D_f}{\left(1 + \left(\frac{k_{on}^*}{k_{off}}\right)\right)} \quad [9]$$

3/ Uncoupled diffusion and reaction when the adhesive interaction is slower compared to diffusion ($(k_{on}^* \times w^2 / D_f) \ll 1$). In this case multiple equations can be used, a full reaction dominant one when the diffusion can be completely ignored ($C_{eq} = 1(k_{off} \ll k_{on}^*)$ [10].

$$frap(t) = 1 - C_{eq} e^{-k_{off} \cdot t} \quad [10]$$

It's also possible to distinguish diffusion from interaction and have a distinct transition ($k_{on}^* \times w^2 / D_f \ll 1$) from diffusion to interaction and in this case the equation [11] is a combination of the equation [8] and [10].

$$frap(t) = (F_{eq} + C_{eq}) * \left[e^{-\frac{\tau_D}{2t}} \left[I_0\left(\frac{\tau_D}{2t}\right) + I_1\left(\frac{\tau_D}{2t}\right) \right] + C_{eq} (1 - e^{-k_{off} \cdot t}) \right] \quad [11]$$

For each condition, we have determined the best fitting model. The parameters obtained from the fits are given in Table 1

In the FRAP analysis of the Nlg1^{L399A/N400A}-GFP mutant³⁹ which does not adhere to Nr1 β -Fc patterns (Fig. 3F), only pure diffusion is expected. The curve was nicely fitted using the pure diffusion model equation [8], yielding a diffusion coefficient (D) of 0.18 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. For the fluorescence recovery of Nlg1-GFP on Nr1 β -Fc stripes, characterized by a prolonged duration of FRAP (>30 min) and a distinctive curve shoulder, the uncoupled diffusion reaction model [11] was applied. The reaction phase, representing 19.5% (+/- 1.5% SEM), enabled the extraction of a very low unbinding rate ($k_{off} = 4.10^{-3} \text{ s}^{-1}$), significantly smaller than values obtained through previous SPR experiments [14]. To confirm this notably slow turnover between Nlg1 receptors and Nr1 β -Fc ligands, an alternative system was employed, isolating the adhesive interaction from the membrane diffusive component. Using the same Nr1 β -Fc-coated micropatterned substrates, cells expressing Nlg1-GFP were replaced with a solution of purified dimeric Nlg1 C-terminally fused to Halo-tag and fluorescently-conjugated to AF488. Nlg1-HaloTag-A488 accumulated on Nr1 β -coated stripes similarly to Nlg1-GFP (Fig. S2). Following photobleaching, fluorescence recovered gradually over time, missing the fast-initial regime corresponding to the 2D membrane diffusion of Nlg1 receptors. Here, the recovery stems from fluorescent Nlg1-HaloTag molecules persisting in the surrounding solution and replacing photobleached molecules that gradually dissociate from their ligands. Consequently, the 3D diffusion is anticipated to be highly efficient and not limiting the recovery process. The FRAP curve was adequately fitted by a reaction-dominant model [10], yielding an unbinding rate of approximately $k_{off} =$

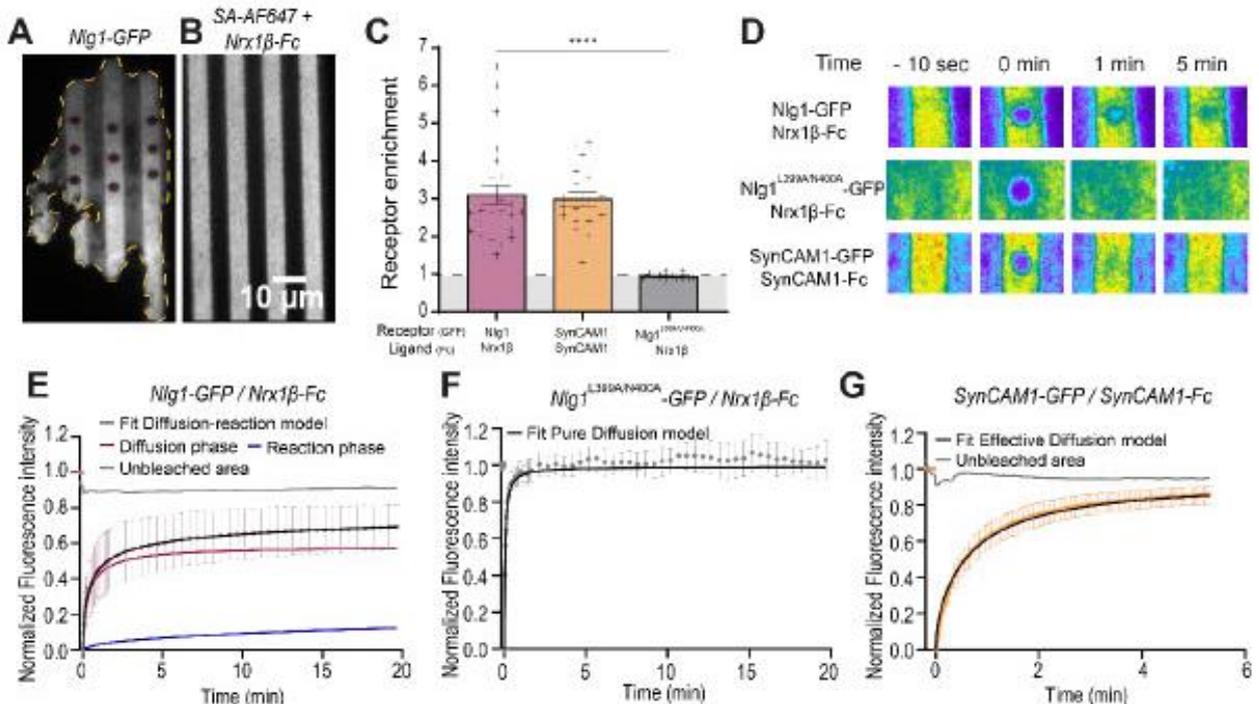


Figure 3. FRAP experiments on GFP-tagged SynCAM1 and Nlg1 accumulated at ligand-coated micropatterns (A) Illustration of a COS-7 cell expressing Nlg1-GFP (left) spread on (B) micropatterned stripes coated with Nr1 β -Fc (streptavidin-A647 signal on right). Nine photobleached spots are shown at time zero. (C) Graph of GFP-tagged receptor enrichment on the micropatterned stripes in the different conditions **** P < 0.0001 by Mann Whitney test. (D) Representative time lapse sequences of FRAP experiments performed on Nlg1^{WT}-GFP or Nlg1^{L399A/N400A}-GFP accumulated at Nr1 β -Fc coated stripes, or on SynCAM1-GFP accumulated at SynCAM1-Fc coated stripes. (E-G) Average recovery curves corresponding to the three conditions. The Nlg1^{WT}-GFP curve is fitted by the diffusion-reaction model, where the diffusion and reaction components are shown individually (red and blue curves, respectively). The Nlg1^{L399A/N400A}-GFP curve was fitted by a pure diffusion model, while the SynCAM1-GFP curve was fitted with an effective diffusion model. Note the different time course for Nlg1-GFP and SynCAM1-GFP (20 min versus 5 min). The statistics are (number of cells/experiments): Nlg1^{WT}-GFP (28/11); Nlg1^{L399A/N400A}-GFP (12/4); SynCAM1-GFP (19/4).

Table 1. Values extracted from fits of FRAP curves

Receptor	Ligand	Diffusion FRAP ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Deffectif ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	k_{off} (s^{-1})	Immobile Fraction %	Error FIT
Nlg1 WT	Nrx1 β -Fc	0,030 +/- 0,005		4,2.10 ⁻³ +/- 1,6.10 ⁻³	22 +/- 1,7	0,0052
Nlg1 ^{E584A/L585A}	Nrx1 β -Fc		0,040 +/- 0,026		16 +/- 1,47	0,035
Nlg1 ^{L399A/N400A}	Nrx1 β -Fc	0,18 +/- 0,018			0,4 +/- 0,3	0,26
SynCAM-Fc	SynCAM1-Fc		0,016 +/- 0,0013		5 +/- 0,8	0,055
Nlg1 WT-HaloTag	Nrx1 β -Fc			1,5.10 ⁻³ +/- 0,8.10 ⁻³	51 +/- 13	0,0029

Values are presented at the mean +/- SEM

1.5.10⁻³ s⁻¹, even slower than observed in the presence of the cell membrane. Notably, a comparative analysis of the two conditions, when plotted side by side, reveals that the FRAP curve obtained for purified Nlg1-HaloTag is similar to the long-term reaction regime observed for Nlg1-GFP. We also observe that the diffusion coefficient extracted from the diffusion phase of the Nlg1-GFP on Nrx1 β -Fc curve ($D = 0.030 \mu\text{m}^2/\text{s}$) is significantly lower than the diffusion coefficient measured with the Nlg1^{L399A/N400A}-GFP mutant. This discrepancy can be attributed to two potentially intertwined factors: 1) The density of contacts established in the wild-type (WT) condition may contribute to a reduction in the diffusion coefficient, and 2) The observed system involves multiple states of interactions characterized by diverse association and dissociation rates. The diffusion phase observed may be governed by either effective diffusion or a reaction-dominant model. The latter possibility is plausible due to the constitutive dimeric nature of Nlg1^{12,40,41}.

The FRAP curve for SynCAM1-GFP on SynCAM1-Fc patterns fitted well with the diffusion uncoupled reaction model but yielded a reaction curve that appeared faster than the actual reaction, contradicting the model's assumptions. Consequently, we postulated that diffusion and reaction are coupled in this scenario. Hence, two fitting solutions were considered: effective diffusion if the reaction is faster than diffusion, or a mixed scenario where no simplified model applies, as described in references 36 and 37. Attempting the effective diffusion fit resulted in a Deff value of 0.016 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. To ascertain the correct solution, access to the free coefficient diffusion of SynCAM is essential. As there is no mutant of SynCAM1 inhibiting the interaction, an alternative approach involved performing FRAP outside the pattern area to obtain this value. However, this method was deemed impractical due to the increased membrane fluidity outside the adhesive zone, leading to a highly noisy signal. Consequently, we opted for Single Particle Tracking - PhotoActivated Localization Microscopy (sptPALM)^{42,43} which allows to measure the diffusion coefficient of assemblies of individual molecules.

sptPALM experiments distinguish free versus bound receptors

We used sptPALM to measure the surface diffusion of individual transmembrane receptors Nlg1 and SynCAM1, all tagged with the photo-convertible protein mEos3.2 (Fig. 4A). We again used TIRF illumination to focus on receptors localized at the ventral surface of the cells, in close contact with the substrate micropatterned with Fc-tagged ligands. In line with the enrichment values reported above for GFP-

tagged receptors, the number of mEos3.2-tagged receptor trajectories, normalized by the surface, was between 3- and 5-fold higher in contact regions than outside, reflecting specific receptor accumulation in those areas. We then systematically compared the motion of receptors on and outside contact areas for specific adhesions (matching ligand/receptor pairs), or non-specific adhesions (non-matching pairs), within the same cell. Because mEos3.2 molecules photobleached in response to the strong 561-nm laser illumination, the mean duration of individual trajectories is relatively short, i.e. around 300 ms, compared to organic dyes⁴⁴, but still long enough to compute relevant dynamic information.

Single molecule trajectories were reconstructed using custom image analysis programs^{27,45}, and individual diffusion coefficients (D) were calculated for each trajectories from the mean squared displacement (MSD) function over time. We have first plotted the mean of the averaged MSD curve of all the trajectories in each cell (Fig. 4C, F), which allowed us to extract, by linear fitting, a mean apparent diffusion coefficient inside and outside the pattern given in Table 1. Afterward, to distinguish between different populations of trajectories, we conducted a comprehensive statistical analysis by calculating a unique diffusion coefficient integrated over the entire trajectory for each molecule. Subsequently, we depicted this distribution on a semi-log scale, comparing regions within patterns (blue) and outside patterns (red) (Fig. 4C, F). The pointing accuracy of our sptPALM detection set-up is around 50 nm (FWHM), such that only molecules whose diffusion coefficient is above 10⁻² $\mu\text{m}^2/\text{s}$ can be considered as mobile⁴⁶. Allowing us to clearly distinguish two receptor populations by setting the threshold to $D = 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$: i) a freely mobile fraction with $D > 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$, and ii) a bound fraction with $D < 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$. In cases where the linear fit of the mean squared displacement (MSD) gave a negative slope, the diffusion coefficient was set to an arbitrary low value of 10⁻⁵ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ and the molecule is considered as unfitted (Fig. 4D, G). In all conditions, the distribution of diffusion coefficients could be fitted by one or two Gaussian curves from which we could extract mean diffusion coefficients (Table 1). The two mEos3.2-tagged receptors displayed high diffusion coefficients in regions not carrying ligands (0.11- 0.18 $\mu\text{m}^2/\text{s}$). Interestingly the diffusion coefficient measured outside of the pattern area for Nlg1 is close to the one measured by FRAP inside pattern for the Nlg1^{L399A/N400A}-GFP mutant (Fig. 3F) which does not interact with Nrx1 β . This confirms the absence of interaction for this mutant and the specificity of our experiment. For the two mEos3.2-tagged receptors, the coefficient diffusion

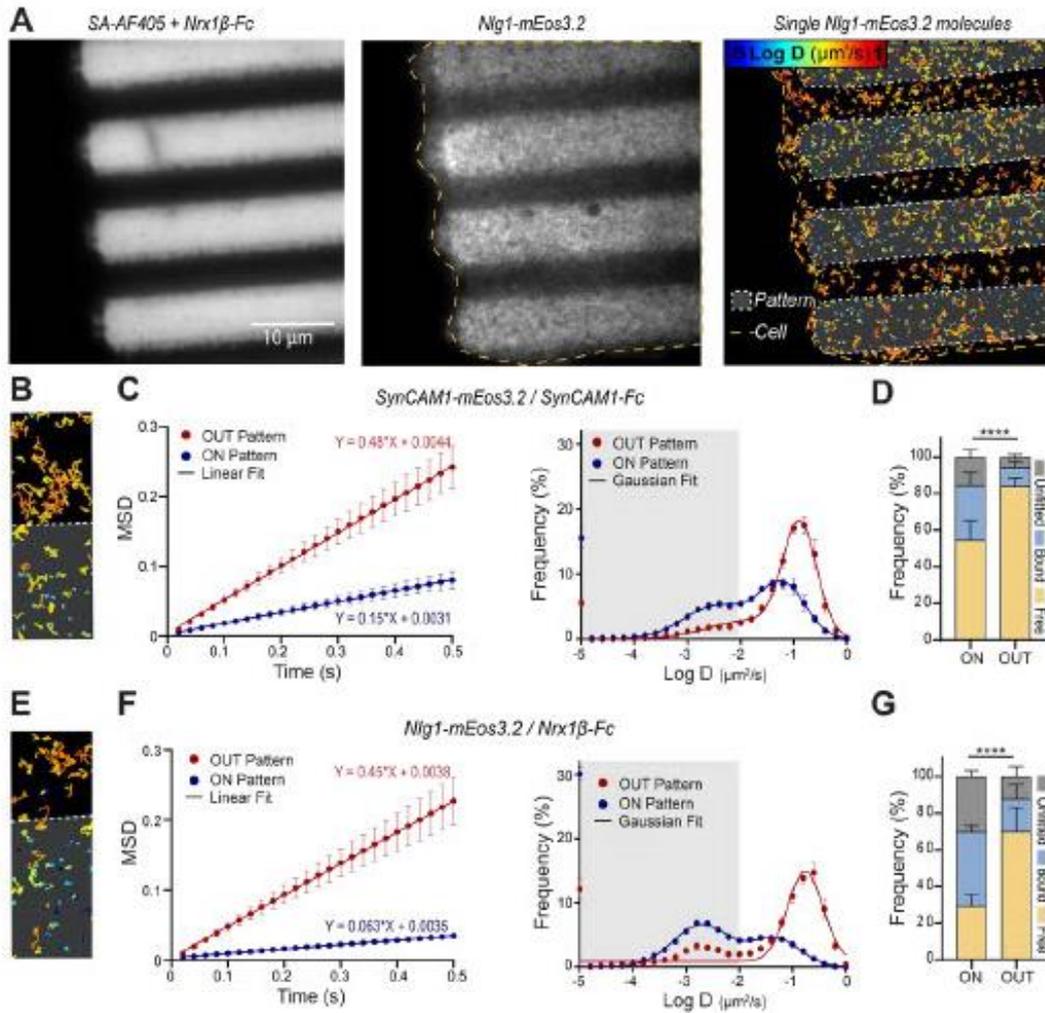


Figure 4. SPT-PALM experiments on mEos3.2-tagged receptors at ligand-coated micropatterned substrates (A) Representative images of Nlg1-mEos3.2 (green emitting form) accumulated at Nrx1β-Fc coated stripes and individual Nlg1-mEos3.2 trajectories (red emitting form). The color codes for diffusion coefficient (blue = low diffusion, red = high diffusion). (B,E) Zoomed images represent examples of individual trajectories in the different conditions (Nlg1-mEos3.2 on Nrx1β-Fc and SynCAM1-mEos3.2 on SynCAM1-Fc). The dashed lines indicate the border between the non-patterned (top) and patterned (bottom) zones. (C-F) Average curve of the average MSD of all trajectories by cells on (blue) and out (red) the pattern area for each condition. Dots; experimental values, Line; Linear fit of the MSD curve. Plots showing the distribution of computed diffusion coefficients in semi-log scale. Red and blue curves represent molecules outside versus inside the micropatterned area, respectively. Dots; experimental values, Lines; Gaussian fit. The gray area with $D < 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ represents confined molecules, while the value at $10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ represent molecules with an unfitted MSD. (D-G) Graphs show the fraction of diffuse (Free), bound and unfitted molecules on the pattern or outside, in the different conditions. Statistics given as (number of cells/experiments/trajectories ON:OUT) Nlg1-mEos3.2 on Nrx1β-Fc (11/2/161802: 15963); Eos3.2-Nrx1β on Nlg1-Fc (7/1/ 36871:10810); SynCAM1-mEos3.2 on Nrx1β-Fc (7/1/151972: 27856); mEos3.2-Nrx1β on SynCAM1-Fc (3/1/7673:12695); **** $P < 0.0001$ by 2way Anova.

decreased significantly inside the pattern area ($0.016\text{-}0.063 \mu\text{m}^2/\text{s}$). The y-intercept of the MSD curve ($\approx 0.0037 \mu\text{m}^2$) extracted from the MSD mean curve (Fig. 4 E, F), gives a good estimation of the pointing accuracy. We confirm that the boundary between free and bound molecules estimated at $10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ is close to the accurate one ($4/(0.0037) = 10^{-1.6}$). Based on this, we can plot the percentage of each population (Fig. 4 D, G). The mobile fraction of the two mEos3.2-tagged receptors is significantly low on the pattern, with 55% for SynCAM1 at 30 % for Nlg1, compared to outside (84-70%).

However, in the case of SynCAM1-mEos3.2 on SynCAM1-Fc coated patterns, despite an enrichment similar to Nlg1 on Nrx1β-Fc ligands (Fig. 1D), the mobile fraction is higher (Fig. 4G). This seems coherent with our observation in FRAP, where the homophilic SynCAM1 interactions are more labile than heterophilic interactions between Nrx1β and Nlg1 and our hypothesis of effective diffusion. To determine if the reaction phase of SynCAM is faster than diffusion, we study more in detail trajectories obtained in this condition.

SynCAM1 receptors display sharp transitions between free and bound states

The distribution of SynCAM1-mEos3.2 mean diffusion coefficients on SynCAM1-Fc patterns showed a peak shifted to the left when compared to free SynCAM1-mEos3.2 molecules outside of patterns (Fig. 4C). This may be due to the presence of rapid events, expected if the reaction is faster than the diffusion which can reduce the apparent coefficient

Table 2. Diffusion coefficients of diverse synaptic adhesion proteins on and outside micropatterns

Receptor	Ligand	Linear Fit		Gaussian Fit	
		Diffusion OUT ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Diffusion IN ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Diffusion OUT ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Diffusion IN ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
Nlg1-mEos3.2	Nrx1β-Fc	0,11	0,016	0,17	0,049
SynCAM1-mEos3.2	SynCAM1-Fc	0,12	0,039	0,13	0,063
Nlg1 ^{E394A/L325A} -mEos3.2	Nrx1β-Fc	0,083	0,022	0,18	0,050

diffusion⁴⁷. To study the presence of events, we analysed individual SynCAM1-mEos3.2 trajectories in more detail, by computing the instantaneous diffusion coefficient over time, using a sliding MSD window of 4 timepoints (0.08s)⁴⁸ (Fig. 5). Qualitatively, we observed many sharp transitions between high diffusion and slow diffusion states, which reflect individual attachment and detachment events between SynCAM1-mEos3.2 receptors and immobilized SynCAM1-Fc ligands on the micropatterns, respectively (Fig. 5A). Indeed, in control regions outside micropatterns, most of SynCAM1-mEos3.2 trajectories diffused rapidly and did not exhibit such transient trapping events (Fig. 5A). By computer simulations performed with the FluoSim software²⁷, in which we introduced different transitions between free and bound states and keeping relatively short trajectory duration through the choice of realistic photophysical rates (Fig. S3). We reproduced the same shift with high free and bound states (i.e. $k_{on}^* = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_{off} = 5 \text{ s}^{-1}$), which confirms that a labile interaction can induce a reduction in the apparent average diffusion coefficient. Based on published analyses⁴⁹, we tried to extract from this transitions an estimation of the association and dissociation rate, by measuring average the duration that the molecules remain in each state T_{bound} and T_{free} (mean residence time), it is possible to approximately estimate the $k_{on}^* = 1/T_{free}$ and $k_{off} = 1/T_{bound}$ governing the interaction of SynCAM1.

In order to measure the mean residence time of the molecule in the free and bound states, inside and outside pattern. We determined a threshold (0.039 $\mu\text{m}^2/\text{s}$), based on the D_{eff} measured with the linear fit of the MSD curve (Fig. 4C). We have first tested our method on simulated experiments made

with FluoSIM with known parameters ($k_{on}^* = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_{off} = 5 \text{ s}^{-1}$) (Fig. S3E). We extract a k_{on}^* and a k_{off} of 6.7 s^{-1} and 3.4 s^{-1} respectively. These values are close to the expected ones but with a systematic error probably due to a limited detection bandwidth. This allowed us to compute the individual kinetic rates $k_{on}^* = 6.2 \text{ s}^{-1}$ and $k_{off} = 3.5 \text{ s}^{-1}$ of the SynCAM1 homophilic interaction using our system (Fig. 5B) which give us a k_{on}^*/k_{off} ratio of 1.7 twice less than the one estimated by FRAP (3.3).

Surprisingly, we detect transition events outside of the patterns as well. However, we note identical residence time values for both free and bound molecules. (Fig. 5B). These findings highlight the limitations of using a fixed detection threshold leading to false detection. Similar behaviors are reproduced in simulated experiments (Fig. S4E). These behaviors suggested the formation of fast bonds between SynCAM1-mEos3.2 and SynCAM1-Fc that contributed to a slow apparent (or effective) diffusion and validate the used of an effective model. Incidentally, in the absence of molecular crowding (i.e. a reduction of receptor diffusion in micropatterned areas through steric hindrance), the theory predicts²⁷ that steady-state receptor enrichment is related to the kinetic rates through the formula 8.

$$E = 1 + k_{on}^*/k_{off} \text{ [8]}$$

Here, using the rates calculated from the transitions in SynCAM1-mEos3.2 behavior, we find $E = 2.7$ which is similar to the experimental value obtained with SynCAM1-GFP on coated SynCAM1-Fc micropatterns (Fig. 1D).

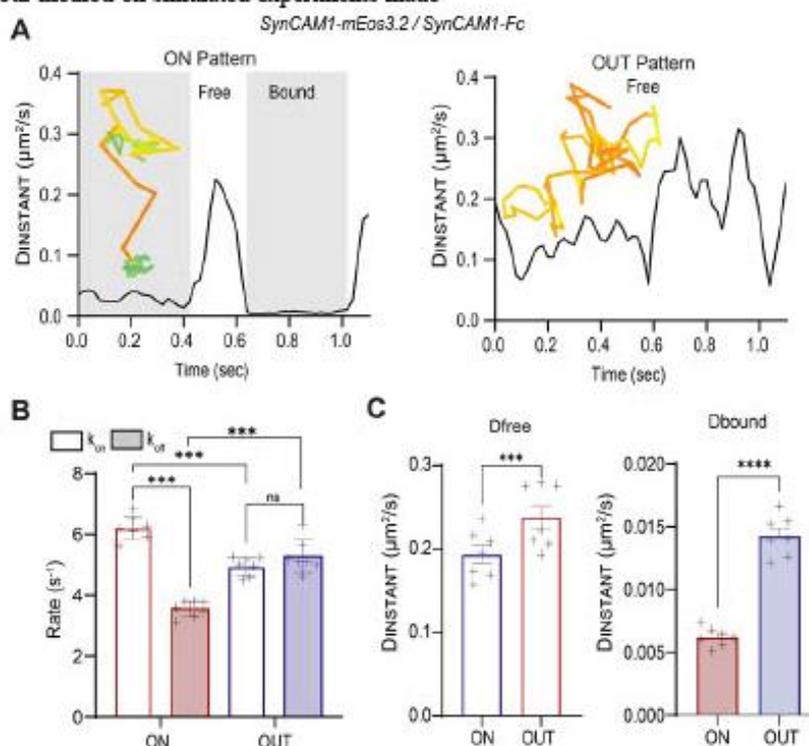


Figure 5. Fast transitions between free and bound states displayed by SynCAM1 (A) Graphs showing individual examples of the instantaneous diffusion coefficient over time for SynCAM1-mEos3.2 on stripes coated with SynCAM1-Fc or on areas outside patterns. Examples of individual trajectories of duration longer than 1 sec, displayed by SynCAM1-mEos3.2 on micropatterned stripes coated with SynCAM1-Fc or on areas outside patterns. The color code represents the instantaneous diffusion coefficient (red: $D > 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, blue: $D < 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Note the transition between free and bound states (B) Distribution of mean association (k_{on}^*) and dissociation rate (k_{off}) measure in transition observed on SynCAM1-mEos3.2 on stripes coated with SynCAM1-Fc or outside the pattern. **** $P < 0.0001$, ns $P = 0.89$ by 1way Anova multiple comparisons. (C) Mean diffusion measured by cell during the event characterized as free or bound outside and inside the pattern. *** $P = 0.0003$, **** $P < 0.0001$ by paired t-test. Statistics given as (number of cells/experiments): SynCAM1-GFP (7/1)

diffusion model [9], which give a value in similar range $D_{eff} = 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

$$frap(t) \approx (F_{eq} + C_{eq}) * \left[e^{-\frac{\tau_{1eff}}{2t}} \left[I_0 \left(\frac{\tau_{1eff}}{2t} \right) + I_1 \left(\frac{\tau_{1eff}}{2t} \right) \right] + C_{2eq} (1 - e^{-k_{2off}t}) \right] \quad [9]$$

In sptPALM experiments, Nlg1^{E584A/L585A}-mEos3.2 molecules accumulated well on Nrx1β-Fc coated stripes, but exhibited a slower coefficient diffusion around 0.02-0.05 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. If we compared the % combined of bound and unfitted molecule between Nlg1^{E584A/L585A} and the wild-type form, we observed that this fraction is 11% higher for the wild type. Between the FRAP and the SPT we can estimate that the proportion of Nlg1 with the two lobes involved in an interaction its around 10-20%.

In summary, Nlg1 appears to form rapid bonds with Nrx1β-Fc by mobilizing only one binding interface, but can also engage in long lasting bonds when the two lobes of the Nlg1 dimer are simultaneously binding two Nrx1β molecules, these configurations are probably favored by high density of Nrx1β. When Nlg1 is forced to be in a monomeric form, only the fast interactions are detected, and only short live bonds remain.

Turnover of PSD-95 recruited at Nrx1β-Nlg1 adhesions

We demonstrated above the utility of our micropatterning assay to study interactions between

transmembrane receptors and micropatterned ligands. Our next step was to characterize the interaction between a transmembrane protein recruited on the patterns and another intracellular membrane-associated partner. As a canonical molecular system, we looked at PSD-95, a post-synaptic scaffolding protein anchored to the plasma membrane through a palmitoylation motif and which contains three PDZ domains enabling interactions with C-terminal PDZ binding motifs of various synaptic receptors, including Nlg1^{26,57,58}. We co-electroporated COS-7 cells with recombinant GFP-tagged PSD-95 and AP-tagged Nlg1 and plated them on micropatterned substrates containing Nrx1β-Fc coated stripes (Fig. 7A). Triggering the binding between membrane Nlg1 and Nrx1β-Fc caused the specific accumulation of PSD-95-GFP-WT at Nrx1β-Fc coated stripes (Fig. 7B), with an enrichment factor $E = 1.9$ (± 0.09 SEM), a little lower than that of Nlg1-GFP (Fig. 7C). As a negative control, we used a Nlg1 mutant with a -5 aa C-terminal truncation (AP-NLG1-Δ5) that removes the binding site to PSD-95^{59,60}. The enrichment of PSD-95-GFP observed at Nrx1β-Fc coated stripes in COS-7 cells co-expressing Nlg1-Δ5 was close to 1.2 (± 0.09 SEM) and significantly lower than that observed with Nlg1-WT, indicating that the Nlg1 PDZ-domain binding motif was involved in the recruitment of PSD-95. To further characterize the PDZ domains of PSD-95 involved in the binding to Nlg1, we used mutant PSD-95-GFP molecules carrying critical histidine to valine substitutions in PDZ

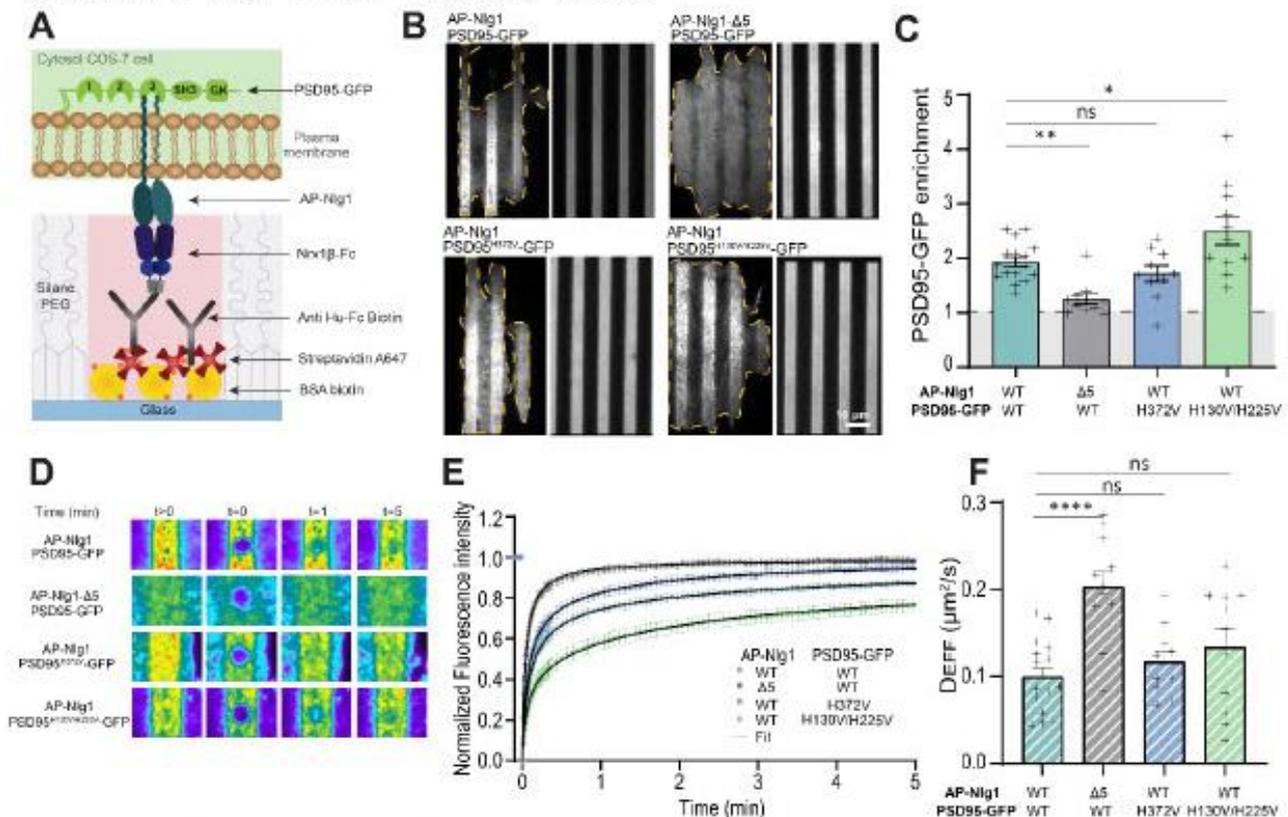


Figure 7. FRAP experiments on PSD-95-GFP at micropatterned Nrx1β-Nlg1 adhesions (A) Schematic diagram of the experiment. (B) Representative images of COS-7 cells co-expressing AP-Nlg1-WT or AP-Nlg1-Δ5 and PSD-95-GFP (either wild type or point mutants H130V/H225V or H372V) on micropatterned substrates coated with Nrx1β-Fc. PSD-95-GFP accumulation on Nrx1β-Fc coated lines in the different conditions. (C) Average PSD-95-GFP enrichment on Nrx1β-Fc coated lines versus regions between lines, in the different conditions (mean ± sem). ** P=0.0074, ns P= 0.1687, * P=0.0330 by one-way Anova multiple comparisons. (D) Representative FRAP sequences in the different conditions. (E) Average FRAP curves in the different conditions (mean ± sem). The curves were fitted by an effective diffusion model, except for PSD-95-GFP on Nlg1-Δ5 which was fitted by a pure diffusion model. (F) Graph showing the effective diffusion coefficient. **** P<0.0001, ns=0.85 (H372V) et 0.37(H130V/H225V) by Kruskal-Wallis test. Statistics given as (number of cells/experiments): WT (16/4), Δ5 (11/3), H372V (10/2) and H130V/H225V (11/2)

domains 1, 2, or 3 (H130V, H225V, and H372V, respectively), which reduce the binding to C-terminal ligands^{61,62}. PSD-95-GFP carrying mutations in PDZ domains 1-2 (H130V/H225V) not expected to affect the binding to NLG1, accumulated at Nr1 β -Fc coated lines as well as PSD-95^{WT}-GFP ($E = 2.5 \pm 0.2$ SEM) (Fig. 7B, C), indicating strong binding to Nlg1. Surprisingly PSD-95-GFP carrying a mutated PDZ3 domain (H372V) expected to abolish the binding to NLG1, also exhibited a relatively high PSD-95-GFP enrichment level at Nr1 β -Fc coated lines ($E = 1.7 \pm 0.15$ SEM), albeit significantly lower than the PSD-95^{H130V/H225V}-GFP mutant. This result suggests that domains other than PDZ3 in PSD-95 might compensate for the binding to NLG1. To quantify the interaction dynamics between Nlg1 and PSD-95, we then performed FRAP experiments on PSD-95^{WT}-GFP or PSD-95-GFP mutants present at Nr1 β -Fc coated lines (Fig. 7D,E). When co-expressed with full length HA-Nlg1, PSD-95^{WT}-GFP showed a monophasic fluorescence recovery compatible with a diffusion-trapping model and reaching 80% in about 5 min, much quicker than the recovery of Nlg1-GFP on Nr1 β -Fc micropatterns. As a control, PSD-95^{WT}-GFP co-expressed with HA-Nlg1 $\Delta 5$ showed very fast fluorescence recovery that can be fitted with a pure diffusion model and yield a diffusion coefficient of $0.20 \mu\text{m}^2/\text{s}$, demonstrating that the Nlg1 C-terminal motif is responsible for stabilizing PSD-95 in this assay, as described in the literature⁵⁷. When co-expressed with AP-Nlg1, the fluorescence recovery was barely faster for PSD-95^{H372V}-GFP than for PSD-95^{WT}-GFP (Fig. 7 E). Instead, the PSD-95^{H130V/H225V}-GFP mutant showed a much lower recovery rate than PSD-95^{WT}-GFP, confirming its higher enrichment level on Nr1 β -Fc patterns.

However, we cannot overlook the intrinsic turnover of Nlg1-Nr1 β adhesions at the substrate in this time frame. Indeed, by fitting the curve with the diffusion-trapping model we find that the slope of the trapping part gives a k_{off} between 5.10^{-3} s^{-1} and 8.10^{-3} s^{-1} depending on the condition, which is relatively close to the k_{off} obtained for the dimeric part of Nlg1 (4.10^{-3} s^{-1}). Our hypothesis is that we are in the presence of a dual state model with a part corresponding to the PSD-95 interaction, which would be effective diffusion, and a part corresponding to the long dynamics of Nlg1/Nr1 β , reaction only [9]. This hypothesis is validated by the values of diffusion coefficient extracted from the first phase of the curve which are much higher for PSD-95^{WT} and the PSD-95 PDZ mutants compared to the Nlg1- $\Delta 5$ condition, where there is no interaction. This confirms that the first part of the FRAP curve correspond to a diffusion slows down by the interaction (Fig. 7F).

Together, these observations suggest that PDZ domains 1 and 2 compete with PDZ domain 3 for the binding to the Nlg1 C-terminal tail, and that when these domains are mutated, the interaction of Nlg1 with PDZ domain 3 is reinforced.

Discussion

Accurate measurement of ligand-receptor affinity is of paramount importance for a detailed understanding of cellular

signaling mechanisms. However, conventional methods often fall short in capturing the intricate dynamics within cellular environments. We propose here an approach that allows us to quantitatively assess ligand-receptor interactions at the single-cell level by analyzing the fluorescence intensity emitted by cell-surface receptors in contact with substrate regions micropatterned with their corresponding ligands. Single molecule tracking provided accurate determinations of instantaneous receptor diffusion coefficients and short-term transitions between free and bound states, while FRAP combined with appropriate mathematical models allowed for the estimation of long-term receptor turnover rate. The simple requisite of our system being to produce the Fc-tagged ligand and express its counter receptor in a cell line, our strategy should be applicable to many types of ligand-receptor pairs within different fields of biology, including development, immunology, and neuroscience. In fact, similar micropatterning approaches have already been used to characterize the signaling and dynamic properties of adhesion complexes such as those formed between EphB receptors and ephrins, or between T cell receptors and the intracellular kinase ZAP-70^{32,63}.

On the technological side, the superposition of several layers of proteins on the substrate, i.e. BSA-biotin followed by streptavidin and biotinylated anti-Fc antibody to capture Fc-tagged ligands, provided a way not only to passivate the micropatterned area to decrease non-specific binding, but also to amplify ligand adsorption, together resulting in a highly reactive surface where only the appropriate counter-receptors accumulated. The technique should thus be expandable to screening purposes in multi-well plates, knowing that large protein banks of Fc-tagged ligands are already available⁶⁴. Using a tunable UV dose, the LIMAP technique also allowed us to vary ligand density on the micropatterns and study the effect on receptors within the same cell. This feature was used to show that both the enrichment of GFP-tagged receptors and the confined fraction of single mEos3.2 tagged receptors are linearly dependent on ligand density. These experiments further demonstrate the molecular specificity of our system. By performing a second round of printing with an orthogonal molecular chain (e.g. based on another protein tag)³⁵, this approach should also be applicable to the side-by-side patterning of different ligands, e.g. to study synergetic or competitive binding mechanisms between different ligand-receptor pairs.

On the biological side, we used this biomimetic model to dissect the interaction dynamics of canonical synaptic molecular complexes, namely the heterophilic extracellular binding between Nr1 β and Nlg1, the homophilic binding between SynCAM1 partners, and the intracellular binding between Nlg1 and PSD-95. Specifically, we showed that SynCAM1 forms relatively short-lived homophilic bonds that can be detected by fast transitions from free to bound states in SPT, and by the fitting FRAP curves by an effective diffusion model. To our knowledge, there are very few reports in the literature focusing on the interaction kinetics between SynCAM family members, except one measurement of the dissociation constant between all the SynCAM family members⁶⁵. In this paper the interaction SynCAM1/SynCAM1 is less labile than our results, i.e $k_{off} = 0.0072 \text{ s}^{-1}$. But it is difficult to compare 3D dissociation constants of proteins in solution to the 2D kinetic

measurements performed here without a precise knowledge of the density of ligands and receptors¹⁹.

In contrast, our data show that Nlg1 forms long-lived bonds with Nr1 β , mostly due to its dimeric nature. The introduction of point mutations in Nlg1 (L399A/N400A) shown to impair Nr1 β -Nlg1 binding in vitro resulted in very little accumulation of the receptors and rapid FRAP kinetics on their respective ligands, confirming binding specificity. Moreover, a Nlg1 point mutant unable to dimerize (E584A/L585A) displayed a little bit less accumulation and more rapid FRAP kinetics on Nr1 β -Fc coated micropatterns than wild type Nlg1, demonstrating that Nlg1 dimerization slows down its interaction with Nr1 β . This relatively slow kinetics is in agreement with that predicted from the gradual detachment of Nr1 β -coated Quantum dots from primary neurons expressing Nlg1⁵⁶. In comparison, SPR measurements performed on the Nr1 β -Nlg1 complex report disparate values, ranging from very fast kinetics when dimeric Nlg1 is adsorbed on the chip and interacts with soluble monomeric Nr1 β , i.e. k_{off} on the second time scale¹⁵, to much slower kinetics when Nr1 β -Fc is grafted on the chip and interacts with dimeric soluble Nlg1, i.e. k_{off} = 0.015 s⁻¹¹⁴. It is well known that Nr1 β -Fc also forms dimers thanks to two covalent disulfide bonds in the Fc domain. So, our first hypothesis was that the "dimerization" of Nr1 β by Fc domains affects the interaction. With the idea that monomeric Nr1 β can bind rapidly to either lobe of the Nlg1 dimer, but when arranged in dimeric form (Nr1 β -Fc) establishes long-lasting bonds with the Nlg1 dimer. But more recent measurements by isothermal calorimetric titration, where the molecules are in soluble form, describe an interaction with a strong exothermic reaction and a K_d of 390 nM between the ectodomain of Nlg1 and monomeric Nr1 β . In the same article, measurements carried out in SPR with soluble Nr1 β , and therefore monomeric form, give a K_d twice as high with a value of 718 nM⁶⁶. Value corresponding to the measurement performed in the presence of dimerized Nr1 β via Fc. The hypothesis of the creation of a double state due to Fc therefore does not appear to be the cause of the measurement differences described in previous articles^{14,15}, but really to the dimeric form of Nlg1 and some rebinding effect promote by high density of Nr1 β .

This strong binding interface between Nlg1 and Nr1 β -Fc was further used as a template to explore the interaction dynamics between the Nlg1 C-terminus and PSD-95, revealing a complex interplay between the 3 PDZ domains. A potential mechanism to explain our findings would be that one C-terminal tail of a Nlg1 dimer interacts preferentially with PDZ domain 3 of PSD-95, while the other C-terminal tail binds PDZ domains 1 or 2 on the same PSD-95 molecule. When PDZ domains 1 and 2 are mutated, the Nlg1 dimer interacts (more strongly) with two PDZ domains 3 on neighboring or dimerized PSD-95 molecules⁶⁷.

These results obtained in heterologous cells should be valuable to better understand the dynamics of synaptic complexes in neurons. For example, SynCAM1 forms small domains at the periphery of synapses that move away upon an NMDA treatment which mimics long term depression (LTD)⁶⁸. The fast kinetics of the homophilic SynCAM1 complex reported here is compatible with a rapid regulation of its adhesiveness at the synaptic belt. Nr1 and Nlg1 were found to form stable sub-micron clusters facing each other at the

core of the synaptic cleft⁶⁹⁻⁷¹. The stability of these trans-synaptic complexes shown in our biomimetic assay may explain the fact that neurons are endowed with the ability to proteolytically cleave Nlg1 below its extracellular adhesive domain, when synapses are weakened in response to chemical LTD⁷²⁻⁷⁴. Dimerization of Nlg1 is required for the ability of Nlg1 to induce new synapses in a co-culture assay, and to increase AMPA receptor-dependent synaptic transmission in organotypic hippocampal slices, these effects being mediated by the clustering of pre-synaptic neuroligins^{24,55}. Our results showing that the monomeric mutant Nlg1^{E584A/L585A} unbinds quickly from with Nr1 β supports the concept that long-lasting trans-synaptic interactions between dimeric Nlg1 and Nr1s are necessary to mediate the full function of Nlg1 at synapses. Whether Nr1s can also form dimers through interactions with multimodal pre-synaptic proteins such as CASK^{75,76} remains unclear, but this would represent an additional mechanism to reinforce trans-synaptic bonds with Nlgs. In fact, FRAP experiments performed on synaptic Nlg1 in neurons reveal a longer turnover rate than the one measured here on Nlg1 accumulated at Nr1 β -Fc coated micropatterns^{69,77} suggesting that, in addition to pre-synaptic Nr1, other molecular interactions stabilize Nlg1 at synapses. Indeed, Nlg1 can interact with a variety of intracellular partners, including PDZ domain containing scaffolding proteins such as PSD-95 and the WAVE regulatory complex^{26,29,78}. Interestingly, FRAP experiments performed on PSD-95-GFP accumulated at Nlg1 clusters induced by Nr1 β -Fc cross-linking in neurons²⁶ reveal a much lower turnover rate than the one observed here for PSD-95-GFP expressed in COS-7 cells and accumulated at Nr1 β -Fc coated micropatterns. These results suggest a bi-directional stabilization of Nlg1 and PSD-95 in neurons, most likely through the formation of multivalent bonds that are dominant at synapses. Further modeling work is necessary to predict the actual turnover rate of such proteins at synapses based on the individual protein-protein kinetic rates measured here.

Acknowledgements

We thank T. Biederer, P. Scheiffele, S. Okabe, and A. Ting for the generous gift of plasmids, B. Tessier and S. Benquet for molecular biology; R. Sterling, A. Castets, and the cell culture facility of the Institute; J.B. Sibarita, C. Butler, and A. Kechkar for the generous gift of the PALM-Tracer program for analysis of SPT-PALM experiments.

This work received funding from the Fondation pour la Recherche Médicale ("Equipe FRM" DEQ20160334916), French Ministry of Research, Agence Nationale de la Recherche (grant « Synthesyn » ANR-17-CE16-0028-01), Investissements d'Avenir Labex BRAIN (« Single Pull » ANR-10-LABX-43), the national infrastructure France BioImaging (grant ANR-10INBS-04-01), and the Conseil Régional Aquitaine (« SiMoDyn »).

Materials and methods

DNA plasmids

Materials and methods

DNA plasmids

SynCAM1-GFP (+420)⁷⁹ was kind gift from T. Biederer (Yale University, New Haven, USA). GFP-Nrx1 β ⁸⁰ was kind gift from M. Missler (Münster University, Germany). HA-Nlg1-GFP (-21)²¹ and AP-Nlg1⁸¹, and were kind gifts from P. Scheiffele (Biozentrum, Basel, Switzerland) and A. Ting (Stanford University, Palo Alto, CA, USA) respectively. The PSD-95-GFP (+253) plasmid and the H130V-H225V and H372V mutant versions of this plasmid were kindly offered by M. Sainlos (IINS, Bordeaux), these plasmids have already been described⁸². AP-Nlg1 Δ 5 was already described⁸³. All Nlg1 DNA constructs contained both A and B splice inserts. SynCAM1-mEos3.2 (+420) and HA-Nlg1-mEos3.2 (-21) were derived from GFP-Nrx1B, SynCAM1-GFP and HA-Nlg1-GFP (-21), respectively, by replacing the GFP sequence by PCR-amplified-mEos3.2 from mEos3.2-C1, a gift from Michael Davidson & Tao Xu (Addgene plasmid # 54550; <http://n2t.net/addgene:54550>; RRID: Addgene_54550). HA-Nlg1^{E584AL385A}-GFP (-21) was generated by sub-cloning the mutated part of Nlg1 from HA-Nlg1^{E584AL385A}, already described⁸⁴, in HA-Nlg1-GFP (-21) at EcoRV/KpnI sites. The double mutation L399A/N400A was inserted in the HA-Nlg1-GFP (-21) by replacing the EcoNI-EcoRV WT sequence of Nlg1 by the insert generated by Eurofins containing the mutations.

Purified proteins

Nrx1 β and SynCAM1 C-terminally fused to human Fc were produced by transfecting HEK cells with the corresponding plasmids containing a hygromycin resistance, and culturing the cells for several weeks under hygromycin pressure (0,5 mg/ml) in serum-free medium. 500 mL of conditioned medium was collected in total and frozen at -20°C. The Fc-tagged proteins were affinity-purified on a protein G column, and eluted with glycine, as described⁸⁵. Nlg1-HaloTag was generously provided by Carsten Rössner. The coupling with the Halotag-Alexa488 ligand (Promega, G1002) to Nlg1-HaloTag was performed by incubating Nlg1-HaloTag with an excess (5X) of Halotag-Alexa488 ligand at 4°C under agitation overnight. Subsequently, the solution was passed through a centricon (10 kDa) to remove the excess free ligand. The Nlg1-Halo-Alexa488 was resuspended to a concentration of 0.5 mg/ml in a solution containing 10 mM Hepes and 300 mM NaCl. Aliquots of the solution were stored at -20°C after filtration. To examine the purity of the produced proteins, we ran samples of 1 μ g of each protein on SDS-PAGE and immunoblotted the proteins using anti-human Fc antibodies.

Bovine serum albumin biotinylated was purchased from Thermo fisher. Cy3-conjugated Human Fc fragment and Biotin-SP-conjugated Goat Anti Human IgG Fc was purchased from Jackson ImmunoResearch. Streptavidin, Alexa Fluor 405 or 647 conjugates were purchased from molecular probes.

Glass micropatterning with Fc-tagged synaptic proteins

Substrate micropatterning was performed in a clean room. 18 x 18 mm High Precision Microscope Cover Glasses (Marienfeld SUPERIOR Germany Cat.No. 0107032) were

first activated by a 5 min air plasma treatment (Harrick Plasma, Ithaca, NY, USA). An 18 mm, 250 μ m thick piece of Poly(dimethylsiloxane) (PDMS), with one square hole was cut in a transparent silicone film (BISCO HT-6240, Rogers Corporation Carol Stream, IL, USE) with a craft Robo Pro vinyl cutter (Graphtec, Irvine, CA, USA) and placed on the coverslip. Then the coverslips are placed in a closed chamber with 150 μ l of (3-aminopropyl) triethoxysilane (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and a desiccator (Sigma-Aldrich) for 1hr. A solution of poly (ethylene glycol) -Succinimidyl Valerate, MW 5000 (Peg-SVA, Laysan Bio, Arab, AL, USA) at 228.6 mg / ml in 10 mM carbonate buffer pH> 8, is incubated in the well for 1 h and rinsed thrice with phosphate buffered saline (PBS) without drying the surface. Micropatterning was achieved using the PRIMO system coupled to the Leonardo software (Alveole, France) and mounted on an inverted microscope (Nikon Eclipse Ti-E, Japan). The pattern chosen is a series of 5 μ m-wide parallel lines separated by 5 μ m. After alignment of the well center with the UV pattern by moving the scanning stage, a solution of photo-initiator (PLPP, Alveole, France) was incubated on the sample. The UV-activated photo-initiator molecules locally cleave the PEG chains in a UV dose dependent manner and allows for protein adsorption to the UV-exposed areas. After rinsing the PLPP solution, the well was incubated with biotinylated bovine serum albumin (BSA) diluted to 100 μ g/ml in PBS. Successive incubations were made with streptavidin-Alexa647 (FRAP) or streptavidin-Alexa405 (SPT-PALM), biotinylated anti-Fc antibody, and Purified-Fc protein (all at 50 μ g/mL in PBS) all the incubations are done at RT except for Purified-Fc protein where the incubation is done at 4°C. The BSA-biotin and the streptavidin are incubated 3 min, the biotinylated anti-Fc antibody 10min and the Purified-Fc protein overnight. Between proteins, three washes were made in PBS without drying the surface.

Cell culture and electroporation

COS-7 cells (ATCC) were cultured in FluoroBrite Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GIBCO/BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units mL⁻¹ penicillin, 100 μ g mL⁻¹ streptomycin, 1% Glutamax and 1% Sodium-Pyruvate in a 37°C-5% CO₂ atmosphere. two days before the experiments, cells were rinsed twice in warm PBS, trypsinized for 5 min, mixed in culture medium, and centrifuged for 5 min at 1,000 rpm. The pellet containing around 1M cells was suspended in 100 μ L electroporation medium, placed in a cuvette, and electroporated with 1-3 μ g of each of the following plasmids, using the Amaxa Nucleofector system (Lonza): mEos3.2-Nrx1 β , Nlg1-mEos3.2, or SynCAM1-mEos3.2 (for sptPALM); and GFP-Nrx1 β , GFP-Nrx1 β A137A, Nlg1-GFP or SynCAM1-GFP (for FRAP). For FRAP experiments on PSD-95-GFP, cells were co-electroporated with AP-NLG1 or AP-NLG1 Δ 5, together with PSD-95-GFP (either WT or point mutants H130V/H225V or H372V), in a 4:1 NLG1:PSD-95 ratio. Electroporated cells were resuspended in culture medium, plated in 12-well plates and placed back in the incubator for 36 hr. Then, cells were detached with trypsin and seeded on micropatterned glass coverslips at a concentration of 20,000 cells per coverslip, after 2 hours of incubation, rinsed to remove non-adherent cells and imaged 1-3 hrs later.

FRAP experiments and analysis

COS-7 cells expressing the different GFP-tagged proteins (Nlg1, SynCAM1, or PSD-95) were seeded for 3 hrs on Fc-tagged ligand coated micropatterned substrates in culture medium, before being mounted in Tyrode solution in an Inox chamber. Cells were observed on a Nikon TiE Eclipse inverted microscope through a 100x/1.49 oil immersion objective, using 491 nm laser light under Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF). Enrichment was quantified as the GFP level measured on Ligand-Fc coated lines divided by the level between those lines. The laser bench used for TIRF illumination has a second optical fiber output connected to an illumination device containing two x/y galvanometric scanning mirrors (ILAS, Roper Instrument) steered by MetaMorph. It allows precise spatial and temporal control of the focused laser beam at any user-selected region of interest within the sample for targeted photobleaching. Switching between the two fibers for alternating between imaging and bleaching is performed in the millisecond range using an AOTF. Oblique illumination was performed using the 491 nm laser at low power (300 μ W at the front of the objective) to image molecules in the plasma membrane close to the substrate plane. After acquiring a 10 sec baseline at a 0.5 Hz frame rate, rapid and selective photo-bleaching of 9 circular areas of diameter 10 pixels was achieved at high laser power (3mW at the front of the objective), during 560 ms. Fluorescence recovery was then recorded immediately after the bleach sequence for 5 to 20 min at a 0.5-1 Hz frame rate. Observational photobleaching was kept very low, as assessed by measuring control unbleached areas nearby. FRAP curves were obtained by computing the average intensity in the photobleached area, after background subtraction, normalization with a none photobleach region to compensate bleaching if it is necessary and normalized between 1 (baseline) and 0 (time zero after photo-bleaching).

Single Molecule Tracking (sptPALM)

Cells expressing the various mEos3.2-tagged receptors (Nlg1, Nlg1^{E584A/L585A}, or SynCAM1) were mounted in FluoroBright medium used for cell culture in an open Inox observation chamber (Life Imaging Services, Basel, Switzerland). The chamber was placed on an inverted microscope (Nikon TiE Eclipse) equipped with an EMCCD camera with 16 μ m pixel size (Evolve, Roper Scientific, Evry, France), a thermostatic box (Life Imaging Services) providing air at 37°C and an APO TIRF 100x/1.49 NA oil immersion objective. Epifluorescence imaging was done using a mercury lamp (Nikon Xcite) and appropriate filter sets (Semrock) for each fluorophore. For Alexa 405 (Excitation: FF01-379/34; Dichroic: FF-409Di03; Emission: FF01-440/40); GFP (FF02 472/30; Dichroic: FF01 495Di03; Emission: FF01 520/35), and Alexa647 (FF02 628 / Dichroic: FF 660Di02; Emission: FF01 692/40). A four-color laser bench (405, 491, 561, and 642 nm, 100 mW each; Roper Scientific) is connected through an optical fiber to the TIRF illumination arm of the microscope. Laser power was controlled through an acousto-optical tunable filter (AOTF) driven by the MetaMorph® software (Molecular Devices). Samples were excitation by TIRF laser illumination, allowing the detection of individual mEos3.2-tagged membrane receptors close to the ligand-coated glass surface. Fluorescence was collected using a FF01 676/29 nm emission

filter placed on a filter wheel (Sutter Instruments). Stacks of 4,000 consecutive frames were obtained from each cell with an integration time of 20 ms, using the Nikon perfect focus system to prevent axial drift. Images were analyzed using the PALM-Tracer program running on MetaMorph® based on wavelet segmentation for localization and simulated annealing algorithms for tracking, generously provided by JB Sibarita (IINS, Bordeaux)⁴⁵. This program allows the tracking and reconnection of localized molecules through successive images. Trajectories longer than 10 frames (200 ms) were selected. The global diffusion coefficient, *D*, was calculated for each trajectory, from linear fits of the first 4 points of the mean square displacement (MSD) function versus time. Trajectories with displacement inferior to the pointing accuracy (~50 nm in SPT-PALM conditions) and whose MSD function cannot be fitted properly are arbitrarily placed at $D = 10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Single molecule pull-down

Single molecule pull-down was performed essentially as described^{34,86}. Briefly, cleaned glass coverslips (VWR) were treated with N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane (United Chemical Technologies, #A0700), then incubated with mPEG-succinimidyl valerate (SVA) containing a 1:100 fraction of biotin PEG-SVA (both from Laysan Bio MW 5,000 Da). Coverslips were dried and stored at -20°C. Just before the experiment, coverslips were incubated with 1 μ M NeutrAvidin for 5 min (Invitrogen, A2666), followed by 10 nM biotinylated anti-GFP antibody for 15 min (ABCAM, 6658), both diluted in T50 buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH = 7.5). Two days before the experiment, HEK cells were transfected with GFP-Nrx1 β , Nlg1-GFP, or Nlg1^{E584A/L585A}-GFP using Lipofectamine (Invitrogen) in optiMEM buffer. Two hours before the experiment, cells were detached in Ca-free PBS (30 min, 37°C), then centrifuged at 3,000 rpm for 2 min. The cell pellet was dissolved in 100 μ L lysis buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 % Igepal, and protease inhibitor cocktail (Pierce). Samples were rotated for 2 hrs at 4°C to solubilize proteins, then centrifuged at 14,000 rpm for 15 min to remove aggregates. The supernatant was kept on ice and diluted 1:200 in observation solution (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 4 mM Trolox, 40 mM D-glucose, 0.03% Igepal, pH = 7.4). 100 μ L of this mix was added to glass substrates for several minutes, then rinsed out with fresh solution when the molecular density reached about 50 per field of view (256 x 256 pixels of 160 nm each = 41 x 41 μ m). Single GFP-Nrx1 β molecules were observed with a 491 nm laser under TIRF illumination on the same microscope used for SPT-PALM (Nikon TiE Eclipse equipped with the 100X/1.49 N.A. oil immersion objective). GFP-tagged molecules did not stick to a control coverslip containing no secondary anti-GFP antibody, revealing binding specificity to the GFP tag. Ten acquisition sequences of 700 frames for each condition were recorded at 30 Hz on the EMCCD camera (Evolve, Roper Scientific, Evry, France), resulting in the photobleaching of nearly all immobilized GFP-tagged molecules. Images were analyzed using MetaMorph by measuring the average fluorescence intensity in small regions drawn around individual molecules, and the number of photobleaching steps

was determined visually for more than 120 molecules per condition.

Computer simulations of sptPALM experiments using FluoSim

FluoSim is a stand-alone program written in the C++ language and installed on any personal computer running with a Windows 10 operating system. FluoSim allows for the fast calculation of thousands of single molecule positions and fluorescence intensities in parallel, within a working space defined from an imported microscopy image²⁷. Here, a COS-7 cell expressing SynCAM1-GFP spread on SynCAM1-Fc coated micropatterned stripes was taken as a reference image. The cell outlines and the regions corresponding to the SynCAM1-Fc coated stripes were manually drawn in Metamorph and imported in FluoSim as a .rgn file. This internal space was populated by 250 molecules. Those molecules are kept within the cell boundaries by rebound conditions. An individual molecule is characterized by its 2D coordinates x and y over time t , and its fluorescence intensity. The time step of the simulations ($\Delta t = 20$ ms) and the total duration of the simulations (4,000 frames = 80 sec) exactly correspond to that of an sptPALM experiment.

The diffusion coefficient of free receptors outside the micropatterned areas (D_{free}) was chosen around $0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$, based on sptPALM data on SynCAM1-mEos3.2. Although in FluoSim we can set a lower diffusion coefficient (D_{in}) for free receptors moving in adhesive zones to consider steric hindrance due to molecular crowding, we neglected this phenomenon here and chose $D_{in} = D_{out}$. A small fraction of unfitted receptors was observed (~10% with $D = 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$), which might be due to non-specific adhesion, and introduced in the program at random positions with zero diffusion coefficient.

In the micropatterned area, surface-diffusing mEos3.2-tagged receptors are allowed to bind reversibly to immobilized ligands, with first order binding and unbinding rates k_{on} and k_{off} , respectively (both in s^{-1}). Bound complexes are allowed to diffuse at a lower diffusion coefficient $D_{bound} = 0.005 \mu\text{m}^2/\text{s}$, reflecting the pointing accuracy of our detection system⁴⁶. The number of receptor binding sites is assumed to be in excess, such that the binding rate k_{on} is maintained constant throughout the simulations, i.e. it does not depend on the number of ligand-receptor complexes formed over time. We further consider a uniform distribution of ligands in the micropatterned area, consistent with a homogeneous patterning process.

Transitions between ON/OFF intensity values are set by two photo-physical parameters: the switch-on rate (k_{on}^{Fluo}) and the switch-off rate (k_{off}^{Fluo}). These rates are in units of sec^{-1} and represent the probabilities per unit of time that a molecule will switch from a state where it emits fluorescence, to a state where it does not emit fluorescence, and vice versa. We chose these rates to model the photo-switching of mEos3.2 from its green-emitting to its red-emitting forms in a typical PALM experiment. The parameter $k_{off}^{Fluo} = 3 \text{ s}^{-1}$ was set to equal the inverse of the average duration of mEos3.2 fluorescence emission in our conditions (300 ms), while the parameter k_{on}^{Fluo} was set to 1 s^{-1} , so as to yield approximately the same density of visible molecules per surface area as in the experiments ($0.1 \text{ mol}/\mu\text{m}^2$).

The initial position of a freely diffusing molecule is defined by $x(0) = x_0$ and $y(0) = y_0$, taken as random numbers to fall within the cell boundaries. At each time step, the (x, y) coordinates of each molecule are incremented by the distances $(\Delta x, \Delta y)$, which depend on whether the molecule is free or bound to a ligand molecule on a micropattern. If the molecule is free, it follows a random walk with diffusion coefficient D_{free} . The positions $x(t)$ and $y(t)$ are then incremented at each time step by $n_x(2D_{free}\Delta t)^{1/2}$ and $n_y(2D_{free}\Delta t)^{1/2}$, respectively, where n_x and n_y are random numbers generated from a normal distribution with 0 mean and variance unity, to account for the stochastic nature of diffusion. This ensures that the mean square displacement stays proportional to time, i.e. $\langle x^2 + y^2 \rangle = 4D_{out}t$. When the adhesion molecule reaches a micropatterned area, it is allowed to bind to its immobilized ligand only if the probability of coupling in this time interval, $P_{coupl} = k_{on}\Delta t$, is greater than a random number N between 0 and 1 generated from a uniform distribution. If this is not the case, the molecule continues to diffuse until both conditions are met, i.e. the molecule remains in the micropatterned area and the probability of binding is greater than the random number N , chosen different at each time increment. Upon binding, the adhesive complex is set to diffuse with a slow diffusion coefficient D_{bound} , thus the positions $x(t)$ and $y(t)$ are incremented by $n_x(2D_{bound}\Delta t)^{1/2}$ and $n_y(2D_{bound}\Delta t)^{1/2}$, respectively. The complex stays bound until the probability for dissociation $P_{detach} = k_{off}\Delta t$, exceeds another random number N' .

A relatively short equilibration phase of 2,000 frames was run under FluoSim until the molecular system reached steady state, both in terms of binding kinetics and photophysics. Sequences of 4,000 frames was generated with different sets of k_{on} and k_{off} , always keeping a ratio $k_{on}/k_{off} = 2$, which roughly determines an enrichment value $E = 3$ ²⁷. The (x, y) positions of individual molecules emitting fluorescence were stored as .trc files. Under the SPT Analysis menu of FluoSim, we first performed a global analysis, where trajectories longer than 10 frames were selected and the diffusion coefficient, D , was calculated for each trajectory, from linear fits of the first 4 points of the MSD function versus time. In a second analysis, trajectories longer than 30 frames (1 sec) were selected and the instantaneous diffusion coefficient D_{inst} was calculated over time by linear fitting of a sliding MSD window of 9 frames. This allowed the analysis of the free to bound transitions.

References

1. Südhof, T. C. Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell* **171**, 745–769 (2017).
2. Bemben, M. A., Shipman, S. L., Nicoll, R. A. & Roche, K. W. The cellular and molecular landscape of neuroligins. *Trends in neurosciences* **38**, 496–505 (2015).
3. de Wit, J., Hong, W., Luo, L. & Ghosh, A. Role of Leucine-Rich Repeat Proteins in the Development and Function of Neural Circuits. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **27**, 697–729 (2011).
4. Biederer, T. et al. SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* **297**, 1525–31 (2002).

5. Bourgeron, T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience* **16**, 551–563 (2015).
6. Chamma, I. & Thoumine, O. Dynamics, nanoscale organization, and function of synaptic adhesion molecules. *Molecular and Cellular Neuroscience* **91**, 95–107 (2018).
7. Neupert, C. *et al.* Regulated Dynamic Trafficking of Neurexins Inside and Outside of Synaptic Terminals. *Journal of Neuroscience* **35**, 13629–13647 (2015).
8. Fu, Y. & Huang, Z. J. Differential dynamics and activity-dependent regulation of alpha- and beta-neurexins at developing GABAergic synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 22699–22704 (2010).
9. DeWit, J. *et al.* LRRTM2 Interacts with Neurexin1 and Regulates Excitatory Synapse Formation. *Neuron* **64**, 799–806 (2009).
10. Eleghert, J. *et al.* Structural Mechanism for Modulation of Synaptic Neuroligin-Neurexin Signaling by MDGA Proteins. *Neuron* **95**, 896–913.e10 (2017).
11. Loh, K. H. *et al.* Proteomic Analysis of Unbounded Cellular Compartments: Synaptic Clefts. *Cell* **166**, 1295–1307.e21 (2016).
12. Araç, D. *et al.* Structures of Neuroligin-1 and the Neuroligin-1/Neurexin-1 β Complex Reveal Specific Protein-Protein and Protein-Ca²⁺ Interactions. *Neuron* **56**, 992–1003 (2007).
13. Boucard, A. a, Chubykin, A. a, Comoletti, D., Taylor, P. & Südhof, T. C. A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron* **48**, 229–36 (2005).
14. Comoletti, D. *et al.* Characterization of the Interaction of a Recombinant Soluble Neuroligin-1 with Neurexin-1 β . *Journal of Biological Chemistry* **278**, 50497–50505 (2003).
15. Leone, P. *et al.* Structural insights into the exquisite selectivity of neurexin/neuroligin synaptic interactions. *The EMBO journal* **29**, 2461–71 (2010).
16. Anderson, R. G. W. & Jacobson, K. A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains. *Science* **296**, 1821–1825 (2002).
17. Palsdottir, H. & Hunte, C. Lipids in membrane protein structures. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1666**, 2–18 (2004).
18. Wu, Y., Honig, B. & Ben-Shaul, A. Theory and simulations of adhesion receptor dimerization on membrane surfaces. *Biophysical Journal* **104**, 1221–1229 (2013).
19. Zarnitsyna, V. & Zhu, C. T cell triggering: insights from 2D kinetics analysis of molecular interactions. *Physical Biology* **9**, 045005 (2012).
20. Arumugam, S. & Bassereau, P. Membrane nanodomains: contribution of curvature and interaction with proteins and cytoskeleton. *Essays in Biochemistry* **57**, 109–119 (2015).
21. Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R. & Serafini, T. Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* **101**, 657–69 (2000).
22. Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S. X., Linhoff, M. W. & Craig, A. M. Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* **119**, 1013–1026 (2004).
23. Ko, J. *et al.* Neuroligin-1 performs neurexin-dependent and neurexin-independent functions in synapse validation. *The EMBO journal* **28**, 3244–55 (2009).
24. Dean, C. *et al.* Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nature Neuroscience* **6**, 708–716 (2003).
25. Heine, M. *et al.* Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroligin contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20947–52 (2008).
26. Giannone, G. *et al.* Neurexin-1 β Binding to Neuroligin-1 Triggers the Preferential Recruitment of PSD-95 versus Gephyrin through Tyrosine Phosphorylation of Neuroligin-1. *Cell Reports* **3**, 1996–2007 (2013).
27. Lagardère, M., Chamma, I., Bouilhol, E., Nikolski, M. & Thoumine, O. FluoSim: simulator of single molecule dynamics for fluorescence live-cell and super-resolution imaging of membrane proteins. *Scientific Reports* **10**, 19954 (2020).
28. Löchte, S., Waichman, S., Beutel, O., You, C. & Piehler, J. Live cell micropatterning reveals the dynamics of signaling complexes at the plasma membrane. *Journal of Cell Biology* **207**, 407–418 (2014).
29. Czöndör, K. *et al.* Micropatterned substrates coated with neuronal adhesion molecules for high-content study of synapse formation. *Nature communications* **4**, 2252 (2013).
30. Schwarzenbacher, M. *et al.* Micropatterning for quantitative analysis of protein-protein interactions in living cells. *Nature Methods* **5**, 1053–1060 (2008).
31. Groves, J. T. *et al.* Spatially modulated ephrinA1:EphA2 signaling increases local contractility and global focal adhesion dynamics to promote cell motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, E5696–E5705 (2018).
32. Motsch, V., Brameshuber, M., Baumgart, F., Schütz, G. J. & Sevcsik, E. A micropatterning platform for quantifying interaction kinetics between the T cell receptor and an intracellular binding protein. *Scientific Reports* **9**, 3288 (2019).
33. Strale, P.-O. *et al.* Multiprotein Printing by Light-Induced Molecular Adsorption. *Advanced materials* **28**, 2024–9 (2016).
34. Jain, A. *et al.* Probing cellular protein complexes using single-molecule pull-down. *Nature* **473**, 484–488 (2011).
35. Reissner, C., Klose, M., Fairless, R. & Missler, M. Mutational analysis of the neurexin/neuroligin complex reveals essential and regulatory components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 15124–15129 (2008).
36. Sprague, B. L., Pego, R. L., Stavreva, D. A. & McNally, J. G. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical Journal* **86**, 3473–3495 (2004).
37. Sprague, B. L. & McNally, J. G. FRAP analysis of binding: Proper and fitting. *Trends in Cell Biology* **15**, 84–91 (2005).
38. Soumpasis, D. M. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal* **41**, 95–97 (1983).
39. Reissner, C., Klose, M., Fairless, R. & Missler, M. Mutational analysis of the neurexin/neuroligin complex reveals essential and regulatory components. *PNAS* **105**, 15124–15129 (2008).

40. Fabrichny, I. P. *et al.* Structural Analysis of the Synaptic Protein Neuroligin and Its β -Neurexin Complex: Determinants for Folding and Cell Adhesion. *Neuron* **56**, 979–991 (2007).
41. Chen, X., Liu, H., Shim, A. H. R., Focia, P. J. & He, X. Structural basis for synaptic adhesion mediated by neuroligin-neurexin interactions. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**, 50–56 (2008).
42. Manley, S. *et al.* High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat Methods* **5**, 155–157 (2008).
43. Garcia, M. *et al.* Two-tiered coupling between flowing actin and immobilized N-cadherin/catenin complexes in neuronal growth cones. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 6997–7002 (2015).
44. Renner, M. L., Cognet, L., Lounis, B., Triller, A. & Choquet, D. The excitatory postsynaptic density is a size exclusion diffusion environment. *Neuropharmacology* **56**, 30–36 (2009).
45. Izeddin, I. *et al.* Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Optics express* **20**, 2081–95 (2012).
46. Rossier, O. *et al.* Integrins β 1 and β 3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nature Cell Biology* **14**, 1057–1067 (2012).
47. Vink, J. N. A., Brouns, S. J. J. & Hohlbein, J. Extracting Transition Rates in Particle Tracking Using Analytical Diffusion Distribution Analysis. *Biophysical Journal* **119**, 1970–1983 (2020).
48. Michalet, X. Mean Square Displacement Analysis of Single-Particle Trajectories with Localization Error: Brownian Motion in Isotropic Medium. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **82**, 041914 (2010).
49. Akimoto, T. & Yamamoto, E. Detection of transition times from single-particle-tracking trajectories. *Phys. Rev. E* **96**, 052138 (2017).
50. Roosen-Runge, F. *et al.* Protein self-diffusion in crowded solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 11815–11820 (2011).
51. Zimmerman, S. B. & Minton, A. P. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**, 27–65 (1993).
52. Erbaş, A., Olvera de la Cruz, M. & Marko, J. F. Receptor-Ligand Rebinding Kinetics in Confinement. *Biophysical Journal* **116**, 1609–1624 (2019).
53. Lagerholm, B. C. & Thompson, N. L. Theory for Ligand Rebinding at Cell Membrane Surfaces. *Biophysical Journal* **74**, 1215–1228 (1998).
54. Vauquelin, G. & Charlton, S. J. Long-lasting target binding and rebinding as mechanisms to prolong in vivo drug action. *Br J Pharmacol* **161**, 488–508 (2010).
55. Shipman, S. L. & Nicoll, R. A. Dimerization of postsynaptic neuroligin drives synaptic assembly via transsynaptic clustering of neurexin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 19432–7 (2012).
56. Saint-Michel, E., Giannone, G., Choquet, D. & Thoumine, O. Neurexin/neuroligin interaction kinetics characterized by counting single cell-surface attached quantum dots. *Biophysical Journal* **97**, (2009).
57. Irie, M. *et al.* Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* **277**, 1511–5 (1997).
58. Mondin, M. *et al.* Neurexin-neuroligin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds. *The Journal of neuroscience* **31**, 13500–15 (2011).
59. Letellier, M. *et al.* A unique intracellular tyrosine in neuroligin-1 regulates AMPA receptor recruitment during synapse differentiation and potentiation. *Nature communications* **9**, 3979 (2018).
60. Nam, C. I. & Chen, L. Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 6137–6142 (2005).
61. Schnell, E. *et al.* Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 13902–7 (2002).
62. Hafner, A. S. *et al.* Lengthening of the stargazin cytoplasmic tail increases synaptic transmission by promoting interaction to deeper domains of PSD-95. *Neuron* **86**, 475–489 (2015).
63. Dong, M. *et al.* Spatiomechanical Modulation of EphB4-Ephrin-B2 Signaling in Neural Stem Cell Differentiation. *Biophysical Journal* **115**, 865–873 (2018).
64. Ozgul, S. *et al.* An ELISA-Based Screening Platform for Ligand-Receptor Discovery. *Methods in Enzymology* **615**, 453–475 (2019).
65. Ito, T. *et al.* Quantitative Analysis of Interaction Between CADM1 and Its Binding Cell-Surface Proteins Using Surface Plasmon Resonance Imaging. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, (2018).
66. Elegheert, J. *et al.* Structural Mechanism for Modulation of Synaptic Neuroligin-Neurexin Signaling by MDGA Proteins. *Neuron* **95**, 896–913.e10 (2017).
67. Zeng, M., Ye, F., Xu, J. & Zhang, M. PDZ Ligand Binding-Induced Conformational Coupling of the PDZ-SH3-GK Tandems in PSD-95 Family MAGUKs. *Journal of Molecular Biology* **430**, 69–86 (2018).
68. Perez de Arce, K. *et al.* Topographic Mapping of the Synaptic Cleft into Adhesive Nanodomains. *Neuron* **88**, 1165–1172 (2015).
69. Chamma, I. *et al.* Mapping the dynamics and nanoscale organization of synaptic adhesion proteins using monomeric streptavidin. *Nature communications* **7**, 10773 (2016).
70. Trotter, J. H. *et al.* Synaptic neurexin-1 assembles into dynamically regulated active zone nanoclusters. *The Journal of Cell Biology* **218**, 2677–2698 (2019).
71. Klatt, O. *et al.* Endogenous β -neurexins on axons and within synapses show regulated dynamic behavior. *Cell Reports* **35**, 109266 (2021).
72. Chamma, I., Levet, F., Sibarita, J.-B., Sainlos, M. & Thoumine, O. Nanoscale organization of synaptic adhesion proteins revealed by single-molecule localization microscopy. *Neurophotonics* **3**, 041810 (2016).
73. Peixoto, R. T. *et al.* Transsynaptic signaling by activity-dependent cleavage of neuroligin-1. *Neuron* **76**, 396–409 (2012).
74. Suzuki, K. *et al.* Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* **76**, 410–22 (2012).
75. Mukherjee, K. *et al.* CASK Functions as a Mg²⁺-Independent Neurexin Kinase. *Cell* **133**, 328–339 (2008).
76. LaConte, L. E. W. *et al.* CASK stabilizes neurexin and links it to liprin- α in a neuronal activity-dependent manner. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 3599–3621 (2016).

77. Lagardère, M., Drouet, A., Sainlos, M. & Thoumine, O. High-Resolution Fluorescence Imaging Combined With Computer Simulations to Quantitate Surface Dynamics and Nanoscale Organization of Neuroligin-1 at Synapses. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* **14**, 835427 (2022).
78. Xing, G. *et al.* Neurexin–neuroligin 1 regulates synaptic morphology and functions via the WAVE regulatory complex in *Drosophila* neuromuscular junction. *eLife* **7**, 1–23 (2018).
79. Cheadle, L. & Biederer, T. The novel synaptogenic protein Farp1 links postsynaptic cytoskeletal dynamics and transsynaptic organization. *The Journal of Cell Biology* **199**, 985–1001 (2012).
80. Klatt, O. *et al.* Endogenous β -neurexins on axons and within synapses show regulated dynamic behavior. *Cell Reports* **35**, 109266 (2021).
81. Liu, D. S., Loh, K. H., Lam, S. S., White, K. A. & Ting, A. Y. Imaging Trans-Cellular Neurexin-Neuroligin Interactions by Enzymatic Probe Ligation. *PLoS ONE* **8**, e52823 (2013).
82. Sainlos, M. *et al.* Biomimetic divalent ligands for the acute disruption of synaptic AMPAR stabilization. *Nat Chem Biol* **7**, 81–91 (2011).
83. Letellier, M., Lagardère, M., Tessier, B., Janovjak, H. & Thoumine, O. Optogenetic control of excitatory post-synaptic differentiation through neuroligin-1 tyrosine phosphorylation. *eLife* **9**, e52027.
84. Saint-Michel, E., Giannone, G., Choquet, D. & Thoumine, O. Neurexin/Neuroligin Interaction Kinetics Characterized by Counting Single Cell-Surface Attached Quantum Dots. *Biophys J* **97**, 480–489 (2009).
85. Mondin, M., Tessier, B. & Thoumine, O. Assembly of synapses: biomimetic assays to control neurexin/neuroligin interactions at the neuronal surface. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.] Chapter 2*, (2013).
86. Vafabakhsh, R., Levitz, J. & Isacoff, E. Y. Conformational dynamics of a class C G-protein-coupled receptor. *Nature* **524**, 497–501 (2015).

Supplemental figure

Figure S1. Quantitative micro-photopatterning of synaptic adhesion proteins

(A) Epifluorescence images of the micro-patterned region coated with BSA-biotin and streptavidin-Alexa647, then with biotinylated anti-Fc antibody and Fc-Cy3. (B) Relationship between UV laser dose and fluorescence intensity of micropatterned streptavidin-A647 and Fc-Cy3. Note the saturation in grafted Fc-Cy3 at 600 mJ/mm². (C) Anti-Fc immunoblot of the various purified Fc-tagged proteins used in this study (Nr_x1 β , SynCAM1, and human Fc alone as a control).

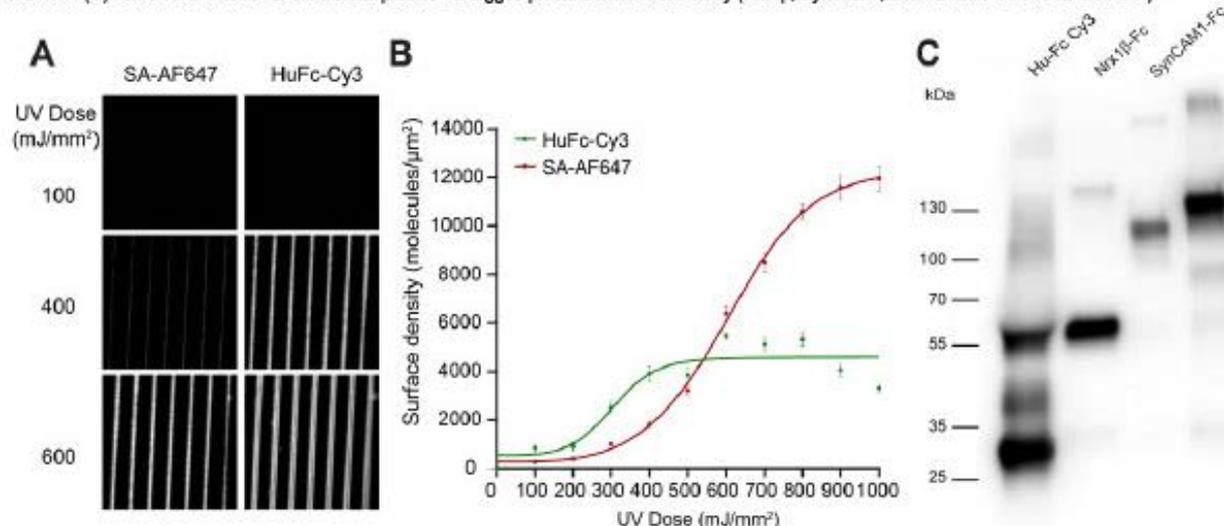


Figure S2. FRAP experiments on soluble Nlg1-HaloTag accumulated at Nr_x1 β -Fc patterns

(A, B) Purified Nlg1-HaloTag-A488 (green) binds to micropatterned lines coated with dimeric Nr_x1 β -Fc (red), but not to Fc alone. (C) FRAP curves Nlg1-HaloTag-A488 on Nr_x1 β -Fc patter.

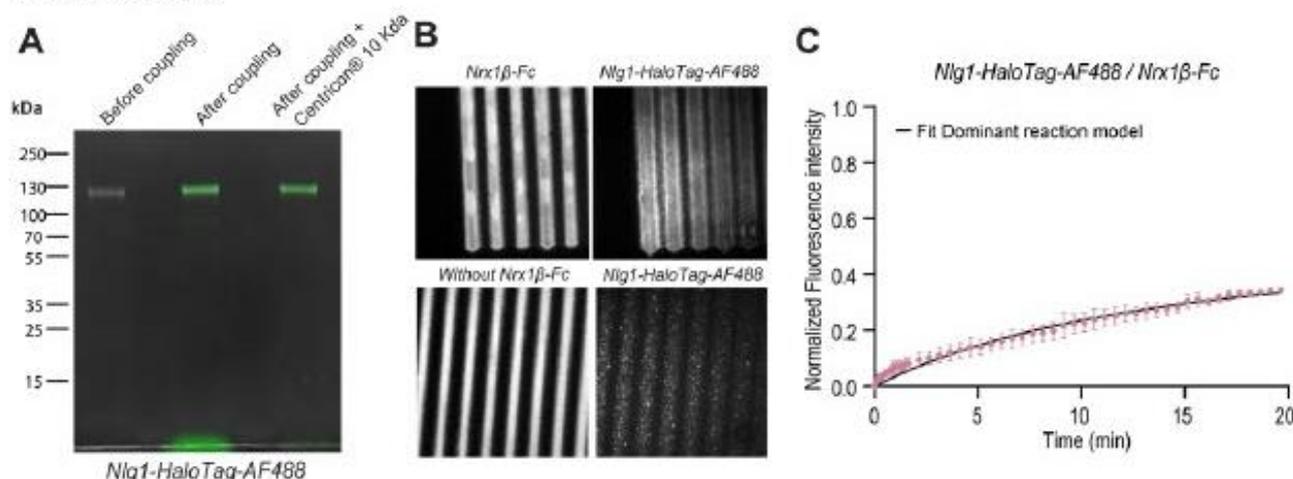


Figure S3. Computer simulations reveal the impact of fast ligand-receptor interaction kinetics on receptor diffusion

(A) Simulated sptPALM experiments within an imported cellular geometry, where stripes (delimited by red lines) represent micropatterned areas coated with ligands. The photophysics coefficients are chosen to mimic actual sptPALM experiments. Freely diffusing receptors ($D_{free} = 0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$) are allowed to bind reversibly to immobilized ligands with different kinetic rates. Bound receptors are set to diffuse more slowly ($D_{bound} = 0.005 \mu\text{m}^2/\text{s}$). (B) Average curve of the average MSD of all trajectories by cells on (circle) and out (diamond) the pattern area. Dots: experimental values Line: Linear fit of the MSD curve (C) Impact of ligand-receptor kinetics on receptor diffusion. The kinetic rate k_{on} was varied between 0 and 10 s^{-1} while the ratio k_{on}/k_{off} was kept constant ($= 2$), and the distribution of the mean receptor diffusion coefficient was computed for 250 molecules per condition. When ligand-receptor interaction kinetics is slow (e.g. $k_{on} = 2 \text{ s}^{-1}$), there is a clear separation between the peak of mobile receptors ($D_{free} = 0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$) and the peak of bound receptors ($D_{bound} = 0.005 \mu\text{m}^2/\text{s}$). When the ligand-receptor interaction kinetics becomes faster (e.g. $k_{on} = 10 \text{ s}^{-1}$), a population of receptors appears with an effective diffusion coefficient D_{eff} between 0.01 and $0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. (D) Graph showing the instantaneous diffusion coefficient $D_{instant}$ for several simulated trajectories greater than 50 frames (1 sec) located either outside or inside ligand-coated stripes, respectively. Note the variations of $D_{instant}$ around the mean value $D_{free} = 0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for molecules outside ligand-coated stripes, and the sharp transitions from high to low diffusion for molecules inside ligand-coated stripes, that characterize free and bound states, respectively. The kinetic rates in these simulations are $k_{on} = 10 \text{ s}^{-1}$ and $k_{off} = 5 \text{ s}^{-1}$. (E) Distribution of mean association (k_{on}) and dissociation rate (k_{off}) measure in transition observed on simulation $k_{on} = 10 \text{ s}^{-1}$ and $k_{off} = 5 \text{ s}^{-1}$. **** $P < 0.0001$ by 1way Anova multiple comparisons. (F) Mean diffusion measured by cell during the event characterize as free or bound outside and inside the pattern. *** $P = 0.0002$, **** $P < 0.0001$ by paired t-test. Statistics given as (number of replication): 6

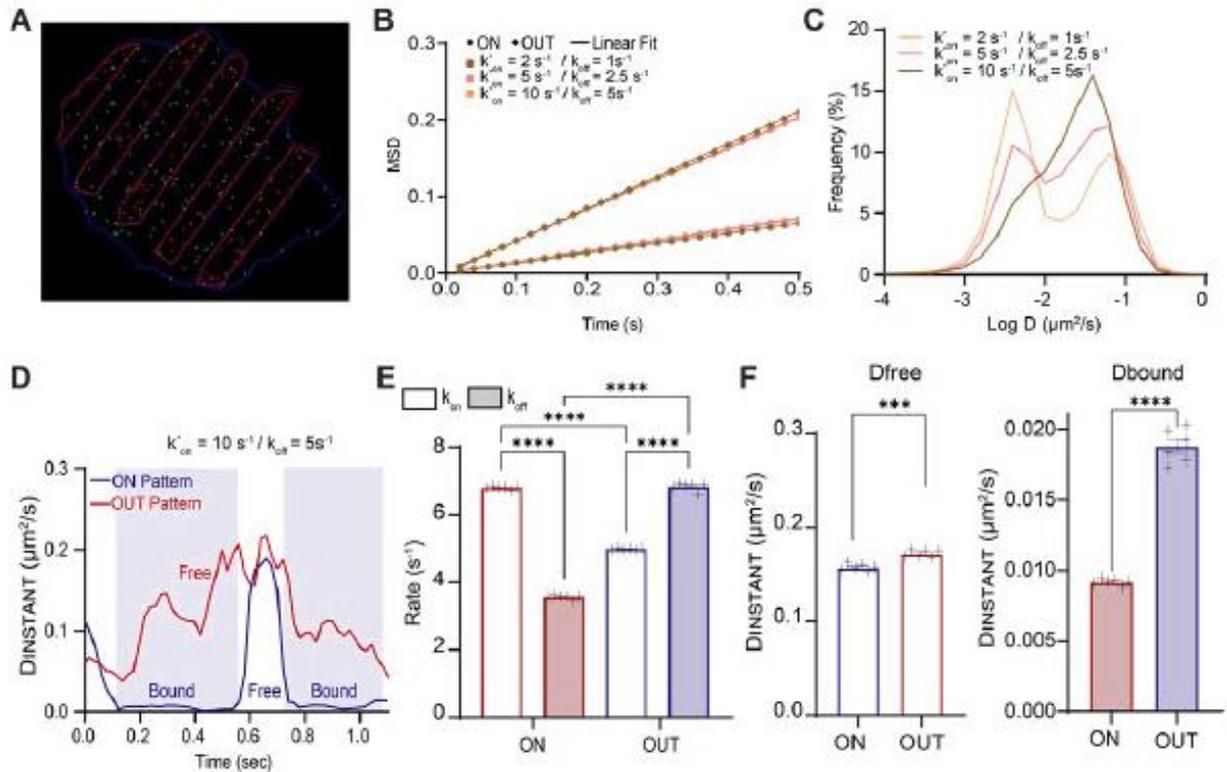


Figure S4. Effect of ligand density on receptor diffusion

(A) Epifluorescence image of micropatterns coated with streptavidin-Alexa405 and $Nrx1\beta$ -Fc and corresponding TIRF image of a COS cell expressing Nlg1-mEos (green emitted form). (B) Trajectories of Nlg1-mEos3.2 inside and outside $Nrx1\beta$ -Fc coated micropatterns for each density, with color code for diffusion coefficient (red = fast, blue = slow diffusion). (C) Average curve of the average MSD of all trajectories by cells on (blue) and out (red) the pattern area. **Dots**; experiment values **Line**; Linear fit of the MSD curve (D) Graph of the bound fraction versus the level of fluorescent streptavidin. (E) Graph of the diffusion extract from linear of the MSD curve versus the level of fluorescent streptavidin.

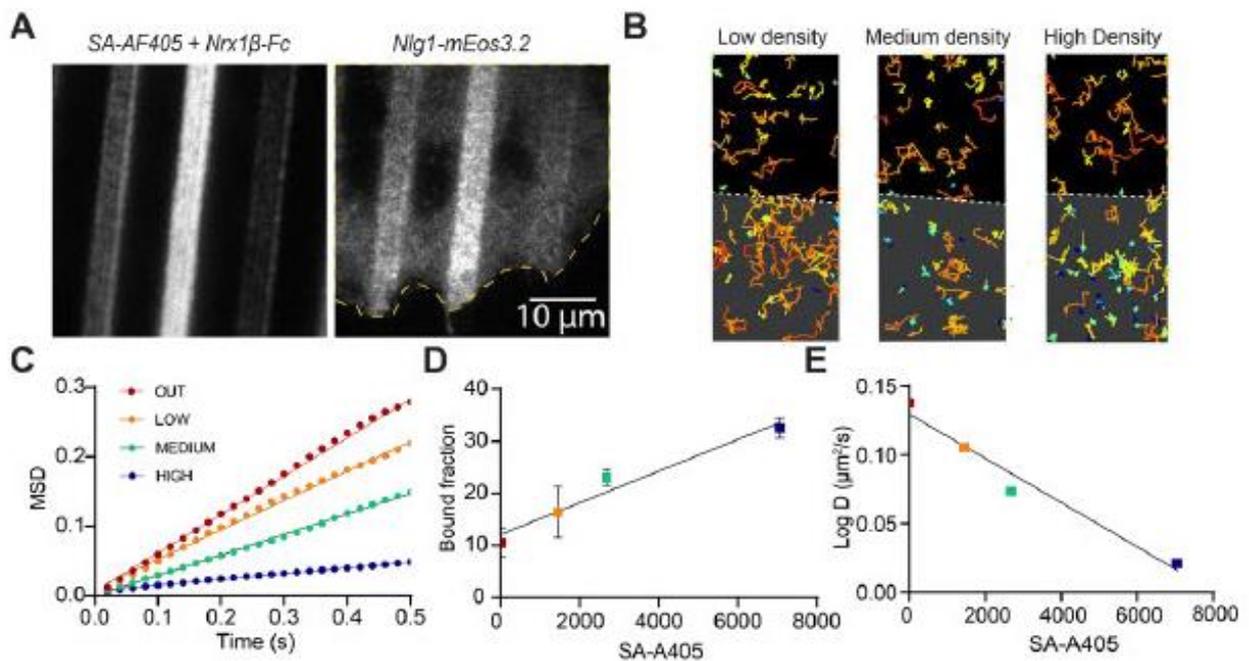
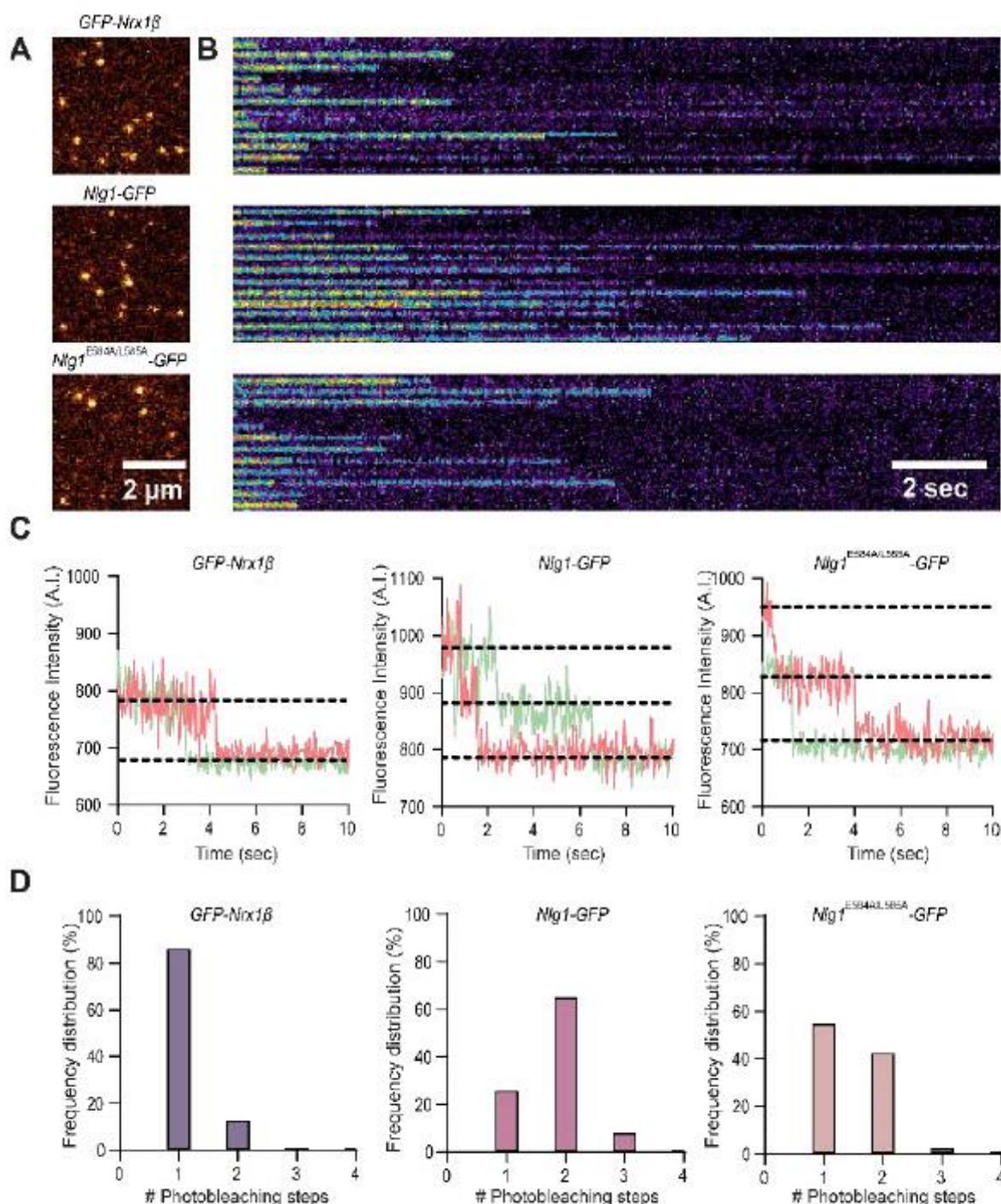


Figure S6. Quantification of the photo-bleaching steps of GFP-Nrx1 β and Nlg1-GFP by single molecule pull-down

HEK293T cells expressing GFP-Nrx1 β , Nlg1^{WT}-GFP, or Nlg1^{E504A/L585A}-GFP were lysed and the diluted cell lysates were incubated on glass coverslips coated sequentially with PEG-biotin, neutravidin, and biotinylated anti-GFP antibody, resulting in the binding of individual GFP-tagged membrane molecules. Samples were illuminated with a 481-nm laser in TIRF mode for 20 sec (500 frames, 40 ms exposure), a time after which all molecules were photobleached. (A) Representative images of the first frame of the sequence for the three conditions (GFP-Nrx1 β , Nlg1^{WT}-GFP, and Nlg1^{E504A/L585A}-GFP). (B) Kymographs showing the fluorescence intensity of 12 independent molecules over time, for each condition. (C) Graphs showing the fluorescence intensity over time for a few individual molecules per condition. Note the sharp photobleaching events that occur as one step (GFP-Nrx1 β) or as two steps (for Nlg1-GFP). The Nlg1^{E504A/L585A}-GFP mutant exhibits both one-step and two-step photobleaching events. Dashed lines are guides for the eye to show the three fluorescence levels (bottom line = camera background noise, middle line = one GFP molecule, upper line = two GFP molecules). (D) Histograms showing the number of photobleaching steps quantified for 120-130 molecules per condition.



1.1.1 Détails des analyses cinétiques

Dans l'article, les diverses analyses cinétiques utilisées en FRAP et en SPT sont présentées de manière succincte. Cependant, elles sont basées sur des analyses complexes et globalement peu utilisées par les biologistes, car elles vont au-delà des analyses de base. Cette section complémentaire de l'article vise à résumer l'état de notre compréhension du sujet, ainsi que les travaux que nous avons consultés concernant l'analyse des paramètres cinétiques en SPT-PALM et en FRAP.

1.1.1.1 Analyse des trajectoires de SPT-PALM

L'analyse des trajectoires de molécules uniques est importante pour comprendre la cinétique des biomolécules. L'étude du coefficient de diffusion permet de distinguer si une molécule diffuse librement, ou au sein d'un complexe, ou si elle est ralentie à cause d'interaction ou de son environnement.

Une fois la trajectoire de chaque molécule unique reconstruite (III.6.2. Analyse du suivi de molécule unique), le coefficient de diffusion apparent de chaque molécule est déterminée en ajustant la courbe de l'écart quadratique moyen (Kusumi et al., 1993; Saxton & Jacobson, 1997). Le MSD (*mean square displacement*) s'apparente à l'aire (r^2) explorée par la molécule à chaque point de temps (t). Pour tracer la courbe de l'écart quadratique moyen (Figure 44.A), il faut tracer la moyenne de l'aire parcouru (r^2), pour tous les points de temps de la trajectoire (t), et ceux pour chaque décalage temporelle Δt ($\Delta t = t, 2t, 3t, 4t...$).

L'analyse des courbes de MSD par trajectoire permet de donner des informations sur le mode de diffusion. La diffusion normale est équivalente à de la diffusion libre caractéristique d'un mouvement brownien, tandis que la diffusion anormale implique une diffusion dirigée ou

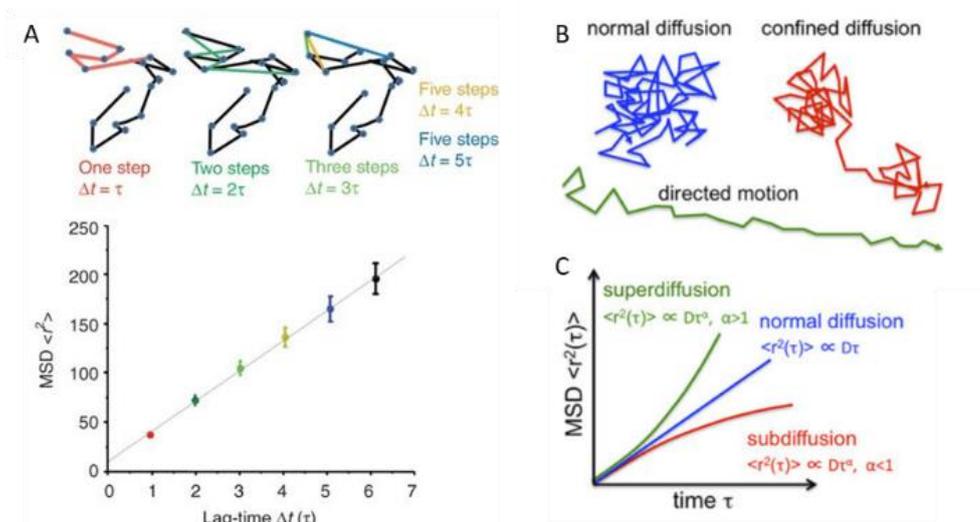


Figure 44. MSD et coefficient de diffusion

(A) Représentation schématique de la mesure de la moyenne des distances parcourue (r^2) pour chaque décalage temporelle (Δt). Exemple de courbe de MSD (B) Exemple de trajectoires types correspondant aux différents types de diffusion (C) Courbe de MSD type en fonction des différents types de diffusion.

Source : Kapanidis et al., 2018 et Ruthardt et al., 2011

confinée (Figure 44.B) (Kapanidis et al., 2018). Dans le cadre d'une diffusion 2D normale, l'ajustement de la courbe de MSD est linéaire ($MSD = 4Dt$) et la pente de la courbe permet d'estimer le coefficient de diffusion (Figure 44.C). Cette analyse est plus complexe pour les diffusions anormales, avec une relation $MSD = 4Dt^\alpha$ (Figure 44.C). Un coefficient alpha supérieur à 1 indique un régime de super diffusion lié à une diffusion dirigée, comme dans le cadre du transport moléculaire par exemple. Lorsque alpha est inférieur à 1, cela indique une subdiffusion due à des encombrements stériques ou spatiaux, à l'intégration dans un complexe, ou à des interactions ponctuelles.

Cependant, lorsque les molécules présentent au sein d'une trajectoire des comportements complexes, mêlant différents modes de diffusion mais également des événements de liaisons, l'analyse des trajectoires devient plus complexe et des analyses telles que le déplacement quadratique moyen et la détermination du coefficient de diffusion ne sont plus suffisantes. En effet, la présence de multiples transitions au sein des trajectoires entraîne la variation de la distribution des coefficients de diffusion (Figure 45 A-C). De nombreux facteurs peuvent induire ce type de comportement complexe (Montiel et al., 2006). Par exemple, la présence de structures membranaires telles que les complexes lipidiques, des encombrements stériques ou spatiaux, ainsi que des interactions avec des composants intracellulaires peut impacter la diffusion de la protéine.

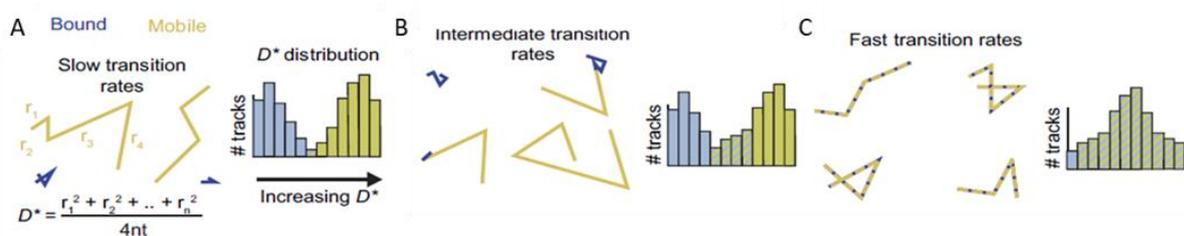


Figure 45. Effet des taux de transition sur la distribution des coefficients de diffusion

Simulation de l'impact des taux de transition sur les distributions du coefficient de diffusion apparent (D^*). Trois taux de transition sont évalués : lent (A), intermédiaire (B) et rapide (C) par rapport à la fréquence d'images. Une fusion des distributions liées et non liées apparaît en présence de taux de transition élevés (C), entraînant une diffusion apparente intermédiaire.

Source : Vink et al., 2020

Pour une meilleure lecture de potentielle variation de la diffusion au cours du temps, il est également possible de réaliser une mesure qui, cette fois-ci, ne sera pas un unique coefficient de diffusion apparent, mais plusieurs coefficients de diffusion au cours du temps, donc tout au long de la trajectoire. On nomme cela des coefficients de diffusion instantanée ($D_{instant}$) (Michalet, 2010; Pinaud et al., 2009). Pour chaque point de la trajectoire, une fenêtre de N points centrée autour de la position est sélectionnée afin de créer une sous-trajectoire, dont le $D_{instant}$ pourra être défini en ajustant la courbe de MSD de cette sous-trajectoire. Cela est répété pour tous les points de la trajectoire. Plus la valeur de N est faible, plus le coefficient de diffusion reflète l'instant, mais avec une précision plus faible pour les mesures de MSD (Michalet, 2010), il est donc nécessaire de trouver le juste équilibre entre ces deux paramètres.

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

Dans le cadre de notre projet, nous nous sommes particulièrement intéressés aux études ayant cherché à distinguer les périodes où la molécule est libre des périodes où la molécule est liée. Ces études tentent de démontrer qu'il est possible d'estimer les paramètres cinétiques d'interactions (k_{on} , k_{off}) à partir de ces trajectoires individuelles. En effet, dans le cas d'interactions faibles et très labiles, il est possible, selon la longueur des trajectoires, d'observer des transitions entre l'état libre et l'état lié.

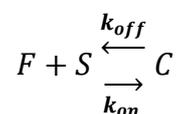
Dans l'article de Marianne Renner (M. Renner et al., 2017), un coefficient (P_c = packing coefficient) permettant d'estimer le degré de liberté de mouvement de la molécule au cours du temps est utilisé. Ce coefficient prend en compte la taille du compartiment dans lequel la molécule diffuse, ce qui est totalement pertinent pour les études en synapse. Cependant, ce paramètre pourrait également être utilisé pour déterminer les paramètres cinétiques si les périodes confinées sont dues à une interaction. Dans cet article les trajectoires étudiées sont longues car elles ont été obtenues avec des QDs, qui ont un faible taux de photoblanchiment, mais peuvent, en raison de leur taille, avoir un impact sur la diffusion, surtout dans des compartiments étroits. La longueur des trajectoires favorise l'observation de transitions complètes. Cependant, pour les études utilisant des protéines fluorescentes, les trajectoires sont souvent beaucoup plus courtes.

D'autres modèles plus complexes ont été développés afin d'extraire les phases de transitions pour les trajectoires courtes. Le défi de ce type d'analyse, comparé aux travaux sur des trajectoires longues, est de parvenir à combiner correctement les informations d'une multitude de courtes trajectoires, avec des transitions partielles. Nous pouvons citer en exemple deux types d'analyses : l'une basée sur une méthode bayésiennes variationnelles et des modèles de Markov (Persson et al., 2013), et d'autre méthodes analytique mettant en œuvre l'estimation maximale de vraisemblance et les probabilités (Akimoto & Yamamoto, 2017; Vink et al., 2020).

1.1.1.2 Analyse des retours de FRAP

L'analyse des courbes de FRAP est la partie la plus complexe et qui nous a pris le plus de temps à comprendre, mais ce travail nous a permis de définir les bons modèles analytiques à utiliser puis de les appliquer.

Lorsqu'on s'intéresse à une interaction, on peut décrire des populations distinctes : une population de molécules diffusives, également appelées libres ou mobiles (F), qui, en présence de sites de liaison vacants (S), vont former une population de molécules piégées ou liées (C). Les transitions entre ces deux états sont régulées par les constantes d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}). En plus de ces deux constantes, il faut également prendre en compte la diffusion des molécules libres ainsi que les concentrations en molécules libres (f), en sites de liaison non occupés (s) et en complexes (c).



Cette réaction est médiée par des équations complexes qui peuvent être simplifiées en admettant plusieurs critères. Le premier critère est que la réaction est à l'équilibre lors du photoblanchiment, ce qui signifie que les concentrations de f, s et c sont à l'équilibre (F_{eq}, C_{eq}, S_{eq}). Cela nous permet de définir une pseudo-constante de première ordre k*_{on}, qui équivaut donc à k*_{on} = k_{on} x S_{eq}. La deuxième hypothèse simplificatrice est que les sites de liaison font partie d'un complexe immobile et de taille importante, du moins pendant la durée de la mesure du FRAP. Cette hypothèse est particulièrement valable dans notre modèle d'impression protéique, où le partenaire de la molécule observée est fixé sur le motif. Le deuxième critère est la circularité de la zone de photoblanchiment, qui est la géométrie la plus couramment utilisée par les biologistes. D'autres critères incluent la taille réduite de ces zones de FRAP par rapport au compartiment fluorescent, ainsi que l'observation d'une diffusion en 2D plutôt qu'en 3D dans le plan de focalisation.

Toutes ces simplifications permettent de dériver des équations de bases complexes pour obtenir une solution universelle pour les mesures de FRAP pour des interactions avec ou sans diffusion et avec une seule liaison, dans le cadre d'une géométrie de photoblanchiment circulaire (B. L. Sprague et al., 2004) (Figure 46).

$$\overline{f_{rap}}(p) = \frac{1}{p} - \frac{F_{eq}}{p} (1 - 2K_1(qw)I_1(qw)) \times \left(1 + \frac{k_{on}^*}{p + k_{off}}\right) - \frac{C_{eq}}{p + k_{off}}, \quad \text{where } q^2 = \left(\frac{p}{D_f}\right) \left(1 + \frac{k_{on}^*}{p + k_{off}}\right)$$

Figure 46. Equation de réaction-diffusion générique par transformé de Laplace

P est la variable de Laplace inversé pour obtenir le temps, w et le rayon de la zone de photoblanchiment et K1 et I1 sont les fonctions modifiées de Bessel de première et seconde espèce.

Bien que ce modèle permette d'accéder à tous les comportements de FRAP, il est possible de dériver ce modèle générique en des modèles simplifiés, utilisables dans des cas spécifiques. Ces modèles peuvent être classés en trois grandes catégories : la diffusion pure, le FRAP non couplé à la diffusion, et le FRAP couplé à la diffusion que nous détaillerons en première partie. Ces catégories sont soumises à des contraintes qui permettent de les utiliser. Ces contraintes sont liées aux constantes d'association et de dissociation. Les valeurs de ces contraintes peuvent être simulées pour des ratios ($\tau_D = \frac{w^2}{D_f}$) donnés de taille de zone de photoblanchiment (w : rayon) et de diffusion libre de la molécule d'intérêt (D_f) (Figure 47) (B. L. Sprague et al., 2004). Dans une dernière partie nous abordons de manière moins détaillée le cas des réactions avec des liaisons multiples.

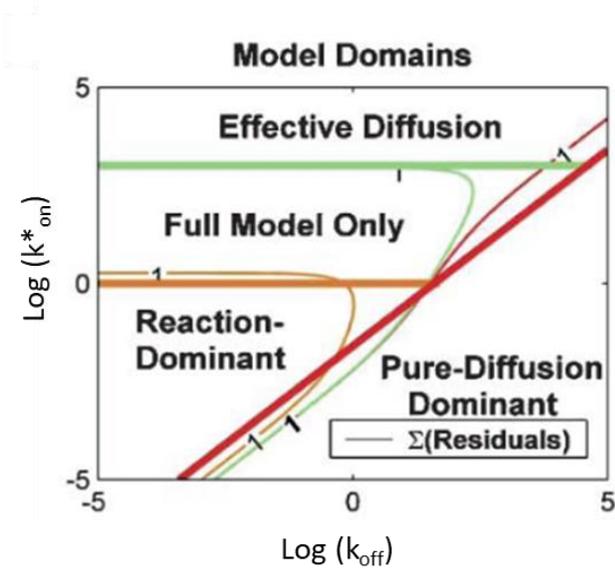


Figure 47. Graphique des différents régimes d'interaction et de leurs frontières

Limite approximative (Ligne épaisses) des limites entre les différents modèles simplifiés pour une simulation avec un τ_D de 0.008 ($D_f = 30 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et $w = 0.5 \mu\text{m}$).

Domaine de diffusion pure ($k^*_{on} / k_{off} \ll 1$) : les molécules sont majoritairement dans un état libre sans piégeage.

Domaine de réaction dominante ($(k^*_{on} \times w^2 / D_f) \ll 1$) : la majorité des molécules sont dans un état piégé, une première phase de diffusion brève peut être présente.

Domaine de diffusion effective ($(k^*_{on} \times w^2 / D_f) \gg 1$) : Les échanges entre la fraction piégée et diffusive sont très rapides, ce qui donne une courbe semblable à une courbe de diffusion pure mais avec un coefficient de diffusion effectif ralenti. Le **modèle générique** (Full model) s'adapte à toutes les conditions mais certains régimes ne sont ajustables que par ce modèle. **Source** : B. L. Sprague et al., 2004

1. Diffusion pure dominante :

Ce modèle est utilisable lorsque la grande majorité des molécules fluorescentes sont libres, c'est-à-dire non piégées. Dans ce cas, on mesure principalement la dynamique des molécules diffusives. Cela est possible quand le temps moyen nécessaire au piégeage est très grand par rapport au temps nécessaire pour que la protéine se détache ($k^*_{on} / k_{off} \ll 1$), ou en cas d'absence ou d'abolition de l'interaction, par exemple, par mutation.

L'équation de diffusion libre pour une zone de blanchiment circulaire utilise l'équation modifiée de Bessel (Soumpasis, 1983), avec I_0 et I_1 qui désignent les fonctions de Bessel d'ordre 0 et 1. D'autres équations existent en fonction de la géométrie de la zone de photoblanchiment (Goehring et al., 2010; Mueller et al., 2008).

$$frap(t) = e^{-\frac{\tau_D}{2t}} [I_0\left(\frac{\tau_D}{2t}\right) + I_1\left(\frac{\tau_D}{2t}\right)] \text{ avec } \tau_D = \frac{w^2}{D_f}$$

La courbe de FRAP est ajustée à l'aide d'un seul paramètre, qui est τ_D . Ce facteur permet, en utilisant le rayon (w) de la zone de FRAP, d'extraire le coefficient de diffusion de la molécule (D_f).

2. FRAP non couplé à la diffusion :

Ce modèle est le plus souvent utilisé quand la diffusion est très rapide ou inexistante par rapport au piégeage, et qu'il y a une fraction importante de molécules piégées à l'équilibre ($k^*_{on} \times w^2 / D_f \ll 1$). Dans ces conditions, les deux modalités sont donc totalement dissociées, et les molécules ont déjà diffusé dans la zone de photoblanchiment avant que les échanges entre les molécules piégées et diffusives commencent (Figure 48) (B. Sprague & McNally, 2005).

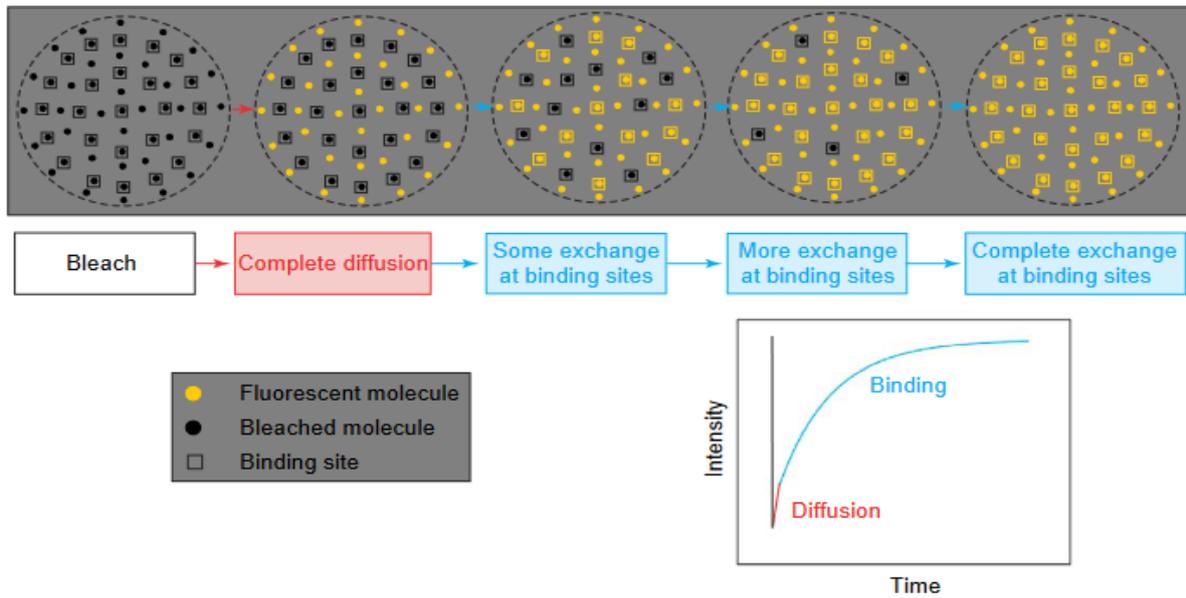


Figure 48. Schéma explicatif du modèle de FRAP non couplé à la diffusion

Les molécules dans la zone blanchie commencent par diffuser rapidement. Ensuite, des échanges plus lents entre états lié et libre se produisent, permettant le remplacement des molécules photo-blanchies par des molécules fluorescentes. Ce mécanisme induit une courbe principalement influencée par la liaison. **Source** : B. Sprague & McNally, 2005

- Réaction dominante :

Si la diffusion est inexistante ($C_{eq}=1(k_{off} \ll k_{on}^*)$) ou trop rapide par rapport à la période d'acquisition des premiers points de temps après le photoblanchiment, on utilisera un modèle de réaction dominante (L. Sprague et al., 2004). Dans ce modèle, les molécules libres reviennent instantanément à l'équilibre juste après le blanchiment ($f=Feq$). Il est important de souligner que cette équation n'est pas dépendante de la géométrie de la zone de FRAP, ce qui en fait l'une des rares équations de ce type.

$$frap(t) = 1 - C_{eq}e^{-k_{off}^*t}$$

- Transition entre un régime de pure-diffusion et un de réaction :

Il est possible d'observer des retours de FRAP avec des transitions distinctes entre diffusion et réaction dans le cas où ($k_{on}^* \times w^2/D_f \ll 1$) le temps nécessaire pour que les molécules diffusent, sur l'ensemble de la région photo-blanchie, est plus important que le temps nécessaire pour que la molécule se lie (B. L. Sprague et al., 2004). Cela correspond à des réactions situées dans la partie basse des domaines de modèles (Figure 47). Dans ce cas, l'équation de ce modèle est l'addition des équations de diffusion pure et de réaction dominante. Les fractions diffusive et liée sont déterminées par les concentrations à l'équilibre (Feq et Ceq). Pour pouvoir observer cette fraction diffusive, la période d'acquisition dans les premiers points de temps doit être courte.

$$frap(t) = (Feq + Ceq) * \left[e^{-\frac{\tau_D}{2t}} \left[I_0\left(\frac{\tau_D}{2t}\right) + I_1\left(\frac{\tau_D}{2t}\right) \right] \right] + Ceq (1 - e^{-k_{off}^*t})$$

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

Ce type de modèle basé sur des doubles exponentielles doit être utilisé avec prudence et en se basant sur d'autres connaissances concernant l'interaction étudiée. En effet, les ajustements en double exponentielle permettent d'ajuster un grand nombre de courbes de FRAP, ce qui peut conduire à formuler des fausses hypothèses sur la force et le nombre de liaisons. Cependant, c'est le type d'ajustement le plus souvent utilisé par les biologistes.

En effet, par exemple si la courbe a une forme « d'épaule » et que la partie initiale est donc relativement importante, cela peut aussi refléter la présence de multiples sites d'interaction plutôt qu'une phase diffusive (Figure 49). Cela signifie que la partie diffusive peut correspondre davantage à une interaction faible et la partie piégée à une interaction forte. Il est alors possible de déterminer la fraction de chaque type d'interaction, tout comme on détermine la fraction mobile et piégée. Dans ce cas, il est nécessaire d'analyser ces courbes avec des modèles plus appropriés basés sur des liaisons multiples (4. *Modèle à double états*).

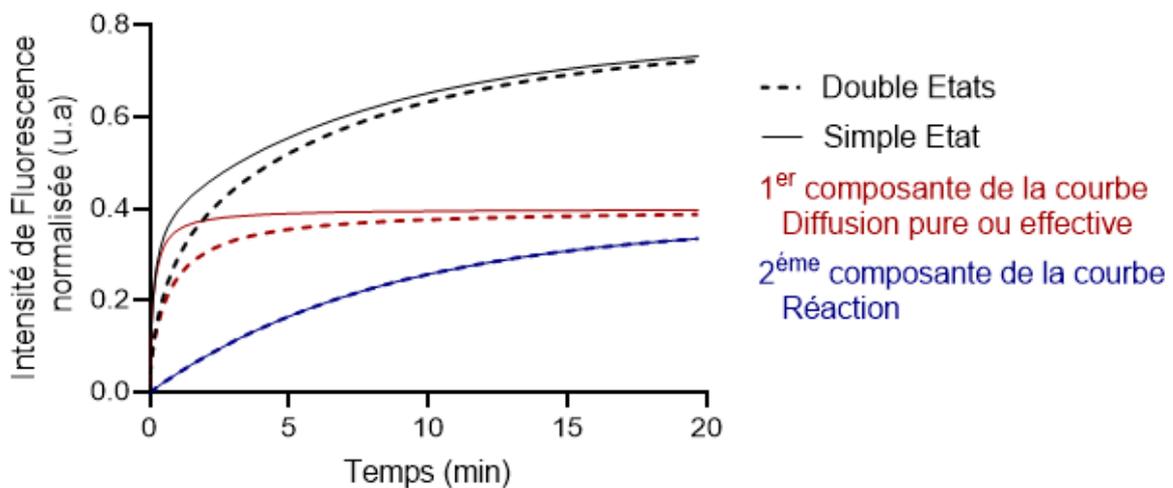


Figure 49. Courbe en épaule pour des modèles à simple état versus double états

Représentation graphique de la difficulté à différencier une courbe pour une réaction avec une réaction avec deux états (pointillées) (Diffusion effective + réaction) et une courbe pour une réaction unique (courbe pleine). Entre ces deux modèles, seule la première composante de la courbe change, soit par de la diffusion pure, soit de la diffusion effective.

3. FRAP couplé à la diffusion :

A l'opposé on trouve le FRAP couplé à la diffusion, où les échanges entre la fraction piégée et la fraction libre commencent avant que les molécules aient terminé de diffuser dans la zone photo-blanchie (Figure 50). Ces comportements sont les plus complexes à analyser, et il est important de noter que ces modèles sont rarement utilisés par les biologistes pour expliquer le comportement de leurs protéines d'intérêt. En fonction de la différence entre le temps de diffusion et le temps d'association, on peut utiliser un modèle simplifié appelé diffusion effective.

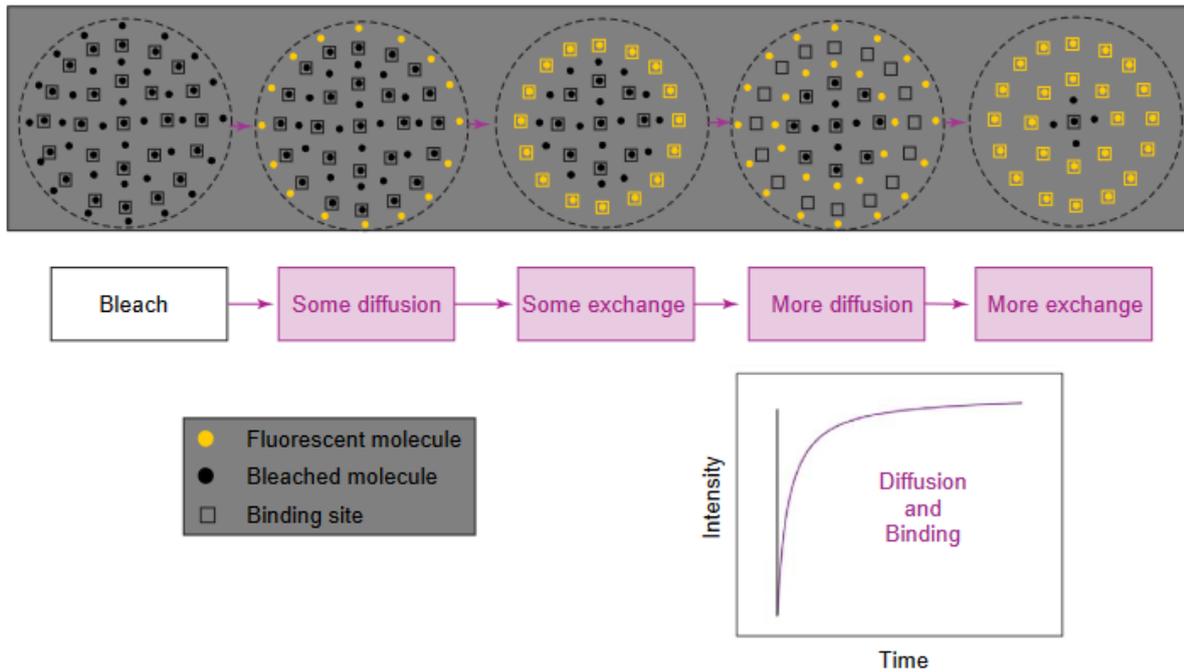


Figure 50. Schéma explicatif du modèle de FRAP couplé à la diffusion

Les molécules photo-blanchies transitent entre l'état lié et l'état libre plus rapidement que le temps nécessaire à la molécule pour diffuser dans l'intégralité de la surface blanchie. Par conséquent, les deux composantes (diffusion et interaction) se mélangent, rendant difficile la séparation des états au niveau analytique.

Source : B. Sprague & McNally, 2005

- Diffusion effective :

Ce modèle est utilisé lorsque le temps d'association avec un site de liaison est plus rapide que le temps de diffusion dans la zone de blanchiment ($k_{on}^* \times w^2/D_f \gg 1$). Ce type de comportement donne des courbes de FRAP qui ressemblent à des courbes de diffusion pure, mais qui sont plus lentes. En utilisant la même équation que pour un comportement de diffusion pure on peut extraire un coefficient de diffusion effective qui sera plus lent qu'une diffusion classique, et il est donnée par $\tau_D = \frac{w^2}{D_{eff}}$. Ce coefficient peut être relié à un ratio de k_{on}^*/k_{off} (B. L. Sprague et al., 2004; B. Sprague & McNally, 2005).

$$D_{eff} = \frac{D_f}{(1 + \frac{k_{on}^*}{k_{off}})} \text{ soit } \frac{k_{on}^*}{k_{off}} = \frac{D_f}{D_{eff}} - 1$$

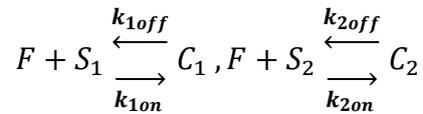
La situation se complique quand le temps de diffusion est équivalent au temps d'association. Dans ce cas, le modèle de diffusion effective n'est plus valable et il n'existe pas de modèle simplifié pour ce comportement. Il est donc nécessaire d'utiliser le modèle générique pour analyser ces interactions complexes.

4. Modèle à double états :

Si nous ne sommes plus dans un cas d'interaction simple, mais avec deux états d'association indépendants, ce qui peut être le cas dans le cadre d'interaction dimérique, par exemple, il y a maintenant deux constantes d'association et de dissociation qui régissent l'interaction. De

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

la même manière, il est possible d'obtenir une équation universelle pour ce type d'interaction (B. L. Sprague et al., 2004), équation qui peut être réduite en fonction du modèle qui régit chaque état, ces modèles sont soumis aux mêmes contraintes que ceux pour un simple état.



Nous allons nous attarder sur deux modèles en particulier. Le premier qui est une réduction basée sur la combinaison de deux modèles de réaction dominante (Kimura & Cook, 2001; Molk et al., 2004; B. L. Sprague et al., 2004).

$$frap(t) = 1 - C_{1eq}(e^{-k_{1off}t}) - C_{2eq}(e^{-k_{2off}t})$$

Le deuxième est un cas où la première réaction comprend une première composante de diffusion effective et une deuxième composante de réaction dominante. Cette équation est semblable à celle utilisée pour définir une transition entre un régime de diffusion pure et un régime de réaction dans le cadre d'une réaction à un seul état, puisque la diffusion effective est ajustée par l'équation de diffusion pure. (B. L. Sprague et al., 2004)

$$frap(t) \approx (F_{eq} + C_{eq}) * \left[e^{-\frac{\tau_{1eff}}{2t}} \left[I_0\left(\frac{\tau_{1eff}}{2t}\right) + I_1\left(\frac{\tau_{1eff}}{2t}\right) \right] \right] + C_{2eq}(1 - e^{-k_{2off}t})$$

1.2 Développement futur pour l'étude des interactions protéiques

Afin de démontrer le potentiel futur de l'impression protéique subcellulaire avec PRIMO pour l'étude des interactions protéiques, le développement de fonctions supplémentaires du modèle biomimétique présenté dans l'article a été initié. Cela a débuté par l'amélioration de l'impression et de production des protéines pour des essais à haut débit. Cela afin de permettre de cribler des interactions protéiques, dans le but de déterminer tous les partenaires d'une protéine, leurs paramètres cinétiques et éventuellement découvrir de nouvelles interactions. Ce développement ouvrirait des perspectives dans des domaines tels que la pharmacologie, par exemple.

Une seconde perspective concerne le développement d'un modèle compétitif. En raison de la multiplicité d'interacteurs pour certaines protéines, la question de l'impact de la compétition entre ces partenaires sur la stabilité et la fonction synaptique revêt une importance particulière. Cependant, il s'agit d'une thématique pour laquelle les données demeurent limitées, principalement en raison du manque de modèles *in vitro* permettant d'étudier ces compétitions. Nous sommes d'avis que l'impression protéique pourrait offrir un modèle d'étude des compétitions relativement puissant.

La dernière perspective étudiée est orientée vers l'étude de la structure membranaire au niveau des zones d'interactions des protéines transmembranaires. En effet, la différence soulevée entre les modèles *in vitro*, tels que le SPR, et notre modèle biomimétique est la présence de la membrane. La présence de cluster protéique, surtout avec des protéines pouvant interagir avec le cytosquelette a un impact sur la membrane (Arumugam & Bassereau, 2015). Nous souhaitons donc observer l'impact des interactions créées sur la morphologie de la membrane plasmique et étudier l'espace entre la membrane et le motif protéique, pour cela on utilise la microscopie électronique. Récemment, des articles ont démontré le potentiel du système PRIMO pour des expérimentations de microscopie électronique réalisée sur grille (Engel et al., 2019; Toro-Nahuelpan et al., 2020). L'impression protéique est, comme à ses débuts, principalement utilisée pour donner une forme à la cellule, observer l'impact de la géométrie sur des structures précises, ou localiser précisément des structures au niveau des zones d'imagerie sur les grilles de microscopie électronique. L'idée est donc également de démontrer d'autres applications de l'impression protéique en microscopie électronique et de proposer des protocoles complémentaires.

Les résultats pour chacun de ces développements sont préliminaires, nous avons exploré ces projets pour valider des preuves de concepts en vue de futurs sujets de thèse ou des collaborations.

1.2.1 Criblage d'interaction

La réalisation d'essais de criblage nécessite plusieurs critères. Premièrement, il est nécessaire d'avoir une capacité de rendement importante en termes de préparation d'échantillons. Deuxièmement, il faut avoir accès à des banques de molécules d'intérêt suffisamment conséquentes ou être en mesure de les produire. Enfin, il est indispensable de disposer de

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

modalités d'imagerie et d'analyse compatibles avec la quantité de données à acquérir et à traiter. En ce qui concerne la capacité de rendement, le temps d'impression en PLPP liquide est considérablement long, avec une durée d'impression d'une heure pour une zone de 20 mm². Si l'on vise un modèle de plaque 96 puits, cela représente environ 75 heures d'impression. Le développement du PLPP gel (*1.1.1. Augmenter la vitesse d'impression surfacique*) permet d'accélérer l'impression en réduisant de 20 fois la durée d'impression. Le PLPP gel ayant été développé et caractérisé pendant ma thèse, nous n'avons pas eu le temps de réaliser un criblage sur les protéines synaptiques. Cependant, tout au long de la thèse, plusieurs paires de protéines purifiées ont été testées, et des essais d'interaction croisée ont été réalisés comme contrôles (Tableau 2). On constate que chaque fois qu'une interaction est attendue, on observe effectivement une interaction quantifiable par l'enrichissement. Cependant, dès que l'on associe des protéines qui n'interagissent pas entre elles, la protéine membranaire n'est pas enrichie sur les motifs. L'ensemble de ces essais démontre la spécificité des interactions créées dans notre modèle.

Ligand \ Récepteur	SynCAM1-Fc	Neurexin1-Fc	LRRTM2-Fc	Ncadhérine-Fc	Neuroligine1-Fc
SynCAM1			X	X	X
Neurexin1		X		X	
LRRTM2	X		X	X	X
Ncadhérine	X		X		X
Neuroligine1			X		X
Neuroligin ^{L399A-N400A}	X		X	X	X
Neuroligine ^{E584A/L585A}	X		X	X	X

Tableau 2. Synthèse des interactions protéiques testées

Les interactions montrant un enrichissement du récepteur sur le ligand sont indiquées en vert, tandis que celles qui ne présentent pas de recrutement du récepteur sont en rouge. Les cases barrées signalent que cette interaction n'a pas été testée.

Pour faciliter davantage le processus de criblage, nous avons exploré des moyens pour accélérer la production de banques d'ectodomains de protéines, afin d'alléger la charge temporelle pour les utilisateurs. La production de protéines recombinantes se fait en transfectant une lignée cellulaire avec un plasmide codant pour la protéine d'intérêt (*III.3.1 Protéines recombinantes*). Ainsi, avant d'obtenir une banque de protéines, il est nécessaire de disposer de l'ensemble des plasmides codant pour ces protéines.

Une fois produite par les cellules, la protéine est libérée dans le milieu extracellulaire. Ce milieu, qualifié de "conditionné", est ensuite purifié pour isoler la protéine recombinante, souvent en utilisant son étiquette biologique, comme le fragment cristallisable (Fc). Ces étapes peuvent s'étendre sur plusieurs semaines, surtout lorsqu'un rendement conséquent est recherché. Par ailleurs, du côté des solutions commerciales, les protéines recombinantes sont relativement coûteuses, et le choix demeure limité pour les protéines synaptiques étiquetées.

Dans le but de réduire les coûts et le temps nécessaires à la préparation d'une banque de ce type, nous avons exploré la possibilité de s'affranchir de l'étape de purification, qui permet de concentrer et d'isoler la protéine d'intérêt des autres composants du milieu. Dans cette optique, nous avons comparé en tant que preuve de concept des solutions purifiées de Ncadherine-Fc et de Neurexine1 β -Fc avec des solutions non purifiées de ces mêmes protéines. Parallèlement, on a soumis des cellules au même protocole de production, mais nous avons incorporé un plasmide vide afin de valider que le milieu extracellulaire (« milieu conditionnée ») en lui-même n'induit pas d'interaction non spécifique.

Ce que l'on constate, c'est qu'en présence des protéines non purifiées une accumulation est observée (Figure 51.A et B) avec un enrichissement autour de 1.9 et de 2.9 pour Ncadherine-Fc et Neurexine1 β -Fc respectivement. Ce qui pour Neurexine1 β -Fc équivaut à l'enrichissement obtenue avec la protéine purifiées (2.5). Pour Ncadherine-Fc, le niveau d'enrichissement est plus faible pour la condition avec la protéine non purifiée, en effet l'enrichissement obtenu en présence de la protéine purifiée est autour de 2.8 mais cette diminution n'est pas significativement différente. De plus, comme on n'a pas mesuré la concentration de nos solutions non purifiées, cela peut s'expliquer par une quantité de protéine imprimée plus faible. Enfin, en présence du milieu conditionné seul, aucune accumulation (enrichissement <1) n'est observée dans les deux cas, indiquant qu'il n'y a pas d'interaction non spécifique induit par des composants du milieu.

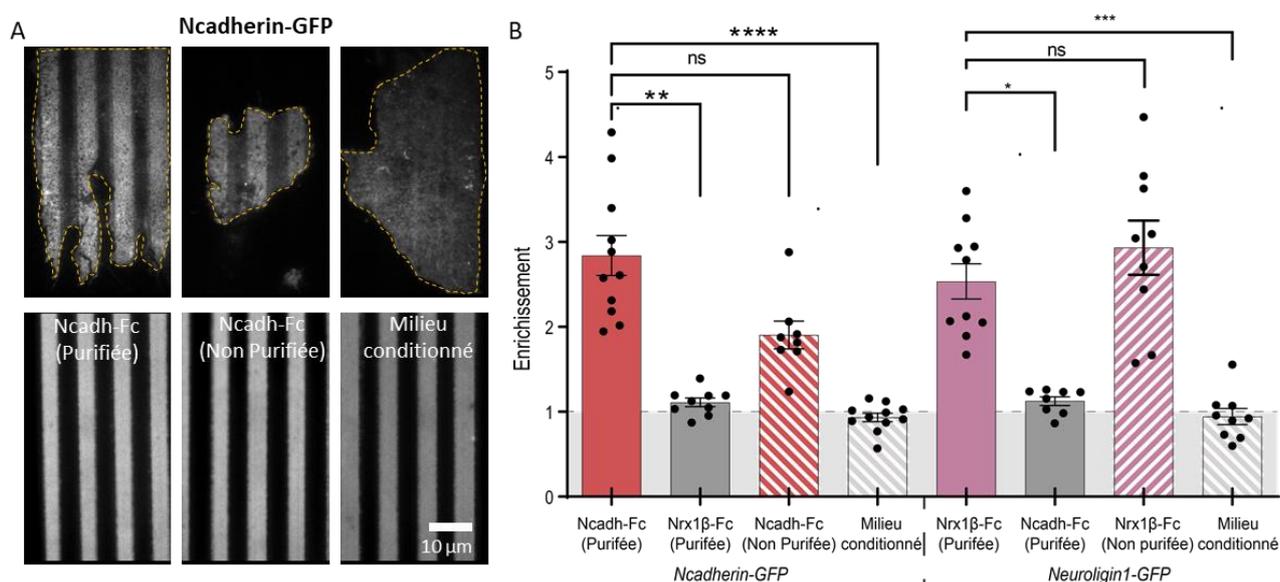


Figure 51. Impression de protéines non purifiées

A) Images TIRF (100X) de COS-7 surexprimant la Ncadherine-GFP, avec l'image en épifluorescence des motifs correspondants (Streptavidine-A647) (B) Graphiques de la distribution de l'enrichissement pour chaque condition. Kruskal wallis test ** $P=0.0063$, **** $P<0.0001$, * $P=0.0272$, *** $P=0.0002$, ns $>0,9999$ (Nbr de cellules/ Nbr d'expérimentations) Ncadherine-GFP/Ncadherine-Fc purifiée (11/1), Ncadherine-GFP/Nrx1 β -Fc purifiée (6/1), Ncadherine-GFP/Ncadherine-Fc non purifiée (8/1), Ncadherine-GFP/milieu conditionné (11/1), Neuroligine1-GFP/Nrx1 β -Fc purifiée (10/1), Neuroligine1-GFP/ Ncadherine-Fc purifiée (8/1), Neuroligine1-GFP/Nrx1 β -Fc non purifiée (9/1), Neuroligine1-GFP/ milieu conditionné (9/1).

1.2.2 Modèle de compétition

La Neurexine1 β a de nombreux partenaires post-synaptiques tels que Neuroligine et LRRTM. Ces partenaires, présents dans les mêmes synapses, sont en compétition pour interagir avec la Neurexine1 β . Cependant, il existe peu de connaissances biophysiques sur l'impact de ce phénomène compétitif, principalement des études structurales et fonctionnelles. Il existe peu de modèle *in vitro* permettant de tester la compétition entre les protéines transmembranaires. L'un des protocoles couramment utilisés consiste à agréger la protéine transmembranaire exprimée dans une cellule par une première protéine purifiée, puis à ajouter dans la solution la deuxième protéine compétitrice pour observer si elle permet de déstabiliser l'interaction initialement créée (Siddiqui et al., 2010).

L'utilisation de l'impression protéique offre la possibilité d'imprimer de manière distincte deux protéines d'intérêt (Figure 52), ce qui permet d'étudier le comportement du récepteur de manière précise. De plus, via l'impression quantitative, il est possible de jouer sur les quantités des protéines pour évaluer si cela influence l'affinité du récepteur. Les variations de concentrations et potentiellement d'affinités entre les différents partenaires pourraient en effet jouer un rôle crucial dans la régulation de la stabilisation dans plasticité synaptique, par exemple. Ce projet de modèle *in vitro* de compétition, a été proposé comme sujet de stage de deux mois pour un étudiant en L3 Sciences de la vie et de la terre, sous ma supervision, pour ce stage nous avons cherché un sujet relativement multidisciplinaire impliquant l'impression protéique, la biochimie, la biologie moléculaire, la culture cellulaire et l'imagerie.

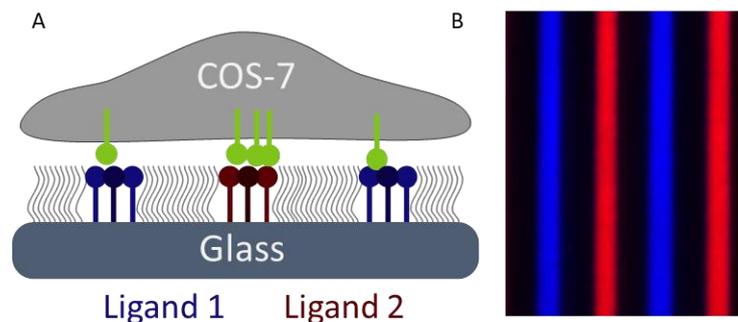


Figure 52. Modèle de compétition

(A) Schéma en coupe longitudinale d'une impression multiple de 2 ligands d'intérêts. (B) Image de fluorescence d'une impression de deux composés fluorescents.

De plus, la demande croissante de solutions, de protocoles et de support de la part des utilisateurs de PRIMO pour l'impression multiprotéique souligne l'importance d'acquérir des données et des connaissances dans ce domaine. Cette approche multidisciplinaire, alliant des techniques d'impression protéique à la biologie moléculaire et à l'imagerie, peut contribuer de manière significative à notre compréhension des interactions protéiques complexes et de leurs implications fonctionnelles. Elle pourrait également avoir des applications potentielles dans la recherche biomédicale et pharmaceutique pour le développement de nouvelles thérapies ciblées.

La complexité de ce type d'essai réside dans la nécessité d'éviter toute contamination entre les différentes protéines. Cependant, les techniques d'impressions soustractives, telles que

notre protocole, ne sont pas les plus adaptées à cet égard car le dépôt de la protéine n'est pas localement contrôlé, contrairement aux impressions mécaniques (*1.3.1 Impression mécanique*). Plusieurs articles préconisent l'utilisation d'agent de saturation de nature différente suivant le protocole (BSA, PEG ...) (Delhaye, 2021). L'idée est de bloquer tous les sites libres d'adsorption, avant de réaliser la deuxième impression. Dans notre cas, dans la chaîne d'amplification que nous utilisons (Figure 53), la première couche est de la BSA biotine. La BSA est couramment utilisée pour bloquer les sites d'adhésion non spécifiques, et nous avons constaté que cela facilite la réalisation d'impressions multiples.

Cependant, pour réussir à imprimer une seconde protéine synaptique, il est nécessaire de développer une deuxième chaîne d'amplification qui ne repose pas sur des interactions streptavidine-biotine et sur la reconnaissance du fragment cristallisable (Fc) comme étiquette biologique. Notre hypothèse est que cette chaîne d'amplification permet d'amplifier et d'orienter correctement la protéine synaptique que l'on souhaite imprimer. Nous avons choisi cette chaîne initiale en se basant sur la littérature, car la liaison biotine-streptavidine est couramment utilisée pour fixer des protéines (N. Li & Ho, 2008; Schwarzenbacher et al., 2008).

Pour le développement de la seconde chaîne, nous avons envisagé plusieurs solutions en étudiant à nouveau la littérature, notamment l'étiquette 6-His (Gautrot et al., 2010) et la chimie clic (Löchte et al., 2014). Au cours de ces recherches, nous avons découvert une étude portant sur l'impression de fibrinogène couplé à différentes molécules (Watson et al., 2021). Le fibrinogène est un facteur de la coagulation, c'est une protéine de grande taille (340Kda) et cette étude a montré une forte adsorption de cette protéine.

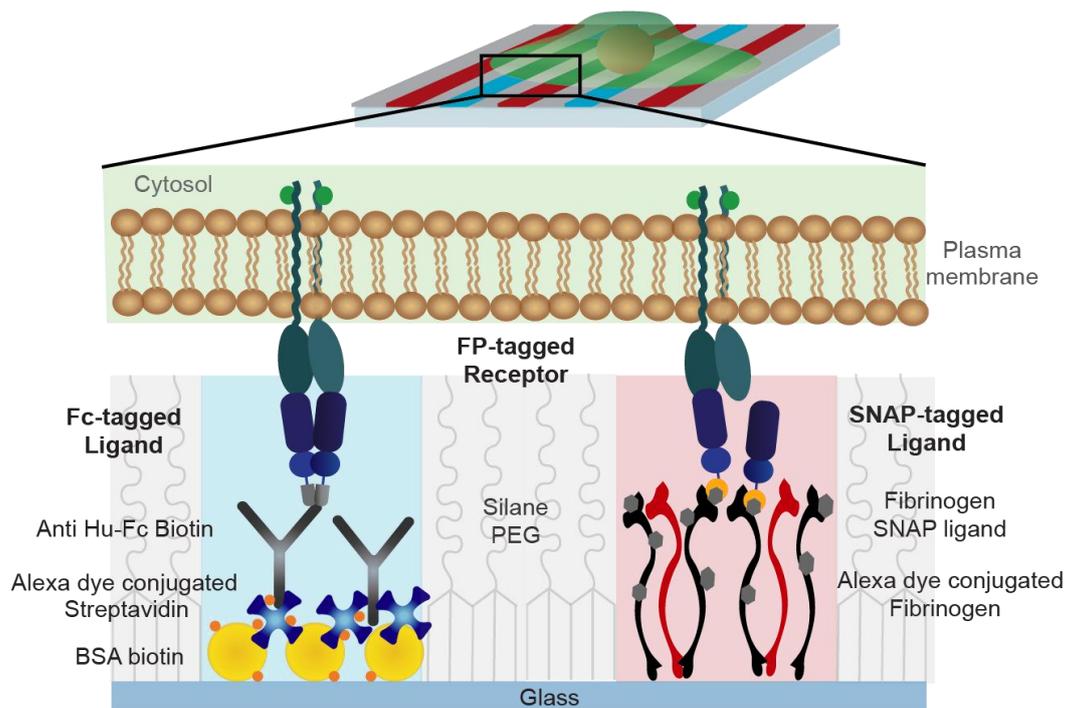


Figure 53. Chaînes d'amplification

La chaîne d'amplification en bleu est celle initialement développée et qui repose sur des interactions biotines-streptavidines pour l'impression de protéine couplée à un tag Fc. En rouge, la chaîne d'amplification secondaire que l'on cherche à développer est essentiellement basée sur le fibrinogène et les interactions de chimie clic.

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

Pour valider le choix du fibrinogène nous avons réalisé quelques essais préliminaires (Figure 54), pour voir s'il est possible d'obtenir des motifs distincts sans contaminations croisées en utilisant la base de nos chaînes (BSA + Streptavidine et Fibrinogène). Pour cela, nous avons essayé en première instance d'imprimer la chaîne de BSA, puis ensuite le fibrinogène. Ce premier essai nous a permis d'observer que le fibrinogène présente effectivement des propriétés d'adsorption élevées, puisqu'il parvient à combler des zones non saturées par la BSA et ainsi à se fixer sur le premier motif insolé (Figure 54.A). En inversant l'ordre d'incubation des protéines, nous constatons que le niveau de saturation du fibrinogène est bien supérieur (Figure 54.B) ce qui permet d'avoir très peu de contamination croisée entre les deux incubations. L'augmentation du temps d'incubation du fibrinogène permet d'obtenir un résultat quasiment parfait (Figure 54.C).

Cependant, tester seulement le niveau de fluorescence n'est pas suffisant. En effet, dans notre chaîne d'amplification, seule la streptavidine est fluorescente, donc il est impossible de visualiser si l'anticorps ou la protéine d'intérêt se fixe de manière non spécifique sur le fibrinogène. De plus, pour optimiser les temps d'incubation, la protéine d'intérêt (ici Neurexine), qui doit incuber pendant un minimum de 2 heures à température ambiante, est incubée toute la nuit, en dernier, après la deuxième insolation, plutôt qu'entre les deux insolations. Le seul moyen valide de tester la spécificité est par l'étude du recrutement du partenaire membranaire (ici Neuroligine) sur les motifs protéiques. Pour ce faire, nous avons donc déposé sur une double impression de Neurexine1B-Fc et de fibrinogène des cellules exprimant la Neuroligine1-GFP (Figure 54.D). Nous constatons que la Neuroligine1-GFP est recrutée uniquement au niveau des zones où nous avons imprimé la chaîne d'amplification basée sur la streptavidine-biotine et donc bien uniquement où la Neurexine1B-Fc est attendue. Ceci démontre qu'il est possible, même en impression multiple, de créer des zones définies d'interaction lorsqu'on utilise l'impression indirecte et des liaisons fortes. Ce type de preuve de concept peut paraître évident, mais en réalité, de plus en plus d'utilisateurs de PRIMO demandent des conseils pour améliorer leurs protocoles d'impressions multiples, et ce type de démonstration permet de montrer que chaque protéine a des caractéristiques uniques et que des choses simples telles que le temps et l'ordre d'incubation sont des facteurs qui peuvent faire varier considérablement la qualité de l'impression multiple.

Cependant, il est important de noter que cet essai n'est pas totalement représentatif de ce que l'on souhaite faire, car on utilise du fibrinogène couplé à un fluorophore. Or, j'ai observé au cours de mes travaux que certains fluorophores, notamment les Alexa-fluor, favorisent une meilleure adsorption des protéines en apportant des charges négatives. Donc, en travaillant avec du fibrinogène sans fluorophore, rien ne nous assure d'avoir la même efficacité.

Pour notre seconde chaîne d'amplification, nous avons choisis d'utiliser du fibrinogène. Afin de fixer la protéine d'intérêt dessus, nous avons décidé d'utiliser un système de chimie clic (Dreyer et al., 2023). La protéine d'intérêt serait donc étiquetée avec un SNAP et le fibrinogène avec un SNAP ligand (Figure 53). Comme il n'existe aucune solution commerciale pour ces protéines chimériques, le projet de stage a été principalement axé sur la production et le couplage de ces protéines.

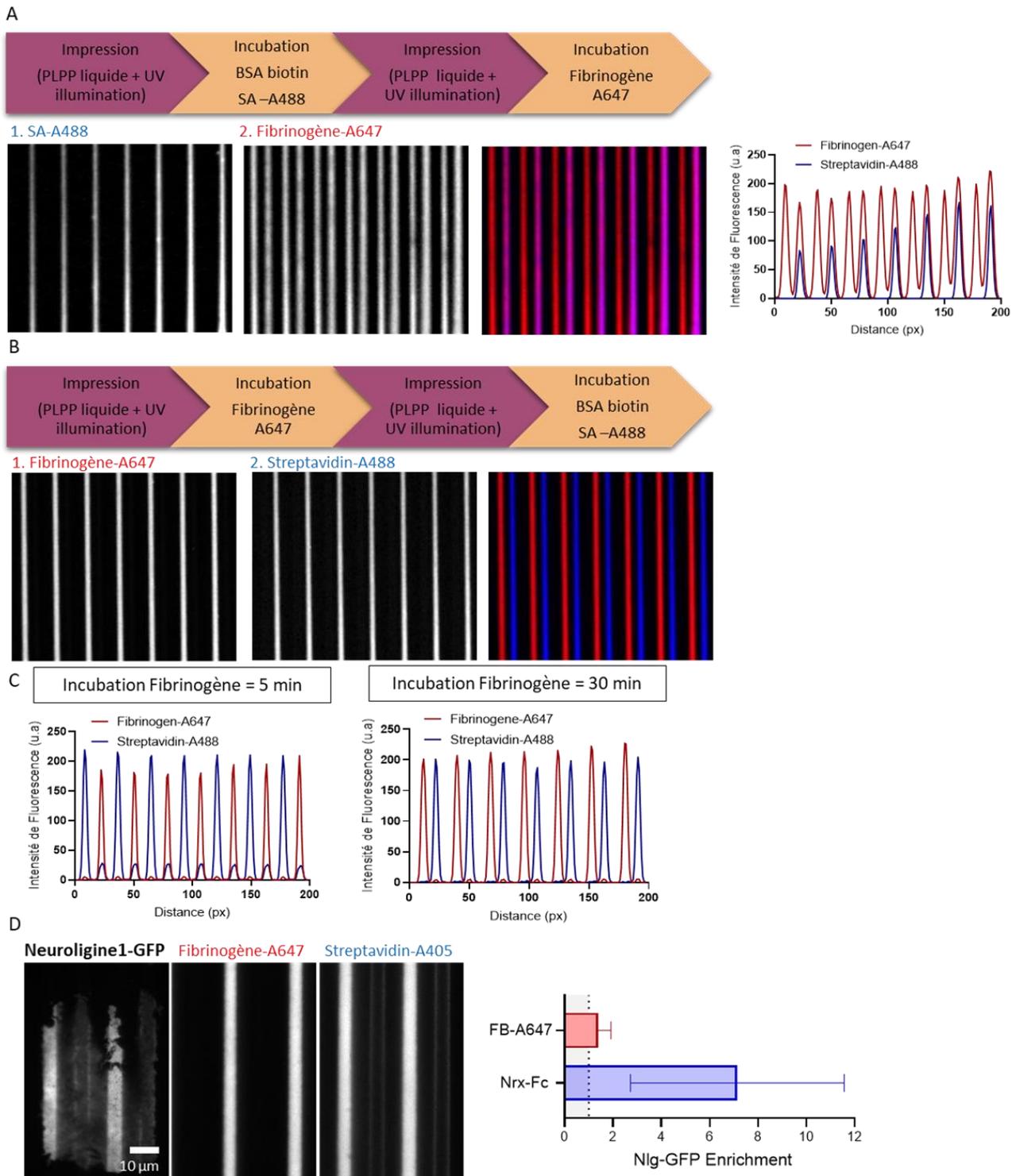


Figure 54. Facteurs d'améliorations de l'impression multiple

(A) Frise des étapes du protocole avec l'incubation de la BSA biotine + streptavidine-A488 en premier, suivie du fibrinogène-A647. Image de fluorescence de ces deux molécules imprimées. Graphique montrant le niveau de fluorescence du Fibrinogène et de la streptavidine, démontrant une fixation du fibrinogène sur le premier motif insolé. (B) Protocole inversant l'ordre d'incubation des protéines. Images et graphique démontrant le peu de contamination croisée entre les impressions protéiques. (C) Impact du temps d'incubation du fibrinogène sur la cross-contamination (D) Image en TIRF d'une cellule surexprimant la Neurologine1-GFP sur un motif de Fibrinogène-A647 et de BSA+streptavidine-A405+Neurexine1 β -Fc. Graphique de l'enrichissement de Neurologine1-GFP sur les deux chaînes de protéines différentes.

1.2.2.1 *Efficacité du couplage Fibrinogène SNAPligand*

Ce couplage est réalisé entre du fibrinogène humain natif et un SNAPligand doté d'une fonction NHS capable de former des liaisons avec les amines du fibrinogène (*III.3.2. Couplage protéique*). Pour évaluer l'efficacité de ce couplage, nous avons réalisé, à partir d'un gel d'électrophorèse (SDS-PAGE), un Coomassie, afin d'observer l'intégralité des protéines et un Western Blot pour valider l'efficacité du couplage, en révélant la présence d'une protéine commerciale SNAPtag qui va se lier au SNAPligand. Comme contrôle, nous avons utilisé différentes protéines (Figure 55.A) : du fibrinogène-A647 (condition 1), du fibrinogène-SNAPligand seul (condition 2) et de la protéine SNAPtag seule (condition 4). La condition d'intérêt qui permettra de déterminer l'efficacité du couplage est le complexe entre le fibrinogène-SNAP ligand et la protéine SNAPtag commerciale (condition 3).

En Coomassie (Figure 55.B), nous observons un résultat similaire pour les conditions 1 et 2 avec trois bandes de taille moléculaire entre 55 et 80 kDa. Ces trois bandes correspondent aux trois chaînes non identiques du fibrinogène. Pour la condition 2, il est normal de ne pas observer de décalage lié au couplage avec le SNAPligand (BG-GLA-NHS) car il a un poids moléculaire négligeable. Pour la protéine commerciale SNAPtag (4), nous observons deux bandes autour de 20kda, ce qui correspond au poids moléculaire des deux espèces constituant la protéine SNAPtag commerciale. Une troisième bande est observable à 40 kDa, correspondant à des dimères de la protéine. Pour notre condition d'intérêt (3), en plus des trois bandes caractéristiques du fibrinogène entre 55 et 80 kDa, nous observons une bande à 20kDa qui pourrait correspondre à un excédent de protéine SNAPtag. Pour cette condition, nous nous attendions à un décalage des poids moléculaires dû à la liaison du fibrinogène-SNAP ligand avec la protéine SNAPtag, que nous n'observons pas ici.

Le western blot (Figure 55.C) permet de révéler la présence de la protéine commerciale SNAPtag, grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-SNAPtag. La révélation ayant été faite via un anticorps secondaire fluorescent, lors de l'imagerie, le fibrinogène-A647 (1) est du coup également observable. Cependant, aucun marquage ne ressort pour le fibrinogène-SNAPligand seul (2), ce qui montre bien la spécificité de notre anticorps. Pour la protéine SNAPtag seule (4), nous observons un marquage avec les bandes autour de 20kDa et 40kDa comme pour le Coomassie. Dans notre condition d'intérêt, nous retrouvons les deux bandes correspondant à la protéine seule mais également une trainée au-dessus de 70kDa, que nous observons dans aucune autre condition. Lors du couplage du fibrinogène et du SNAP ligand, le nombre de SNAP ligand fixé par protéine et même par sous domaine de la protéine est variable, ce qui explique que nous avons des poids moléculaires si étalés. Cependant, la forte intensité des trois bandes sur le Coomassie comparées au marquage en western blot nous laisse penser que la quantité de fibrinogène couplé est relativement faible face à la quantité de fibrinogène non couplé. Même si le couplage semble possible, l'efficacité de ce dernier n'est pas optimale.

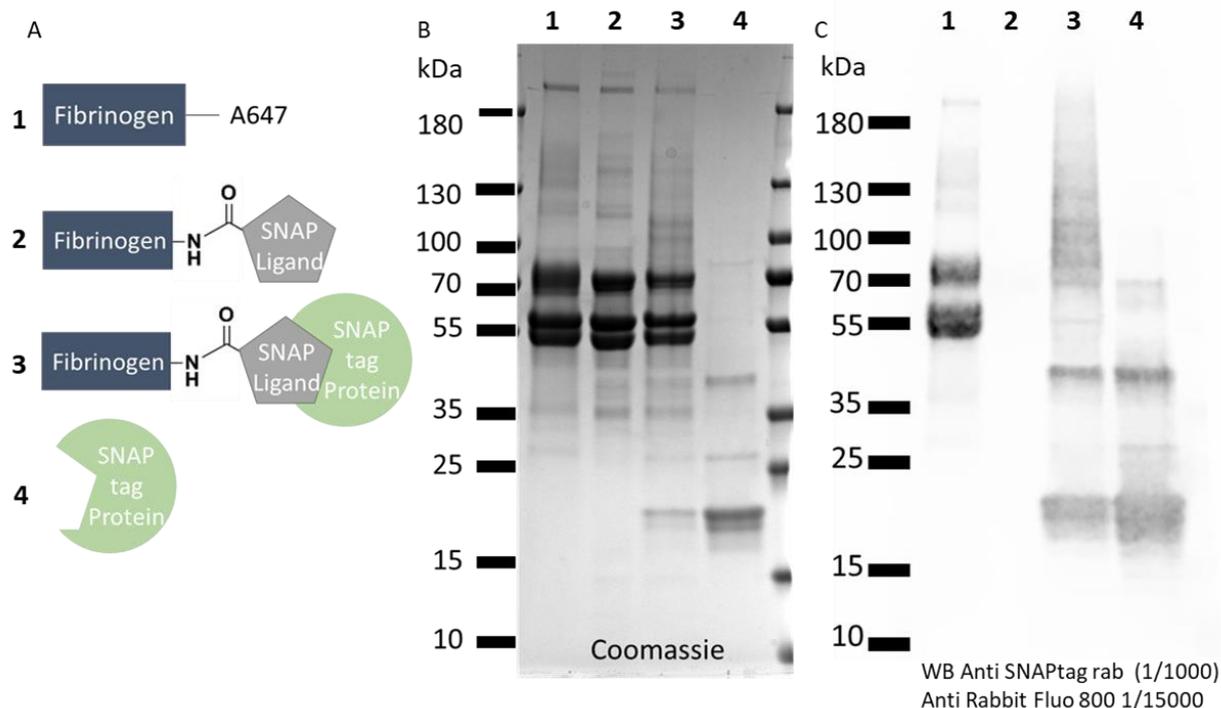


Figure 55. Efficacité du couplage Fibrinogène et SNAPligand

(A) Représentation schématique des différentes conditions utilisées pour valider l'efficacité du couplage entre le Fibrinogène et le SNAPligand. (B) Coomassie des différentes conditions (C) Western blot, révélation des protéines SNAP tag par un anticorps anti-SNAPtag.

1.2.2.2 Activité de la Neurexine-SNAPtag

En parallèle du couplage du fibrinogène au SNAPligand, nous avons produit la protéine Neurexine1 β -SNAPtag recombinante (III.3.1. Protéines recombinantes). Nous nous sommes orientés vers la production de la Neurexine comme première protéine afin, ensuite, de comparer les interactions créées avec la Neurexine1 β -SNAPtag et notre contrôle la Neurexine1 β -Fc. Cette comparaison permettra de déterminer si les interactions créées avec les deux chaînes d'amplification sont équivalentes.

Après la production de la Neurexine1 β -SNAPtag, un Western blot (Figure 56.A) a été réalisé pour valider la présence de la protéine. A cet effet, un anticorps anti-SNAPtag a été utilisé. Nous observons la présence d'une bande entre 40 kDa et 55 kDa. Puisque la Neurexine1 β -Fc a un poids moléculaire autour de 55 kDa on s'attendait effectivement à une réduction du poids moléculaire, car le SNAPtag est de taille plus réduite que le Fc. Cette bande n'est pas observée dans la condition contrôle de production avec un plasmide vide (pcDNA), ce qui confirme que la protéine présente est bien liée au plasmide codant pour la Neurexine1 β -SNAPtag est non à un composant du milieu.

Pour évaluer la fonctionnalité de la protéine, nous avons effectué un marquage, sur des cellules vivantes surexprimant la Neuroline1-GFP, avec la Neurexine1 β -SNAPtag couplé à un SNAPligand-A647 (III.3.2. Couplage protéique). Nous avons utilisé deux contrôles dans notre

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

essai. Un premier contrôle validant la possibilité de créer une interaction Neurologine1/Neurexine1 β , en utilisant la protéine Neurexine1 β -Fc, qui sera reconnue par un anticorps reconnaissant le fragment cristallisable (Figure 56.B). Un deuxième contrôle, avec des cellules surexprimant la Neurexine1 β membranaire fusionnée à un SNAPtag extracellulaire, qui seront, elles, directement marquées avec le SNAPligand de surface couplé à une AlexaFluor647 (Figure 56.C). Ce deuxième contrôle permettra de valider le marquage avec le SNAPligand de surface.

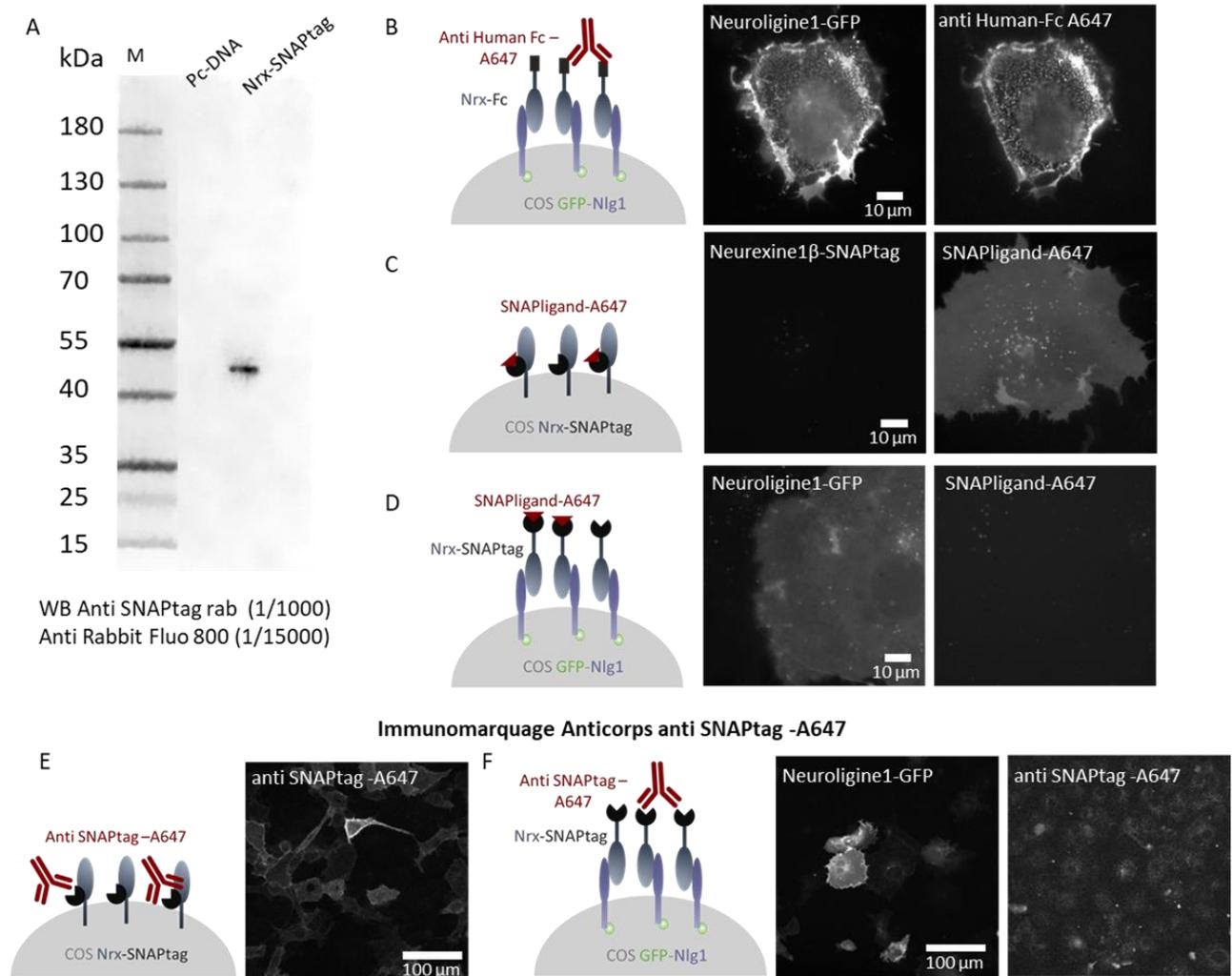


Figure 56. Activité de la Neurexine1 β -SNAPtag recombinante

(A) Western blot de la Neurexine1 β -SNAPtag et d'une condition contrôle de production sans protéine exprimée (pcDNA) (B-D) Image en épifluorescence (100X) de cellules COS. (B) Formation de cluster de Neurologine1-GFP en présence de Neurexine1 β -Fc. (C) Contrôle du marquage SNAPligand-A647 sur des cellules exprimant la Neurexine1 β -SNAPtag. (D) Condition test de la protéine recombinante Neurexine1 β -SNAPtag, sur des cellules sur des cellules exprimant la Neurologine1-GFP, par un marquage avec SNAPligand-A647. (E-F) Image en épifluorescence (20X) de l'immunomarquage avec l'anti-SNAPtag-A647. Soit sur des cellules exprimant Neurexine1 β -SNAPtag membranaire (E) ou sur des cellules exprimant la Neurologine1-GFP et mises en contact juste avant la fixation avec la protéine Neurexine1 β -SNAPtag recombinante

En présence de Neurexine1 β -Fc, la Neurologine1-GFP se clustérise (Figure 56.B) et un marquage de l'anticorps anti Humain-Fc A647 est observable après une dizaine de minute d'incubation. Dans la seconde condition contrôle (Figure 56.C), un marquage des cellules avec le SNAPligand-A647 est observé, indiquant une reconnaissance du SNAPligand et du SNAPtag. Pour notre condition test (Figure 56.D), en présence de la Neurexine1 β -SNAPtag recombinante, aucun marquage n'est observé sur les cellules exprimant la Neurologine1-GFP. Ce résultat indique soit un défaut de couplage entre la Neurexine1 β -SNAPtag et le SNAPligand-A647, soit une absence d'interaction de la Neurexine1 β -SNAPtag avec la Neurologine1-GFP.

Pour s'assurer que le problème ne provienne pas du couplage avec le SNAPligand-A647, une deuxième expérience a été menée sur des cellules Neurologine1-GFP fixées après mise en contact avec la Neurexine1 β -SNAPtag). Un immunomarquage est ensuite réalisé avec un anticorps anti-SNAPtag et un anticorps secondaire fluorescent pour observer si la Neurexine1 β -SNAPtag interagit avec la Neurologine1-GFP (Figure 56.F). En tant que contrôle positif, nous utilisons à nouveau les cellules surexprimant la Neurexine1 β membranaire fusionnée à un SNAPtag extracellulaire (Figure 56.E). Dans la situation de contrôle, une reconnaissance du SNAPtag extracellulaire est à nouveau observée, validant la fonctionnalité de l'anticorps anti SNAPtag. Pour notre condition test de la Neurexine1 β -SNAPtag, aucune cellule exprimant la Neurologine1-GFP ne présente de marquage de l'anticorps anti-SNAPtag. L'absence de marquage, signifie que nous n'arrivons pas à observer une interaction entre la Neurologine1 et notre protéine recombinante Neurexine1 β -SNAPtag, indiquant une absence de fonctionnalité de cette dernière.

1.2.3 Etude de la zone membrane-motif protéique par EM

Afin d'étudier la structure membranaire au niveau des zones d'interactions des protéines transmembranaires avec le motif protéique imprimé, nous avons utilisé de la microscopie à balayage (MEB) pour pouvoir observer la morphologie des cellules sur nos impressions protéiques. De plus, la microscopie à transmission (MET) a été employée pour examiner l'interface membranaire au niveau des zones de recrutement des protéines sur le motif.

Les observations en microscopie à balayage ont permis d'observer la morphologie que prennent nos cellules sur les motifs linéaires. Nous avons observé que les cellules sont principalement alignées dans le sens du pattern avec la plus grande surface d'étalement dans l'axe du motif ; ce qui est qualifié de « guidage par contact ». Des écartements plus importants entre les lignes peuvent influencer ce phénomène (Buskermolen et al., 2020). Ces images mettent en évidence l'impact du substrat non adhésif constitué de PEG sur les cellules. On peut clairement voir que lorsque les cellules atteignent le bord du motif, elles subissent une forte contrainte physique (Figure 57.A). Les lamellipodes et les filopodes des cellules se forment au niveau des zones d'impression pour permettre aux cellules de se déplacer et de s'étendre sur les zones de motif (Figure 57.B). Entre chaque ligne de pattern, on observe des zones de membranes concaves non adhésives (Figure 57.B). Ces zones ont déjà été largement caractérisées au niveau du cytosquelette avec la présence de fibre de stress en grande quantité (Tabdanov et al., 2018; Théry et al., 2006). Cependant, bien que ces images soient

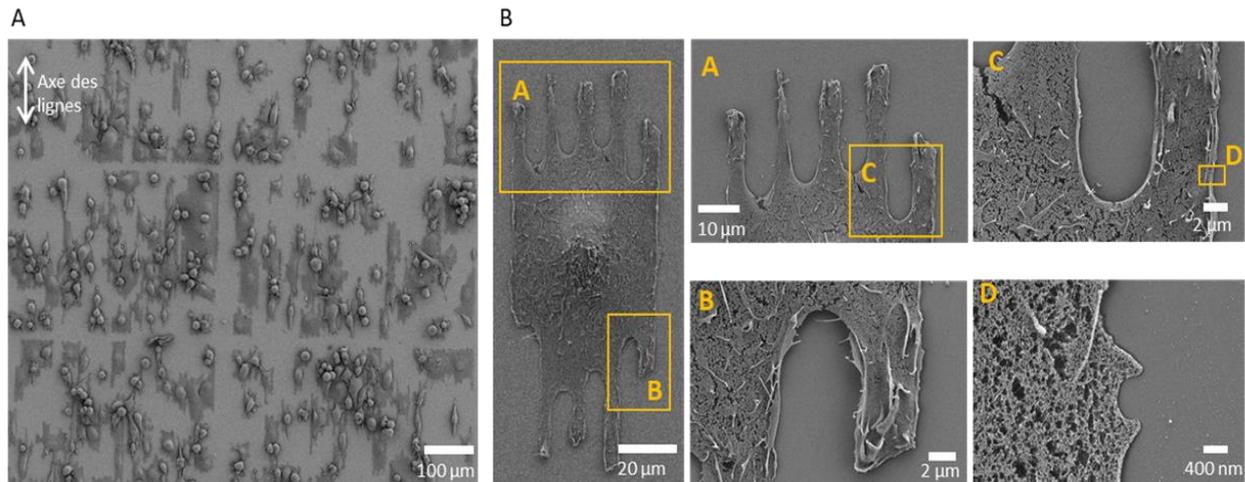


Figure 57. Microscopie électronique à balayage sur des COS-7 sur des impressions protéiques linéaires (A) Image champ large de cellules C07-7 surexprimant SynCAM1-GFP sur des motifs en lignes, de 5 µm d'épaisseur séparées par 5 µm, de SynCAM1-Fc (B) Zoom sur un cellule et sur différentes régions de la cellule pour voir les zones adhésives versus non adhésive.

esthétiquement attrayantes, elles ne nous permettent pas d'accéder à ce qui se passe au niveau membranaire entre la protéine imprimée et la protéine transmembranaire.

Pour accéder à l'espace membrane-motif, la microscopie à transmission a été utilisée. L'objectif était d'obtenir une vue en coupe longitudinale de la cellule et du motif afin d'observer ce qui se déroule dans la cellule au niveau structural entre les zones de recrutement des protéines transmembranaires et les zones non adhésives. Pour réussir cela, un nouveau support d'impression a été utilisé en remplacement des lamelles de verre, à savoir l'aclar. L'aclar est un polymère disponible sous forme de film mince (199 µm) et flexible, couramment utilisé en microscopie électronique. L'avantage de ce film réside dans sa souplesse, permettant ainsi sa découpe à l'ultramicrotome. Le protocole consiste en l'impression des protéines sur l'aclar, suivi du dépôt des cellules pour induire le recrutement du récepteur membranaire. Ensuite, après fixation et traitement en vue de la microscopie, l'ensemble est inclus dans la résine. La principale difficulté réside dans la réalisation de coupes longitudinales de 70 nm, qui doivent être effectuées dans le bon axe par rapport au motif pour permettre l'observation des zones de motifs et des zones non adhésives sur la coupe.

L'impression sur aclar n'a nécessité que très peu d'optimisation du protocole. Seule une augmentation de la dose UV a été nécessaire, car la transmission à travers l'aclar est moins efficace que sur le verre. En conséquence, l'impression de motifs sur l'aclar a été rapidement réussie (Figure 58.A). L'observation par imagerie TIRF s'est avérée compliquée sur l'aclar, car les objectifs utilisés sont adaptés pour l'indice de réfraction du verre (1.5), tandis que celui de l'aclar est plus faible (1.3). Heureusement, sur certaines cellules, il a été possible d'observer l'enrichissement du récepteur en épifluorescence (Figure 58.B), ce qui a validé la fonctionnalité de l'impression sur l'aclar. Pour faciliter l'identification et l'imagerie des cellules présentant un enrichissement, des incisions non traversantes ont été réalisées, sur les substrats d'aclar imprimés, à l'aide d'un scalpel (Figure 58.C-D).

Cette grille doit être réalisée après impression, sinon les marques induisent d'importants effets de diffraction des UV, ce qui réduit considérablement la qualité des impressions. Après le dépôt et la fixation des cellules surexprimant le récepteur, on réalise un scan rapide de la lamelle à faible grossissement pour identifier les cellules présentant un recrutement du récepteur (Figure 58.D). Les premières observations de coupes transversales en MET (Figure 58.E), n'ont pas été concluantes. Malgré l'observation de cellules étalées sur plusieurs des surfaces couvrant plusieurs régions adhésives et non adhésives (zones de 5 μm séparées de 5 μm), on n'a pas pu distinguer de structures ou de densités qui pourraient représenter les zones d'interactions. Cependant, nous avons pu observer certains éléments cytosoliques, tels que des mitochondries et du réticulum (Figure 58.E). L'un des problèmes est que l'on essaye de trouver des différences structurelles sans savoir où se trouvent les zones de motif et les zones de PEG.

Pour pouvoir distinguer les zones d'adhésions des zones non adhésives pendant l'imagerie, nous avons souhaité incorporer des billes d'or dans nos motifs fluorescents. Pour ce faire, nous avons travaillé avec deux streptavidines couplées à des billes d'or de tailles différentes : 10 nm et 1.4 nm. L'avantage des billes de 1.4 nm est que leur petite taille risque de moins perturber l'interaction que les billes de 10 nm, qui présentent un encombrement stérique plus important. Cependant, les billes de 1.4 nm nécessitent une étape d'amplification à l'argent après la post fixation pour augmenter leur taille et les rendre observables en MET.

Pour vérifier que l'utilisation de billes dans les zones de motif n'affecte pas l'interaction, nous avons testé différentes concentrations de streptavidine gold 10 nm, sur lamelle de verres pour pouvoir utiliser du TIRF et observer le recrutement de récepteur (Figure 58.F-H). En comparant l'enrichissement par rapport à une condition avec uniquement de la streptavidine fluorescente, nous avons constaté que la présence de streptavidine gold dans le motif n'affecte pas l'enrichissement du récepteur (Figure 58.F). Lors des observations en MET (Figure 58.I-L), nous observons la présence de billes pour les deux tailles de bille d'or. L'une des constatations est que pour les billes de 1.4 nm, l'amplification à l'argent n'est pas très homogène, ce qui provoque des variations importantes de taille des billes (Figure 58.L). Ce problème ne se pose pas avec les billes de 10 nm (Figure 58.J). Dans tous les cas, le nombre de billes observées pour une coupe de 70 nm est relativement élevé, comparé à ce que l'on peut observer avec des immunomarquages avec des billes d'or. Cela laisse penser que nous parvenons à concentrer les billes d'or sur les patterns.

Cependant, la taille du motif de 5 μm avec un espacement de 5 μm est trop important pour pouvoir observer plusieurs zones de motif sur un même champ de vision avec la résolution nécessaire pour observer des structures. Nous pensons qu'il serait plus pertinent de passer à des zones d'une épaisseur de 1 μm , compte tenu des capacités du MET, et ainsi plus facilement identifier les zones de motif.

Lorsque nous avons tenté d'imprimer des lignes de 1 μm espacé par 1 μm , deux problèmes sont apparus. Tout d'abord, la transmission de l'aclar est plus faible que celle du verre en raison de l'indice de réfraction de ce dernier, ce qui rend difficile l'impression de petits motifs, car nos objectifs sont adaptés à l'indice de réfraction du verre.

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

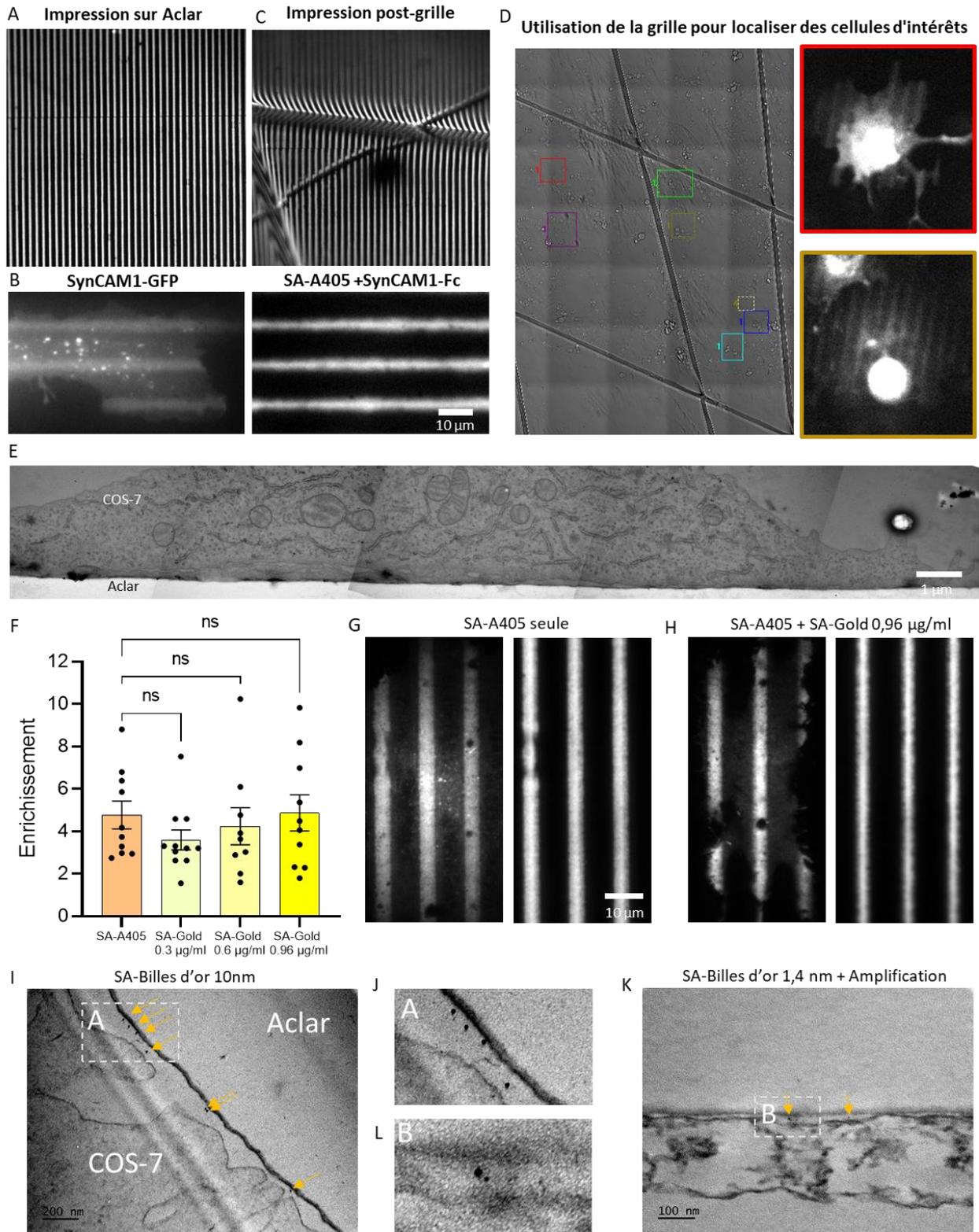


Figure 58. Impression protéique sur de l'Aclar pour la microscopie électronique à transmission

(A) Image en épifluorescence d'impression sur aclar (B) Images en épifluorescence d'une cellule surexprimant SynCAM1-GFP sur des motifs de SynCAM1-Fc réalisés sur de l'aclar (C) Image en épifluorescence d'impression sur aclar post-griffage (D) Localisation de cellules avec accumulation via la grille sur Aclar. (E) Image de MET d'une cellule SynCAM1-GFP étalée sur plusieurs motifs SynCAM1-Fc de 5µm (basée sur la taille). (F) Graphique de l'enrichissement de cellules SynCAM1-GFP sur des motifs de SynCAM1-Fc en présence ou non de différentes concentrations de streptavidine couplé à des billes d'or. (G-H) Image TIRF de cellules surexprimant SynCAM1-GFP sur des motifs de SynCAM1-Fc en présence ou non de streptavidine couplée à des billes d'or. (I-K) Image de MET de zones avec des billes d'or de 10 nm ou de 1.4 nm.

Pour remédier à ce problème, nous avons augmenté la concentration de photo-initiateur, ce qui a permis d'accélérer la réaction et de réussir à imprimer des motifs de petite taille. Le deuxième problème réside dans le fait que les lignes de 1 μm que l'on imprime ne sont pas homogènes en termes de fluorescence et donc en termes de protéines absorbées, que ce soit sur le verre ou sur l'aclar (Figure 59.C).

Lorsque que nous avons cherché à comprendre la cause de ces inhomogénéités, il nous est apparu que cela devait provenir des caractéristiques du DMD présent dans le PRIMO (DLP4500, de Texas instrument). Pour information, ce DMD est constitué d'un ensemble de micro-miroirs agencés en losange (Figure 59.A). L'adressage des micro-miroirs, c'est-à-dire leurs coordonnées sur le DMD, est tel que le réseau compte des lignes de 912 micro-miroirs (axe x) et des colonnes de 1140 micro-miroirs (axe y). Chaque micro-miroir correspond à un pixel de l'image numérique envoyée au DMD. Ils sont mobiles et peuvent pivoter autour d'un axe central pour réfléchir ou non les UV vers le chemin optique (Figure 59.B). Cette disposition en losange permet d'obtenir un dispositif plus compact et généralement moins coûteux. En effet, le fait que l'axe de rotation des micro-miroirs soit situé en diagonale permet d'avoir un système optique global plus petit car le rayon réfléchi est dans le même plan que le rayon incident. Cependant, cela entraîne quelques subtilités à prendre en compte, en particulier si l'on veut faire des patterns avec des petits motifs et contrôler précisément les micro-miroirs.

En effet, on peut voir que l'adressage des miroirs selon l'axe x et l'axe y est différent (Figure 59.A). Si on appelle δ la longueur d'une diagonale d'un micro-miroir, on voit que la distance entre deux colonnes est de δ alors que la distance entre deux lignes est $\delta/2$. De plus, une ligne de micro-miroirs n'a pas exactement la même forme qu'une colonne de micro-miroirs. Dans le premier cas, c'est une ligne droite de carré connecté par les sommets, dans l'autre un « serpent » de carré connecté par les côtés. Il y a donc une transformation non triviale entre l'image numérique qui est chargée sur le DMD et l'image affichée sur ce DMD. En négligeant les subtilités qui peuvent subvenir avec des patterns de quelques pixels ou sur les bords des patterns, on peut considérer que l'image affichée subit une dilatation d'un facteur deux dans la largeur par rapport à l'image numérique.

Cette dilatation entre l'image numérique et l'image affichée sur le DMD se traduit par une différence de ratio $\mu\text{m}/\text{pixel}$ en x qui est le double du ratio en y. Ce n'est pas idéal pour la création d'images numériques par les utilisateurs qui doivent prendre en compte ce paramètre. Pour leur faciliter la tâche, il a été décidé que Leonardo, le logiciel pilote de PRIMO, prendrait en entrée des images de 1824 pixels de large par 1140 pixels de haut avec un rapport $\mu\text{m}/\text{pixel}$ équivalent dans les deux axes (0,28 $\mu\text{m}/\text{px}$ à 20x par exemple). Le logiciel redimensionne ensuite l'image pour obtenir une image de 912 par 1140 pixels, en transformant les motifs via une interpolation du plus proche voisin, sans lissage. Cette transformation entraîne des pertes d'informations, en particulier pour les petits motifs, ce qui peut entraîner des variations de taille des motifs, ainsi que des niveaux de protéines si les motifs sont répartis sur deux micro-miroirs.

La solution la plus simple pour notre motif consiste à fournir une image numérique avec les lignes le long de l'axe x, ce qui permet d'éviter les artefacts dues au redimensionnement de l'image. Cependant, cette solution n'est pas adaptée à tous les motifs. Suite à ces

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

observations, une solution plus pérenne a été implémentée dans la dernière version du logiciel Léonardo. Il est dorénavant possible de fournir des images numériques avec une taille de 912 par 1140 pixels et un ratio pixel/ μm différent en x et y permettant ainsi d'éviter le redimensionnement de l'image et la perte d'informations. En utilisant cette solution, il est possible d'imprimer des lignes avec beaucoup moins de variations de taille, permettant ainsi d'obtenir des patterns micrométriques voire même submicrométriques de meilleure qualité (Figure 59.D). Cette avancée va nous permettre, lors de futures expérimentations, d'observer en microscopie électronique des alternances de zones d'interaction de $1\ \mu\text{m}$. De plus, elle nous offrira la possibilité de proposer aux utilisateurs une meilleure résolution d'impression.

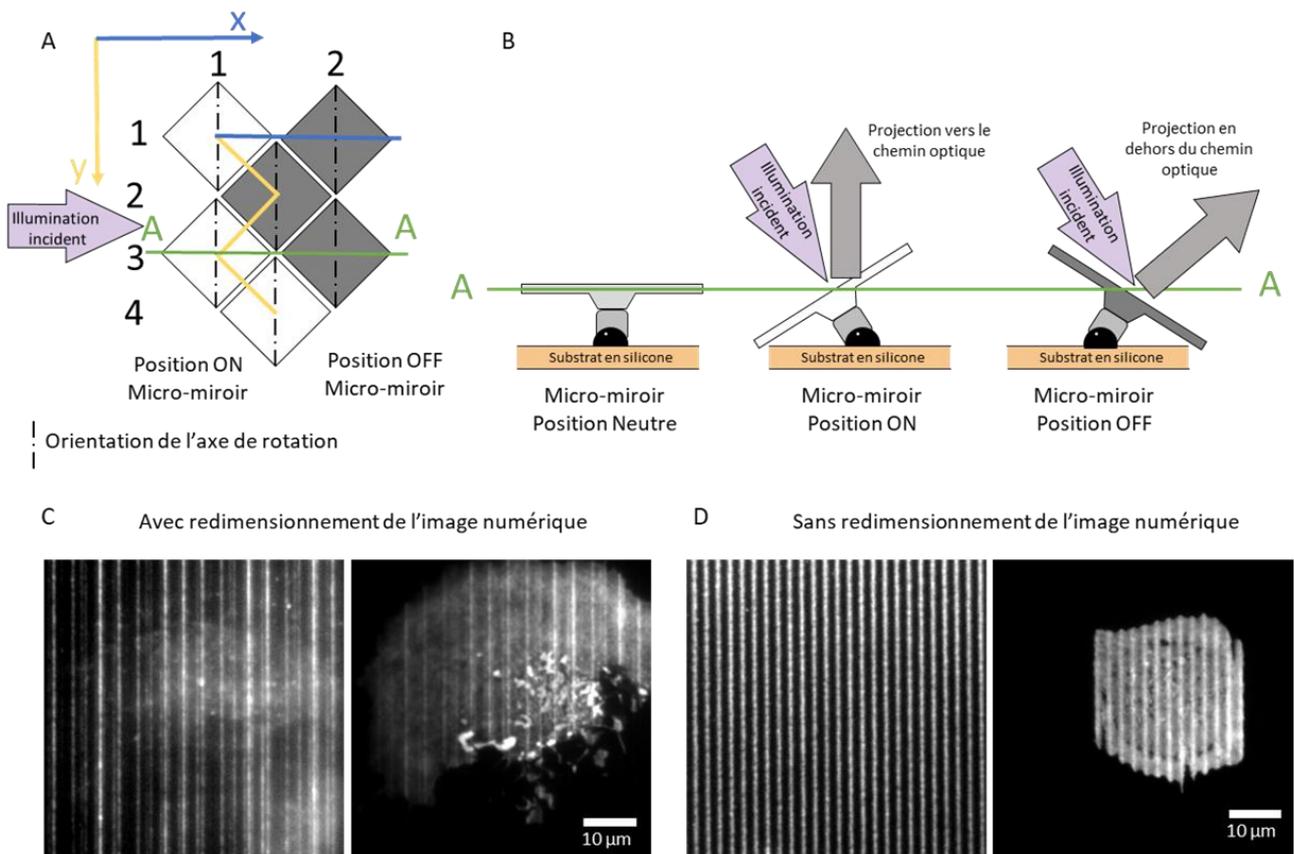


Figure 59. Impact de l'orientation et de l'adressage des miroirs sur des impressions micrométriques

(A) Représentation schématique du DMD (DLP4500, Texas instrument) et de l'ordre des micro-miroirs dans les axes des y et des x (B) Vue en coupe des micro-miroirs pour montrer les différentes positions possibles permettant de projeter les UV dans le chemin optique ou non. (C) Cellule présentant de l'accumulation sur des motifs de $1\ \mu\text{m}$ réalisé avec un redimensionnement de l'image numérique (D) Cellule présentant de l'accumulation sur des motifs de $1\ \mu\text{m}$ réalisé sans redimensionnement de l'image numérique

II Conclusion

Pour conclure cette première partie, nous avons présenté une approche reposant sur l'impression protéique, permettant d'évaluer de manière quantitative les interactions ligand-récepteur au niveau de la cellule individuelle, dans un environnement membranaire. En combinant ce modèle avec le suivi de molécules uniques, nous avons pu précisément déterminer les coefficients de diffusion des récepteurs ainsi que les transitions à court terme entre l'état libre et l'état lié. Parallèlement, le FRAP, associé à des modèles analytiques adaptés, a permis d'estimer le taux de renouvellement à long terme des récepteurs.

Du point de vue biologique, nous avons utilisé ce modèle biomimétique pour analyser la dynamique d'interaction des complexes moléculaires synaptiques, notamment la liaison extracellulaire homophile entre SynCAM1, la liaison hétérophilique entre Neurexine1 β et Neuroligine1, ainsi que la liaison intracellulaire entre Neuroligine1 et PSD-95.

Plus précisément, nos résultats ont démontré que SynCAM1 forme des liaisons homophiliques de courte durée, détectables par des transitions rapides de l'état libre à l'état lié en SPT lors de l'analyse de la diffusion instantanée et par l'ajustement des courbes FRAP à l'aide d'un modèle de diffusion effective. À notre connaissance, il existe très peu d'articles dans la littérature se concentrant sur la cinétique d'interaction entre les membres de la famille SynCAM, à l'exception d'un article qui mesure en SPRi les paramètres cinétiques entre les différents membres de la famille SynCAM (Ito et al., 2018). Pour l'interaction SynCAM1/SynCAM1, ils obtiennent un k_{on} de $6.4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, un k_{off} de $7.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et une constante de dissociation (K_d) de 114.4 nM. Dans notre étude nous avons déterminé par FRAP un rapport entre k_{on}^*/k_{off} de 3.3, et par SPT nous avons estimé de manière très approximative un k_{on}^* de 6.2 s^{-1} et un k_{off} de 3.5 s^{-1} . L'interaction que nous décrivons semble beaucoup plus labile que celle décrite dans la littérature. Cependant, il est difficile de comparer nos mesures réalisées dans un environ 2D, sans connaissance précise de la densité de surface des ligands et des récepteurs, à celles réalisées dans un environ 3D sans présence de membrane (Wu et al., 2011).

Le rôle de SynCAM1 au niveau de la synapse est multiple, il participe à sa formation (Stagi et al., 2010), à sa morphologie (Fogel et al., 2011) et à son intégrité structurelle de par sa présence au niveau péri synaptique (Perez de Arce et al., 2015). En plus de cela, SynCAM1 a également un rôle de régulation dans la plasticité synaptique. En effet, son absence induit une augmentation de la dépression à long terme (LTD) (Robbins et al., 2010), qui est un mécanisme qui contribue à l'apprentissage et à la mémoire (Stacho & Manahan-Vaughan, 2022) et au cours duquel la morphologie des synapses varie pour renforcer ou déstabiliser certaines connections (Becker et al., 2008). Cela nous semble cohérent que la modulation morphologique, ne soit pas médiée par des interactions fortes et de longue durée qui offriraient peu de capacité d'adaptation et de réactivité. La présence d'une interaction ayant un taux d'association et de dissociation élevé permet d'avoir un contact qui se renouvelle en permanence, permettant une réponse rapide aux signaux neuronaux. Cette interaction SynCAM1 peut d'ailleurs être modulée par des modifications de glycosylation (Fogel et al., 2010), présentées comme un mécanisme de régulation de l'adhésion trans-synaptique.

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

Concernant l'interaction entre Neurexine1 β et Neuroligine1, nos données révèlent, que Neuroligine1 établit des liaisons de longue durée avec Neurexine1 β , très probablement du fait de sa nature dimérique. L'introduction de mutations ponctuelles dans Neuroligine1 (L399A/N400A), connues pour altérer la liaison Neurexine1 β - Neuroligine1 (Reissner et al., 2008), a conduit à une absence d'accumulation des récepteurs et à une cinétique de FRAP correspondant à une diffusion pure. Cela confirme la spécificité de la liaison créée sur nos substrats micro-imprimés. De plus, un mutant ponctuel de Neuroligine1 (E584A/L585A) incapable de se dimériser (Araç et al., 2007; Dean et al., 2003) a présenté une accumulation moindre et une cinétique de FRAP plus rapide sur les motifs recouverts de Neurexine1 β -Fc par rapport au Neuroligine1 de type sauvage. Ceci démontre que la dimérisation de Neuroligine1 ralentit son interaction avec Neurexine1 β .

A l'opposé de SynCAM1, il existe de nombreuses études utilisant une variété de méthodes pour caractériser la cinétique d'interaction du couple Neuroligine1/Neurexine1 β . Les mesures en SPR, utilisées comme technique de référence, rapportent des valeurs disparates : une cinétique rapide, avec un K_d à 16 nM, lorsque la Neuroligine1 dimérique est adsorbée sur la puce de SPR et interagit avec la Neurexine1 β monomérique soluble (Leone et al., 2010) ; et une cinétique plus lente ($k_{off} = 0,015 \text{ s}^{-1}$ et $K_d = 300 \text{ nM}$) lorsque la Neurexine1 β -Fc est greffé sur la puce et interagit avec la Neuroligine1 soluble dimérique (Comoletti et al., 2003). Ceci laisse penser que lorsque l'on étudie la Neurexine1 β comme analyte, qui est nativement monomérique, elle échange rapidement avec l'un des deux composants de la Neuroligine1 qui est constitutivement dimérique. Mais lorsque l'on utilise la Neurexine1 β -Fc, la Neurexine devient faussement « dimérique » à cause de la formation d'un pont disulfure entre les fragments cristallisables (Saint-Michel et al., 2009). Cela induisant un modèle à deux états et de potentiels effets de liaison successive (*rebinding en anglais*), rendant la liaison avec la Neuroligine1 beaucoup plus stable.

Avec notre modèle, nous trouvons des interactions encore plus lentes que celle décrite dans la littérature avec un $k_{off} = 0,0042 \text{ s}^{-1}$ et de $0,0015 \text{ s}^{-1}$ mesuré respectivement en FRAP dans un environnement membranaire 2D ou en solution (3D). Ce retour de FRAP très lent concorde avec celle prédite par le détachement progressif de QDs recouvert de Neurexine1 β -Fc interagissant avec des neurones primaires exprimant Neuroligine1 (Saint-Michel et al., 2009). De plus, nous avons décrit deux composantes à la cinétique pour Neuroligine1, une partie très lente qui correspondrait à une interaction dimérique et une partie plus rapide. Cette partie plus rapide, ne donnant pas un coefficient de diffusion cohérent avec les résultats de SPT, nous nous sommes aperçus qu'elle était très similaire au retour de FRAP observé pour le mutant Neuroligine1^{E584A/L585A} incapable de se dimériser. Nous supposons donc que cette partie rapide correspond à une interaction monomérique, nous sommes donc en présence d'un modèle à deux états.

Face à cette analyse nous avons réfléchi à la pertinence de notre modèle et de nos résultats. Neurexine1 β étant monomérique *in vivo*, est-ce que la composante dimérique de l'interaction que l'on observe est un biais expérimental, dû à la présence du fragment cristallisable ? Mais des mesures plus récentes par titration calorimétrique isotherme, où les molécules sont sous forme soluble, décrivent une interaction avec une forte réaction exothermique et un K_d de

390 nM entre l'ectodomaine de Neuroligine1 et la Neurexine1 β monomérique (Elegheert et al., 2017). Dans le même article, des mesures réalisées en SPR avec Neurexine1 β sous forme soluble, donc monomérique, donnent un k_D deux fois plus élevé avec une valeur de 718 nM (Comoletti et al., 2003; Leone et al., 2010). Valeur qui correspond à la mesure réalisée en présence de la Neurexine1 β dimérisé via le Fc (Comoletti et al., 2003). L'hypothèse de la création d'un double état du fait du Fc ne semble donc pas être la cause des différences de mesure décrites dans les articles précédents (Comoletti et al., 2003; Leone et al., 2010)

Dans la littérature, des études montrent qu'en l'absence de dimérisation de la Neuroligine, la formation de clusters de Neurexine est annihilée, impactant ainsi la maturation de la synapse. C'est pourquoi, *in vivo*, la forme monomérique de Neuroligine, étant une conformation instable, est retenue dans le réticulum (Poulopoulos et al., 2012). Cela laisse suggérer que l'interaction à double état que l'on mime dans notre modèle est potentiellement présente au niveau physiologique, avec un rôle non négligeable.

De plus, il est connu que la présence de multiple interactions, comme les interactions dimériques, permet effectivement d'obtenir des interactions plus fortes, via un phénomène appelé l'effet cluster (Deng et al., 2022; Gopalakrishnan et al., 2005; Marianayagam et al., 2004; Wu et al., 2013). Ce phénomène de cluster est favorisé par différents mécanismes, dont un principalement décrit pour les interactions ligands solubles – récepteurs : le ré-attachement (*rebinding* en anglais), favorisé par une densité élevée de partenaire et leur proximité (Erbaş et al., 2019; Lagerholm & Thompson, 1998; Vauquelin & Charlton, 2010). Lors d'essais préliminaires visant à déstabiliser les dimères de Neurexine1 β -Fc par utilisation de DTT (Saint-Michel et al., 2009), aucune différence de retour de FRAP n'est observée, laissant suggérer que le double état décrit est davantage lié à une forte densité de Neurexine1 β -Fc sur nos motifs protéiques qu'à la dimérisation de ce dernier.

Pour aller dans ce sens, nos résultats sur différentes densités d'impression de Neurexine1 β , réalisées pour étudier l'impact sur la diffusion et l'enrichissement des récepteurs au sein d'une même cellule, démontrent un impact non négligeable de la densité sur la diffusion instantanée des molécules. En effet, en présence d'une forte densité la diffusion des molécules au sein des motifs est ralenti par des effets d'encombrements stériques (Roosen-Runge et al., 2011), comme déjà démontrés à la synapse (M. Renner et al., 2012) et par simulation sur des micro-motifs (Arnold et al., 2016). Bien que l'encombrement stérique soit décrit comme ayant principalement un effet sur la diffusion, cela a quand même un impact, certes moindre, sur la cinétique d'interaction. La plupart des études affirme que l'encombrement augmente également le taux d'association (Zimmerman & Minton, 1993).

In vivo, l'interaction Neurexine1 β /Neuroligine1 est indispensable, car l'absence d'un des deux partenaires est létale chez les rongeurs (Missler et al., 2003). La formation des synapses n'est pas impactée par la perte de cette interaction, mais c'est la maturation et la fonctionnalité des synapses qui se voient dégradées. Il a été montré que l'affinité de cette interaction peut être modulée par une autre protéine membranaire, MDGA, qui par interaction avec la Neuroligine1 bloque les sites d'interactions avec la Neurexine1 β (Elegheert et al., 2017). La variation de la concentration de MDGA permet de moduler plus ou moins son effet.

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

Dans la dernière partie de cette étude sur les interactions protéine-protéine, nous avons utilisé la forte liaison entre Neurologine1 et Neurexine1 β -Fc comme modèle pour explorer la dynamique d'interaction entre l'extrémité C-terminale de Neurologine1 et la protéine d'échafaudage intracellulaire PSD-95. Ceci a permis de révéler une interaction plus complexe avec les 3 domaines PDZ que ce qui est décrit dans la littérature. Il est en effet décrit que la Neurologine1 interagit via son domaine d'interaction au protéine PDZ avec le domaine PDZ3 (Irie, 1997) de la PSD-95. Cependant, notre modèle indique, via l'utilisation de mutants de PSD-95, que bien que l'interaction avec PDZ3 semble être la plus stable, Neurologine1 peut également interagir avec les domaines 1 et/ou 2, mais avec une affinité moindre. L'interaction avec le mutant ayant uniquement le domaine PDZ3 semble cependant plus stable qu'en présence de la forme sauvage. Un mécanisme potentiel pour expliquer ce résultat serait qu'une queue C-terminale d'un dimère Nlg1 interagit préférentiellement avec le domaine PDZ 3 du PSD-95, tandis que l'autre queue C-terminale lie les domaines PDZ 1 ou 2 sur la même molécule PSD-95. En présence uniquement du mutant avec une mutation sur les domaines PDZ 1 et 2, les deux extrémités de Nlg1 sont liées à un domaine PDZ3 ralentissant le détachement.

Pour pousser notre modèle un peu plus loin, nous avons commencé à développer des preuves de concept pour de futurs développements. Ces résultats étant très préliminaires, les conclusions le sont également. Ces développements sont orientés autour de 3 axes : le criblage haut-débit, un modèle de compétition protéique et l'étude de la topologie de la membrane cellulaire. Nous avons principalement développé les aspects techniques, en démontrant la possibilité d'imprimer des protéines non purifiées pour réduire le temps de production de banque protéique. Nous avons proposé des solutions pour réussir à fixer de manière spécifique et contrôlée deux protéines d'adhésions synaptiques, afin de développer un modèle de compétition protéique. Cependant, nous avons fait face à des difficultés de couplage protéique en raison d'un manque d'expérience dans ce domaine. Enfin, nous avons amélioré notre capacité d'impression micrométrique et démontré la possibilité d'observer les motifs protéiques par l'utilisation de la microscopie électronique pour étudier la membrane cellulaire au niveau des zones de motifs. Ces projets seront développés dans le cadre de prochaines collaborations ou par de prochains étudiants.

III Matériels et méthodes

3.1 Plasmides d'ADN

3.1.1 Plasmide pour mesure d'enrichissement, SPT-PALM et FRAP

SynCAM1-GFP (+420) (Cheadle & Biederer, 2012) a été gracieusement offerts par T. Biederer (Yale University, New Haven, USA).

GFP-Neurexine1B (SS4-) (Klatt et al., 2021) a été gracieusement offerts par M. Missler (Münster University, Allemagne).

HA-Nlg1-GFP (-21) (Scheiffele et al., 2000) et AP-Nlg1 (Liu et al., 2013) sont des dons respectifs de P. Scheiffele (Biozentrum, Basel, Suisse) et A. Ting (Stanford University, Palo Alto, CA, USA). Toutes les constructions d'ADN Nlg1 contiennent les inserts d'épissage A et B.

Les plasmides SynCAM-mEos3.2 (+420) et HA-Nlg1-mEos3.2 (-21) ont été dérivés des plasmides SynCAM-GFP et HA-Nlg1-GFP (-21), respectivement, en remplaçant la séquence GFP par des mEos3.2 de mEos3.2-C1, un don de Michael Davidson & Tao Xu (Addgene plasmid # 54550 ; <http://n2t.net/addgene:54550> ; RRID : Addgene_54550).

HA-Nlg1^{E584A/L585A}-GFP (-21) a été généré en sous-clonant la partie mutée de Nlg1 de HA-Nlg1^{E584A/L585A}, déjà décrite (Saint-Michel 2009), dans HA-Nlg1-GFP (-21) aux sites EcoRV/KpnI.

La double mutation L399A/N400A a été insérée dans le plasmide HA-Nlg1-GFP (-21) en remplaçant la séquence EcoNI-EcoRV WT de Nlg1 par l'insert généré par Eurofins contenant les mutations.

La mutation AP-Nlg1-Δ5 a déjà été décrite (Letellier et al, 2018, eLife). Le plasmide Ncadhérine-GFP a déjà été décrit (Gavard et al., 2004).

Le plasmide PSD-95-GFP (+253) et les versions mutants H130V-H225V et H372V de ce plasmide ont été gracieusement offerts par M.Sainlos (IINS, Bordeaux), ces plasmides ont déjà été décrit (Sainlos et al., 2011).

Le plasmide LRRTM2-GFP, a été généré en remplaçant dans la séquence du plasmide LRRTM2-CFP (dons de A.M Craig), le CFP au site AgeI/NotI par la séquence GFP du vecteur pEGFP-N1 (clontech). La fidélité de toutes les constructions a été vérifiée par séquençage à l'aide de la société Genewiz.

3.1.2 Plasmide pour production de protéines recombinante

Le plasmide Neurexine1β-Fc (SS4-) a été généreusement donné par P. Scheiffele (Biozentrum, Basel), SynCAM1-Fc par T. Biederer (Université de Yale), le plasmide Ncadhérine-Fc par D.Commoletti (Université Victoria, Wellington). Le plasmide Neurexine1-SNAPtag est dérivé du plasmide Neurexine1β-Fc et du vecteur commercial pSNAPf (NEB) en remplaçant la séquence du Hu-Fc par la séquence du SNAPtag via les sites BamHI et XhoI.

3.2 Electroporation

Pour toutes les expérimentations nous avons travaillé avec des cellules COS-7 (ATCC). Ces cellules sont cultivées dans du milieu FluoroBrite Dulbecco's modified Eagle's medium

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

(DMEM; GIBCO/BRL) supplémenté avec 10% de sérum bovin foetal (FBS), 100 unités mL⁻¹ de pénicilline, 100 µg. mL⁻¹ de streptomycine, 1% de Glutamax et 1% de Sodium-Pyruvate dans une atmosphère à 37°C et 5% de CO₂. L'absence de rouge de phénol dans le milieu est préconisée car ce dernier s'adsorbe dans les zones d'impression créant un fort niveau d'auto-fluorescence dans le vert.

36 heures avant les expériences, les cellules sont rincées avec du PBS à 37°C, trypsinées pendant 5 min, suspendue dans du milieu de culture et centrifugées pendant 5 min à 1000 rpm. Le culot contenant environ 1M à 2M de cellules est suspendu dans 100 µl de milieu d'électroporation, placé dans une cuvette et électroporées en utilisant le système Amaxa Nucleofector (Lonza) avec 1-3 µg d'un des plasmides suivants :

- Pour le SPT-PALM : Nlg1-mEos3.2, SynCAM1-mEos3.2 ou Nlg1^{E584A/L585A}-mEos3.2
- Pour le FRAP : et GFP-Nrx1β, Nlg1-GFP, Nlg1^{E584A/L585A} GFP, Nlg1^{L399A/N400A}GFP, SynCAM1-GFP, Ncadhérine-GFP, LRRTM2-GFP (pour FRAP et/ou enrichissement). Pour les expériences FRAP sur PSD-95-GFP, les cellules sont électroporées avec 2 plasmides : AP-Nlg1 ou AP-Nlg1Δ5, ainsi que PSD-95-GFP (WT ou mutants ponctuels H130V/H225V ou H372V), avec un rapport Nlg1 :PSD-95 de 4 :1.
- Pour l'étude de l'activité de la protéine recombinante Neurexine1β-SNAPtag : Neuroligine1-GFP, SNAPtag-Neurexine1β

Les cellules électroporées sont ensuite remises en suspension dans un milieu de culture, placées dans des plaques de 12 puits et replacées dans l'incubateur jusqu'à le début de l'expérimentation.

3.3 Protéines

3.3.1 Protéines recombinantes

Les protéines recombinantes Nrx1β, Ncadhérine, SynCAM1 fusionnées au Fc humain au niveau C-terminale et Neurexine1β fusionnées au SNAPtag, ont été produites en transfectant (X-Gene) des cellules HEK-293 avec les plasmides correspondants, qui contiennent une résistance à l'hygromycine. Vingt-quatre heures après la transfection, de l'hygromycine (0,5 mg/ml) a été ajoutée, le milieu (DMEM-F12) a été changé tous les deux jours en rajoutant de l'hygromycine pour maintenir la sélection. Après une sélection d'une quinzaine de jours, le milieu a été remplacé par du milieu synthétique AIMV sans sérum (Invitrogen), et le milieu conditionné a été prélevé tous les 2-3 jours. Au total, 500 ml de milieu conditionné ont été recueillis, filtrés à 0.2 µm, et congelés à -20°C.

Pour la purification des protéines, les 500 ml de milieu conditionné ont été décongelés. La protéine a été purifiée par affinité sur une colonne de protéine G (HiTrap protG) et éluée avec de la glycine. La purification a été réalisée par la plateforme de Biochimie du Neurocentre Magendie. Différentes fractions ont été collectées et équilibrées avec du Tris 1 M pH 9, pour tamponner le pH à 7,2. Les échantillons ont été conservés congelés à -80°C. La pureté des protéines a été évaluée par électrophorèse sur gel suivie d'une coloration au bleu de Coomassie. Pour caractériser la production des protéines, des échantillons de fractions

collectées, ainsi que des quantités connues de Fc humain purifié, ont été séparés par SDS-PAGE à 4-20 % en présence de b-mercaptoéthanol. Les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose, et les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués avec 5 % de BSA pendant 1 heure. La présence de protéine-Fc et de Fc a été révélée avec un anticorps Fc antihumain de chèvre (dilution 1/1000, Jackson) et un anticorps secondaire anti-chèvre conjugué à la HRP (dilution 1/5000, Jackson). Les Western blots ont ensuite été développés à l'aide de la méthode ECL (Amersham). Des fractions sont regroupées en deux lots et la concentration de protéines purifiées a été estimée, en accord avec des mesures indépendantes par dosage protéique (Bio-Rad), en utilisant la BSA comme étalon. Les lots sont ensuite aliquotés et conservés à -80°C.

Les protéines recombinantes Ncadhérine-Fc (1388-NC) et LRRTM2-Fc (5589-LR) ont été achetées chez R&D biosystems. Le fragment humain Fc couplé à la Cy3 (009-160-008) a été acheté chez Jackson immunoresearch.

3.3.2 Couplage protéique

3.3.2.1 *Neurologine1-HaloTag*

La Nlg1-Halotag et la Nlg1AB-Fc a été gracieusement offerte par Carsten Ressler. Le couplage avec le ligand Halotag-Alexa488 (Promega, G1002) de la Nlg1-Halotag a été réalisé par nos soins en incubant la Nlg1-HaloTag avec un excès (5X plus) de ligand Halotag-Alexa488 à 4°C sous agitation pendant une nuit. Ensuite, la solution a été passée à travers un centricon (10 kDa) pour éliminer l'excès de ligand libre. La Nlg1-Halo-Alexa488 a été remise en suspension à une concentration de 0.5 mg/ml dans une solution de 10 mM de Hepes et 300 mM de NaCl. Des aliquotes de la solution ont été conservées à -20°C après filtration.

3.3.2.2 *Fibrinogène SNAPligand*

- Couplage Protéique :

Pour obtenir le Fibrinogène SNAPligand, nous avons utilisé du fibrinogène humain commercial (RP-43142, Invitrogen) et du BG-GLA-NHS (S9151S, BioLabs). Le BG-GLA-NHS est spécialement conçu pour coupler des protéines à un SNAPligand, permettant ainsi la reconnaissance par un SNAPtag. Grâce à la fonction NHS et à la présence d'amines en quantité sur le fibrinogène, il est possible d'induire un couplage via une liaison ester (Figure 60). Pour ce faire, le BG-GLA-NHS est dissous dans du DMSO afin de réduire l'hydrolyse du NHS. Le fibrinogène est ensuite ajusté à un pH de 8.1 afin que les amines soient sous forme non ionisées. Ces deux composants

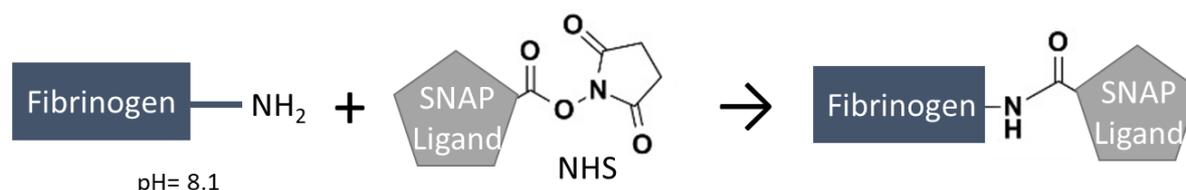


Figure 60. Réaction de couplage pour le fibrinogène-SNAPligand

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

ont ensuite été mélangés avec un excès de BG-GLA-NHS (3 fois plus) et incubés pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Ensuite, la solution a été passée à travers une colonne de dessalage (PD MiniTrap G-25) pour éliminer l'excès de BG-GLA-NHS non fixé, qui a un poids moléculaire bien inférieur à celui du fibrinogène. L'éluât a ensuite été aliquoté, et les échantillons ont été conservés à -80°C.

- Western blot et Coomassie :

Avant le dépôt des protéines, un couplage entre le fibrinogène-SNAPligand et la protéine SNAPtag commerciale (P9312, New England BioLabs) a été réalisé en incubant 10 µl de Fibrinogène-SNAPtag à 6 µM avec 2 µl de protéine SNAPtag à 50 µM, auxquels nous avons ajouté 1µl de DTT à 10 µM pour éliminer les dimères de protéine SNAPtag. Le couplage a été effectué pendant 30 minutes à 37°C sous agitation, conformément aux recommandations commerciales.

Pour toutes les protéines (le fibrinogène-A647, le fibrinogène-SNAPligand, le fibrinogène-SNAPligand couplé à la protéine SNAPtag), 10 µg de chaque ont été déposés. La protéine SNAPtag seule a été déposée à 2 µg. Les échantillons ont été dénaturés pendant 5 minutes à 95°C avant d'être chargés sur un sur un gel de polyacrylamide contenant du Laury sulfate de sodium (SDS-PAGE) 4-20% (Biorad) pour permettre la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. Étant donné que le gel comportait 15 puits, le dépôt de chaque protéine a été réalisé deux fois, permettant ainsi la réalisation d'un Coomassie et d'un Western Blot. Après la migration (200V pendant 35 minutes), le gel a été coupé en deux.

Pour la coloration au bleu de Coomassie, une moitié du gel a été rincée à l'eau, puis immergée dans une solution de bleu de Coomassie. Après rinçage du bleu et élimination de l'excès de colorant, les bandes positives ont été visualisées à l'aide du système d'imagerie Odyssey Fc (LI-COR).

Pour le western blot, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose et incubées dans une solution de blocage (LI-COR) pendant 1 heure à température ambiante, avant d'être incubées avec des anticorps primaires et secondaires : anti-SNAPtag de lapin (P9310, New England BioLabs 1 : 1000) ; IRdye-800-conjugué AffiniPure chèvre Anti-lapin (LI-COR, 926-32211, 1 :15000). Les bandes positives ont été visualisées à l'aide du système d'imagerie Odyssey Fc (LI-COR).

3.3.3 Activité de la protéine recombinante Neurexine1β-SNAPtag

3.3.3.1 *Western blot*

Les échantillons ont été dénaturés 5 minutes à 95°C, avant d'être chargés sur un gel SDS-PAGE 8% (Biorad) pour permettre la séparation des protéines. Après migration sur le gel (200V,35 min), les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose et incubées dans une solution de blocage (LI-COR) pendant 1 heure à température ambiante, avant d'être incubées avec des anticorps primaires et secondaires : anti-SNAPtag de lapin (P9310, New England BioLabs 1 : 1000) ; IRdye-800-conjugué AffiniPure chèvre Anti-lapin (LI-COR, 926-

32211, 1 :15000). Les bandes positives ont été visualisées à l'aide du système d'imagerie Odyssey Fc (LI-COR).

3.3.3.2 *Marquage live et immunomarquage*

En premier lieu, un échantillon de 3.5 ml de Neurexine1 β -SNAPtag a été concentré et partiellement filtré via l'utilisation d'un filtre à centrifuger (10 kDa) et suspendu dans 450 μ l de PBS1X.

Après 36 heures suivant l'électroporation, le marquage avec le SNAPsurface-A649 (S9159S, New England BioLabs) a été effectué. Pour les cellules SNAPtag-Neurexine1 β , le SNAPsurface-A649 a été dilué au 1 :200 dans du milieu, puis incubé pendant 30 minutes à 37°C dans du milieu de culture. Pour les cellules Neurologine1-GFP, il a été nécessaire de coupler par chimie clic la protéine recombinante Neurexine1 β -SNAPtag avec le SNAPsurface-A649. Pour ce faire, nous avons mélangé 5 μ M de Neurexine1 β -SNAPtag avec 10 μ M de SNAPsurface-A649 dans du milieu, en ajoutant du DTT (Dithiothréitol), puis incubé pendant 30 minutes à 37°C sous agitation. Ensuite, ce mélange a été déposé sur les cellules Neurologine-GFP pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été rincées, puis observées en épifluorescence avec un objectif 100X. Pour le marquage Neurexine1 β -Fc, nous avons travaillé avec un mélange de 2 μ M d'anti Humain-Fc A647 et 2 μ M de Neurexine1 β -Fc dilué dans du milieu. Les paramètres d'incubation et d'observation sont les mêmes que pour la protéine Neurexine1 β -SNAPtag.

Pour l'immunomarquage, les lamelles de cellules Neurologine1-GFP restantes ont été disposées sur de la glace, et de la Neurexine1 β -SNAPtag (concentrée ou non concentrées) a été incubée pendant 30 min. Les lamelles de cellules SNAPtag-Neurexine1 β restantes ont suivi le même protocole, sans incubation de protéines. Ensuite, les cellules ont été fixées chimiquement avec une solution de 4% de paraformaldéhyde (PFA). Après rinçage du PFA avec du PBS1X, une première étape dans du NH₄CL pendant 15 min a été réalisée pour bloquer les molécules de PFA libres restantes. Ensuite, à l'aide de PBS contenant 1% d'albumine de sérum bovin sans biotine (Carlroth) pendant 1 heure, on bloque les zones non-spécifique pour limiter le bruit de fond. Les cellules ont ensuite été marquées par un anticorps polyclonal de lapin anti-SNAPtag (P9310, New England BioLabs 1 : 500) pendant 1 heure, suivi d'un anticorps d'âne anti-lapin Alexa647 (A31573, Thermo Fischer Scientific, 1 :1000) pendant 1 heure. Les lamelles ont ensuite été observées en épifluorescence avec un objectif 20X.

3.4 Micro-impression de biomolécule en PLPP liquide

La passivation du substrat a été réalisée dans une salle blanche. Des lamelles de verre de 18 x 18 mm (Marienfeld SUPERIOR Germany, 0107032) ont été activées par un traitement plasma de 5 minutes (Harrick Plasma, Ithaca, NY, USA). Pour les manipulations de microscopie électronique à transmission, les lamelles de verres ont été remplacées par de l'Aclar (33C #50425-10, EMS) découpé en carrés de 20 mm x 20 mm, mais le traitement est équivalent. Un disque de polydiméthylsiloxane (PDMS) de 18 mm de diamètre et 250 μ m d'épaisseur, avec un puit carré de 16 mm au centre, a été découpé dans un film de silicone transparent (BISCO HT-6240, Rogers Corporation Carol Stream, IL, USE) à l'aide d'un cutter vinyle craft Robo Pro (Graphtec, Irvine, CA, USA) et placé sur la lamelle. Ensuite, les lamelles ont été placées dans

MODELE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

une chambre fermée avec 150 µl de (3-aminopropyl) triéthoxysilane (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et un dessiccateur (Sigma-Aldrich) pendant 1 heure. Une solution de poly (éthylène glycol) -Succinimidyl Valerate, MW 5000 (PEG-SVA, Laysan Bio, Arab, AL, USA) à 228,6 mg/ml dans un tampon carbonate 10 mM pH > 8, a été incubée dans le puits pendant 1 h, puis rincée trois fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS 1X) sans sécher la surface. Le *micropatterning* a été réalisé à l'aide du système PRIMO monté sur un microscope inversé (Nikon Eclipse Ti-E Japon) et couplé au logiciel Leonardo (Alvéole, France). Le motif choisi est une série de lignes parallèles de 5 µm de large espacées de 5 µm. Les images numériques ont été réalisées via le logiciel Inkscape, les images doivent être au format 8 bits et en TIFF. La taille des images est de 1824 * 1140 pixels avec un ratio px/µm de 0.28 pour un objectif 20X (Nikon Super Fluor 0.75 NA). Après avoir aligné le centre du puits avec le motif UV en déplaçant la platine de balayage, une solution de photo-initiateur (PLPP, Alvéole, France) est déposée sur l'échantillon. Les molécules de photo-initiateur activées par les UV catalysent la réaction de dégradation des chaînes PEG en fonction de la dose d'UV ce qui permet l'adsorption des protéines sur les zones exposées aux UV. Nous avons travaillé avec une dose UV de 600mJ/mm² pour les expérimentations sur verre et avec une dose de 800 mJ/mm² pour celles sur Aclar.

Après rinçage au PBS1X de la solution de PLPP, de l'albumine sérique bovine (BSA) biotinylée (Thermo scientific, 29130) diluée à 100 µg/ml dans du PBS1X a été incubée. Des incubations successives ont été réalisées avec de la Streptavidine, conjugué Alexa Fluor™ 647 (Invitrogen, S21374) pour le FRAP, de la Streptavidine, conjugué Alexa Fluor™ 405 (Invitrogen, S32351) pour le SPT-PALM ou de la streptavidine conjuguée avec des billes d'or de 1.4 nm (Nanogold®-Streptavidin de Nanopobres) ou de 10 nm (S9059, Merck) pour la microscopie électronique à transmission, et de l'anticorps anti-Fc Humain biotinylé (Jackson immunoresearch, 109-065-098) et de la protéine Fc purifiée. Toutes ces molécules ont été incubées à une concentration de 50 µg/ml dans du PBS 1X. Toutes les incubations ont été réalisées à température ambiante, sauf pour la protéine Fc purifiée, où l'incubation a été effectuée à 4°C. La BSA-biotine et la streptavidine ont été incubées pendant 3 minutes, l'anticorps anti-Fc biotinylé pendant 10 minutes, et la protéine-Fc purifiée toute la nuit. Entre les différentes incubations, trois rinçages ont été effectués avec du PBS 1X sans jamais laisser sécher la surface. Une observation en épifluorescence a été réalisée pour contrôler la qualité des motifs juste après l'incubation de la streptavidine.

Pour réaliser une deuxième impression protéique, il est possible de renouveler l'insolation en incubant à nouveau du PLPP et en effectuant une seconde exposition aux UV. Pour les manipulations d'impression multiple, nous avons également travaillé avec du fibrinogène humain couplé à de l'Alexa Fluor 647 (F35200, Invitrogen) à 50µg/ml. Différents ordres d'incubation et de temps d'incubation ont été testés et sont présentés dans les résultats.

Ensuite, les cellules électroporées ont été détachées avec de la trypsine etensemencées sur les supports micro-imprimés à une concentration d'environ 20 000 cellules par lamelle. Après 2 heures d'incubation, les cellules non adhérentes ont été rincées, puis des images ont été acquises entre 1 et 3 heures plus tard.

3.5 Imagerie

3.5.1 Epifluorescence et TIRF

Pour l'imagerie des motifs et des cellules, nous utilisons deux modalités de microscopie à champ large. Pour l'imagerie des motifs, nous utilisons l'épifluorescence, qui est le mode d'illumination le plus courant. En épifluorescence (Figure 61.A), l'échantillon est illuminé par une colonne de lumière. Pour créer cette colonne, le faisceau de lumière incident est focalisé sur l'axe optique dans le plan focal arrière de l'objectif, de sorte que les rayons sortent de l'objectif parallèlement à l'axe optique. Dans ce type d'illumination, l'ensemble de l'épaisseur de l'échantillon est illuminé, et l'image d'émission obtenue correspond à tous les fluorophores, même ceux en dehors du volume focal, ce qui peut induire un fond de fluorescence et du flou suivant le type d'échantillon. Pour l'imagerie des motifs, cela ne pose pas de problème car l'épaisseur de ces derniers est relativement faible, le ratio signal sur bruit est donc très bon en épifluorescence.

Cependant, pour l'imagerie des cellules, cela peut poser problème car l'épaisseur de la cellule et la présence de deux membranes sur le même axe peuvent limiter l'observation du recrutement du récepteur au niveau du motif en détériorant le signal par rapport au bruit. Pour remédier à cela, nous avons utilisé l'imagerie TIRF (*total internal reflection fluorescence*). Dans ce type d'illumination, les rayons sont inclinés par rapport à l'axe optique (Figure 61.B). Pour ce faire, le faisceau incident est décalé par rapport à l'axe optique au niveau du plan focal arrière de l'objectif. Lorsque le faisceau émergent est suffisamment incliné en sortie d'objectif, il est totalement réfléchi au niveau de l'interface lamelle/milieu. Cela induit également la formation d'une onde évanescente à l'interface verre/eau. Pour réussir à incliner le faisceau il est nécessaire de travailler avec des objectifs ayant une forte ouverture numérique (NA). Cette onde non propagatrice (en champ proche) a une intensité qui décroît de manière exponentielle avec la distance à l'interface avec une longueur caractéristique de l'ordre de 200 nm. Dans notre cas, cela permet d'illuminer uniquement la zone qui nous intéresse, à savoir la membrane qui est en contact avec nos motifs. Cette modalité d'imagerie est couramment utilisée pour l'étude des protéines membranaires.

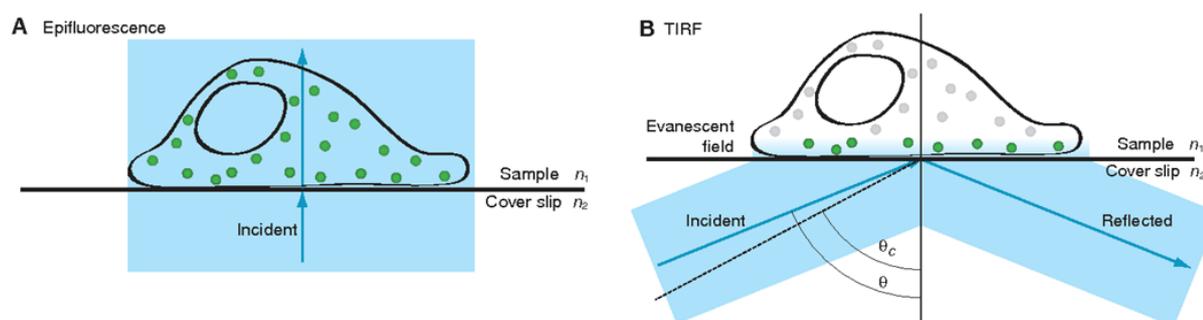


Figure 61. Epifluorescence et TIRF

Schéma illustrant la différence d'illumination entre l'épifluorescence (A) et l'imagerie TIRF (B). Les molécules fluorescentes excitées sont représentées en vert, et celles non excitées en gris.

3.5.2 Système d'imagerie optique

Pour l'imagerie, nous utilisons un microscope inversé (Nikon Eclipse TiE), équipé d'un objectif APO TIRF 100x/1,49 NA à immersion à huile. L'appareil est installé dans une boîte thermostatique (Life Imaging Services) fournissant de l'air à 37 °C pour l'imagerie du vivant (FRAP et SPT)

L'imagerie par épifluorescence est réalisée à l'aide d'une lampe à mercure (Nikon Xcite) et de jeux de filtres appropriés (SemROCK) pour chaque fluorophore : EGFP (Excitation : FF01-472/30; Dichroïque: FF-495Di02; Emission: FF01-525/30); et Alexa647 (Excitation: FF02-628/40; Dichroïque: FF-660Di02; Emission: FF01-692/40); Alexa 405 (Excitation : FF01-379/34 ; Dichroïque : FF-409Di03 ; Emission : FF01-440/40), et mEOS3.2 561 nm (Excitation: FF01-543/22; Dichroïque: FF562Di02; Emission: FF01-593/40). Pour l'imagerie TIRF, un banc laser à quatre couleurs (405 ; 488 ; 561 ; et 642 nm, 100 mW chacun ; Roper Scientific) est connecté par une fibre optique au bras d'illumination TIRF du microscope. Les puissances des lasers sont contrôlées par des filtres acousto-optiques accordables (AOTF) pilotés par Metamorph. La fluorescence est recueillie à l'aide de filtres d'émission (FF01 676/29 nm) placés sur une roue à filtres (Sutter Instruments). Les images sont acquises à l'aide d'une caméra EMCCD Evolve 512 (Photometrics®).

3.5.2.1 FRAP

Les cellules COS-7 exprimant les différentes protéines marquées GFP (Nrx1 β , Nlg1, SynCAM1, ou PSD-95) ont étéensemencées pendant 3 heures sur des lamelles imprimées avec différentes protéines marquées Fc. Les lamelles ont été montées, dans le milieu FluoroBrite complet utilisé pour la culture, dans une chambre d'observation inox ouverte (Life Imaging Services, Basel, Suisse). L'observation a été réalisée via le système d'imagerie décrit précédemment. Le banc laser utilisé pour l'illumination TIRF possède une deuxième sortie de fibre optique connectée à un dispositif d'illumination contenant deux miroirs de balayage galvanométrique x/y (ILAS, Roper Instrument) pilotés par MetaMorph. Cela permet un contrôle spatial et temporel précis du faisceau laser focalisé sur n'importe quelle région d'intérêt sélectionnée par l'utilisateur à l'intérieur de l'échantillon pour un photoblanchiment ciblé. La commutation entre les deux fibres pour alterner entre l'imagerie et le blanchiment est réalisée en quelques millisecondes à l'aide d'un AOTF. L'illumination TIRF a été réalisée en utilisant le laser 488 nm à faible puissance (300 μ W à l'avant de l'objectif) pour imager les molécules dans la membrane plasmique près du plan du substrat. Après l'acquisition d'une ligne de base de 10 secondes à une fréquence d'images de 1s, un photoblanchiment rapide et sélectif de 9 zones circulaires de 18 pixels de diamètre (finale) a été réalisé à une puissance laser élevée (3 mW à l'avant de l'objectif), avec 35 répétitions soit environ 560 ms de blanchiment. La profondeur de photoblanchiment est comprise entre 70-80%. La récupération de la fluorescence a ensuite été enregistrée immédiatement après la séquence de blanchiment pendant 5 à 20 minutes avec différente fréquence (Tableau 3) le tout avec un temps d'exposition de 100ms. Le photoblanchiment observé a été maintenu à un niveau très bas, comme cela a été évalué en observant des zones de contrôle non blanchies à proximité.

Ligand	Neurexine1 β -Fc		SynCAM1-Fc		Neurexine1 β -Fc	
Récepteur	Neuroigin1-GFP		SynCAM1-GFP		PSD95-GFP	
En seconde	Durée	Intervalle	Durée	Intervalle	Durée	Intervalle
Pré acquisition	10	1	10	1	10	1
Post-Acquisition 1	16	2	3,5	0,5	7	0,5
Post-Acquisition 2	75	7,5	14	1	14	1
Post-Acquisition 3	1110	30	300	4	300	3

Tableau 3. Séquence de FRAP

3.5.2.2 SPT PALM

Les cellules exprimant les différents récepteurs marqués mEos3.2 (Nrx1 β , Nlg1, ou SynCAM-1 + monomère) ont étéensemencées pendant 3 heures sur des lamelles imprimées avec différents ligands marqués Fc. Les lamelles ont été montées dans le milieu FluoroBrite complet utilisé pour la culture dans une chambre d'observation inox ouverte (Life Imaging Services, Basel, Suisse). L'observation a été réalisée via le système d'imagerie décrit précédemment.

Une faible puissance du laser 405 nm a été utilisée pour induire le changement de conformation de la mEOS3.2 de manière stochastique. Les échantillons ont été imagés par illumination laser TIRF, permettant l'excitation de ligands individuels conjugués au mEOS3.2 et liés à la surface de la cellule, sans illuminer les ligands en solution.

La fluorescence a été recueillie à l'aide d'un filtre d'émission FF01 676/29 nm placé sur une roue à filtres (Sutter Instruments). Des piles de 4 000 images consécutives ont été obtenues pour chaque cellule avec un temps d'intégration de 20 ms, en utilisant le système de mise au point parfaite de Nikon pour éviter la dérive axiale.

3.5.3 Microscopie Electronique

En microscopie électronique à balayage et à transmission, l'étape de fixation des cellules est identique. Trois heures après le dépôt des cellules, elles sont fixées dans un mélange de PFA composé de 1,6% PFA qualité EM et 2% de glutaraldéhyde dilué dans un tampon phosphate (0.1 M pH=7,4). Cette phase de fixation est suivie par trois rinçages de 5min dans du tampon phosphate (PB) 0.1 M.

3.5.3.1 Microscopie électronique à balayage

Pour cette technique, des lamelles de 12 mm sont utilisées afin de s'adapter aux supports d'observation du microscope à balayage. Dans le cadre de la microscopie à balayage, la fixation est suivie d'une déshydratation réalisée par une série d'incubations dans de l'éthanol à des concentrations croissantes (50° pendant 5 min, 70° pendant 5 min, 95° pendant 5 min, 100° pendant 2 fois 5 min sur tamis moléculaire). Ensuite, l'échantillon est métallisé au platine à l'aide d'un métalliseur QT150T, à un courant 15mA pendant 25 min. Les observations sont effectuées sur la plateforme de microscopie électronique du *Bordeaux Imaging Center* (BIC) sur le GEMININ300 de Zeiss.

3.5.3.2 Microscopie électronique à transmission

Pour la microscopie électronique à transmission, après la fixation, on effectue une post fixation de 1 heure 30 sur glace et dans le noir, avec une solution de 1ml tétr oxyde d'osmium (OsO₄) à 4% et du Ferrocyanure de potassium (0.04 g) dans 3 ml de PB 0.1M. Dans le cas des essais réalisés avec de la streptavidine couplée à des billes d'or de 1.4 nm, une étape d'amplification à l'argent est effectuée en utilisant le kit « HQ Silver enhancement » de Nanoprobes.

Ensuite, on procède à l'étape de contraste en utilisant de l'acétate d'uranyle 0.5% (filtré à 0.22µm) dilué dans de l'eau, pendant 30 min à température ambiante et dans l'obscurité. Ces deux étapes sont suivies de trois lavages à l'eau de 5 minutes, à température ambiante. L'échantillon est ensuite déshydraté par incubation dans des solutions d'éthanol à concentrations croissantes (50° pendant 10 min, 70° pendant 10 min, 95° pendant 2 fois 15 min, 100° pendant 2 fois 20 min sur tamis moléculaire). Par la suite, on procède à une première étape d'imprégnation dans un mélange de 50% d'éthanol à 100° et 50% de résine époxy décongelé, pendant 2h à température ambiante. Pendant cette période, nous préparons de la résine époxy fraîche en vue d'une incubation de résine pure pendant la nuit (congélation à -20°C de la résine restante en 2 aliquots pour le lendemain). Le matin suivant, on décongèle un des aliquots de résine en vue d'un changement de la résine pour une incubation de 5 heures. Après ces 5 heures d'incubation, les cellules sont incluses dans une gélule de résine, puis incubés à 60°C pendant plus de 48h. La gélule est décollée de la lamelle en utilisant alternativement de l'eau chaude et de l'azote. Ensuite, la gélule est trimée autour de la zone de motif, visible à l'œil nu. Des coupes longitudinales fines de 70nm, à une vitesse de 1mm/s, sont réalisées au microtome équipé d'un couteau diamant. Les coupes sont récupérées dans l'ordre sur des grilles carbonées. Les observations sont effectuées sur la plateforme de microscopie électronique du BIC en utilisant le microscope Hitachi (120kv, H7650).

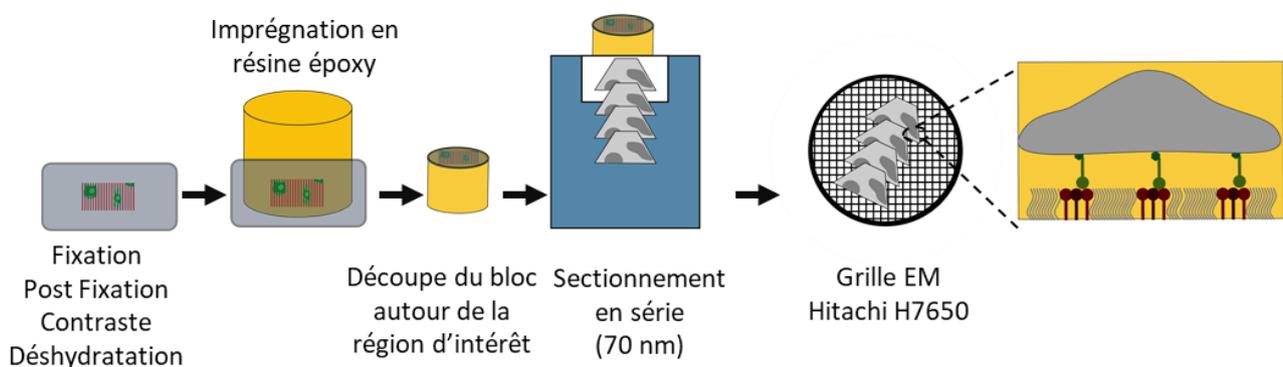


Figure 62. Protocole de préparation des coupes longitudinales pour l'imagerie MET

3.6 Analyse

3.6.1 Mesure de l'enrichissement

Les mesures d'enrichissement sont réalisées sur les images TIRF de la cellule. Ces mesures sont partiellement automatisées grâce à une macro ImageJ (Annexe 1). L'utilisateur de la macro doit spécifier le fichier d'entrée contenant les images, ainsi que le fichier de sortie pour les images d'analyse, les régions d'intérêt et des données extraites. Cette macro a été conçue pour traiter les images acquises avec le logiciel MetaMorph© en utilisant une acquisition multidimensionnelle, impliquant plusieurs canaux d'excitation/émission.

L'image TIRF de la cellule ainsi que l'image en épifluorescence du motif permettent de distinguer les zones d'interactions potentielles, c'est-à-dire celles situées sur le motif, des zones en dehors du motif, où il n'y a pas d'interaction (Figure 63). Dans un premier temps, l'intervention de l'utilisateur est requise pour tracer les contours de la cellule à analyser sur chaque image TIRF. C'est la seule étape qui nécessite l'intervention de l'utilisateur, car la forte différence de contraste entre les zones cellulaires recrutant le récepteur et celles sans recrutement rend difficile la réalisation d'un seuillage automatique de la cellule.

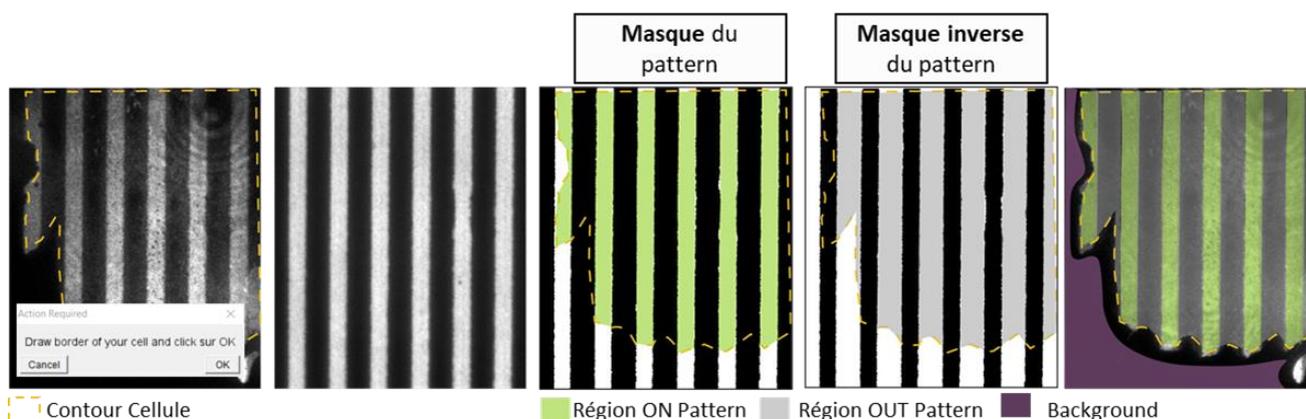


Figure 63. Mesure d'enrichissement en COS-7

Étapes des différentes étapes du pipeline d'analyse automatique pour la mesure de l'enrichissement en COS-7.

Ce contour de la cellule permet ensuite, lorsqu'il est superposé sur un masque de l'image du motif, d'extraire les zones situées sur le motif (ON Pattern) et, en utilisant son inverse, les zones en dehors du motif (OUT Pattern). Pour mesurer l'enrichissement, il suffit ensuite de calculer le ratio entre l'intensité de fluorescence à l'intérieur de la cellule sur les zones de motif (I_{ON}) et celle à l'extérieur des zones de motif (I_{OUT}). Un ratio égal à 1 ($E=1$) indique que le niveau de fluorescence est équivalent à l'extérieur et à l'intérieur des zones du motif, ce qui signifie l'absence d'enrichissement du récepteur.

$$E = \frac{(I_{ON} - \text{Background})}{(I_{OUT} - \text{Background})}$$

3.6.2 Analyse du suivi de molécule unique

3.6.2.1 SPT-PALM

Les acquisitions de SPT-PALM ont été analysées à l'aide du programme PalmTracer, qui fonctionne sous Metamorph®. Ce programme est basé sur la segmentation en ondelettes et le fit gaussien pour la localisation des molécules et la détermination du centroïde de la particule unique (Izeddin et al., 2012; Kechkar et al., 2013). Il a été généreusement fourni par Jean-Baptiste Sibarita (IINS, Bordeaux).

Dans un premier temps, un seuil d'intensité est défini pour détecter les signaux moléculaires du bruit de fond, mais également ceux au bon focus (Seuil entre 250 et 300), ainsi qu'un paramètre de *watershed* à 7. Ce dernier paramètre permet de séparer deux molécules uniques qui se touchent via la création d'une carte des distances. La reconnexion des points au cours du temps est ensuite réalisée. Un fichier .trc est extrait contenant pour chaque point, le numéro de la trajectoire à laquelle il appartient, le numéro de l'image où il apparaît, ses coordonnées x, y des centroïdes, son intensité intégrée, son id. Les trajectoires à l'intérieur et à l'extérieur des motifs sont ensuite extraites en utilisant les régions déterminées en utilisant l'image en épifluorescence du motif et le contour de la cellule, nous avons gardé uniquement les trajectoires qui sont à 100% dans chaque compartiment. Nous avons sélectionné les trajectoires de plus de 200 ms (10 points) pour la mesure des coefficients de diffusion apparent (D). Pour l'ajustement de la courbe de MSD nous avons utilisé un Δt de 4, et pour les coefficients de diffusion apparent un histogramme entre -6 et 1 avec intervalle de 35 en log. Les trajectoires dont la fonction MSD ne peut être ajustée sont arbitrairement considérées comme $D = 10^{-5} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Les trajectoires dont la zone d'exploration est inférieure ($D = 10^{-2} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) à celle imposé par la résolution spatiale de l'image (~50 nm pour notre système) par rapport au laps de temps utilisé pour ajuster MSD (256 ms), sont considérés comme immobile ($(0.05^2 / (4 \cdot 4 \cdot 0.02)) \approx 0.007 \mu\text{m}^2 / \text{s}$). Pour le calcul des D_{instant} nous avons utilisé une fenêtre de 4 points autour du point d'intérêt et un pour l'ajustement de la courbe de MSD nous avons conservé un Δt de 4. Seules les trajectoires de plus de 30 frames sont utilisées pour le D_{instant} .

3.6.2.2 Extraction des coefficients cinétiques

Pour extraire les T_{off} et T_{on} de nos trajectoires, nous avons développé un code Matlab qui permet de calculer la durée des événements où la molécule est liée (Free) ou libre (Bound) en se basant sur le coefficient de diffusion instantanée. A partir des fichiers .trc fournis par PalmTracer, nous calculons le MSD (I.1.1.1. Analyse des trajectoires de SPT-PALM) pour ensuite extraire le coefficient de diffusion instantanée le long de chaque trajectoire.

Ensuite, pour distinguer les molécules liées des molécules libres, nous avons défini un seuil à $0.039 \mu\text{m}^2 / \text{s}$ en fonction du fit de la courbe moyenne de MSD. Sur une trajectoire, il va donc être possible de définir en fonction des D_{instant} si la molécule est libre ($D_{\text{instant}} > 0.039 \mu\text{m}^2 / \text{s}$) ou liée ($D_{\text{instant}} < 0.039 \mu\text{m}^2 / \text{s}$). Ceci va nous permettre de définir des plages de diffusion et d'interaction. La durée de ces plages nous permettra d'extraire le temps de résidence en secondes dans chaque comportement, respectivement le T_{off} et le T_{on} (Figure 64).

Pour s'assurer d'avoir des événements complets, nous ne conservons que les événements qui sont entourés par d'autres événements, donc nous éliminons principalement les débuts et fins de trajectoires et les trajectoires de molécules complètement mobiles ou immobiles (Figure 64). L'inverse de ces temps va nous permettre d'extraire le k_{on}^* (T_{off}) et le k_{off} (T_{on}).

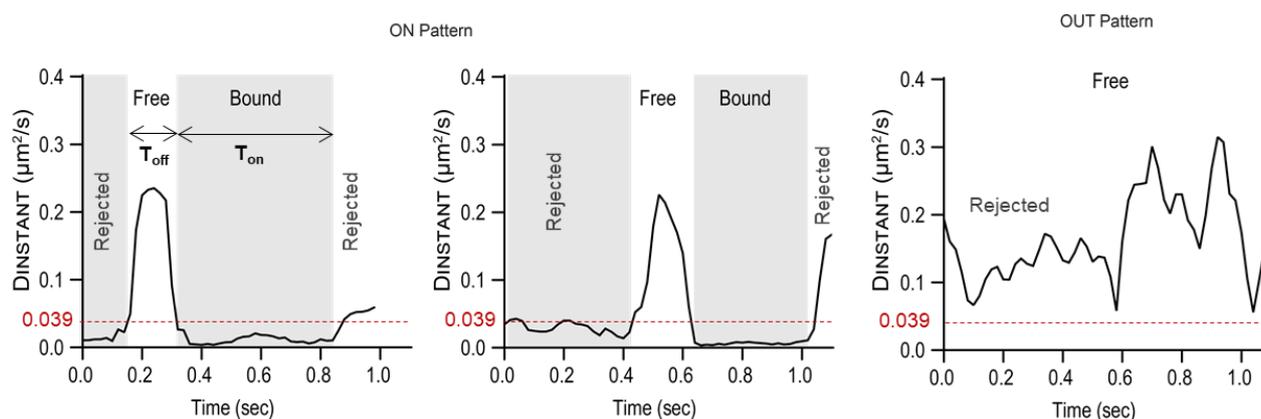


Figure 64. Distribution de $D_{instant}$ le long de trajectoires à l'extérieur et à l'intérieur du motif protéique
Graphique de la distribution de $D_{instant}$ pour des trajectoires expérimentales de SynCAM1-mEoS3.2 sur des motifs de SynCAM1-Fc. Délimitation des événements où la molécule unique est liée ou libre au cours du temps en fonction du seuil défini (ligne rouge) de $0.039 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

3.6.2.3 Simulation de trajectoires via FluoSIM

L'algorithme complet du logiciel FluoSIM ainsi qu'un manuel d'utilisation détaillé ont été publiés (Lagardère et al., 2020). Nous avons utilisé ce logiciel pour simuler des trajectoires en SPT et voir l'impact des valeurs de k_{on}^* , k_{off} , et donc du taux de transitions sur la distribution du coefficient de diffusion. Le contour d'une cellule type ainsi que des zones de contact correspondant aux zones de motifs ont été dessinés dans Metamorph à l'aide d'une image de référence et importé sur FluoSIM.

Ensuite, il est possible de venir peupler ces régions avec une quantité donnée de molécules (2000), pour correspondre à la quantité de molécules stochastiquement activées au cours de l'acquisition. Chaque molécule individuelle est caractérisée par ses coordonnées 2D x et y au cours du temps t , et par son intensité. Il est possible de reproduire les conditions de l'expérience en fixant la durée des simulations (80s) et le pas de temps d'acquisition (20 ms). Le coefficient de diffusion des récepteurs libres en dehors des zones de motif (D_{OUT}) a été défini à $0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$, sur la base des données sptPALM sur SynCAM1-mEoS3.2. Bien que dans FluoSIM, nous puissions définir un coefficient de diffusion (D_{ON}) plus faible pour les récepteurs libres se déplaçant dans les zones adhésives afin de prendre en compte l'encombrement stérique, nous avons ici négligé ce phénomène et avons choisi $D_{ON} = D_{OUT}$. Les complexes liés peuvent diffuser à un coefficient de diffusion inférieur $D_{bound} = 0,005 \mu\text{m}^2/\text{s}$, reflétant la précision de pointage de notre système de détection.

Les transitions entre les valeurs d'intensité ON/OFF sont définies par deux paramètres photo physiques : le taux d'allumage ($k_{onFluo} = 1 \text{ s}^{-1}$) et le taux d'extinction ($k_{offFluo} = 3 \text{ s}^{-1}$). Ces taux représentent les probabilités par unité de temps qu'une molécule met pour passer d'un état

où elle émet de la fluorescence à un état où elle n'émet pas de fluorescence, afin de modéliser la photo-conversion de mEos3.2.

Une phase d'équilibrage relativement courte de 2000 images a été exécutée sous FluoSim jusqu'à ce que le système moléculaire atteigne un état d'équilibre, à la fois en termes de cinétique de liaison et de photo-physique. Des séquences ont été générées avec différents ensembles de k_{on} et k_{off} , en gardant toujours un rapport $k_{on}^*/k_{off} = 2$, ce qui détermine approximativement une valeur d'enrichissement $E = 3$. Les positions (x, y) des molécules individuelles émettant de la fluorescence ont été stockées sous forme de fichiers .trc, puis ensuite analysées pour extraire les T_{on} et T_{off} (III.6.2.2. *Extraction des coefficients cinétiques*).

3.6.3 Correction et normalisation des données de FRAP

Pour chaque zone de FRAP, deux corrections sont effectuées. La première correction concerne l'élimination du bruit de fond de l'image, tandis que la seconde concerne le photoblanchiment global de l'ensemble de l'image. Pour ce faire, à chaque point de temps d'acquisition (t) , on soustrait le niveau de fond de l'image ($f_{fond}(t)$) au niveau de fluorescence mesuré dans la zone de FRAP ($f(t)$), puis on divise, par l'intensité de fluorescence moyenne sur l'ensemble de la cellule ($f_{référence}(t)$), à l'exclusion des zones de FRAP.

$$F_{corrigé}(t) = \frac{f(t) - f_{fond}(t)}{f_{référence}(t)}$$

Ensuite, pour chaque retour dans chaque zone, on normalise les valeurs entre 0 et 1. Pour ce faire, on soustrait du niveau de fluorescence corrigé le niveau de fluorescence minimum mesuré juste après photoblanchiment (t_0) qu'on nomme $F(t_0)$. Ensuite, on divise le tout par $\Delta fluo$ qui représente la différence entre le niveau de fluorescence maximum mesuré avant photoblanchiment ($F(t_{<0})$) et $F(t_0)$. Le calcul de $F(t_{<0})$ consiste à prendre la moyenne des différents niveaux de fluorescence dans la zone de FRAP, sur l'ensemble des points d'acquisition avant photoblanchiment.

$$F_{corrigé}^{normalisé} = \frac{F_{corrigé}(t) - F(t_0)}{\Delta fluo} \text{ avec } \Delta fluo = F(t_{<0}) - F(t_0)$$

Ensuite, les courbes de FRAP normalisées pour chaque zone de photoblanchiment sont moyennées afin d'obtenir une courbe moyenne par cellule. Sans cette normalisation, il est impossible de pouvoir comparer et moyenner les signaux de photoblanchiment entre les différentes cellules car le niveau d'expression entre les cellules est beaucoup trop variable.

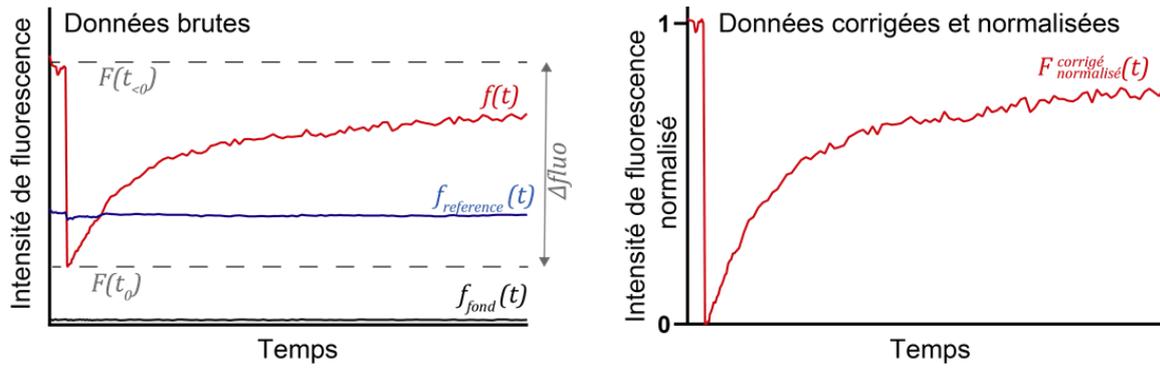


Figure 65. Correction et normalisation des données de FRAP

(A) $f(t)$ correspond à l'intensité dans la région photo-blanchie au cours du temps, $f_{référence}(t)$ mesure l'intensité de fluorescence totale dans la cellule moins les zones photo-blanchies. Ce signal est utilisé pour corriger le photoblanchiment observationnel. $f_{fond}(t)$ mesure le signal de fond de l'image au cours du temps, il est utilisé pour corriger le signal de retour de fluorescence ($f(t)$) et l'intensité totale ($f_{référence}(t)$). $F(t_{<0})$ est le niveau de fluorescence maximal avant photoblanchiment, $F(t_0)$ est le niveau de fluorescence après photoblanchiment. Δf_{fluo} est la différence entre le niveau minimum et maximum. Ces valeurs sont mesurées après correction du fond et du photoblanchiment. (B) Les données sont ensuite normalisées entre zéro et un afin de pouvoir moyenner et comparer l'ensemble des courbes.

MODELE D'HEMI-SYNAPSE

Dans le cadre de ce second projet, les objectifs visent à réaliser, via la technologie PRIMO, un modèle d'hémi-synapse pré et post-synaptique fonctionnelle pour étudier la formation des synapses au cours du développement. La proposition d'un modèle permettant d'étudier de manière standardisée et à haut débit des synapses pourrait contribuer à l'acquisition de nouvelles connaissances concernant les étapes de la formation des synapses au niveau structurel et organisationnel. En effet, de nombreuses maladies neurodéveloppementales présentent des défauts de connexion synaptique, tels que des variations du nombre de synapses (Howes & Onwordi, 2023; Pagani et al., 2021) ou des anomalies du recrutement de protéines et de structure synaptique (Moretto et al., 2018; Nishiyama, 2019).

En comparaison avec les techniques classique de formation d'hémi-synapse, l'impression protéique permet de standardiser la taille de la zone de contact, le nombre de synapses possibles par unité de surface, ainsi que la position des hémi-synapses. De plus, elle permet également d'obtenir un nombre conséquent d'hémi-synapses formées, facilitant ainsi l'acquisition d'une quantité d'information importante pour décrire l'image moyenne d'une synapse dans une condition donnée. La qualité de ces informations est favorisée par une meilleure capacité d'imagerie, grâce à l'orientation des hémi-synapses formées dans le plan focal au plus proche de la lamelle. Enfin, l'avantage majeur réside dans la possibilité de suivre l'évolution à long terme d'une même synapse, car le compartiment synaptique artificiel ne peut théoriquement pas être phagocyté.

Pour les premières étapes de ce projet, nous allons travailler avec des neurones hippocampiques primaires de rat. L'hippocampe est la structure qui régit la mémoire, et elle est la plus précocement touchée dans les troubles neurologiques. Cependant, dans le but de réduire l'expérimentation animale et d'étudier les maladies neurodégénératives touchant les humains, nous souhaiterions réussir à transposer ce type d'essais pour des neurones dérivés de cellules souches de patient. Cependant, avant d'en arriver à ces étapes, le premier défi consiste à maintenir des neurones en culture sur le long terme. De nombreux collaborateurs d'Alvéole sont confrontés à des difficultés lorsqu'ils cultivent des neurones sur leurs substrats micro-imprimés. Pour cela nous avons visé deux axes : proposer un protocole limitant le stress

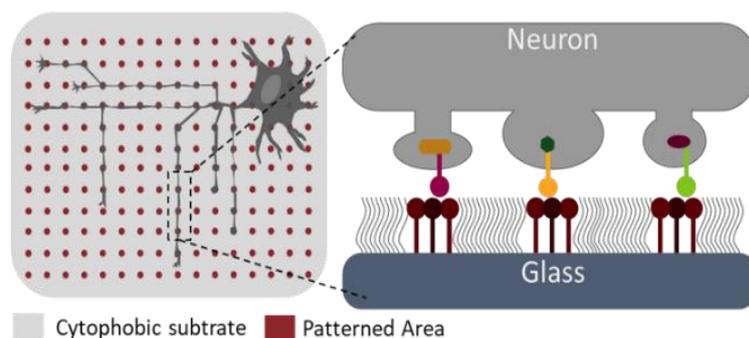


Figure 66. Modèle d'hémi-synapse

Schéma du modèle in vitro en vue de dessus et en coupe transversale. Neurones de l'hippocampe (gris foncé) en culture sur des micro-motifs (points de $5\mu\text{m}$ séparés par $10\mu\text{m}$) de protéines synaptiques (rouge). En gris clair, le revêtement antifouling sur lequel les cellules ne peuvent pas adhérer.

pour les neurones et adapté à une culture peu dense, et améliorer notre capacité d'impression surfacique pour obtenir de plus grande surface d'adhésion pour les neurones.

Dans le cadre de ce projet, nous avons décidé de modifier la géométrie des motifs afin de les rapprocher de celle des synapses. Cependant, au début de ce projet que nous menions en parallèle du projet COS, nous n'avions pas encore résolu les problèmes d'impressions à l'échelle micro et submicrométrique. Par conséquent, nous avons principalement travaillé avec des motifs circulaires de 5 μm séparés de 10 μm les uns des autres. L'adhésion des neurones sur des motifs plus petits s'est en plus avérée complexe.

I Résultats

1.1 Culture de neurones primaires sur substrat micro imprimés

1.1.1 Augmenter la vitesse d'impression surfacique

Lors de nos premiers essais de culture de neurone sur des patterns réalisés en PLPP liquide, nous avons constaté que la surface de l'impression est un facteur critique pour la viabilité des cultures de neurones sur le long terme. Les neurones ne se développent pas de manière optimale à faible densité (Figure 67.A), ce qui induit souvent la mort des cellules. Si l'on augmente la densité, en présence d'une petite surface de motif, les corps cellulaires occupent une trop grande partie de la surface, rendant ainsi difficile l'observation des synapses qui se forment le long des axones et des dendrites (Figure 67.B). Donc, une augmentation de la surface d'impression permet une meilleure observation des zones de formation des hémisynapses (Figure 67.C)

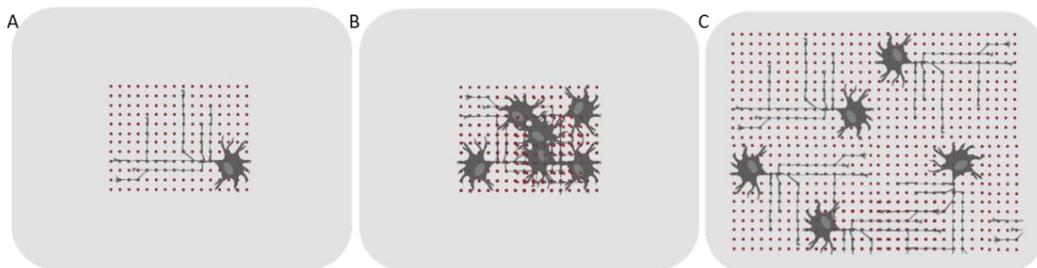


Figure 67. Impact de la densité neuronale et de la surface de motif

Schéma explicatif de l'impact de la densité cellulaire et de la surface du motif adhésif sur l'observation des potentiels zones de formation des hémisynapses. (A) Culture peu dense, ce qui peut être préjudiciable pour les cellules (B) Surface de motif non adaptée à la densité cellulaire (B) Combinaison optimale entre densité cellulaire et surface de motif.

Cependant, avec le protocole d'impression initial basé sur l'utilisation du PLPP en phase liquide, obtenir des surfaces importantes (plus de quelques mm^2) nécessitait plus d'une heure pour la dose UV optimale déterminée dans la première partie ($600 \text{ mJ}/\text{mm}^2$), ce qui n'était pas adapté pour mener des expériences scientifiques avec plusieurs conditions et répétitions. Pour augmenter la vitesse d'impression de notre système, plusieurs solutions ont été envisagées :

- Réduire la dose UV nécessaire pour dégrader la même quantité de PEG. Pour cela, des variations ont été envisagées sur le photo-initiateur et la puissance laser.
- Paralléliser les insulations pour augmenter le débit. Cependant, cette solution nécessite un temps de développement industrielle élevé, ce qui n'est pas envisageable à court terme.

La solution développée par Alvéole consiste en un nouveau photo-initiateur appelé PLPP gel. Ce composé est déposé en forte concentration en fine couche gélifiée, au plus près des brosses de PEG, optimisant la catalyse de la réaction de dégradation du PLPP par rapport à la version liquide du PLPP. La fine couche est créée en mélangeant le PLPP gel avec de l'éthanol absolu, qui, en s'évaporant, forme une fine couche de PLPP sous forme de gel. Ce produit permet de réduire de 30 fois la dose d'UV nécessaire, permettant ainsi l'impression de surfaces d'environ de 20 mm² en 3 min environ (Tableau 4). La réaction médiée par le photo-initiateur nécessite la présence d'oxygène (Sikkema et al., s. d.). Dans le cas d'illumination prolongées, comme lors de l'utilisation de PLPP liquide, il peut y avoir une déplétion locale de l'oxygène, ce qui diminue l'efficacité de la réaction. Pour pallier à cela, nous injectons en continu du carbogène durant l'illumination, ce qui n'est pas forcément réalisable pour tous les utilisateurs du PRIMO. L'accélération de l'impression grâce au PLPP gel permet également de s'affranchir de l'utilisation du carbogène. Enfin, l'avantage de travailler avec une solution « gélifiante » est la possibilité d'imprimer sur des surfaces opaques, que l'on pourra retourner face à l'objectif. Mon rôle dans ce développement a consisté à caractériser et valider le PLPP gel pour une utilisation en biologie cellulaire.

	PLPP Liquide	PLPP gel
Dose UV (mJ/mm ²)	600	20
Temps d'illumination (surface = 20 mm ²)	60 min	3 min
Impression sur surface opaque	-	+

Tableau 4. Comparatif du PLPP liquide versus PLPP gel

1.1.1.1 Caractérisation du PLPP gel

Pour la caractérisation du PLPP gel, des cellules hétérologues (COS-7) surexprimant une protéine synaptique, en l'occurrence la Neuroligine1-GFP, ont été utilisées. Ce modèle cellulaire est plus approprié pour l'optimisation que les neurones, du fait de sa simplicité et de sa capacité à fournir rapidement une réponse cellulaire. L'hypothèse relative au fonctionnement du PLPP gel repose sur l'idée selon laquelle la quantité de PEG dégradé est plus importante en raison de la concentration accrue de photo-initiateur au niveau des brosses de PEG.

Cela permet une adsorption protéique plus efficace en un temps d'exposition réduit. Il est à noter que, dans la première partie de cette thèse, la nécessité d'utiliser un "arbre d'amplification" composé d'une chaîne protéique basée sur les interactions streptavidine-biotine a été démontrée pour visualiser une interaction entre la protéine imprimée et la protéine cellulaire (Figure 68). L'objectif était de vérifier si cette interaction pouvait être

reproduite sur des impressions réalisées en PLPP gel. À cette fin, l'enrichissement de Neurologine1-GFP surexprimé dans les cellules sur des motifs de Neurexine1-Fc a été comparé en utilisant l'arbre d'amplification complet (condition 1 : BSA-biotin, streptavidine-A647, anticorps anti-Human Fc biotinyllé). L'expérience a également été réalisée dans deux conditions supplémentaires en retirant une couche protéique à chaque étape, en commençant par la BSA-biotin (Figure 68, Conditions 1 et 2).

En PLPP liquide, en présence de l'intégralité de la « chaîne d'amplification », nous observons un enrichissement de 3.8 (+/-0.6 SEM). Pour les deux autres conditions, l'enrichissement diminue à 1.5 (+/-0.2 SEM), lorsque la BSA-biotin est retirée, puis à 1.1 (+/-0.1 SEM) lorsque la streptavidine est enlevée (Figure 68. C). En outre, lors de l'observation des images en TIRF, nous remarquons que l'enrichissement est beaucoup plus homogène en présence de BSA-biotine (Figure 68. Condition 1. A). Cette différence peut s'expliquer par une faible adsorption de la streptavidine-A647 et de l'anticorps anti-HuFc-A647 par rapport à la BSA-biotine. En effet, si nous examinons le niveau de fluorescence du motif (Figure 68.B), il est plus élevé en présence de BSA-biotine. En PLPP gel, dans la condition 1, nous obtenons un enrichissement similaire à celui obtenu en PLPP liquide (Figure 68.B & C), avec un enrichissement de 4.0 (+/-0.2 SEM). Cependant, pour les conditions 2 et 3, l'enrichissement est cette fois similaire à la condition BSA-biotin avec respectivement 4.3 (+/-0.2 SEM) et 4.6 (+/-0.3 SEM). En plus de ces trois conditions, nous avons aussi réalisé un essai en imprimant uniquement la Neurexine1B-Fc, mais nous n'avons pas observé d'enrichissement significatif, et très peu de cellule qui adhèrent sur les patterns (données non illustrées). Ce résultat n'est pas surprenant car l'adsorption direct d'une protéine peut fortement perturber son activité. La chaîne protéique minimale, en PLPP gel, pour pouvoir observer une interaction est donc anti-HuFc et la protéine d'intérêt marquée avec une étiquette Fc. En observant le niveau de fluorescence sur les patterns, il n'y a pas de différence significative entre les trois conditions en PLPP gel, ce qui suggère que l'efficacité accrue de la réaction en présence de PLPP gel favorise l'adsorption des protéines.

Pour vérifier la spécificité en PLPP gel, nous avons réalisé en parallèle une expérimentation de réaction croisée en disposant des cellules surexprimant la Neurologine1-GFP sur des impressions de SynCAM1-Fc. Dans ce cas, aucune cellule n'a adhéré, ce qui laisse supposer qu'il y a moins d'adhésion cellulaire non spécifique en PLPP gel par rapport au PLPP liquide (données non illustrées). Pour la suite des expérimentations, nous avons choisi de conserver l'intégralité de la chaîne d'amplification. Cependant, il est important de noter que les caractéristiques d'adsorption des protéines diffèrent entre des impressions en PLPP liquide et en PLPP gel, ce qui peut influencer certaines expérimentations, tels que l'impression multiprotéique (1.3.1. Impression multiprotéique).

1.1.2 Culture de neurone sur le long terme

Dans ce projet, notre objectif est d'étudier la formation d'hémi-synapses en effectuant un suivi dans le temps. Nous nous concentrons sur les neurones hippocampiques, avec lesquels nous travaillons. La formation de synapses commence autour de 5 jours *in vitro* (DIV5) et se poursuit pendant plusieurs semaines (Kaech & Banker, 2006).

Par conséquent, avant de tenter de former des héli-synapses, il est essentiel de valider que nos neurones peuvent survivre en culture sur le long terme. En premier lieu, il est crucial de s'assurer que nos motifs, et plus particulièrement les protéines d'intérêt, restent stables au fil du temps.

1.1.2.1 *Stabilité des patterns*

Afin de vérifier la stabilité des impressions protéiques au fil du temps, des impressions protéiques ont été réalisées au jour 0. Certaines lamelles micro-imprimées ont été conservées dans du milieu de culture et dans les conditions de culture standard (37°C, 5% CO₂) pendant 7 ou 14 jours. Aux jours 0, 7 et 14, des cellules surexprimant le partenaire d'intérêt fluorescent ont été déposées sur les substrats pour mesurer le niveau d'enrichissement. Cette expérience a été menée avec deux protéines : LRRTM2-Fc, connue pour induire des présynapses *in vitro* et Ncadhérine-Fc, utilisée comme contrôle négatif dans les essais de formations d'héli-synapse. Les cellules utilisées expriment Neurexine1B-GFP et Ncadhérine-GFP, qui sont les partenaires réciproques des protéines imprimées.

Pour évaluer la stabilité des patterns, deux paramètres ont été mesurés : le niveau de fluorescence sur le pattern, correspondant à la streptavidine-A647, et l'enrichissement. En ce qui concerne l'enrichissement, deux aspects ont été examinés : la présence ou l'absence d'enrichissement après plusieurs jours dans les conditions de culture des neurones, ainsi que le niveau de l'enrichissement par rapport aux substrats utilisés le jour de leur réalisation (Jour 0). Lorsque nous analysons le niveau de fluorescence entre les différentes conditions (Figure 69.A & B), nous constatons des variations significatives, notamment pour la condition LRRTM2 J7. Cependant, ces variations ne semblent pas être liées à l'incubation du substrat. Les variations intra-manipulations sont souvent observables et elles sont liées à la préparation des substrats, en particulier à l'étape de pégylation, et sont plus prononcées entre les expérimentations. Par conséquent, les premières couches de l'arbre d'amplification (BSA-biotine, streptavidine) semblent rester stables au fil du temps. Cependant, pour confirmer la présence et le bon fonctionnement des autres couches, en particulier de la protéine synaptique, il est nécessaire d'étudier leur capacité à établir une interaction, ce qui implique de se pencher sur l'enrichissement de la protéine cellulaire transmembranaire (Figure 69.A & C).

Pour Ncadhérine et LRRTM2, nous observons à J0 un enrichissement respectif moyen de 6.5 (+/-0.5 SEM) et 5.0 (+/-0.4 SEM). Dans les deux conditions à J14 un enrichissement de la protéine est toujours observable et mesurable. Cependant, nous constatons une diminution de cet enrichissement au fil du temps, avec un enrichissement de 5.0 (+/-0.4 SEM) et 1.7 (+/-0.2 SEM) pour Ncadhérine et LRRTM2 respectivement à J14. Cette baisse est significative pour LRRTM2. Cette réduction de l'enrichissement résulte du détachement d'éléments au niveau de la chaîne protéique ou d'une perte d'activité de la protéine, expliquant ainsi la différence observée entre LRRTM2 et Ncadhérine, car certaines protéines sont plus sensibles en fonction de leur configuration. Cette expérimentation a permis d'analyser la stabilité des patterns dans les conditions de culture. Cependant, il est aussi possible que la présence de neurones puisse avoir un impact positif ou négatif sur la stabilité du pattern, en le stabilisant par des

interactions ou en le déstabilisant par des contraintes mécaniques ou par endocytose des protéines. De plus, cette expérience a révélé que les cellules s'étendent davantage sur les patterns ayant 7 ou 14 jours que sur la condition initiale (Figure 69.D). Cela semble indiquer que le recouvrement non adhésif de PEG est moins efficace. Une hypothèse plausible est que les composants du milieu (sérum, etc.) ayant des propriétés adhésives peuvent s'accumuler en surface, favorisant ainsi l'expansion des cellules.

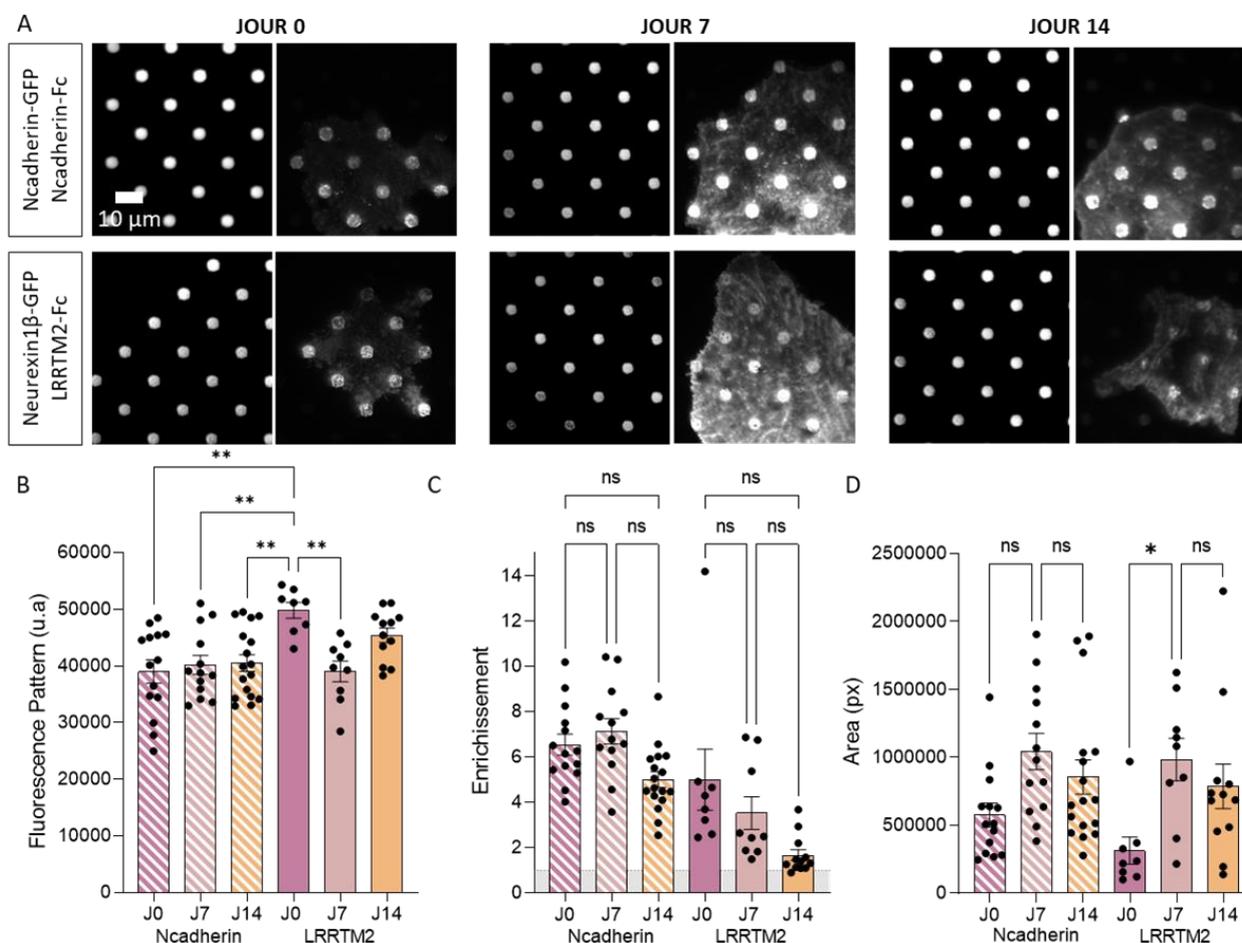


Figure 69. Stabilité des patterns

(A) Images TIRF (100X) de COS-7 surexprimant la Ncadhérine-GFP ou Neurexine1β-GFP avec l'image en épifluorescence des patterns correspondant (Streptavidin-A647) après conservation du pattern 0, 7 ou 14 jours dans l'incubateur (B) Graphiques montrant la distribution du niveau de fluorescence de la streptavidine pour chaque condition. ** P [0.0015-0.0065] Ordinary one way Anova. (C) Graphiques montrant la distribution de l'enrichissement pour chaque condition. Kruskal-Wallis (D) Graphiques montrant la distribution de la surface cellulaire (px²) pour chaque condition. *P=0.0011 Kruskal-Wallis

(Nbr de cellules/ Nbr d'expérimentations) Ncadhérine-GFP / Ncadhérine-Fc (14(J0),13(J7),17(J14) /1) ; Neurexine1β-GFP/LRRTM2-Fc (8(J0),9(J7),1(J14) /1).

1.1.2.2 Culture Banker

Pour la culture des neurones nous avons opté, après de nombreux essais, pour les cultures en Banker (Kaech & Banker, 2006). Ce protocole de culture est couramment utilisé en neurosciences pour les neurones primaires hippocampiques. Il consiste à retourner des lamelles de neurones sur une couche nourricière de cellules gliales (Figure 70.A). Un espace entre les lamelles et la couche de glies est créé par la présence de petits points de parafilm

MODELE D'HEMI-SYNAPSE

sur la lamelle. L'avantage de ce protocole est qu'il est optimisé pour des cultures de faibles densité, adaptées pour l'étude des prolongements neuronaux, en particulier les synapses. De plus, la présence des cellules gliales, qui libèrent continuellement des nutriments dans le milieu, permet de réduire les étapes de changement de milieu, réduisant ainsi

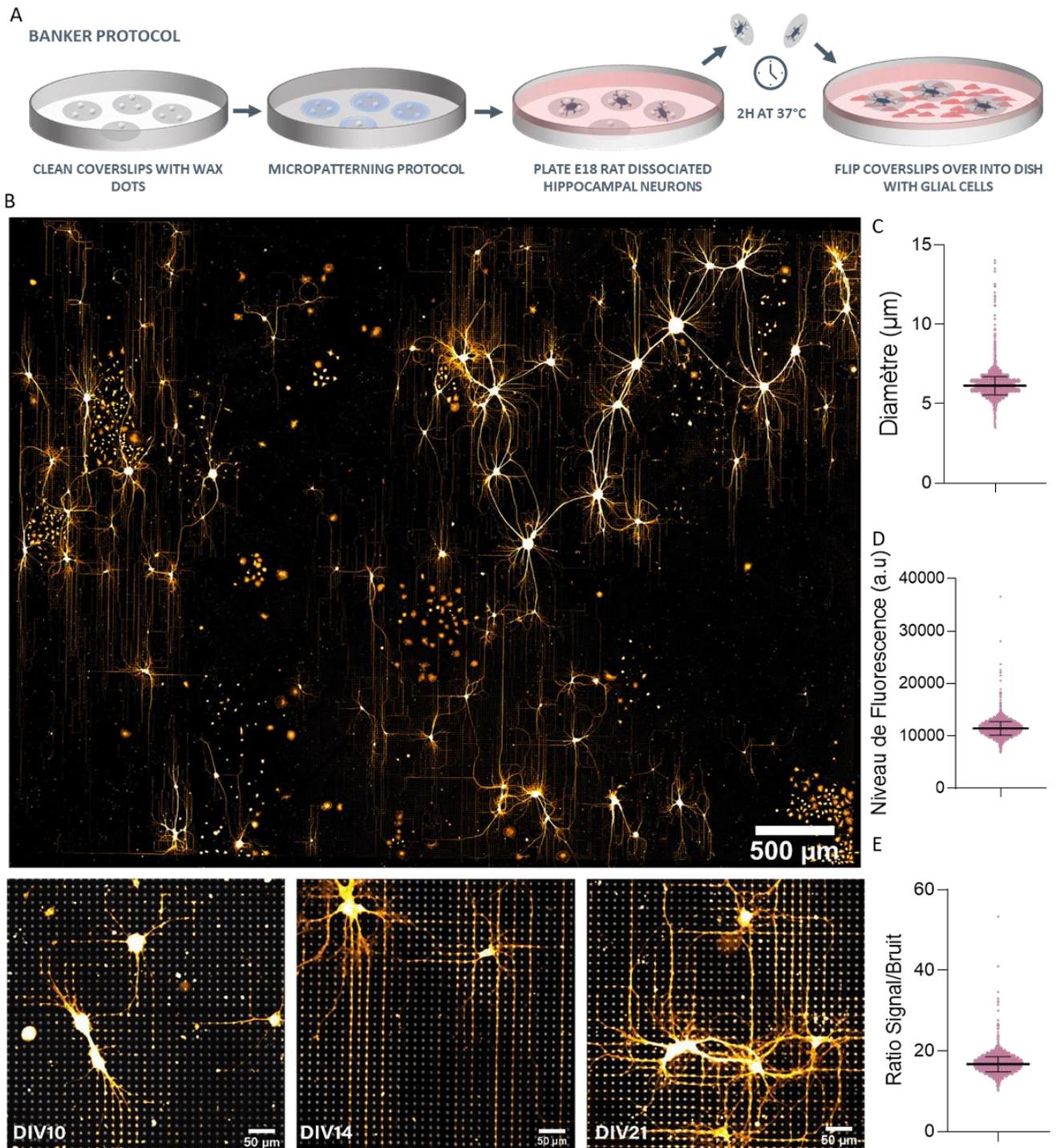


Figure 70. Culture de neurones micro-imprimés

(A) Protocole de culture des neurones hippocampiques en culture banker (B) Mosaïque d'images en épifluorescence (20X) de neurones primaires hippocampiques de rat à DIV14 sur des impressions de SynCAM1-Fc (motif : points de 5 µm) de 20 mm², soit environ 100 000 motifs circulaires. Image de neurones à différents stades de culture (DIV10, 14 et 21). (C) Graphique de distribution des tailles de chaque point individuel (D) Graphique du niveau de fluorescence de chaque point individuel (E) Graphique du ratio signal sur bruit de chaque point individuel.

considérablement le stress pour les neurones. Dans le protocole Banker classique, les neurones sont mis en culture sur des lamelles recouverte de poly-L-lysine. Dans notre cas, nous remplaçons ce revêtement par notre protocole d'impression protéique. Les préparations des cultures de neurones et de glies restent donc inchangées, ce qui rend ce protocole facile à mettre en place pour un laboratoire réalisant déjà des cultures classiques en Banker. La combinaison de ce protocole de culture avec les grandes surfaces de motifs réalisés en PLPP gel permettent de maintenir en culture des neurones hippocampiques de rat pendant plus de 21 jours *in vitro* (DIV21) (Figure 70.B). Les neurones sont mis en culture sur des patterns d'environ 20 mm², ce qui représente environ 100 000 dots de 5 µm, offrant la possibilité de former autant d'hémi-synapse. Cela fait de notre système un bon moyen de criblage en raison de la densité élevée de synapses induites formées. Pour appuyer cet argument, nous avons réalisé des mesures sur les motifs pour observer les fluctuations de taille et d'intensité sur l'ensemble de cette surface, afin d'avoir une idée de l'homogénéité de nos motifs. (Figure 70.C-E). Nous constatons que la taille des motifs obtenus (Figure 70.C) est en moyenne d'environ 1 µm plus grand que la taille escompté (5 µm), avec une distribution autour de 6 µm (+/- 0.58 SD). La différence observée est due à des effets de diffusion de la réaction de clivage. Pour limiter ces effets il suffit de réduire la dose d'UV envoyée. C'est pourquoi pour la suite des expérimentations, nous avons utilisé une dose d'UV de 20 mJ/mm² au lieu de 50 mJ/mm².

Le rapport signal sur bruit (Figure 70.E) est relativement élevé (16.7 +/- 1.89 SD), ce qui démontre une impression de qualité avec un bruit de fond relativement faible, caractéristique des impressions en PLPP gel. Les variations du rapport signal sur bruit sont faibles, on note quelques points avec des variations de taille et de rapport signal sur bruit plus élevées souvent dû à des zones où le substrat n'est pas parfait (séchage, gouttelette de silicone dû à la préparation des lamelles ...). Ce type de variations est récurrent sur quelques zones mais cela est négligeable par rapport à l'ensemble des motifs. Ce protocole de culture de neurones sur impressions protéiques a été rédigé sous la forme d'une note d'application qui est mis à disposition des utilisateurs de PRIMO pour faciliter les essais en Neurosciences (Annexe 3), ainsi qu'un chapitre de livre inclus dans la réédition du livre « Synapse Development » (Czöndör et al., in press) (Annexe 4).

1.2 Formation et caractérisation d'hémi-synapse

Pour valider notre modèle d'hémi-synapse, nous avons travaillé avec des protéines d'adhésions synaptiques, dont la capacité à induire des hémi-synapses a déjà été démontrée via d'autres modèles *in vitro*. Pour la formation de présynapse, on utilise LRRTM2 (Roppongi et al., 2017) et pour la formation de postsynapse, on utilise Neurexine1β (Czöndör et al., 2013; Graf et al., 2004). En tant que contrôle, nous utilisons la Ncadhérine, reconnue pour son rôle dans l'adhésion des synapses, mais non dans le recrutement de marqueurs synaptiques. Pour valider la formation d'hémi-synapse, nous observons le recrutement de marqueurs spécifiques de la présynapse ou de la postsynapse par immunomarquage. Comme marqueur de la présynapse, nous utilisons la protéine du transporteur vésiculaire 1 du glutamate (vGLUT1), présente sur les membranes des vésicules pré-synaptique des neurones excitateurs. Comme marqueur de la postsynapse, nous utilisons la protéine échafaudage PSD-95, présente uniquement au niveau des synapses excitatrices. Pour compléter cette première analyse, nous

observons la présence de structures caractéristiques de la présynapse (vésicules) et de la postsynapse (densité postsynaptique) par microscopie électronique à transmission.

1.2.1 Recrutement spécifique de marqueur pré-synaptique

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur la formation de présynapse en utilisant des impressions de LRRTM2-Fc avec comme contrôle négatif des impressions de Ncadhérine-Fc. Après avoir maintenu les neurones en culture sur des substrats micro-imprimés pendant 14 jours, nous observons, par immunomarquage (Figure 71.A), une distribution régulière et des zones très circulaires du marquage vGLUT1, sur les impressions de LRRTM2-Fc. Ces zones vGLUT1 positives, correspondent parfaitement aux zones d'impressions (Figure 71.A1), démontrant ainsi un recrutement sur les motifs protéiques. En revanche, ce recrutement n'est pas observé sur les impressions de Ncadhérine-Fc (Figure 71.A2), ce qui valide la spécificité de notre essai.

Pour quantifier ce recrutement, nous nous sommes basés sur l'enrichissement des marqueurs synaptiques, que nous avons mesuré par une analyse automatisée (III.7.2 Analyse de l'enrichissement hémi-synaptique). Afin de mieux évaluer les différences, nous avons classifié les enrichissements en trois catégories (Tableau 5) : l'absence d'enrichissement pour les zones avec un enrichissement inférieur ou égal à 1, un enrichissement faible pour les hémi-synapses avec un enrichissement supérieur à 1 et inférieur à 2 et un enrichissement fort pour un enrichissement supérieur à 2. Etant donné que nous travaillions avec des protéines endogènes, les niveaux d'enrichissement moyens (Tableau 5) sont faibles. Cette classification en catégories permet donc une lecture plus détaillée des résultats et une comparaison plus précise entre les différentes conditions.

Sur les impressions de LRRTM2-Fc, à DIV14, nous avons mesuré l'enrichissement de plus de 3000 zones potentiellement hémi-synaptiques. Moins de 10% ne présentent pas d'enrichissement, et plus de 24 % présentent un enrichissement fort pour vGLUT1 (Figure 71.B et Tableau 5). En ce qui concerne le marqueur PSD-95, plus de 46% des zones ne présentent pas d'enrichissement, et 50% présente un faible enrichissement. (Figure 71.B et Tableau 5).

	Nbr de zone potentielle Hémi-synaptique	Nombre de dots						Enrichissement moyen (Dots avec Enri >1) +/- SD		
		Enrichissement <1		Enrichissement]1;2[Enrichissement >2		vGLUT1	PSD95	
		vGLUT1	PSD95	vGLUT1	PSD95	vGLUT1	PSD95			
LRRTM2	DIV7	734	42	699	307	35	8	0	1,33 +/- 0,30	1,17 +/- 0,19
	DIV14	3109	308	1445	2028	1585	773	79	1,75 +/- 0,51	1,32 +/- 0,36
Ncadherin	DIV14	386	271	313	111	72	4	1	1,21 +/- 0,25	1,19 +/- 0,24

Tableau 5. Valeurs d'enrichissement sur les hémi présynapse

Nbr d'hémi-synapses potentielles / Nbr d'expérimentations : LRRTM2-Fc DIV7 (734/1) ; LRRTM2-Fc (3109/1) ; Ncadhérine-Fc (386/1). *P=0.046, 0.023 ; ns P=0.16 ou >0.99 ; ** P=0.0066 ; **** P<0,0001 Kruskal wallis test, multiple comparaison.

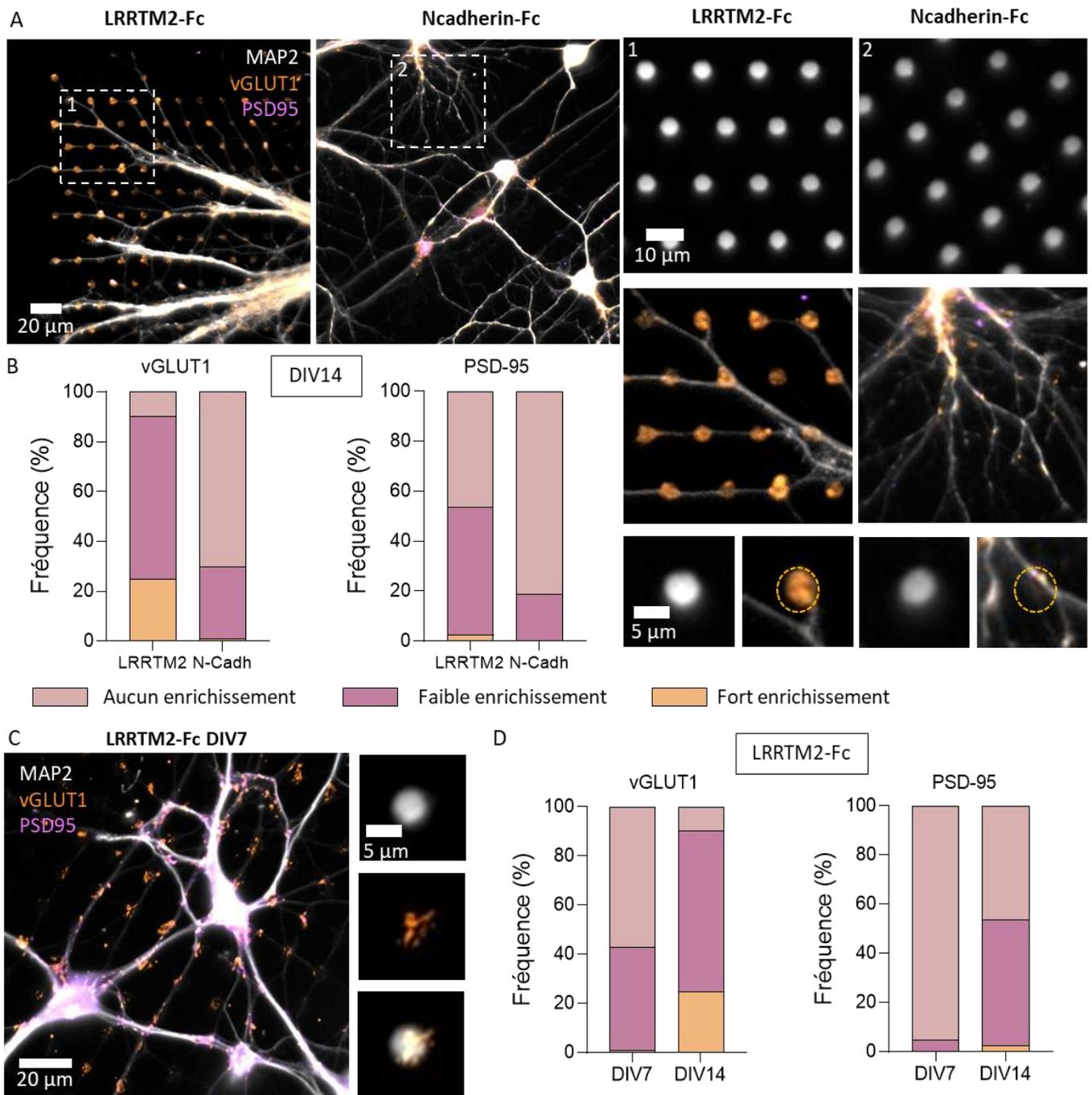


Figure 71. Formation d'hémi-présynapse

A. Images d'épifluorescence (60X) de neurones hippocampiques primaires sur des motifs de Ncadherine-Fc immunomarquage pour vGLUT1 (orange), PSD-95 (violet) et MAP2 (Gris) B. Graphiques illustrant la distribution de trois catégories d'enrichissement en fonction du rapport entre le niveau de fluorescence à l'intérieur (F_{IN}) et à l'extérieur (F_{OUT}) de la zone de motif pour Vglut1 et PSD-95. (Aucun enrichissement = $F_{ON} \leq F_{OUT}$, Rose ; Faible enrichissement = $F_{ON} > F_{OUT}$, Violet ; Fort enrichissement = $F_{ON} \geq 2 \times F_{OUT}$, Orange) C. Images d'épifluorescence (100X) de neurones primaires de l'hippocampe sur des impressions de LRRTM2-Fc immunomarquage pour vGLUT1, PSD-95 et MAP2. D. Graphiques illustrant la distribution des catégories d'enrichissement pour PSD-95 et vGLUT1 à DIV7 et DIV14 sur les motifs LRRTM2-Fc. Nbr d'hémi-synapses potentielles / Nbr d'expérimentations : LRRTM2-Fc DIV7 (734/1) ; LRRTM2-Fc (3109/1) ; Ncadherine-Fc (386/1).

Concernant les impressions de Ncadherine-Fc, nous avons beaucoup moins de zones potentielles d'hémi-synapse, avec seulement 386 zones analysées, parmi lesquelles 70 % et 80 % ne présentent pas d'enrichissement pour vGLUT1 et PSD-95 respectivement (Figure 71.B et Tableau 5). Ces premiers résultats montrent le recrutement spécifique d'un marqueur présynaptique sur les impressions de LRRTM2-Fc, suggérant ainsi la formation d'hémi-synapse. De plus, ce recrutement est bien lié à la protéine, car en présence de Ncadherine, qui est un contrôle négatif, nous n'observons aucun recrutement.

Si l'on examine l'évolution des hémi-présynapses au fil du temps en comparant les marquages après 7 jours et 14 jours de culture des neurones hippocampiques (Figure 71.C-D), nous constatons, tout d'abord, que le nombre de zones potentielles d'hémi-synapses, est plus faible à DIV7, avec 734 zones de mesures. Cela est lié à un étalement moins important des neurones à ce stade de développement. De plus, nous observons une diminution du recrutement de vGLUT1, avec seulement 1% des zones présentant un enrichissement fort et 41% un faible enrichissement.

1.2.2 Recrutement spécifique de structure pré-synaptique

Grâce à l'immunomarquage, il a été établi que sur les motifs de LRRTM2-Fc, nous observons le recrutement de vGLUT1, une protéine présente au niveau des vésicules présynaptiques. Ces vésicules sont des structures caractéristiques de la présynapse, jouant un rôle dans le relargage des neurotransmetteurs et donc dans l'activité synaptique. Afin d'observer ces vésicules au niveau de nos hémi-synapses, nous avons utilisé la microscopie électronique à transmission (MET) (*III.6.2.2 Microscopie électronique à transmission*).

Pour ces premières expériences, nous n'avons pas de moyen de visualiser avec certitude les motifs. Cependant, sur les images en grand champs, nous avons réussi à déterminer approximativement leur emplacement de par l'organisation des croisements axonaux et dendritiques qui connecte les motifs circulaires (Figure 72. A). Un zoom sur les structures au niveau des motifs individuels révèle que les hémi-présynapses formées sur LRRTM2-Fc présentent des zones étendues contenant des vésicules, comparées aux zones sur Ncadherine-Fc qui sont bien plus petites (Figure 72.B). La densité synaptique (nombre de vésicule/ μm^2) est équivalente pour les deux conditions, avec plus de 200 vésicules par micromètre carré (Figure 72.C). Vu que la taille des zones vésiculaire est plus grande sur LRRTM2-Fc, il y a donc plus de vésicules totales pour LRRTM2-Fc que pour Ncadherine sur une zone de motif (Figure 72.D). Ce qui est cohérent avec les résultats d'immunomarquage pour vGLUT1.

En ce qui concerne la morphologie des vésicules, le diamètre de ces dernières est équivalent dans les deux conditions, avec un diamètre compris entre 38 et 36 nm (Figure 72.F). Ces valeurs correspondent à la taille des vésicules décrites dans les synapses des neurones hippocampiques en culture (Qu et al., 2009, p.). Pour rappel, les synapses excitatrices sont décrites comme rondes, de taille régulière et lisses. Pour étudier la forme des vésicules dans nos hémi-synapses, nous avons mesuré leur circularité et leur rondeur (*III.7.2 Analyse des hémi-synapses et des vésicules en MET*). Dans les deux conditions, la rondeur est en moyenne de 0,8, ce qui signifie que les vésicules sont globalement assez lisses.

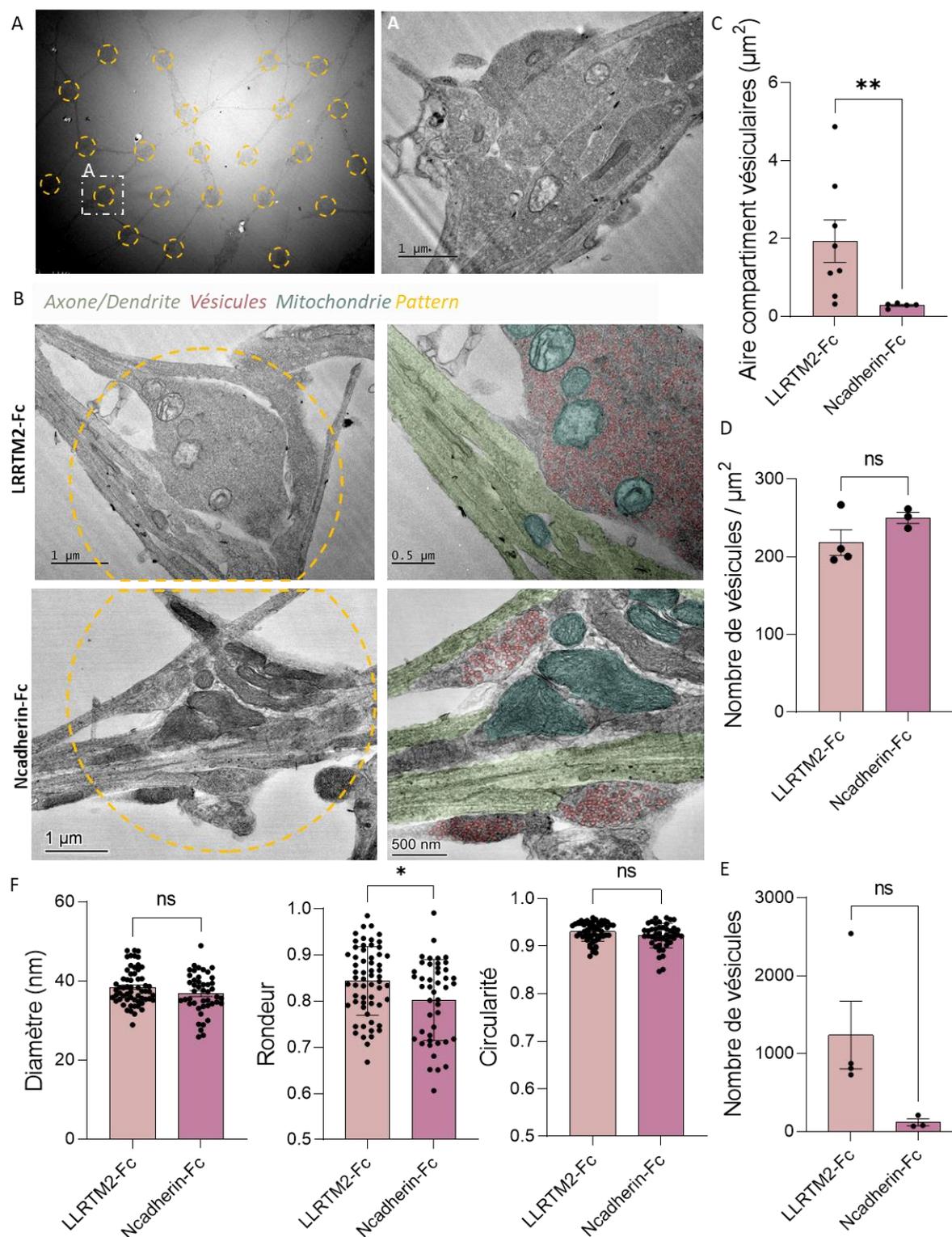


Figure 72. Recrutement de vésicules pré-synaptique

(A) Image grand champ de neurones primaires hippocampiques de rat à DIV14 sur des motifs de LRRTM2-Fc (jaune). Zoom sur un motif avec une héli-synapse potentielle (B) Images représentatives d'héli-synapses sur des motifs de LRRTM2-Fc ou de Ncadhérine-Fc. Coloration manuelle des différents compartiments (axone/dendrite : vert, mitochondrie : bleu, vésicules : rouge). (C-E) Graphiques montrant l'aire des compartiments contenant des vésicules (C), la densité surfacique des vésicules (D), le nombre de vésicules sur l'ensemble du motif (E) et les caractéristiques morphologiques des vésicules (diamètre, rondeur et circularité) (F) entre les motifs LRRTM2-Fc et Ncadhérine-Fc ** $P=0.0031$, ** $P=0.017$, $ns=0.4$, 0.2 , 0.09 , 0.06 Mann-Whitney test (Nbr d'héli-synapses potentielles/ Nbr d'expérimentations) LRRTM2-Fc (4/1) ; Ncadhérine-Fc (3/1), 15 vésicules par héli-synapse analysées pour F).

Concernant la circularité, elle est très élevée et globalement stable avec une moyenne autour de 0,92, ce qui signifie que les vésicules sont rondes (Figure 72.F).

En présence de motif de Ncadhérine-Fc, nous avons observé en immunomarquage un léger enrichissement de vGLUT1 (Tableau 5). Bien que cela ne soit pas comparable avec le recrutement présent sur les motifs LRRTM2-Fc, cela reste néanmoins inattendu. En microscopie électronique (Figure 72.C), nous observons sur les motifs des zones, contenant des vésicules de petites tailles avec une aire moyenne de $0,3 \mu\text{m}^2$. Alors que la taille des zones vésiculaires sur les motifs de LRRTM2-Fc est bien plus conséquente avec une aire d'environ $2 \mu\text{m}^2$ de moyenne. Sachant que l'aire de la zone active dans les présynapses est décrite avec une aire autour de $0,04 \mu\text{m}^2$ (Schikorski & Stevens, 1997) mais pouvant atteindre des tailles allant jusqu'à $0,4 \mu\text{m}^2$ (Yeow & Peterson, 1991), les zones formées sur Ncadhérine pourraient donc correspondre à des synapses natives.

1.2.3 Plurihéli-synapse, tripartite et activité synaptique

1.2.3.1 *Plurihéli synapse et complexe tripartite*

En immunofluorescence et en microscopie électronique, nous avons remarqué la présence de multiples compartiments vésiculaires sur certains motifs de LRRTM2-Fc. Pour mieux étudier ces zones, nous avons capturé des images en épifluorescence à l'aide d'un objectif à plus fort grossissement et avec une meilleure ouverture numérique pour obtenir une meilleure résolution (Figure 73.A-B). En augmentant la résolution et en éliminant le bruit de fond (*III.7.1 Analyse de l'enrichissement hémi-synaptique*), nous avons pu délimiter ces compartiments, ce qui nous a permis d'extraire le nombre et la taille des compartiments par motif (Figure 73.E-F). Cette analyse a été réalisée à la fois pour le marquage vGLUT1 et PSD-95.

Nous avons observé en moyenne cinq compartiments pour vGLUT1 (+/- 2.2 SD), avec une aire moyenne de $1 \mu\text{m}^2$, légèrement supérieure à celle d'une synapse classique. Ces résultats concordent avec nos observations en microscopie électronique. En revanche, pour le marquage PSD-95, nous avons remarqué un nombre plus élevé de compartiments par motif (8 +/- 4.3 SD). Cependant, la taille moyenne de ces compartiments est significativement plus petite, avec une aire moyenne d'environ $0,6 \mu\text{m}^2$, correspondant davantage à la taille d'une synapse normale. Ces zones de petite taille pour PSD-95 pourraient confirmer notre hypothèse émise pour les substrats de Ncadhérine, suggérant la formation de synapses normales au niveau des zones de motifs, entraînant une augmentation des interactions axone-dendrite sur ces motifs protéiques.

Cependant, sur les motifs de LRRTM2-Fc, nous observons occasionnellement des compartiments de PSD-95 plus grands et fortement marqués (Figure 73. C et D), bien que cela ne soit pas la majorité. De plus, une analyse globale sur des images de faible résolution a révélé des données intrigantes : 99% des hémi-synapses étaient positives (enrichissement supérieur à 1) pour PSD-95, tout en étant également positives pour vGLUT1.

À l'inverse, plus de 41% des régions vGLUT1 positives étaient négatives pour PSD-95. Cela souligne la présence systématique de vGLUT1 en présence de PSD-95, alors que l'inverse n'est pas vrai. Ces zones avec des compartiments PSD-95 de grande taille sont d'autant plus

présentes vers le corps cellulaire, là où les dendrites sont plus abondantes (Figure 73. C). De plus, si nous regardons l'enrichissement moyen de vGLUT1 pour les héli-synapses doublement positives (PSD-95 et vGLUT1), il est plus élevé (1.75) que pour l'enrichissement des synapses positives uniquement pour vGLUT1 (1.32). Nous avons nommé ces zones positive pour vGLUT1 et PSD-95, des complexes synaptiques tripartites.

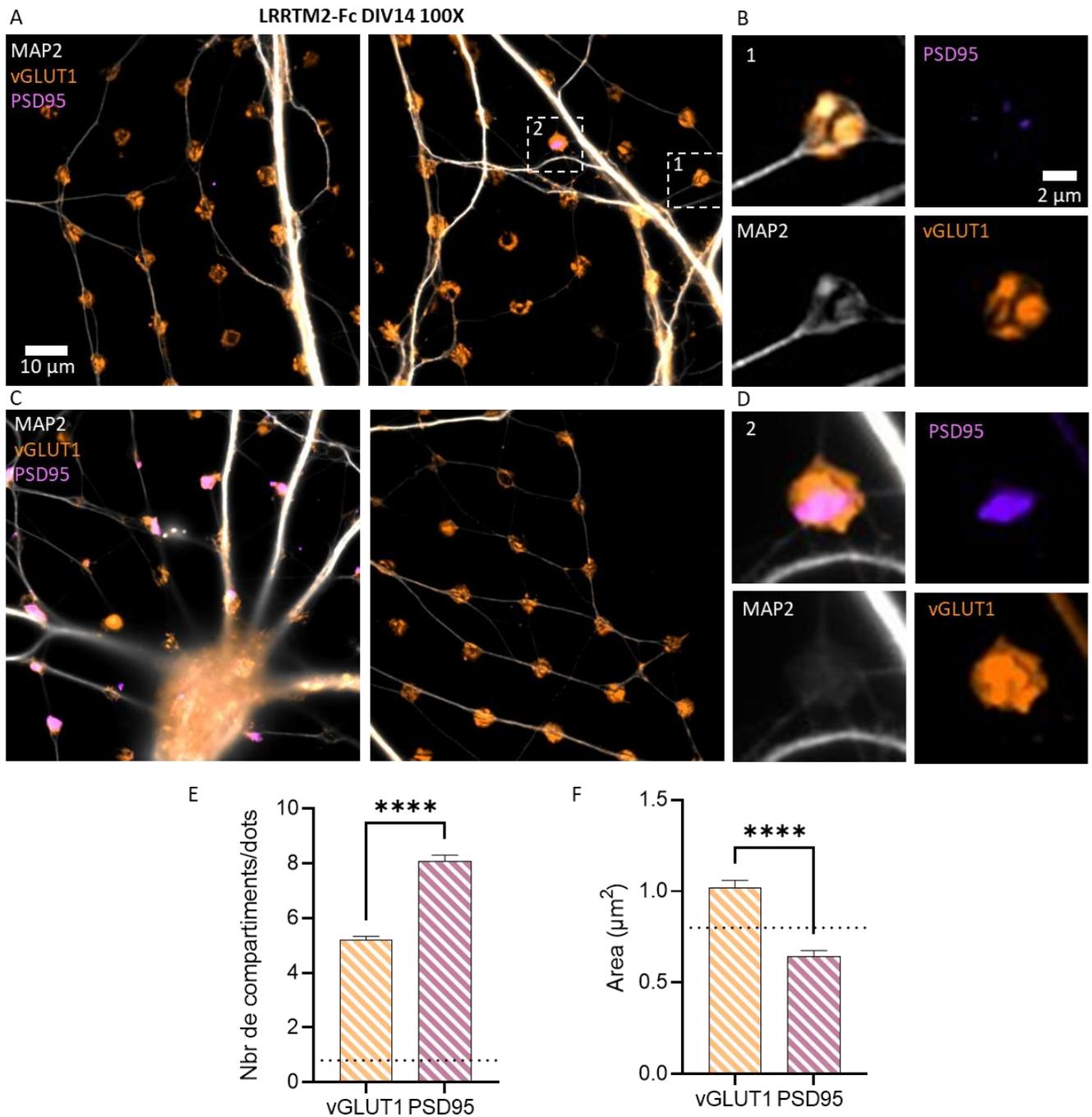


Figure 73. Plurihéli-synapse et tripartite complexe

(A et C) Images d'épifluorescence (100X) de neurones hippocampiques de rat à DIV14 en culture sur des impressions de LRRTM2-FC, immunomarquage pour MAP2 (Gris), vGLUT1 (Orange) et PSD-95 (Violet). (B et D) Zoom sur des zones héli-synaptiques. (E) Graphique du nombre de compartiments/motifs pour vGLUT1 et PSD-95 (F) Graphique de l'aire des compartiments pour vGLUT1 et PSD-95.

**** $p < 0.0001$ Wilcoxon test (Nbr d'héli-synapses/Nbr d'expérimentations) : LRRTM2-Fc (365/1)

Notre idée est que lorsque les dendrites passent près des zones hémi-présynaptiques, ils créent des postsynapses ; ce qui forme un complexe à trois composants : le motif de LRRTM2-Fc qui est un compartiment artificiel, la hémi-présynapse et la postsynapse qui se forme en surplomb (Figure 73. C et D). La formation de ce complexe tripartite semble agir sur l'efficacité de la synapse en augmentant la taille de la zone active et de la PSD.

1.2.3.2 *Activité synaptique*

Pour étudier l'activité synaptique, nous avons réalisé des mesures d'activité calcique, en transfectant (III.3.2 *Transfection Neurones*) des neurones à DIV7 sur des impressions de LRRTM2-Fc avec un indicateur calcique le GCaMP6f, afin d'observer les flux de calcium au niveau des hémi-synapses à DIV14 (Figure 74). Les premières observations démontrent un recrutement de GCaMP6f au niveau des motifs. La mesure du signal de GCaMP6f au fil du

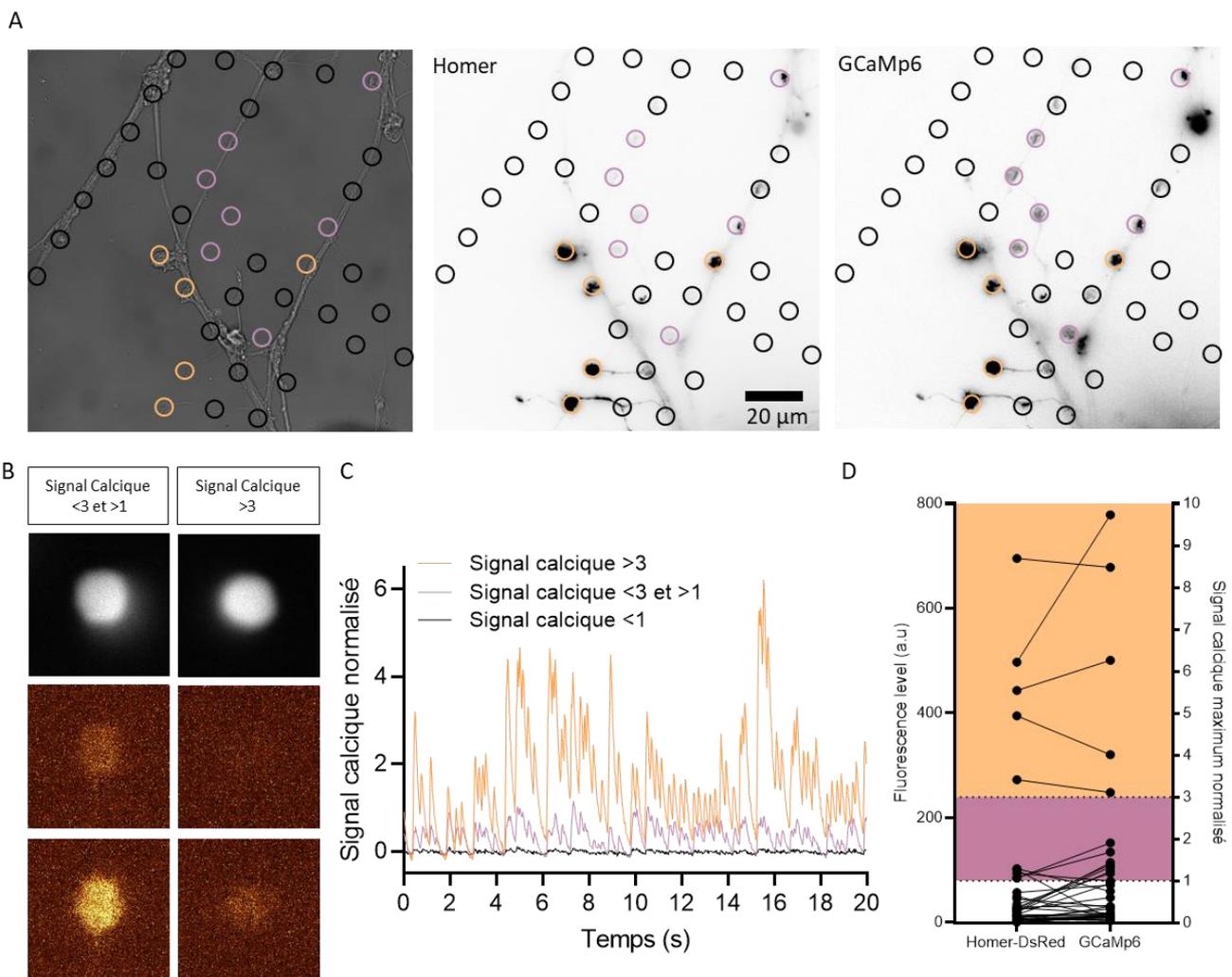


Figure 74. Différence d'activité synaptique entre les hémi-présynapses simples et les complexes tripartites
 (A) Image en lumière claire de neurones hippocampiques de rat à DIV14 sur des motifs de LRRTM2-Fc. Image en épifluorescence inverse du marqueur post-synaptique Homer-DsRed et de l'indicateur calcique GCaMP6. Les motifs circulaires indiquent les zones de synapses potentielles. Coloration basée sur le niveau de signal calcique maximum observé. (B) Zoom sur des hémi-synapses présentant différents niveaux de signal calcique avec le niveau basal et les influx calcique (C) Graphique des moyennes des signaux calcique pour les hémi-synapses de chaque catégorie (D) Corrélation entre le marquage Homer et le signal calcique maximum observé. (Nbr d'hémi-synapses potentielles / Nbr d'expérimentations : 40/1)

temps, présente des fluctuations d'intensité, correspondant à des vagues calciques spontanées. Ce qui démontre la présence d'une activité au niveau des héli-synapses formées avec les motifs imprimés.

Afin de pouvoir différencier les héli-synapses tripartites des héli-présynapses, nous avons également transfecté un marqueur postsynaptique, Homer-DsRed. En observant les images en épifluorescence (Figure 74.A), nous constatons qu'il y a des héli-synapses avec un fort recrutement de Homer et de GCaMP6f, alors que certaines héli-synapses ne présentent pas de recrutement de Homer mais montrent un marquage GCaMP6f, bien que ce dernier semble plus faible. Après avoir analysé les courants calciques spontanés normalisés par rapport au niveau basal, nous avons pu distinguer trois catégories d'héli-synapses (Figure 74.B-C) en fonction du signal calcique : élevé (orange), modéré (violet rose) ou nul (noir). Les héli-synapses ayant le signal calcique le plus élevé durant les phases d'influx sont celles présentant un recrutement du marqueur post-synaptique Homer (Figure 74.D) le plus élevé. Cependant, pour les héli-synapses avec un signal modéré, certaines ne présentent aucun recrutement du marqueur Homer (Figure 74.D). Nous avons émis l'hypothèse que ces héli-synapses, correspondent aux héli-synapses positives uniquement pour vGLUT1 dans les expérimentations précédentes. Cela signifie donc que les héli-synapses formées semblent recevoir des influx calciques, mais que la formation d'un complexe tripartite accroît ce signal calcique et donc potentiellement l'activité.

1.2.1 Morphologie des synapses

Suite aux images en immunofluorescence et en microscopie électronique à transmission, nous avons été surpris par l'ampleur des synapses formées, recouvrant quasiment la totalité des motifs, bien que nous ayons démontré l'existence de plusieurs compartiments. Afin d'étudier plus en détails la morphologie des héli-synapses, nous avons utilisé la microscopie électronique à balayage pour examiner la topologie des membranes.

Ces observations ont été réalisées sur des neurones à DIV14, cultivés sur des motifs de LRRTM2-Fc. Les images obtenues montrent clairement la croissance des neurones uniquement sur les zones de motifs (Figure 75.A). Il est intéressant de noter que lorsque différentes dispositions des motifs sont utilisées (Figure 75.B), que ce soit une distribution carrée avec une distance en diagonale plus importante ou une distribution hexagonale, les prolongements favorisent la distance la plus courte. Une observation plus précise au niveau des motifs de 5 μm (Figure 75.C) révèle une membrane très étalée avec un aspect poreux au niveau du motif. Si le diamètre du motif circulaire est réduit à 2 μm , la membrane est beaucoup moins étalée et présente un aspect beaucoup plus lisse. En revanche, en modifiant la géométrie du motif pour adopter une forme en L, plus asymétrique que le motif circulaire, nous observons une adaptation de la forme de l'héli-synapse. Cependant, une analyse en immunomarquage du recrutement de vGLUT1 sur ce type de motif asymétrique (Figure 75.D), montre un taux de recouvrement moins important que sur les motifs circulaires de 5 μm . En effet, sur ces motifs asymétriques, nous observons un recouvrement d'environ 50% du pattern. Il est donc possible de modifier la morphologie des héli-présynapses en modifiant la morphologie du motif protéique.

MODELE D'HEMI-SYNAPSE

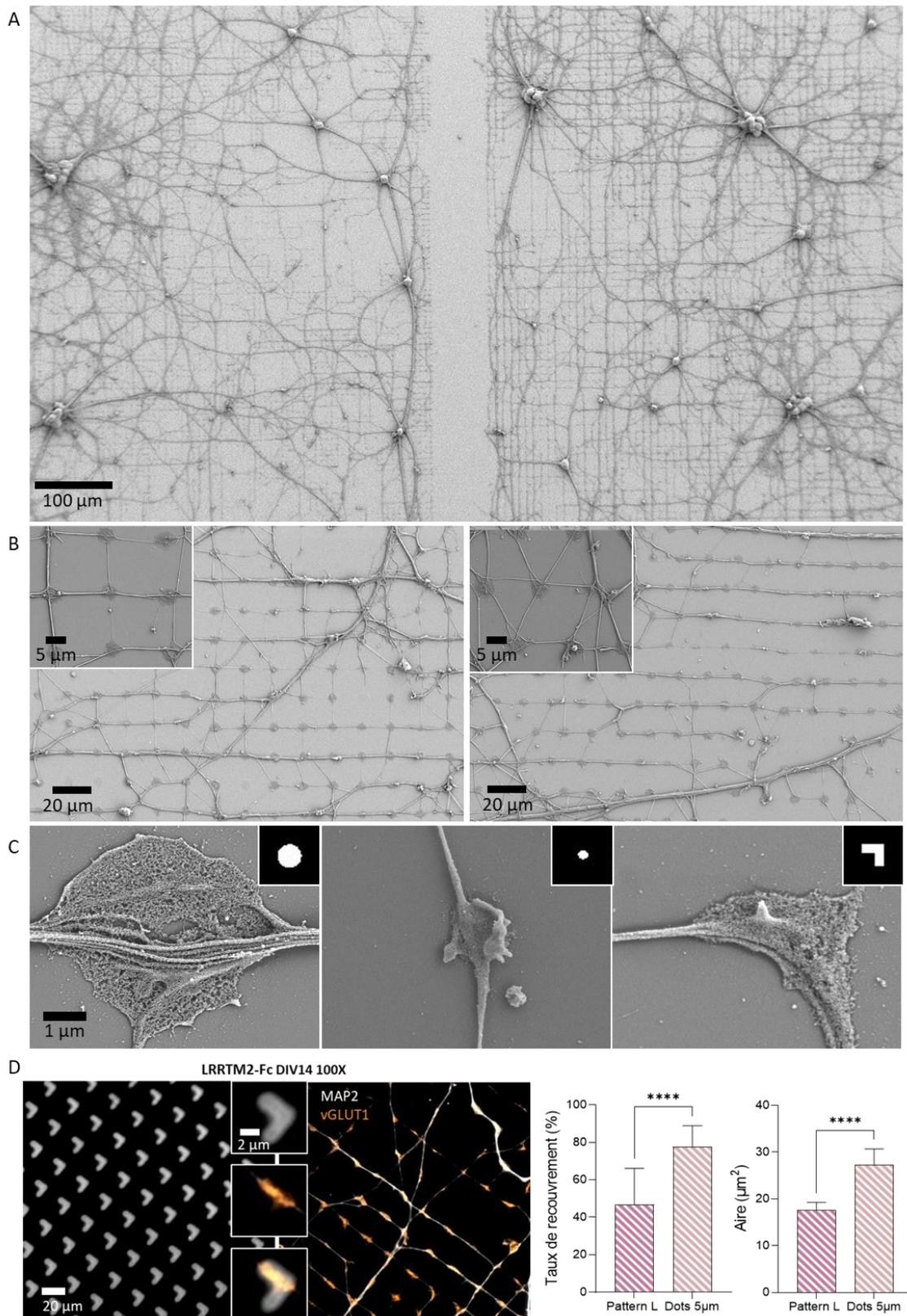


Figure 75. Morphologie membranaire des hémiprésynapses

(A) Image grand champ de neurones primaires d'hippocampe de rat à DIV14 sur des motifs de LRRTM2-Fc. (B) zoom sur des neurones sur des motifs de 5 µm avec soit une répartition en carrée (droite) soit hexagonale (gauche) (C) Gros plan sur différentes morphologies d'hémi-synapses induites sur différentes géométries de motif LRRTM2-Fc. (D) Immunomarquage de neurones primaires d'hippocampe de rat à DIV14 sur des motifs en forme de L de LRRTM2-Fc. Graphique du taux de recouvrement et de l'aire des hémi-synapses formées entre les motifs en L et des motifs circulaires de 5µm. **** $P < 0.0001$, Kruskal-Wallis test comparaisons multiple (Nbr d'hémi-synapses/ Nbr d'expérimentations) : Pattern L (774/1), Pattern dots 5µm (3110/1)

1.2.2 Hémi-postsynapse

Afin de démontrer la versatilité de notre modèle il est important de montrer que l'on peut également former des hémi-postsynapses. Pour cela, nous avons décidé de travailler avec la Neurexine que nous avons caractérisée dans la première partie de cette thèse, et qui est également l'une des protéines de la présynapse les plus utilisées dans les modèles de présynapses. Cependant, nous avons rapidement rencontré un problème, car les neurones n'adhèrent pas sur les impressions de Neurexine1 β -Fc. Et lorsque, de manière très rare, quelques neurones arrivent difficilement à adhérer, nous constatons qu'ils évitent totalement les zones de motifs et préfèrent pousser sur le PEG, normalement non adhésif pour les cellules (Figure 76).

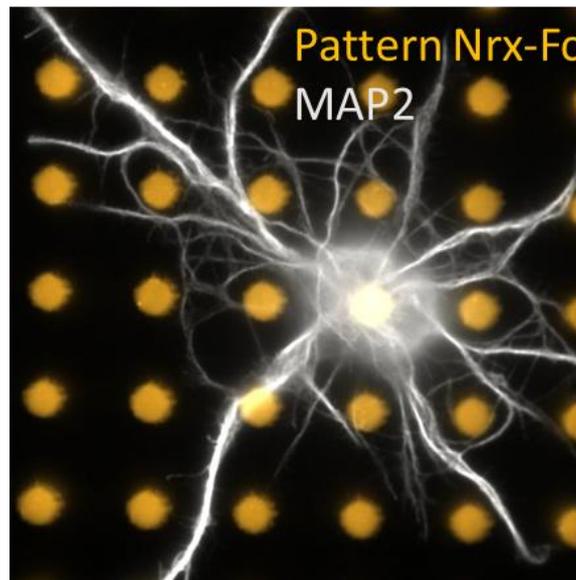


Figure 76. Neurone sur impression de Neurexine

Image en épifluorescence (100X) d'un neurone primaire d'hippocampe de rat DIV14 immunomarquée pour MAP2 sur un motif de Neurexine1 β -Fc.

Afin de comprendre ce phénomène, une comparaison a été réalisée avec les différents articles scientifiques utilisant Neurexine1 β -Fc dans leur compartiment artificiel pour former des postsynapses (Tableau 6). La première observation révèle que, dans l'ensemble des essais, la Neurologine est surexprimé dans les neurones, ce qui peut favoriser une formation de contact. Les articles de Graf de 2004 et de Lee de 2017 sont les seuls qui démontrent la possibilité de former des hémi-postsynapses sans surexpression de la Neurologine1. Dans les deux cas, ils utilisent un modèle de coculture où la protéine du compartiment artificiel n'est pas une protéine purifiée, puisqu'elle est exprimée par la cellule à la membrane. Dans l'article de Czöndör de 2013, basé sur l'impression protéique, il est indiqué que lors d'essais sans surexpression de la Neurologine, ils n'obtiennent pas d'hémi-synapses. En revanche, la plupart des essais de formation de présynapses utilisant la Neurologine1, ne nécessitent aucune surexpression de Neurexine1 (Tableau 7), ce qui semble indiquer que la formation de présynapses est plus facile.

Il existe, à notre connaissance, peu d'essais de formation d'hémi-synapse utilisant d'autres protéines pré-synaptiques que la Neurexine. Un essai basé sur un modèle de coculture, avec

MODELE D'HEMI-SYNAPSE

la présence de la protéine FLTR3 dans le compartiment artificiel, montre l'incapacité de recruter la synapsine, un marqueur postsynaptique, sans transfection de son partenaire, la latrophiline 3 (O'Sullivan et al., 2012). Un second article, démontre cependant que le récepteur neuronal de la pentraxine (NPTXR) permet, dans un modèle de coculture, d'induire la formation de postsynapse sans surexpression de la protéine partenaire (Lee et al., 2017).

Une autre différence par rapport à notre protocole est la présence de protéine d'adhésion de la matrice, telles que la polylysine ou la laminine (Tableau 6 et Tableau 7). Ces protéines permettent l'adhésion des neurones et découragent ainsi l'adhésion de l'action de la protéine synaptique. Dans la littérature, il n'est pas clair que Neurexine1 β a un rôle dans la croissance et l'adhésion des neurones. Il est donc possible que la seule présence de la Neurexine1 β ne soit pas suffisante pour induire l'adhésion des neurones à des stades précoces, cependant des essais préliminaires mélangeant Ncadhérine et Neurexine, n'ont pas donné des résultats plus concluants, signifiant que ce n'est pas le principal problème.

Papier référence		Graf et al., 2004		Nam et Chen., 2005	Heine et al., 2008	Mondin et al., 2011	Czöndör et al., 2013	Giannone et al., 2013	Lee et al., 2017	
Modèle d'hémi-synapse		Co-culture		Billes	Co-culture	Billes	Cluster Anticorps	Micropatterning	Cluster Anticorps	Co-culture
Compartiment artificiel	Détails	COS ou CV1		\	PC12 or HEK-293	\	\	\	\	HEK-293
	Protéine	Neurexin1 β -CFP	Neurexin1 β -Fc (SS4-) ou Anti-YFP	Neurexine1 β lipofectamine	Neurexin1 β	Neurexin1 β -Fc	Neurexin1 β -Fc	Neurexin1 β -Fc	Neurexin1 β -Fc	Flag-tagged Neurexin1 β (SS4*)
Compartiment neuronal	Détails	Neurones hippocampique de rat		Neurones hippocampique de rat	Neurones hippocampique de rat	Neurones hippocampique de rat	Neurones hippocampique de rat	Neurones hippocampique de rat	Neurones hippocampique de souris	
	Etat	Isolation E18 Observation DIV 14		Isolation E12-21 Observation	Isolation E18 Observation DIV7	Isolation E18 Observation DIV7-10	Isolation E18 Observation DIV10	Isolation E18 Observation DIV6-10	Isolation P0 Observation DIV 16	
	Protéine	Native ou Avec Transfection YFP-Neurologine1 ou 2		Transfection CFP-Neurologine1 ou PSD95-GFP par	Transfection avec Neurologine1-HA/mcherry	Transfection Neurologine1	Transfection avec Neurologine1-HA	Transfection Neurologine1	Native	
Autre Informations		Bunker	Bunker	Bunker	Polylysine et laminine coating	Polylysine coating	Polylysine et laminine coating	Polylysine coating	Polylysine coating	

Tableau 6. Synthèse formation d'hémi postsynapse avec Neurexine1

Papier référence		Scheiffele et al., 2000		Dean et al., 2003	Baksh et al., 2005	Wei Et al., 2013		Lee et al., 2017		
Modèle d'hémi-synapse		Co-culture		Co-culture	Billes	Cluster Anticorps	Billes	Impression par contact	Co-culture	Co-culture
Compartiment artificiel	Détails	HEK-293		COS ou CV1	\	\	\	\	COS / HEK-293	HEK-293
	Protéine	HA-Neurologine-1 ou HA-Neurologine-2 lipofectamine		HA-Neurologine-2	GPI-Neurologine	Anti-VSV multimères	GPI-Neurologine1	Neurologine-Fc	Neurologine1	HA-tagged neurologine-1
Compartiment neuronal	Détails	Cellules purifiées du granule cérébelleux ou explants du pont de vallat (Souris)		Neurones hippocampique de rat	Neurones hippocampique de rat	Neurones hippocampique de rat	Neurones hippocampique de rat	Neurones hippocampique de rat	Neurones hippocampique de souris	
	Etat	Isolation P5-P7 Observation DIV 2- DIV 4		Isolation E18 Observation DIV 14	Isolation E18 Observation DIV14	Isolation E18	Isolation E18 Observation DIV14	Isolation E18 Observation DIV14-20	Isolation P0 Observation DIV 16	
	Protéine	Native		\	Transfection VSV-Neurexin	\	\	\	Native	
Autre Informations		Coating de 10 mg/ml polyornithine et 30 mg/ml mouse EHS laminin		Bunker	Polylysine coating	Polylysine coating	Polylysine et laminine coating	Polylysine coating	Polylysine coating	

Tableau 7. Synthèse formation d'hémi présynapse avec Neurologine

1.3 Décorrélérer l'adhésion de la formation des synapses

Au vu des résultats obtenus lors des essais de formation de postsynapses, nous avons cherché un moyen de dissocier les motifs inducteurs de synapses, des motifs d'adhérence cellulaire de manière générale. En plus, si nous parvenons à cela, nous pourrions proposer aux utilisateurs du PRIMO de nouveaux protocoles pour travailler avec des protéines répulsives ou non

adhésives pour les cellules. En effet, avec le protocole classique utilisant le PEG, qui est un traitement cytophobique, une molécule adhésive est indispensable, sinon les cellules ne peuvent pas adhérer. Par ailleurs, au cours de ces expérimentations, nous avons souvent été confrontés à des détachements des neurones lors des différentes étapes d'immunomarquage. Ceci démontre que l'adhésion proposée par les motifs circulaires n'est pas suffisante.

Pour atteindre cet objectif, nous avons essayé deux approches : l'une basée sur l'impression multiprotéique et l'autre basée sur le remplacement du PEG par un revêtement adhésif.

1.3.1 Impression multiprotéique

La première solution envisagée pour créer une zone adhésive pour les neurones implique l'ajout de motifs adhésifs en plus des motifs de protéines d'adhésion synaptique. Dans le cadre du développement de modèle compétitif (1.2.2. Modèle de compétition), nous avons déjà validé un protocole de réalisation de double motif protéique en PLPP liquide (Figure 77.A). Ce protocole permet d'éviter la contamination croisée de la laminine sur la zone du premier motif grâce au pouvoir saturateur de la BSA (Figure 77.B). De plus, l'ensemble de la chaîne d'amplification étant nécessaire pour observer un enrichissement en PLPP liquide (*1.1.1.1 Caractérisation du PLPP gel*), nous pouvons nous permettre, afin d'optimiser au mieux le temps d'expérimentation, d'incuber l'anticorps et la protéine synaptique, qui nécessitent une incubation respective de 10 minutes et de 2 heures minimum à RT, après les deux insolations. Nous avons démontré que si l'anticorps et la protéine Fc sont potentiellement adsorbés au niveau du motif de laminine, cela n'était pas suffisant pour observer une interaction protéique (Figure 77.C). Cette optimisation des temps d'expérimentations est un facteur que nous souhaitons au maximum conserver pour faciliter l'accessibilité et le rendement des protocoles proposés par Alvéole.

Cependant, pour la culture de neurones, nous utilisons maintenant le PLPP gel pour obtenir plus rapidement de plus grande surface de pousse. Cependant, nous avons démontré que, dans cette condition, la chaîne d'amplification n'était pas nécessaire (*1.1.1.1 Caractérisation du PLPP gel*). En effet, en suivant exactement le même protocole (Figure 77. A) que pour le PLPP liquide, si nous disposons des cellules exprimant une protéine synaptique (ici SynCAM-mCherry) sur une impression multiple de SynCAM1-Fc et de laminine, on constate que la protéine cellulaire transmembranaire est enrichie sur les deux motifs (Figure 77. D), avec cependant un enrichissement moins fort au niveau des motifs de laminine. Cependant, nous cherchons une complète distinction des zones de formation synaptique des zones d'adhésions. Il est donc nécessaire d'adapter le protocole d'impression multiples à ces nouveaux paramètres.

Une modification potentielle du protocole est d'incuber l'anticorps anti humain Fc avant la deuxième insolation (Figure 77. E). Nous avons en effet montré que la protéine d'adhésion synaptique seule n'était pas suffisante pour obtenir une interaction protéique en PLPP gel (*1.1.1.1 Caractérisation du PLPP gel*), donc même si elle s'adsorbe sur les motifs de laminine, nous ne devrions pas obtenir d'enrichissement.

MODELE D'HEMI-SYNAPSE

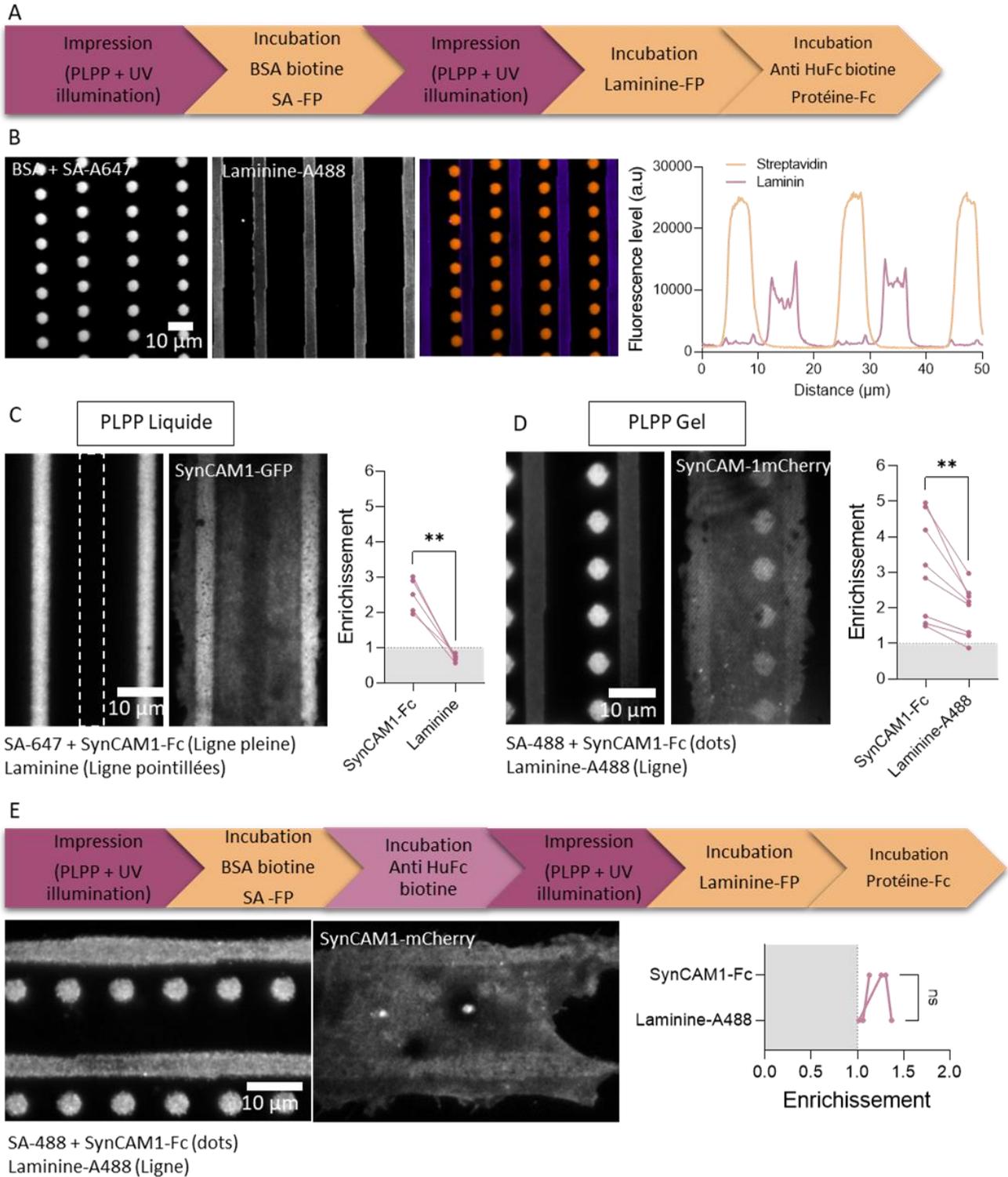


Figure 77. Multiprotéique impression en PLPP gel

(A) Protocole de d'impression multiples (B) Image d'épifluorescence du rendu du *multipatterning* en PLPP gel avec des points de BSA biotine et de streptavidine-A647 (SA-A647) et des lignes de Laminine A488. Mesure par ligne de balayage du niveau de fluorescence (C-D) Image TIRF de cellules COS-7 surexprimant SynCAM1-mCherry sur un revêtement de Laminine (fluo ou non) et SynCAM1-Fc réalisé soit avec du PLPP liquide (C) soit avec du PLPP gel (D). Graphiques montrant la distribution de l'enrichissement entre le motif en points (SynCAM1-Fc) et celui en lignes (Laminine) (E) Protocole alternatif pour l'impression multiple en PLPP gel. Image TIRF de cellules COS-7 surexprimant SynCAM1-mCherry sur des points de SynCAM1-Fc et Laminine-A488. Graphiques montrant la distribution de l'enrichissement entre le motif en points (SynCAM1-Fc) et celui en lignes (Laminine) ** $P=0.0014$, ** $P=0.0046$, ns = 0.5, Paired t test (Nbr de cellules / Nbr d'expérimentations) PLPP liquide (5/1) ; PLPP gel (8/1) , PLPP gel second protocole (3/1).

Cependant, en réalisant cette modification, nous n'avons plus d'enrichissement de la protéine membranaire et ceux sur tous les motifs (Figure 77.E). L'ordre d'incubation de l'anticorps étant le seul changement effectué nous supposons qu'il ne supporte pas l'étape de séchage puis de gélification du PLPP gel nécessaire pour réaliser la seconde insolation, ce qui empêche la fixation de la protéine d'intérêt sur le motif.

1.3.2 Impression sur revêtement adhésif

En parallèle de nos essais d'impression, nous avons testé une approche différente, basée cette fois ci sur le remplacement du revêtement cytophobique (PEG) par un revêtement adhésif (Figure 78.A). Une récente étude, utilise une approche similaire pour étudier le guidage des lymphocytes T en exposant aux UV une surface couverte d'une protéine adhésive, afin de créer des zones plus ou moins adhésives (Luo et al., 2019). Cependant, dans cette étude, il n'imprime pas une seconde protéine dans les zones insolées, il cherche uniquement à dégrader partiellement le revêtement adhésif. Donc, suite à cette étude, nous avons tenté d'utiliser ce type d'approche, dans le cadre d'une collaboration, pour explorer les mécanismes de guidance en imprimant des protéines répulsives sur un revêtement adhésif. Ces essais, réalisés en PLPP liquide, étaient prometteurs avec une légère adsorption de protéine répulsive lors de l'utilisation d'une dose UV de 1000 mJ/mm². Cependant, la dose UV nécessaire pour obtenir un motif protéique avec une adsorption correcte auraient été trop élevées, entraînant des temps d'impression excessivement longs et donc une rentabilité très faible pour des essais sur neurones. Cependant, avec le développement du PLPP gel, permettant d'amplifier la réaction et donc de réduire fortement la dose UV nécessaire (*1.1.1.1 Caractérisation du PLPP gel*), le projet d'impression sur revêtement adhésif a été relancé pour le projet héli-synapse.

Pour cela, nous avons opté pour l'utilisation d'un revêtement homogène de laminine, mais par la suite, nous souhaitons démontrer la faisabilité de ce protocole avec d'autres protéines de la matrice extracellulaire, telles que la polylysine et la fibronectine. Le protocole d'impression est équivalent à celui classiquement utilisé, seule la préparation du substrat change avec l'incubation de la laminine (III.5.2. Impression sur coating homogène) à la place de l'étape de pégylation. Pour valider notre preuve de concept nous avons, dans un premier temps travaillé avec des COS-7, ce qui nous a permis d'obtenir une réponse biologique plus rapide qu'avec des neurones. Dans un deuxième temps, nous avons travaillé avec des neurones primaires, pour valider la formation d'héli-synapses.

En première observation, nous pouvons constater qu'il est possible d'imprimer une protéine, ici la streptavidine-A405, au niveau des motifs insolés (UV +PLPP gel) sur le revêtement de laminine-A488 (Figure 78.B). Nous avons testé différentes doses UV afin de déterminer la condition d'insolation optimale (Figure 78.C). Lors de l'augmentation de la dose UV, nous observons une diminution du niveau de fluorescence de la laminine-A488 dans les zones insolées par rapport au niveau basale à l'extérieur des zones de motifs. Cette diminution semble atteindre un palier entre 200 et 300 mJ/mm². Concernant l'adsorption de la streptavidine, nous observons une relation dose-effet, entre la dose UV et le niveau de fluorescence de la streptavidine au niveau des zones insolées. Cet effet semble atteindre un plateau autour de 500 mJ/mm². Une dose de 500 mJ/mm² induit des impressions déjà

relativement longues (environ 1 heure pour 20 mm²), nous n'avons donc pas cherché à augmenter encore la dose et nous avons gardé cette valeur comme dose optimale. La dose UV classiquement utilisée en PLPP gel est entre 20 et 50 mJ/mm², la réaction de dégradation de la laminine est donc moins efficace de celle du PEG.

Pour valider la fonctionnalité des motifs protéiques, nous avons disposé sur des motifs de SynCAM1-Fc des cellules exprimant SynCAM1-mcherry (Figure 78.D). Nous constatons que la protéine transmembranaire SynCAM1-mCherry est spécifiquement recrutée au niveau des zones d'illumination, où la présence de la protéine synCAM1-Fc est souhaitée (Figure 78.D). Si nous mesurons le niveau de fluorescence le long d'une ligne sur l'image pour la streptavidine-A405, la laminine-A488 et la SynCAM1-mCherry, nous observons des pics de fluorescences pour SynCAM1-mcherry alignés avec les pics de signal de la streptavidine-A405 et totalement désalignés avec les pics de la laminine-A488 (Figure 78.E).

Nous avons réalisé cet essai sur trois conditions (Figure 78.F-G). Deux conditions utilisant la streptavidine comme première protéine d'accroche pour notre arbre d'amplification, mais utilisant soit de la laminine-A488 soit de la laminine non fluorescente comme revêtement adhésif. La troisième condition utilise la BSA biotine comme première protéine d'accroche pour notre arbre d'amplification. Il n'est pas nécessaire, dans le cadre des expérimentations futures, que la laminine soit fluorescente, il est même préférable qu'elle ne le soit pas pour pouvoir réaliser différents marquages d'intérêt sur les neurones. Cependant, nous devons nous assurer que l'absence de fluorophore n'induit pas un biais dans le protocole. Concernant la BSA, de par son pouvoir saturateur, nous avons préféré initialement ne pas l'utiliser par crainte qu'elle se fixe sur la laminine. Cependant, pour travailler dans les mêmes conditions que nos précédentes expérimentations il serait préférable que nous puissions l'utiliser. Dans les trois conditions nous observons le même niveau d'enrichissement de la SynCAM1-GFP sur les motifs de SynCAM1-Fc (Figure 78.F) et ceux même si l'adsorption de streptavidine est significativement plus conséquente en présence de la BSA biotine (Figure 78.G).

Ces essais avec les cellules hétérologues sont très encourageants et ce protocole devrait permettre de former des héli-synapses sur ces motifs réalisés sur revêtement adhésif. Nous avons donc utilisé des neurones primaires afin de réaliser un essai de formation d'héli-présynapse. Lors de l'immunomarquage des neurones, nous constatons qu'ils poussent bien sur les zones de motifs et que le recrutement de vGLUT1 sur les motifs de LRRTM2 est observable (Figure 78.L). Cependant, nous nous attendions à obtenir des neurones sur l'ensemble de la lamelle, dû à la présence de laminine sur l'ensemble de celle-ci. Or, nous avons observé que quelques zones où les neurones se trouvent en dehors de la zone d'impression. Dans ces dernières, nous observons un faible niveau de fluorescence correspondant à la streptavidine (Figure 78.I). Cela peut être dû à des zones qui ont séchés et où les protéines se sont adsorbées. Nous observons au final peu de zones où les neurones poussent uniquement en présence de la laminine (Figure 78.I). La laminine n'ayant pas un rôle adhésif pour les cellules COS-7, nous n'avons donc pas pu évaluer ce paramètre en amont. Il semble donc que nous ne parvenions pas à conserver l'intégrité de la laminine au cours de notre protocole, et qu'elle n'ait donc pas conservé ses propriétés adhésives.

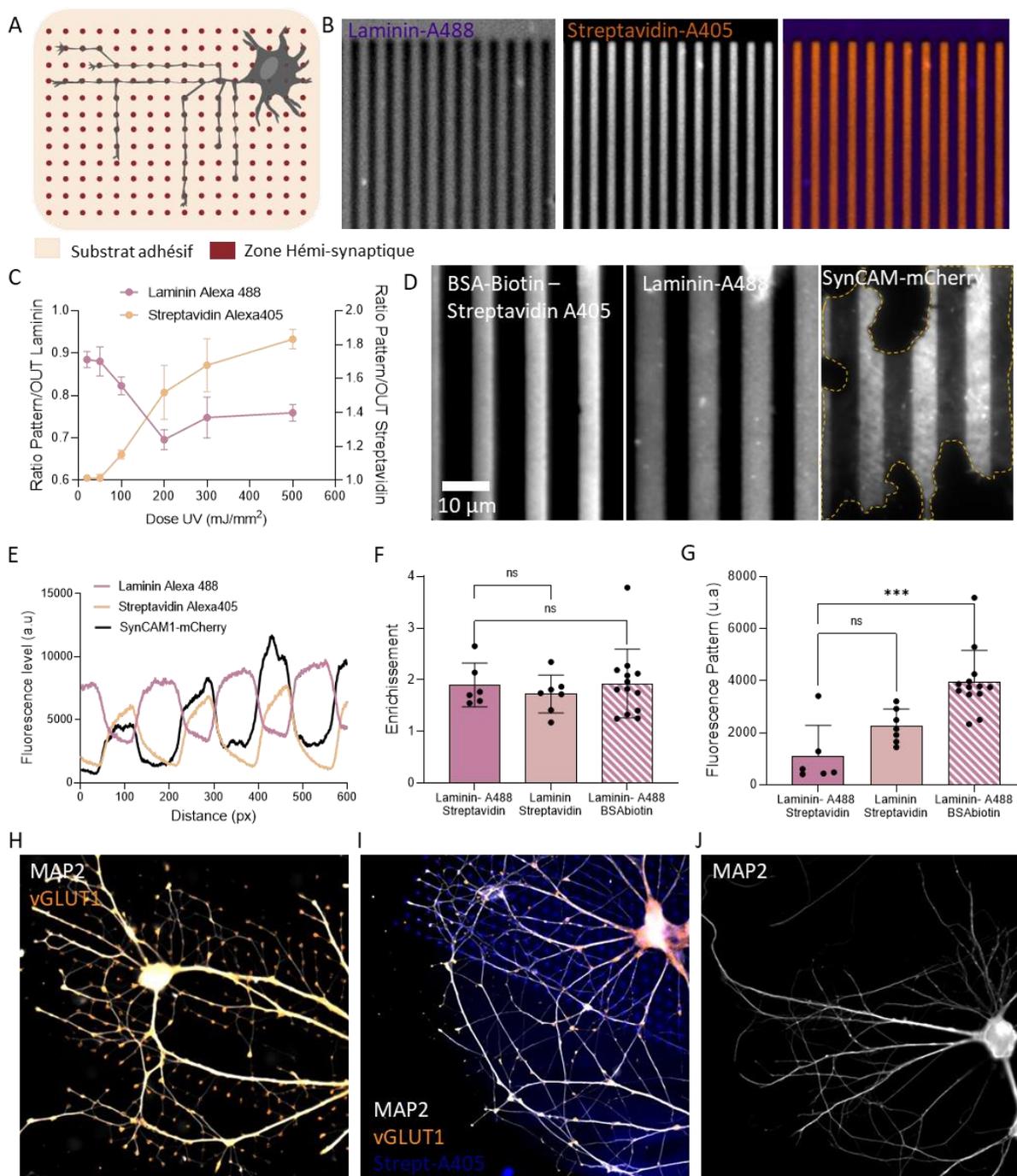


Figure 78. Impression sur recouvrement adhésif

(A) Vue schématique du dessus des neurones poussant sur un revêtement adhésif avec des points de protéines d'adhésion synaptique pour créer des zones de formation de synapse (B) Image en épifluorescence d'un revêtement de laminine-A488 après insolation aux UV et incubation de streptavidine-A405. (C) Graph du ratio signal sur bruit de la laminine-A488 et de la streptavidine-A405 en fonction de la dose d'UV. (D) Image d'épifluorescence d'un motif de BSA+streptavidine-A405 +SynCAM1-FC sur un revêtement homogène de Laminine-A488. Image TIRF d'une cellule COS-7 surexprimant synCAM1-mCherry. (E) Graphique du niveau de fluorescence le long d'une même région linéaire pour la laminine-A488, la streptavidine-A405 et synCAM1-mcherry. Les pics pour la streptavidine-A405 et synCAM1-mCherry sont alignés. (F) Graphique de l'enrichissement de SynCAM1-mCherry sur des motifs de SynCAM1-Fc avec soit la laminine-A488 soit la laminine simple pour la phase adhésive. Pour la première couche de l'arbre d'amplification soit la streptavidine soit la BSA biotine. (G) Graphique du niveau de fluorescence du motif pour les conditions précédentes. (H-J) Image d'épifluorescence (20X) de neurone primaire d'hippocampe à DIV14 sur une impression avec recouvrement adhésif. *ns* >0.99 et 0.54, *** *P*=0.0003, Kruskal-Wallis test comparaisons multiple (Nbr de cellules / Nbr d'expérimentations) Laminine-A488 + SA (6/1) ; Laminine + SA (7/1) , Laminine + BSA biotine + SA (13/1).

II Conclusion

Pour conclure cette seconde partie, nous avons démontré, avec le système d'impression protéique PRIMO, la capacité à induire la formation d'hémi-présynapses à partir de neurones primaires d'hippocampe de rat. Une caractérisation structurale et fonctionnelle a été réalisée en combinant ce modèle à des immunomarquages, à de la microscopie électronique et à de l'imagerie calcique.

Cela a permis d'observer le recrutement de marqueurs vésiculaires (Figure 71) et de caractériser morphologiquement ces vésicules (Figure 72), confirmant ainsi la formation spécifique de présynapses excitatrices sur des impressions de LRRTM2-Fc. Bien que la formation d'hémi-présynapses sur des impressions protéiques ne soit pas une nouveauté, les articles sur ce sujet sont rares (Czöndör et al., 2013; Li Wei et al., 2013). C'est donc la première fois que cela est démontré avec la protéine LRRTM2, et ce, en l'absence de polylysine qui est connue pour induire des formations spontanées de présynapses (Burry, 1982). De plus, c'est la première fois que des images de microscopie électronique à transmission démontrent le recrutement de vésicules sur des impressions protéiques de protéines d'adhésions synaptiques. Cela a permis d'observer que les vésicules recrutées sur les synapses induites ont les mêmes caractéristiques morphologiques que celles présentes dans les synapses excitatrices matures natives des neurones hippocampiques (Qu et al., 2009, p.).

L'analyse du recrutement de vGLUT1, marqueur vésiculaire, a montré une augmentation du recrutement de vésicules au fil du temps, cohérente avec les étapes, précédemment décrites, d'augmentation vésiculaire au cours de la maturation des synapses (Blue & Parnavelas, 1983; Dyson & Jones, 1980; Vaughn, 1989). Cependant, dans notre modèle, il est difficile de différencier différents groupes de vésicules comme décrit dans les synapses natives (Mozhayeva et al., 2002) car ils sont définis en fonction de leur distance par rapport à la densité synaptique. Comme notre modèle mime la postsynapse, nous n'avons pas accès à ces informations.

De plus, par vidéo-imagerie de neurones transfectés avec GcAMP6, nous avons démontré que les hémi-présynapses formées présentent des flux calciques, confirmant leur fonctionnalité (Figure 74). D'autres mesures sur des neurones vivants sont envisageables, telles que le suivi du recrutement de différentes protéines synaptiques ou de nanostructures au cours du développement synaptique. La standardisation et l'orientation des hémi-synapses induites par l'impression protéique représentent un réel avantage pour l'acquisition et l'analyse comparée à des neurones en culture classique.

Quant à l'aspect morphologique des hémi-présynapses formées (Figure 75), l'étalement et l'aspect poreux de la membrane, observés sur les motifs micro-imprimés, sont cohérents avec ce qui a déjà été publié précédemment sur des motifs imprimés de taille similaire (Li Wei et al., 2013). Il existe très peu d'images, à notre connaissance, de boutons synaptiques réalisées en microscopie électronique à balayage sur des neurones en culture, rendant la comparaison peu évidente. Cependant, l'article de Hirano et Kasono (Hirano & Kasono, 1993) présente des images avec un faible grossissement de synapses formées entre des interneurons et des cellules de Purkinje. La morphologie observée est moins étalée que nos hémi-présynapses,

avec un aspect plus protubérant et une membrane plus lisse. Cette différence peut s'expliquer par le fait que, dans notre modèle, les motifs sont aussi les seules zones où l'adhésion est possible, ce qui peut potentiellement changer la morphologie.

Nous avons déterminé qu'avec des motifs de 5 μm , il arrive que plusieurs héli-synapses se forment sur un seul motif. Ce phénomène existe également *in vivo*, où il a déjà été décrit que plusieurs boutons synaptiques peuvent se former sur une même épine dendritique (Jones & Powell, 1969; Santuy et al., 2018), ce qui est très caractéristique chez les neurones hippocampiques (Rigby et al., 2023). Cependant, il serait intéressant de réduire la taille des motifs pour se rapprocher de la taille physiologique de ces dernières. Dans la première partie de cette thèse, nous avons réussi à améliorer l'impression de motifs de petite taille, ce qui sera utile pour les développements futurs sur ce projet d'héli-synapses.

Le contrôle de la taille des synapses formées est intéressant car une corrélation a été établie entre la taille de la synapse et certains compartiments (PSD, zone active...) fortement corrélés entre eux mais surtout avec l'efficacité de la synapse (Bourne et al., 2013; Branco et al., 2008; K. m. Harris & Sultan, 1995; K. Harris & Stevens, 1989; Murthy et al., 2001; Schikorski & Stevens, 1997). Pendant la plasticité synaptique et donc l'apprentissage, la morphologie synaptique varie avec une augmentation de la taille des synapses et des nanostructures (Clavet-Fournier et al., 2023; Marrone & Petit, 2002). Pour un axone qui forme plusieurs contacts avec un même dendrite, il a été démontré que ces synapses ont la même morphologie et la même mémoire, ayant subi le même historique en terme d'activité et d'information (Bartol et al., 2015).

Nous avons constaté que les héli-présynapses formées peuvent adapter leur morphologie en fonction de la géométrie du motif protéique imprimé. En variant le diamètre d'un motif circulaire, nous avons observé une variation de la morphologie et de l'aspect de la membrane. De plus, en utilisant une forme asymétrique, nous avons complètement modifié la morphologie de l'héli-synapse. Si l'on teste différentes tailles de motifs de géométrie similaires pour créer différents « historiques synaptiques », cela pourrait permettre d'observer l'impact sur l'activité des héli-présynapses créées, ainsi que sur la taille de certains compartiments, tels que la zone active, par exemple. A terme, nous espérons obtenir des images modélisées de synapses et de compartiments synaptiques moyens, mais nous avons principalement travaillé avec une géométrie circulaire complètement symétrique, rendant difficile ce type de moyennage.

L'imagerie électronique à balayage a également permis d'observer la présence d'axones isolés, ce qui est relativement difficile à obtenir en culture, où les axones s'enroulent autour des dendrites. Cela est possible grâce à la disposition des motifs mais également au contrôle de la densité cellulaire par rapport à la surface du motif. Nous observons également des paquets d'axones et de dendrites. Ce type de *bundle* dense a déjà été décrit précédemment sur des motifs protéiques linéaires (Jun et al., 2007).

L'analyse plus poussée de l'immunomarquage a montré que certaines héli-présynapses présentent un recrutement de vGLUT1 et de PSD-95 (Figure 73). Le recrutement de PSD-95 seul n'a pas été observé, et une première hypothèse, confirmée par les résultats obtenus en

présence de Ncadhérine, suggère que les motifs sont des zones favorisant le croisement entre axone et dendrite. Ce qui favoriserait la formation de synapses natives sur les motifs, cela étant validé par la taille moyenne des compartiments observés sur les motifs de Ncadhérine. Cependant, certaines postsynapses, surtout autour du corps cellulaire, sont de tailles plus conséquentes et induisent des héli-présynapses avec un enrichissement plus important de vGLUT1. Nous avons défini ces cas spécifiques comme étant un complexe tripartite avec pour constituants : le motif, l'héli-présynapse et une postsynapse. Le nom de ce complexe fait référence à la synapse tripartite décrite depuis quelques années, qui inclut les astrocytes comme acteurs importants dans la formation, la maturation et la plasticité des synapses. Au niveau hippocampique, plus de la moitié des synapses sont des complexes tripartites (Ventura & Harris, 1999). La présence de protéines d'adhésion synaptique, telles que la Neuroligine1, a été démontrée comme permettant la liaison physique entre les astrocytes et les compartiments synaptiques (Tan & Eroglu, 2021). Notre hypothèse est que le motif pourrait dans ce cas mimer l'action des astrocytes, cela est suggéré par l'augmentation du signal calcique dans les complexes tripartites formés. En effet, ce compartiment glial est connu pour jouer un rôle actif dans l'activité synaptique, notamment dans le relargage de neurotransmetteurs et la concentration calcique cytosolique (Araque et al., 1999; Santello et al., 2012).

En ce qui concerne la formation de postsynapses, l'analyse bibliographique (Tableau 7) a montré qu'il n'était pas simple de réussir à en former, surtout en l'absence de surexpression de la protéine présynaptique. Cela soulève un point important concernant l'utilisation de protéines recombinantes, en effet, nous avons observé que, dans les deux publications où la formation de postsynapses a été démontrée en absence de surexpression de Neuroligine1, le modèle d'héli-présynapse utilisé est la coculture. Cette technique est la seule qui ne soit pas basée sur l'utilisation de protéines recombinantes, puisque le compartiment artificiel est une cellule hétérologue exprimant la Neuroligine1 dans sa forme transmembranaire.

Les protéines purifiées sont une version tronquée, conservant seulement l'ectodomaine, qui est la partie extracellulaire. De plus, dans son état natif, Neurexine1 β présente des modifications sulfatées, des chaînes d'héparine sulfates jouant un rôle important en créant une interaction supplémentaire avec les Neuroligine1 et LRRMT2. La présence de ces chaînes est indispensable pour la structure et la fonction des synapses (Zhang et al., 2018). Ces chaînes ont été montrées comme les facteurs induisant la formation spontanée de présynapses, uniquement et non de postsynapses, en présence de billes recouvertes de poly-D-lysine (Lucido et al., 2009). Dans ce même article, il est démontré que la Neurexine1 β recombinante que nous utilisons est tronquée avant la région contenant les sites de modification des héparines sulfates. Cela peut en partie expliquer nos difficultés à former des héli-postsynapses. La question biologique principale que soulèvent nos résultats et l'étude bibliographique est la suivante : est-ce que la formation de postsynapses nécessite la présence d'une présynapse mature pour pouvoir se former ? En effet, il semble beaucoup plus facile d'induire la formation de présynapses, même en l'absence de protéines synaptiques.

Un point technique que nous avons soulevé et qui peut jouer un rôle dans la formation de postsynapses est la capacité adhésive du motif. En effet, dans l'ensemble des études de

MODELE D'HEMI-SYNAPSE

formation d'hémi-présynapses, en plus de la protéine d'intérêt, une protéine adhésive est utilisée (Laminine, PLL...). Pour cela, nous avons testé deux protocoles, l'un basé sur l'impression multiple (Figure 77) et l'autre sur le remplacement du recouvrement cytophobique de PEG une molécule adhésive (Figure 78). Pour le moment, les résultats expérimentaux ne sont pas encore optimaux : dans le premier cas, nous n'arrivons pas à conserver la localisation spécifique de la protéine d'intérêt, et dans le deuxième, nous ne conservons pas les propriétés adhésives de la laminine.

Pour que la solution d'impression multiple fonctionne en PLPP gel, il faudrait effectuer la deuxième illumination UV en utilisant le protocole de PLPP liquide plutôt qu'en PLPP gel, même si cela peut être plus chronophage. Une seconde option consisterait à expérimenter avec des molécules de saturation après la deuxième insolation. En ce qui concerne l'impression sur recouvrement adhésif, l'optimisation de ce protocole n'en est qu'à ses prémices et sera poursuivie par la suite, car le développement offre de belles perspectives pour Alvéole.

III Matériels et Méthodes

3.1 Culture de neurones primaires hippocampiques

Avant le dépôt des neurones, les lamelles sont rincées 3 fois dans du PBS et une fois dans du milieu de culture pour neurone (Neurobasal complet) conditionnées par des cellules gliales (Dénommée milieu conditionné ensuite). 30 min avant l'ensemencement les lamelles sont placées par 4 dans des boîtes de pétrie de 60 mm avec du milieu conditionné à 37°C et 5%CO₂ pour équilibrer l'ensemble.

Les neurones primaires hippocampiques de rat sont dissociés à partir d'embryons de rat Sprague-Dawley à E18 basés sur le protocole décrit précédemment (Kaech and Banker, 2006). Tous les animaux sont utilisés en accord avec les recommandations de l'université de Bordeaux et le comité de protection et d'utilisation des animaux du CNRS.

Les neurones sont ensemencés à une densité de 35 000 cellules par lamelles avec des motifs, soit 3000 cellules/mm² dans notre cas. 6 heures après le dépôt des neurones, les lamelles sont « flippées » dans une boîte de pétri avec une couche nourricière de cellules gliales. 72 heures après 2 µM d'Arac-C est ajouté pour bloquer la pousse des cellules gliales.

Milieu et préparation des astrocytes :

Neurobasal complet : Milieu Neurobasal Plus (sans rouge de phénol) supplémenté avec 0.5 mM GlutaMAX et 1X B-27 Plus (Thermo Fischer Scientific), 100 units mL⁻¹ penicilline, 100 µg. mL⁻¹ streptomycine.

La couche nourricière d'astrocyte est préparée à partir du même type d'embryons que les neurones. Les astrocytes sont ensemencés entre 20 000 et 40 000 cellules par boîtes de pétrie de 60 mm (suivant le lot de sérum de cheval utilisé) et cultivés pendant 14 jours dans du MEM (Thermo Fisher Scientific) contenant 4.5 g.l⁻¹ Glucose, 2mM GlutaMAX et 10% sérum de cheval inactivé par la chaleur (Thermo Fischer Scientific). 4 jours avant la dissection et le dépôt des neurones, le milieu des glies est remplacé par du milieu Neurobasal complet ce qui donne du milieu conditionné après le relargage de nutriments par les cellules gliales.

3.2 Plasmides d'ADN

Electroporation COS : SynCAM1-GFP (+420), SynCAM1-mCherry (+420), et GFP-Neurexine1B (SS4-) sont des dons T. Biederer (Yale University, New Haven, USA) (Cheadle & Biederer, 2012) et M. Missler (Münster University, Allemagne), respectivement.

Le plasmide Ncadhérine-GFP a déjà été décrit (Gavard et al., 2004).

Transfection calcium phosphate Neurones :

Les plasmides Homer1c-DsRed (Mondin et al., 2011) et GCaMP6f (Getz et al., 2022) ont déjà été décrits.

La fidélité de toutes les constructions a été vérifiée par séquençage à l'aide de la société Genewiz.

3.3 Electroporation

3.3.1 Electroporation COS-7

Les cellules COS-7 (ATCC) sont cultivées dans du milieu FluoroBrite Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM ; GIBCO/BRL) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS), 100 unités mL⁻¹ de pénicilline, 100 µg. mL⁻¹ de streptomycine, 1% de Glutamax et 1% de Sodium-Pyruvate dans une atmosphère à 37°C et 5% de CO₂. L'absence de rouge de phénol dans le milieu est préconisée car ce dernier s'adsorbe dans les zones d'impression créant un fort niveau d'auto-fluorescence dans le vert.

Trente-six heures avant les expériences, les cellules sont rincées avec du PBS à 37°C, trypsinées pendant 5 min, puis suspendue dans du milieu de culture et centrifugées pendant 5 min à 1000 rpm. Le culot contenant environ 1M à 2M de cellules est suspendu dans 100 µl de milieu d'électroporation, placé dans une cuvette et électroporé en utilisant le système Amaxa Nucleofector (Lonza) avec 1-3 µg d'un des plasmides décrits. Les cellules électroporées sont ensuite remises en suspension dans un milieu de culture, placées dans des plaques de 12 puits et replacées dans l'incubateur jusqu'à le début de l'expérimentation.

3.3.2 Transfection Neurones

La transfection calcium-phosphate est une méthode basée sur la formation de précipités phosphate de calcium-ADN pour faciliter l'entrée de l'ADN dans les cellules via l'endocytose (Dudek et al., 1998). Ce protocole peut être utilisé avec des cultures neuronales (Graham & van der Eb, 1973).

Nous conseillons d'utiliser la transfection au phosphate de calcium au lieu d'autres méthodes telles que l'électroporation pour les neurones sur impressions protéiques. En effet, l'électroporation doit être effectuée juste avant l'ensemencement des cellules sur les substrats, et c'est assez stressant pour les neurones. Ainsi, pour augmenter l'adhésion des neurones sur des substrats imprimés, la transfection au phosphate de calcium est préférable car effectuée 7 jours après l'ensemencement.

Les neurones ont été transfectés à DIV 7 en utilisant 0,5 à 1 µg de plasmides d'ADN. Avant la transfection, 2 ml du milieu équilibré approprié ont été ajoutés à chaque boîte. La combinaison de différents plasmides a été diluée dans du tampon TE, ajoutée goutte à goutte pour former les précipités et cette solution a été transférée à la solution HEBS (solution saline tamponnée 2x HEPES : NaCl 274 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,4 mM, glucose 12 mM, HEPES 42 mM - pH 7,2). Les lamelles de neurones cultivés ont ensuite été transférées dans des plaques à 12 puits contenant 200 µl/puits de milieu neurones et 50 µl d'acide kynurénique 5x. Nous avons ajouté 50 µL de solution de précipité dans chaque puits et les neurones ont été incubés pendant 1 heure à 37°C. Ensuite, les cellules ont été lavées pendant 20 minutes à 37°C avec 400 µl de milieu équilibré contenant 2 mM de KA, puis ont été remises dans leur boîte de culture d'origine jusqu'à l'imagerie.

3.4 Protéines

Les protéines recombinantes Neurexine1 β (SS4-), Ncadhérine, SynCAM1 fusionnées au Fc humain au niveau C-terminal ont été produites et purifiées comme décrit précédemment (III.3.1 Protéines recombinantes).

Les protéines recombinantes Ncadhérine-Fc (1388-NC) et LRRTM2-Fc (5589-LR) ont été achetées chez R&D biosystems.

3.5 Impression protéique

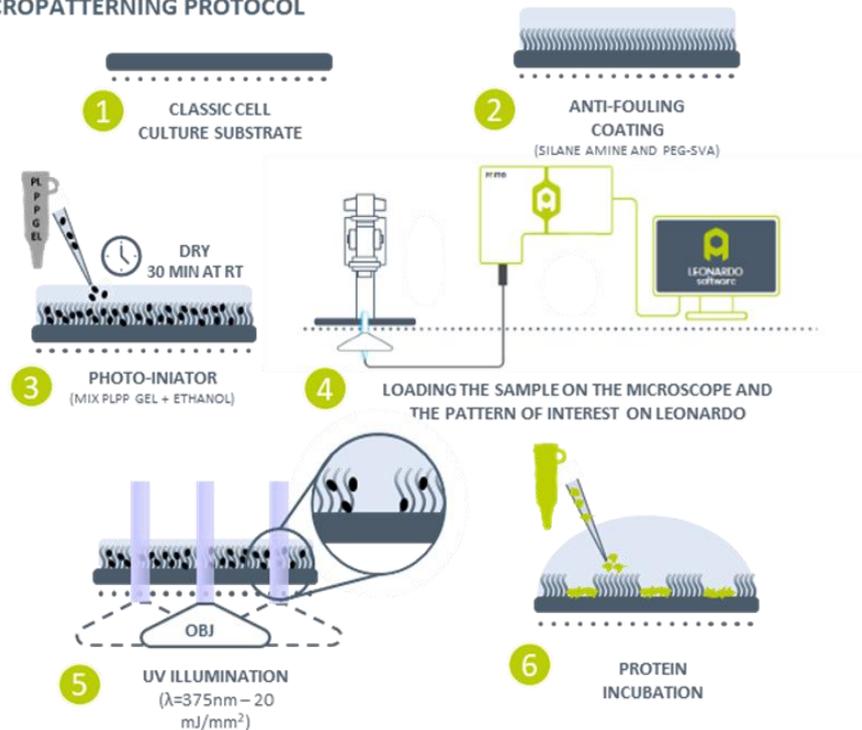
3.5.1 Impression en PLPP gel

Après traitement de 5 min au plasma (Harrick Plasma), les lamelles de 18mm, avec des points de parafilm, préalablement nettoyées à l'acide nitrique, sont placées dans une chambre fermée avec du 3-aminopropyl triéthoxysilane en solution dans des capuchons d'Eppendorf (300 μ l au total) pendant une heure. Après, une solution fraîche de mPEG-SVA à 100 mg/ml dans du tampon carbonate (10mM, pH 8) est incubée pendant une heure (150 μ l par lamelle). Ensuite, les lamelles sont abondamment rincées avec de l'eau distillée puis séchées sous un flux d'azote. Un mix de 33 μ l d'éthanol absolu et de 3 μ l de PLPP gel est déposé par lamelle, une bonne répartition du liquide sur la lamelle est réalisée par des rotations légères de la lamelle. L'ensemble est laissé séché pendant 1 h à température ambiante afin d'obtenir un gel transparent de PLPP à la surface de la lamelle (Figure 79.A).

Le fichier Tiff, en 8-bits est dessiné sur le logiciel Inkscape. Il est chargé sur le logiciel Leonardo fourni avec le système PRIMO (Alvéole, France), qui est lui branché sur un microscope inversé (Nikon TiE Eclipse) avec un objectif Super Fluor 20X/0.75NA. Leonardo permet de définir les coordonnées via la platine du microscope, la dose UV en contrôlant la puissance laser et le temps d'insolation et les différentes géométries à imprimer, en contrôlant le DMD. L'UV structuré est ensuite projeté sur la lamelle via l'objectif 20X à une dose UV entre 20 et 50 mJ/mm² (Figure 79.A).

L'action combinée de l'UV et du PLPP gel va localement induire la dégradation du PEG. La lamelle est ensuite rincée abondamment avec de l'eau distillée stérile puis séchée avec un pistolet à air. Une chambre de rinçage en PDMS (Figure 79.B) (PDMS stencil, Alvéole, France), a été développée permettant de correctement rincer les premières couches de protéines, l'utilisation de cette chambre est critique surtout pour l'impression de multiples protéines. Cette chambre est réalisée en découpant un film de silicone transparent de 250 μ m d'épaisseur (BISCO HT-6240, Rogers Corporation Carol Stream, IL, USE) à l'aide d'une machine de découpe vinyle (Graphtec, Irvine, CA, USA). Le film de silicone est pris en *sandwich* entre deux feuilles de plastique, une de ces feuilles est conservée comme support. Le motif découpé est enlevé permettant, en retournant la partie imprimée de la lamelle (côté des dots) vers l'intérieur du puits, de créer une chambre de rinçage et d'incubation. Il est important de ne pas recouvrir les canaux d'entrée et de sortie de liquide avec la lamelle (Figure 79.B). Après réhydratation de la lamelle avec du PBS pendant quelques minutes, la BSA biotin à 100 μ g/ml est incubée pendant 3 min puis après 3 rinçages en PBS la Streptavidine-Alexa405 est incubée

A MICROPATTERNING PROTOCOL



B

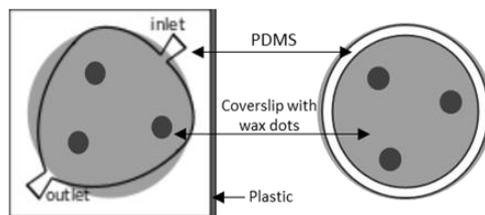


Figure 79. Protocole d'impression protéique en PLPP gel

(A) Sur lamelle classique (1) un revêtement de Silane-PEG permet de créer une brosse antifouling dense (2). Une solution de photo-initiateur (PLPP gel) est ensuite ajoutée (3). La lumière UV (375 nm) est modulée en fonction d'une image chargée dans le logiciel LEONARDO (où les paramètres de l'éclairage sont contrôlés) (4). Le motif de lumière UV est projeté via l'objectif et le PLPP activé clive localement le PEG (5) rendant le substrat adhésif pour les protéines (6). (B) schéma de la chambre de rinçage en PDMS et du stencil en PDMS utilisé pour l'incubation de l'anticorps et la protéine d'intérêt.

à 50 µg/ml pendant 3min. Après 3 rinçages en PBS, la lamelle est rincée à l'eau distillée est séchée à nouveau. La streptavidine étant fluorescente, une vérification de l'aspect et de la qualité des motifs peut être réalisée à cette étape. Un cercle de PDMS de 16 mm² est ensuite utilisé (Figure 79.B). Les lamelles sont conservées dans du PBS à 4°C. Une fois l'impression et l'incubation des premières protéines pour toutes les lamelles, l'anticorps anti Humain-Fc est incubé à 50 µg/ml pendant 10 min et après rinçage la protéine-Fc est imprimée à 50 µg/ml durant toute la nuit à 4°C dans une boîte fermée. Une heure avant le dépôt des neurones, les lamelles sont rincées trois fois avec du PBS1X, sans sécher la lamelle, et le PDMS est enlevé. Après un rinçage avec du milieu de culture, les lamelles sont disposées par quatre dans des boîtes de pétri avec du milieu conditionné.

Pour réaliser une deuxième impression protéique, il est possible de renouveler l'insolation en incubant à nouveau du PLPP et en effectuant une seconde exposition aux UV. Pour les

manipulations d'impressions multiples, nous avons travaillé avec de la Laminine-A488 (couplage maison en colonne de dessalage) et de la Laminine non fluorescente (L2020, Merck).

3.5.2 Impression sur coating homogène

Pour l'impression sur revêtement homogène adhésif, la différence est dans la préparation des lamelles. Les étapes de silanisation et de pégylation ne sont pas réalisées, à la place, la laminine fluorescente, ou non, est incubée à 25 µg/ml dans du PBS1X pendant 48h à 4°C sur les lamelles dans une boîte de pétri fermée. Les lamelles sont ensuite rincées abondamment à l'eau distillée et séchées au pistolet à air. Les étapes du protocole sont ensuite identiques à celles décrites précédemment avec juste une augmentation de la dose UV à 500 mJ/mm².

3.6 Imagerie

3.6.1 Microscopie optique

3.6.1.1 *Système optique*

Pour l'imagerie des immunomarquages, nous utilisons un microscope inversé (Nikon Eclipse TiE), équipé de plusieurs objectifs : TIRF 100x/1,49 NA à immersion a huile, Plan Fluor 40x/1.30 NA à immersion a huile et un Super Fluor 20x/0.75 NA.

L'imagerie par épifluorescence est réalisée à l'aide d'une lampe à mercure (Nikon Xcite) et de jeux de filtres appropriés (SemROCK ou Chroma) pour chaque fluorophore : Alexa 405 (Excitation : D380/60x ; Dichroïque : DM400 ; Emission : D460/50M), Alexa 488 (Excitation : FF01-472/30 ; Dichroïque : 3035B ; Emission : FF01-530/43) ; TRITC (Excitation : FF01 531-40 ; Dichroïque : T585lpxr ; Emission : ET630/75M) et Alexa647 (Excitation : FF02-628/40 ; Dichroïque : FF-660Di02; Emission: FF02-692/40). Les images sont acquises à l'aide d'une caméra EMCCD Evolve 512 (Photometrics®) et du logiciel Metamorph® (Molecular Devices).

3.6.1.2 *Immunomarquage*

Les lamelles avec les neurones ont été fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 min. Un traitement avec NH₄Cl 50mM pendant 10 min a permis de bloquer les groupements aldéhydes libres avant perméabilisation avec du PBS contenant 0,2% de Triton X-100 pendant 10 min. Une étape de blocage avec du PBS contenant 2% de sérumalbumine bovine (BSA) est réalisée pendant 1 h.

Un immunomarquage des neurones a été réalisé avec les marqueurs suivant :

- PSD-95 endogène en utilisant un anticorps monoclonal de souris anti-PSD-95 (Thermo Fischer Scientific, MA1-046, 1 :500) suivi d'un anticorps de chèvre anti-souris Alexa 488 (Sigma-Aldrich, A11001, 1 :500)
- vGLUT1 endogène en utilisant un anticorps monoclonal de cochon d'inde anti-vGLUT1 (Abcam, AB5905, 1 :1000) suivi d'un anticorps d'âne anti-cochon d'inde Alexa 647 (Sigma-Aldrich, A21450, 1 :800)

MODELE D'HEMI-SYNAPSE

- MAP2 endogène en utilisant un anticorps monoclonal de poulet anti-MAP2 (Abcam, AB5905, 1 :500) suivi d'un anticorps d'âne anti-poulet TRITC (Jackson Immunoresearch, 703-025-155, 1 :800)

Les lamelles ont ensuite été montées entre lame et lamelle dans du Fluoromount-G (15586276, Fischer scientifique) sans DAPI.

3.6.2 Microscopie Electronique

Pour la microscopie électronique à balayage et à transmission, l'étape de fixation des neurones est identique. Après 14 DIV, les neurones sont fixés dans un mix de PFA 1,6% EM grade et du glutaraldéhyde à 2% dilué dans du tampon phosphate (0.1M pH=7,4). Cette phase de fixation est suivie par trois rinçages de 5min dans du tampon phosphate (PB) 0.1M

3.6.2.1 *Microscopie électronique à balayage*

Pour cette technique, les lamelles utilisées sont des lamelles de 12 mm sans dots de parafilm pour pouvoir tenir sur les supports d'observation du microscope à balayage. Pour la microscopie à balayage, la fixation est suivie d'une déshydratation par incubation dans des degrés croissants d'éthanol (50°- 5min, 70°-5min, 95°- 5min, 100°-2*5min sur tamis moléculaire). Ensuite l'échantillon est métallisé au platine par un métalliseur QT150T 15 mA/25min. Les observations sont réalisées sur la plateforme de microscopie électronique du BIC sur le GEMININ300 de Zeiss.

3.6.2.2 *Microscopie électronique à transmission*

Pour la microscopie électronique à transmission, après la fixation, on effectue une post fixation de 1heure 30 sur glace et dans le noir, avec une solution de 1ml tétroxyde d'osmium (OsO4) à 4% et du Ferrocyanure de potassium (0.04 g) dans 3 ml de PB 0.1M. Dans le cas des essais réalisés avec de la streptavidine couplée à des billes d'or de 1.4 nm, une étape d'amplification à l'argent est effectuée en utilisant le kit « *HQ Silver enhancement* » de Nanoprobes.

Ensuite, nous procédons à l'étape de contraste en utilisant de l'acétate d'uranyle 0.5% (filtré à 0.22µm) dilué dans de l'eau, pendant 30 min à température ambiante et dans l'obscurité. Ces deux étapes sont suivies de trois lavages à l'eau de 5 minutes, à température ambiante. L'échantillon est ensuite déshydraté par incubation dans des solutions d'éthanol à concentrations croissantes (50° pendant 10min, 70°pendant 10min, 95°pendant 2 fois 15min, 100° pendant 2 fois 20min sur tamis moléculaire). Par la suite, nous procédons à une première étape d'imprégnation dans un mélange de 50% d'éthanol à 100° et 50% de résine époxy décongelée, pendant 2h à température ambiante. Pendant cette période, nous préparons de la résine époxy fraîche en vue d'une incubation de résine pure pendant la nuit (congélation à -20°C de la résine restante en 2 aliquots pour le lendemain). Le matin suivant, nous décongelons un des aliquots de résine en vue d'un changement de la résine pour une incubation de 5 heures. Après ces 5 heures d'incubation, les cellules sont incluses dans une gélule de résine, puis incubées à 60°C pendant plus de 48h. La gélule est décollée de la lamelle

en utilisant alternativement de l'eau chaude et de l'azote. Le matériel biologique d'intérêt se trouvant sur une faible épaisseur, au plus proche du bas de la cupule, pour garantir la récupération de la zone souhaitée dès la première section, l'épaisseur des coupes a été plus que doublée par rapport au protocole traditionnel, avec une épaisseur de 150 nm. Les coupes sont réalisées à une vitesse de 1mm/s au microtome équipé d'un couteau diamant et elles sont récupérées dans l'ordre sur des grilles carbonées. Les observations sont effectuées sur la plateforme de microscopie électronique du BIC en utilisant le microscope Hitachi (120kv, H7650) et le Talos (200 KV FEI F200S).

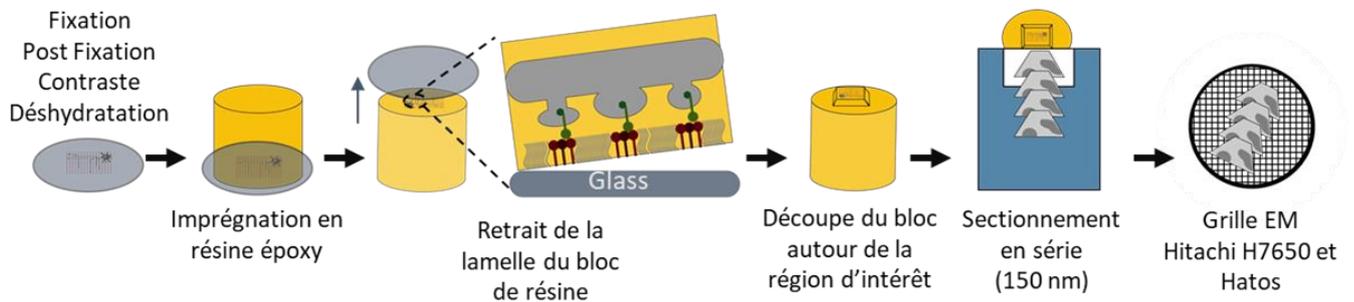


Figure 80. Protocole de préparation des coupes de neurones pour l'imagerie MET

3.7 Analyse

3.7.1 Analyse de l'enrichissement héli-synaptique

Un des avantages majeurs de l'impression protéique est la localisation des héli-synapses créées. En effet, si l'on compare avec une image de neurones en culture 2D classique (Figure 81.A), les synapses formées ne sont pas toujours orientées d'une manière qui permet de distinguer correctement la présynapse de la postsynapse. Dans notre modèle classique (Figure 81.B) un des compartiments est mimé par le motif, ce qui permet d'avoir la formation de l'héli-synapse au plus proche de la lamelle avec une orientation constante. La fluorescence du motif, la répétabilité de sa forme et de sa distribution sont des avantages pour réaliser des analyses de haut-débit.

Pour ce faire, j'ai développé une macro d'analyse ImageJ afin d'automatiser la détection et les mesures de fluorescence pour nos héli-synapses (Annexe 2). Dans ce processus analytique classique (Figure 81.C), le motif va nous permettre de venir localiser nos zones potentielles de formation d'héli-synapse. Pour cela, nous utilisons le centre de masse de chaque motif pour les localiser et ensuite venir définir une région d'intérêt (ROI) carrée autour (taille du carré = $2 \times$ diamètre du motif). Les motifs trop près du bord de l'image dont la région autour serait tronquée ne sont conservés. Ces ROIs seront ensuite transférées sur un masque réalisé en seuillant une image combinée de MAP2 et vLUGT1.

Ce masque binaire (0 ou 256) va nous permettre de pouvoir éliminer les régions sans prolongement neuronal et les régions au niveau du corps cellulaire. Pour cela, nous utilisons la moyenne d'intensité dans chaque région.

MODELE D'HEMI-SYNAPSE

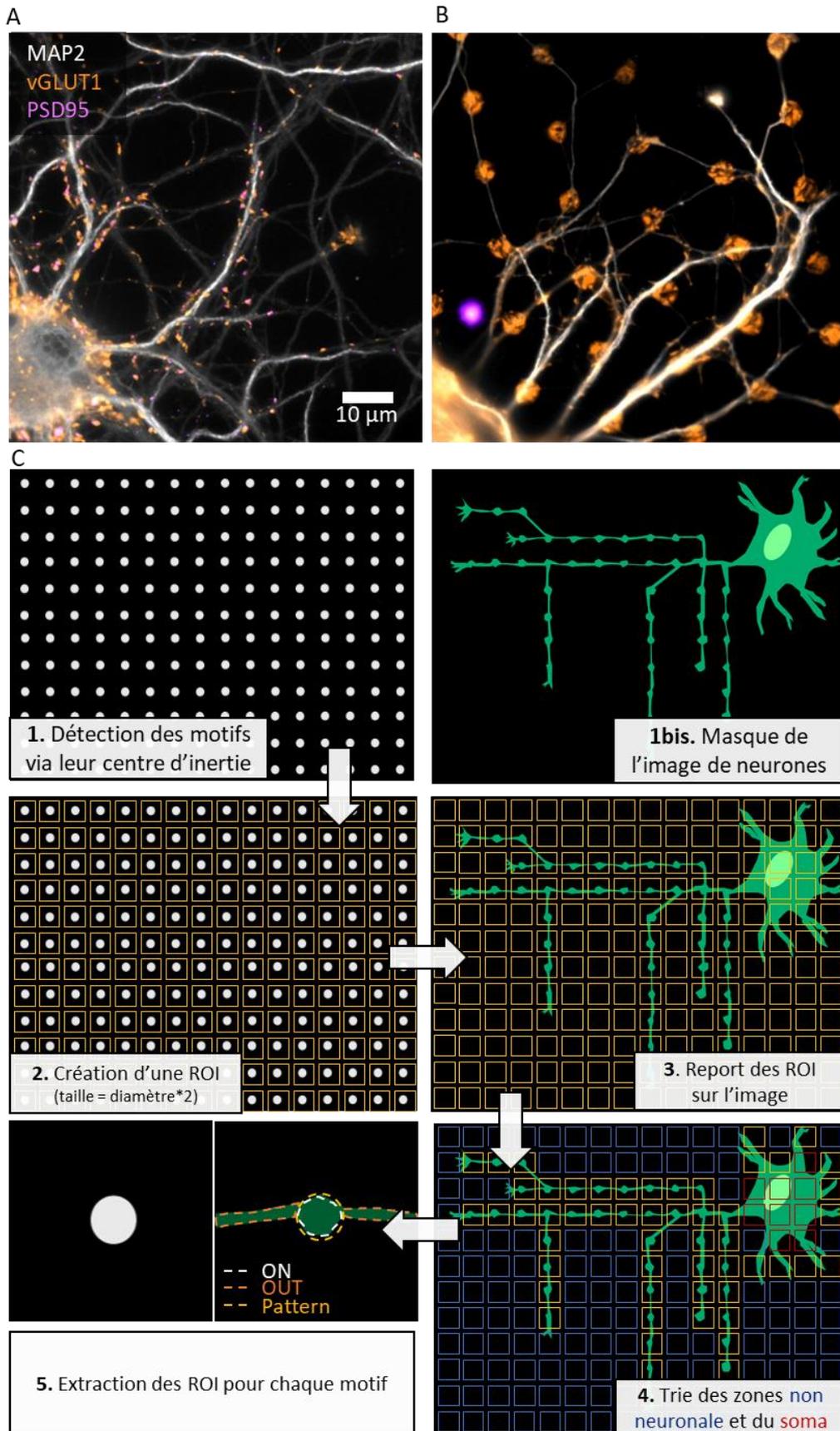


Figure 81. Analyse haut-débit des hémisynapses

En effet, le motif où la formation des héli-synapses a lieu ne représente que 20% de la surface totale de la ROI, et les prolongements, étant des structures relativement fines la surface, couvrent une surface quasiment négligeable. Donc, si la surface neuronale couvre plus de 68% de la région (soit une intensité moyenne à 175) nous avons considéré cette région comme recouverte par le corps cellulaire. Si l'intensité moyenne est inférieure à 255, c'est donc une région vide sans passage du neurone. Pour les régions où un prolongement neuronal est présent, mais en dehors du motif imprimé, nous les éliminons plus tard dans le processus d'analyse, si aucun marquage n'est détecté dans la zone de motif.

Ensuite, pour chaque fluorophore (A647, GFP, A405) correspondant à un marquage d'intérêt (vGLUT1, PSD-95, Motif), nous créons une pile d'images, correspondant aux différentes ROIs, à la suite. La pile d'image avec les motifs individuels nous permet de déterminer par seuillage une région correspondant au motif et une région opposée couvrant la surface en dehors du motif. Puis en réalisant un seuillage dans chacune de ces deux zones sur les images de PSD-95 ou de vGLUT1, nous pouvons déterminer les zones de marquage à l'intérieur du motif (ON pattern) et à l'extérieur (OUT pattern). Ce qui va nous permettre ensuite de mesurer l'intensité dans ces zones (I_{ON} et I_{OUT}) pour pouvoir mesurer l'enrichissement (E).

$$E = \frac{(I_{ON} - \text{Background})}{(I_{OUT} - \text{Background})}$$

Pour cette analyse, nous avons décidé de constituer trois conditions suivant l'enrichissement : Aucun enrichissement = $I_{ON} \leq I_{OUT}$, Faible enrichissement = $I_{ON} > I_{OUT}$ et Fort enrichissement = $I_{ON} \geq 2 \times I_{OUT}$.

Pour les mesures en mode « pluri-synapse » sur les images au 100X, pour définir les régions ON pattern et OUT pattern, nous traitons les images vGLUT1 et PSD-95 avant le seuillage avec un flou gaussien ($\sigma=5$). Ensuite, nous soustrayons cette image à l'image originale pour éliminer les bruits de fond et les niveaux de fluorescence les plus diffus et ainsi mieux isoler par seuillage les compartiments entre eux.

3.7.2 Analyse des héli-synapses et des vésicules en MET

Dans un premier temps, nous avons détournés manuellement les limites des compartiments contenant des vésicules comme représentées par les lignes roses (Figure 82). Ensuite, nous sommes venus compter (points orange) manuellement le nombre de vésicules par compartiments (Figure 82). Les vésicules synaptiques sont facilement identifiables par leur membrane sombre et leur lumière transparente aux électrons. Comme dans des articles publiés (Qu et al., 2009), les grands compartiments membranaires (astérisques noirs) n'ont pas été inclus dans la mesure. Ensuite, quinze vésicules par zone de motif, réparties entre les différents compartiments, ont été détournées en traçant à la main l'extérieur de la membrane comme représenté par les lignes rouges (Figure 82).

Pour déterminer la densité vésiculaire, nous avons mesuré l'aire des compartiments vésiculaires (lignes roses) auxquelles nous avons soustrait l'aire des mitochondries (lignes bleues) s'il y en a dans les compartiments. Pour mesurer le diamètre (d) des vésicules, nous

MODELE D'HEMI-SYNAPSE

avons considéré qu'elles sont circulaires ($d=2\sqrt{\text{aire}/\pi}$). Enfin, pour décrire la forme de ces vésicules, nous avons mesuré la circularité et la rondeur.

Circularité : $4\pi \times \text{aire} / \text{Périmètre}^2$ avec une valeur de 1,0 indiquant un cercle parfait. À mesure que la valeur s'approche de 0 elle indique une forme de plus en plus allongée. Les valeurs peuvent ne pas être valables pour les très petites particules.

Rondeur : $4 \times \text{aire} / (\pi \times \text{Axe majeur}^2)$ l'inverse du rapport hauteur/largeur.

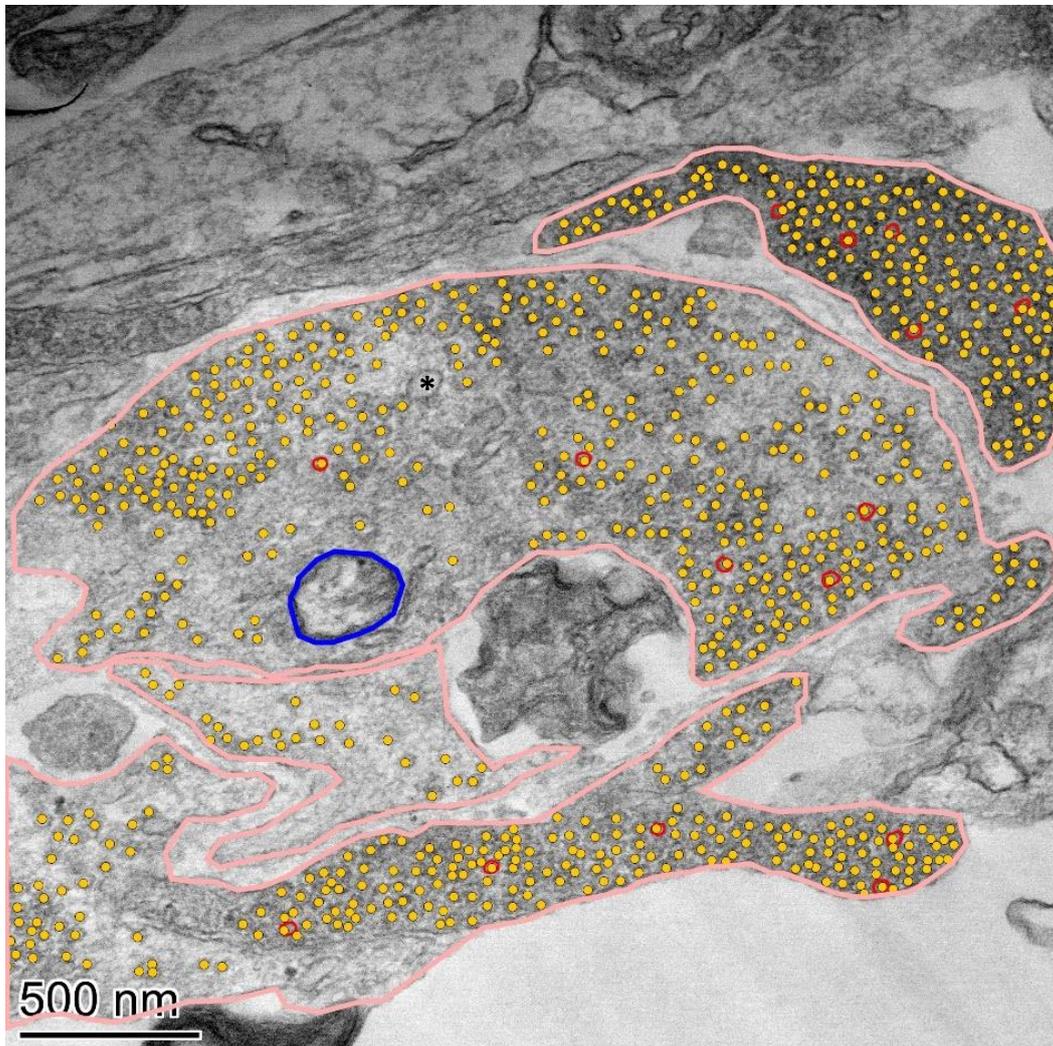


Figure 82. Analyse manuelle des vésicules sur les images de MET d'hémi-synapse

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Bien que de nombreux modèles et techniques permettent d'étudier les interactions protéine-protéine et comprendre le rôle de ces interactions dans la connectivité synaptique, il reste énormément à découvrir sur la compréhension détaillée du rôle de ces interactions dans l'initiation ou la plasticité synaptique. Dans ce projet de thèse, nous avons démontré que l'impression protéique subcellulaire couplée à différentes techniques de microscopie permet d'acquérir de nouvelles connaissances dans ce domaine. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles : un modèle biomimétique avec des cellules hétérologues exprimant une protéine transmembranaire synaptique, et un deuxième modèle, dit d'hémi-synapse, utilisant des neurones hippocampiques primaires, le tout disposé sur des impressions de protéines synaptiques.

Grâce à notre premier modèle, nous avons ainsi mis en évidence, par l'utilisation du FRAP et du sptPALM, que l'interaction homophile de SynCAM1, ayant un rôle dans la morphologie synaptique, est très labile. En revanche, l'interaction Neurologine1/Neurexine1 β est très stable en raison de la forme dimérique de Neurologine1, et cette interaction prolongée est indispensable pour la fonctionnalité de la synapse. De plus, nous avons démontré, en utilisant un mutant de PSD-95, que l'interaction entre Neurologine1 et la protéine intracellulaire PSD-95 peut se faire via les trois domaines PDZ de PSD-95 avec le domaine C-terminale de Neurologine1, mais avec des affinités différentes.

A l'aide du second modèle, nous avons démontré par microscopie photonique et électronique la capacité de former, via LRRTM2, des hémi-présynapses recrutant un marqueur présynaptique ainsi que des vésicules synaptiques, le tout accompagné d'une activité calcique spontanée. De plus, nous avons constaté que la formation de postsynapses par l'impression de Neurexine1 β n'est pas aussi simple que décrite dans littérature, suggérant des biais dans les modèles hémi-synaptiques utilisés avant l'impression protéique. Cette observation nous a amené à formuler l'hypothèse que la postsynapse pourrait être le compartiment initiateur de la synaptogenèse.

I Dissection des interactions protéine-protéine

Avec ce projet nous avons répondu à un besoin de modèle intermédiaire permettant de caractériser des interactions protéine-protéine spécifiques et individuelles dans un environnement membranaire. Pour cela, nous avons couplé l'impression protéique avec des techniques et analyses de sptPALM et de FRAP afin de proposer un modèle intermédiaire entre le SPR et des mesures *in cellulo* dans les synapses. En utilisant ce modèle biomimétique, nous avons pu disséquer les mécanismes d'interaction des couples protéiques hétérophilique Neurexine/Neurologine et homophile SynCAM.

Du point de vue de notre étude, le modèle proposé dans le cadre de cette thèse ne vise pas à remplacer les mesures de SPR ou les mesure *in cellulo*. Cependant, complémentaire et aide à comprendre les divergences de mesure observées entre ces deux techniques. Il constitue ainsi un maillon d'informations supplémentaires dans la caractérisation de la cinétique

d'interaction. En effet, ce modèle permet d'évaluer l'impact de la membrane sur les interactions et offre la possibilité de contrôler les protéines présentes pour comprendre le rôle et l'impact de chaque partenaire ou compétiteur.

La composante analytique du FRAP, principalement, mais aussi du SPT, revêt une importance capitale pour extraire des informations réelles des mesures effectuées. Cependant, en raison de la complexité de ces analyses, il est recommandé, pour les non-initiés à la biophysique, d'avoir des connaissances préalables sur l'interaction étudiée, que ce soit au niveau structural ou cinétique, afin de s'orienter correctement. C'est pourquoi cette technique est complémentaire et ne peut se suffire à elle-même, comme toutes les techniques d'étude des interactions protéiques.

L'utilisation de l'impression subcellulaire pour étudier les interactions protéine-protéine est encore à un stade précoce de son développement et de son utilisation. Affirmer que l'environnement proposé par impression protéique mime parfaitement la complexité physiologique est difficile. Des essais et analyses supplémentaires sont nécessaires. Quelques articles tentent, par des simulations, de comprendre l'impact de l'immobilisation protéique par impressions (Arnold et al., 2016, 2020) sur la diffusion et l'interaction, mais les données et les connaissances sur le sujet doivent encore s'étoffer et ce travail de thèse contribue à cet enrichissement.

Pour se rapprocher davantage de l'environnement physiologique de la synapse, une perspective vraiment intéressante serait d'imprimer des membranes lipidiques fluides contenant la protéine synaptique d'intérêt. Récemment, des articles utilisant le *micropatterning* de membrane lipidiques (Z. Chen et al., 2021; Colin et al., 2023) ont émergé. Un de ces articles a permis de comparer l'impression classique avec des protéines immobiles de l'impression de membrane, permettant aux protéines d'intérêt d'avoir une mobilité et une diffusion sur les motifs. Cela a révélé le rôle de la formation de clusters dans l'efficacité des voies de signalisation induites par les récepteurs Ephrine (Z. Chen et al., 2021). Dans le contexte de l'interaction Neurologine/Neurexine la formation de clusters Neurexine est connue pour avoir un rôle important (Shipman & Nicoll, 2012), expliquant ainsi l'impact significatif de la dimérisation de la Neurologine sur la cinétique d'interaction. Pouvoir étudier la formation des clusters et leurs caractéristiques permettrait d'ajouter une dimension supplémentaire à notre modèle. Surtout que la formation de cluster est quelque chose de relativement présent et important au niveau synaptique, avec pour exemple la formation des nano-colonnes trans-synaptiques, ayant un rôle dans l'efficacité synaptique (Biederer et al., 2017; Tang et al., 2016).

II Hémi-synapse et induction synaptique médié par la présynapse

L'impression protéique permet de surpasser les modèles classiques, d'hémi-synapse, en permettant le suivi de la formation des synapses au fil du temps, avec une capacité de criblage importante en termes de quantité d'hémi-présynapses formées et d'analyse. De plus, comparée aux techniques classiques de formation d'hémi-synapse, qui pour la plupart

utilisent un compartiment artificiel phagocyté par les cellules, nous avons démontré que nos motifs protéiques restent stables sur de longues périodes.

Ce modèle nous a permis de former des hémi-présynapses qui se développent, en termes de marqueurs synaptiques, de manière similaire aux synapses natives. Par microscopie électronique, nous avons observé la présence de nombreuses vésicules présentant des caractéristiques similaires à celles retrouvées dans les synapses hippocampiques. De plus, nous avons détecté, par imagerie en direct, une activité calcique qui pourrait indiquer une activité synaptique, hypothèse renforcée par la présence de mitochondries dans les hémi-présynapses (Ly & Verstreken, 2006).

Concernant la formation d'hémi-postsynapses, nous n'avons pas réussi avec des impressions de Neurexine1 β à obtenir le recrutement de marqueurs postsynaptiques, et nous avons même rencontré des difficultés pour obtenir l'adhésion des neurones. À la lumière de ces résultats et d'une étude approfondie de la littérature, nous avons émis l'hypothèse que la présence d'une présynapse mature est indispensable pour avoir la formation de postsynapse. Cette hypothèse est également soutenue par d'autres travaux, par exemple, la formation d'épines dendritiques induites dans le cortex par la libération de neurotransmetteurs indiquant que le relargage de neurotransmetteurs par des présynapses induit un assemblage des postsynapses, et potentiellement leur spécialisation en synapse excitatrice ou inhibitrice selon le neurotransmetteur relargué (Kwon & Sabatini, 2011; Oh et al., 2016). À l'opposé, l'induction de la formation de présynapses par des éléments non synaptiques tels que la polylysine (Burry, 1982) démontre la simplicité à former des présynapses. De plus, il est intéressant de noter que c'est la Neurologine, et donc le compartiment postsynaptique, qui est régulé par la présence de la protéine MDGA (Elegheert et al., 2017), bloquant les sites d'interactions de Neurologine1 avec la Neurexine. Je trouve cela intéressant que dans notre modèle nous ne parvenons pas à induire la formation de postsynapses avec Neurexine1 β . En effet, l'une des critiques du professeur Südhof (Südhof, 2018), suggérait que de nombreuses protéines sont décrites comme capables d'induire la formation de pré ou de postsynapses artificielles (Südhof, 2018), remettant en question la véracité des résultats obtenus par les méthodes de formation d'hémi-synapse. Il serait donc intéressant de tester davantage de protéines avec notre méthode et de déterminer si notre modèle est plus spécifique.

Concernant les hémi-présynapses, il reste un énorme potentiel à explorer autour de ce modèle, pour confirmer que ces hémi-synapses sont physiologiquement pertinentes et pour pousser l'étude du développement et de la connectivité synaptique. Pour approfondir l'analyse de l'activité synaptique, il serait intéressant d'étudier le relargage des vésicules présentes dans nos structures hémi-synaptiques. Pour cela, j'ai initié une collaboration avec l'équipe de David Perrais, à l'IINS, pour étudier les différentes phases de relargage vésiculaires (Rizzoli & Betz, 2005) en utilisant des protocoles basés sur l'utilisation de fluorophores sensibles au pH (Sposini et al., 2020). Dans notre modèle, l'orientation ventrale des hémi-présynapses, avec la zone de relargage au plus près de la membrane, facilite grandement l'acquisition des événements de libération vésiculaire.

En ce qui concerne l'étude des vésicules, nos observations et analyses en microscopie électronique sont pour le moment approximatives car la localisation des motifs protéiques

ne peut être réalisée précisément. Pour ce faire, il est nécessaire d'utiliser la corrélation entre de la microscopie optique et électronique (CLEM) (Van Rijnsoever et al., 2008). Le CLEM, offrirait également la possibilité de corréler le nombre de vésicules ou d'autres structures avec l'enrichissement de vGLUT1 ou d'autres marqueurs fluorescent. En termes d'analyse, il existe maintenant des logiciels (ex : Ilastik) basés sur l'intelligence artificielle et l'apprentissage profond (*Deep Learning* en anglais) qui permettent d'identifier automatiquement les différentes structures. Cela évite de biaiser les caractéristiques des vésicules via des analyses manuelles et d'augmenter le nombre de mesure possible.

Nous avons observé qu'il était possible d'imposer à la présynapse différentes formes et tailles en fonction de la géométrie du motif imprimé. Lors d'événements de plasticité synaptique, tels que la LTD et LTP, des synapses peuvent apparaître, disparaître ou changer de taille et de morphologie. L'étude de la réponse de nos héli-présynapses à des protocoles mimant ces effets, permettrait de valider la physiologie de nos synapses induites.

Concernant l'étude de l'interactome induit par la protéine imprimée, nous n'avons pour le moment pas développé énormément cet aspect. Cependant, nous avons des idées d'expérimentations qui pourraient nous permettre d'étudier les protéines recrutées au cours du développement de nos héli-synapses. La localisation précise de nos héli-synapses sur les motifs permettrait de récupérer par dissection laser (Cahill et al., 2016) de nombreuses héli-synapses afin d'étudier par spectrométrie de masse les protéines recrutées au cours du développement. Cela permettrait des avancées sur la compréhension de la formation des synapses et de leur maturation, mais également d'identifier potentiellement des interacteurs inconnus.

En plus de l'étude de la synaptogenèse, la formation de présynapses peut également être utilisée pour étudier la nano-organisation de certains composants synaptiques. Par exemple, une étude récente utilise des billes recouvertes de polylysine pour étudier le cytosquelette d'actine au sein de présynapses artificielles par microscopie de super-résolution (Bingham et al., s. d.). L'utilisation d'héli-synapses est essentielle pour cette application car dans les cultures classique la forte densité d'actine postsynaptique masque l'actine présynaptique, rendant impossible l'analyse de sa structure. En utilisant l'impression protéique pour induire les présynapses, nous faciliterions davantage l'analyse de l'organisation de l'actine en ayant une orientation constante de la présynapse artificielle créée.

Des premiers essais de super résolution sur nos héli-présynapses sont en cours au sein de l'équipe pour observer le réseau d'actine (Figure 83.A), mais également la présence de nano-colonne afin de valider que la nano-organisation de nos héli-synapses soit physiologique. Au sein de notre modèle, il n'y a pas que les héli-synapses qui sont intéressantes ; en effet, nous nous sommes aperçus que nous réussissons à obtenir, entre nos motifs, des axones isolés, ce qui n'est pas si simple en culture classique. L'organisation du réseau d'actine en anneau dans les axones (K. Xu et al., 2013) est un exemple de structure dont l'étude est facilité par la présence d'axone isolés. Nous avons d'ailleurs montré que nous arrivons à observer ces anneaux au sein de nos neurones adhésés sur nos motifs (Figure 83.B).

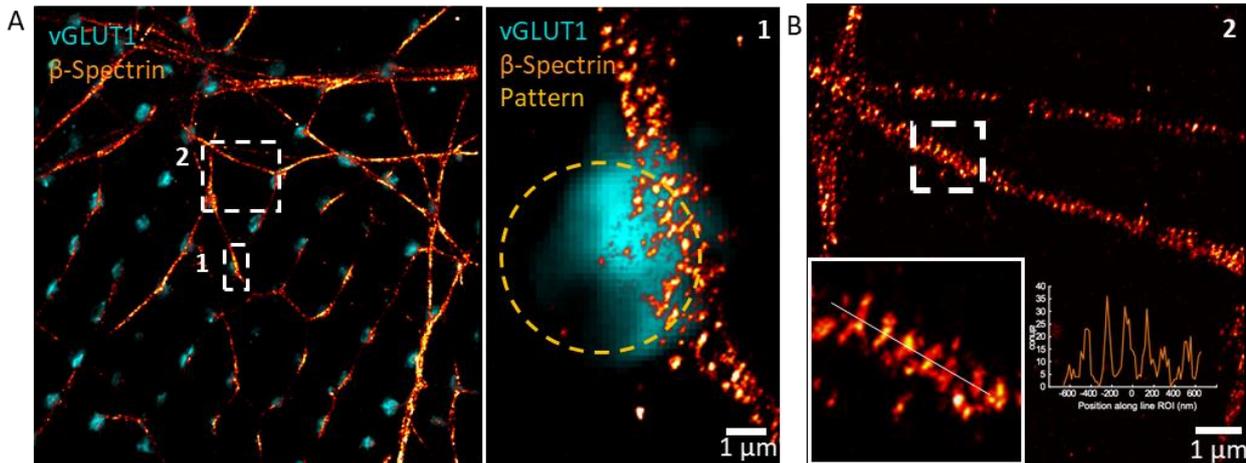


Figure 83. Image du réseau d'actine par STORM sur des neurones adhérents sur des micro-motifs

(A) Imagerie de la β-spectrine par STORM et vGLUT1 par épifluorescence (100X) dans des neurones adhérents sur des micro-motifs de LRRM2-Fc (1) gros plan sur l'architecture du cytosquelette au niveau d'une hémi-présynapse. (B) Imagerie des anneaux d'actine par STORM. Détection de molécules uniques à partir du balayage linéaire, montrant la périodicité des anneaux d'actine à l'intérieur des axones le long de la ligne

Un aspect intéressant des résultats que nous avons obtenus est la formation de complexes tripartites entre un motif protéique mimant une postsynapse, une hémi-présynapse et une postsynapse native. Si notre hypothèse selon laquelle une présynapse mature est indispensable à la formation d'une postsynapse est vraie, ce résultat suggère que nos hémi-synapses sont suffisamment matures pour induire la formation d'une postsynapse. De plus, l'activité calcique est beaucoup plus forte dans ces complexes tripartites. Nous avons comparé ce complexe à la présence des cellules gliales au niveau synaptique, qui interagissent avec les compartiments synaptiques via des protéines d'adhésion synaptique et augmentent l'efficacité synaptique. L'étude de la synapse tripartite et des interactions protéiques qui la médient peut également être envisagée avec notre modèle en cultivant directement des cellules gliales. Nous avons d'ailleurs remarqué que sur les motifs de Neurexine, les cellules gliales prolifèrent très bien, et on sait qu'elles expriment au niveau membranaire Neuroligine (Tan & Eroglu, 2021).

Enfin, nous envisageons de substituer les neurones primaires de rongeurs par des neurones humains dérivés de cellules pluripotentes induites (iPSCs) (Takahashi & Yamanaka, 2006). Des essais avec des neurones dérivés d'iPSC sur des impressions protéiques ont déjà démontré la faisabilité de création de réseaux neuronaux sur ce type de substrats (Burbulla et al., 2016). Cette perspective trouve sa première raison dans l'inévitable diminution à venir de l'expérimentation animale dans les années à venir. Il est donc crucial de montrer la comptabilité de nos modèles avec des solutions alternatives. De manière principale, travailler avec des cellules humaines nous offrirait la possibilité d'utiliser des neurones issus de patients atteints de maladies neurodégénératives. Cette approche comparative, entre les neurones provenant de patients sains et ceux atteints de pathologies, pourrait permettre d'identifier les étapes spécifiques de la formation des synapses ou de la nano-organisation qui sont impactées dans ces conditions pathologiques.

III Impact industriel

Du point de vue technologique, la superposition de plusieurs couches de protéines sur le substrat, à savoir de la BSA-biotine, suivie de la streptavidine et d'anticorps anti-Fc biotinylés pour capturer les ligands marqués Fc, a été cruciale pour amplifier et orienter la protéine d'intérêt. Sans cette chaîne d'amplification, aucun effet de la protéine synaptique n'est observable en PLPP liquide. La spécificité de reconnaissance du ligand étiqueté Fc et la saturation induite par la BSA permettent de travailler avec des protéines non purifiées. Cette chaîne d'amplification sera transmise aux utilisateurs de PRIMO intéressés par l'étude des interactions protéine-protéine.

De plus, nous avons caractérisé un nouveau photo-initiateur proposé par Alvéole, le PLPP gel, permettant de réduire d'environ 60 fois la dose d'UV nécessaire pour imprimer les protéines. Ce protocole représente une avancée significative en termes de vitesse d'impression surfacique pour une modalité d'impression sans masque et sans contact.

Cela ouvre de nombreuses perspectives en matière de criblage, bien que des améliorations soient encore nécessaires pour imprimer sur des supports de type 94 puits. En effet, même si l'utilisation du PLPP gel accélère le temps d'impression, il entraîne d'autres contraintes que le PLPP liquide n'avait pas, comme la rétraction du gel du substrat au bout de quelques heures, par exemple. Nous avons démontré, au cours de la caractérisation du PLPP gel, que la réaction de clivage n'induit pas les mêmes effets, puisque la chaîne d'amplification n'est plus nécessaire. Cela peut être dû soit à une réaction plus efficace, soit à une réaction complètement différente. Afin d'approfondir nos connaissances à ce sujet, nous pensons qu'il est nécessaire de réaliser des mesures d'AFM, sur des impressions en PLPP gel, comme cela a été fait précédemment en PLPP liquide (Strale et al., 2016), pour pouvoir comparer les deux impressions.

L'utilisation du PLPP gel nous a permis de développer un protocole permettant d'imprimer rapidement des surfaces suffisamment denses pour maintenir en culture des neurones hippocampiques de rat selon le protocole de culture en Banker, souvent utilisé par les neuroscientifiques. Ce protocole a été documenté dans une note d'application destinée aux clients d'Alvéole intéressés à maintenir des neurones en culture sur le long terme sur micro-impressions (Annexe 3).

En raison de l'inutilité de la chaîne d'amplification en PLPP gel pour obtenir une interaction, nous rencontrons des difficultés à transposer nos protocoles d'impressions de plusieurs protéines établis en PLPP liquide. Cependant, cela nous a permis de revisiter un ancien projet d'impression sur revêtement adhésif qui demande une dose UV trop importante lors de l'utilisation du PLPP liquide. La réaction étant plus efficace avec le PLPP gel, ce protocole devient envisageable, permettant d'imprimer directement sur une couche adhésive plutôt que sur du PEG. Même si, pour le moment, nous n'avons pas réussi à conserver les propriétés adhésives de la protéine utilisée à la place du PEG, nous avons démontré qu'il était possible d'imprimer des protéines sur ce revêtement, et d'avoir une interaction spécifique. Ce protocole doit continuer à être optimisé car la pégylation est une étape longue, fastidieuse et critique du protocole d'impression. Les difficultés à réaliser des impressions de qualité sont

souvent liés à des défauts de pégylation. Proposer un protocole accessible serait donc une réelle plus-value pour conquérir de nouvelle part de marché pour Alvéole.

Le développement d'un modèle de compétition basé sur l'impression de deux protéines synaptiques est aussi une perspective industrielle, qui mérite d'être reprise suite à ce projet. En effet, il existe peu de modèles permettant d'étudier les compétitions protéiques pour les protéines transmembranaires. Le seul facteur bloquant le développement d'une solution basée sur l'impression protéique, pour le moment, est le développement d'une seconde chaîne d'amplification basée sur une étiquette différente du fragment cristallisable. En collaborant avec des chimistes confirmés ou des sociétés spécialisées dans le domaine nous pourrions certainement obtenir une solution qui pourraient être vendue, sous forme de kit contenant l'ensemble des protéines nécessaire pour les deux chaînes d'amplification, par Alvéole.

Concernant les capacités techniques de PRIMO, nous avons utilisé la capacité d'impression quantitative, qui est une des modalités dans lesquelles les impressions sans contact et sans masque sont les plus performantes. Nous avons montré qu'il était possible, au sein d'une même cellule et donc sans variation inter-cellule, de faire varier la quantité de récepteur accumulé en fonction de la densité de protéines imprimées. Ce qui ouvre de nombreuses possibilités sur des mesures d'affinités. Enfin, étant donné la nécessité d'avoir des motifs de taille submicrométrique en microscopie électronique nous avons amélioré la résolution d'impression de la plateforme PRIMO en améliorant le traitement d'image du logiciel Leonardo dédié à la plateforme. Cette nouveauté sera implémentée dans la prochaine version qui sera disponible pour les utilisateurs.

L'ensemble de ce travail de thèse et les publications qui en découleront permettront à Alvéole de prospecter auprès des chercheurs dans le domaine des neurosciences, en leur démontrant les potentialités de l'impression protéique dans ce domaine.

ANNEXES

Annexe 1. Macro d'analyse de l'enrichissement



<https://github.com/AlieNorsk/Enrichment-Pattern-Cell-line>

Annexe 2. Macro d'analyse des hémi-synapses



<https://github.com/AlieNorsk/Enrichment-Neuron-Paterned>

Annexe 3. Note d'application Alvéole "Micropatterning of primary neurons with PRIMO"

APPLICATION NOTE

Micropatterning of primary neurons with PRIMONathalie Piette^{1,2*}, Louise Bonnemay^{1*}, Olivier Thoumine³, Vincent Studer²

November 2022

¹Alvéole, Paris, France²Organ-izing the cells, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, Bordeaux, France³Cell adhesion molecules in synapse assembly, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, Bordeaux, France

*louise.bonnemay@alveolelab.com

*nathalie.piette@alveolelab.com

Abstract

Micropatterning of neurons allows studying many neuronal behaviors, such as network formation, guidance, synaptogenesis, but also neuronal organization and nanostructure. However, the culture of neurons on micropatterns is complex because primary neurons are relatively difficult to maintain in culture on atypical substrates. In this application note, we propose an accessible protocol for neuroscientists to obtain large surfaces of patterned neurons which are sufficiently resistant to be maintained in culture during weeks and to be adapted to many experiments.

Introduction

Micropatterning is the controlled deposition of biomolecules at the micrometer scale which aims at reproducing or controlling the cell biochemical microenvironment with specific topography. Up to now, the two most commonly used micropatterning approaches are deep UV photolithography through masks and microcontact printing using elastomers stamps (1). However, these approaches do not fulfill the requirements for pattern shape flexibility, multi-substrates compatibility and alignment capability. Yet, such properties would be useful to study neurons that are cells with highly complex morphologies. PRIMO is an optical system allowing users to project any patterns of UV-light through the objective of a conventional inverted microscope. The UV-light, shaped on demand, can be used for multiple purposes: micropatterning of biomolecules (2), photolithography of UV-sensitive resists or precise photopolymerization of hydrogels (3).

In neuroscience, micropatterning has been used to study many different mechanisms at different scales. For example, some researchers tried to create neuronal networks (4) for pharmaceutical applications, or use micropatterning at the cellular scale to control neuronal guidance or growth (5). More recently, some researchers focused on subcellular structures with the study of growth cone motility (6) and synapse formation (7). In all these applications, the main challenge for neuroscientists is to get a wide access to a protocol detailing how to maintain neurons on micropatterns during weeks of culture. Actually, cultivating neurons is not trivial as they are very sensitive to stress, especially on small micropatterned areas where their adhesion is limited. In this application note, we proposed a full protocol using micropatterning for neurobiology assays. This protocol is based on one of the most common protocols used to culture primary hippocampal neurons: the Banker culture (8).

Protocol**Setup description**

The Primo optical module is docked on an inverted microscope (Figure 1). It allows a widefield spatially modulated UV-light illumination thanks to a Digital Micromirror Device (DMD). The expanded beam of a UV laser (375 nm) is modulated according to an image previously designed and loaded into the Leonardo software which then activates the DMD. The corresponding UV micropattern is then reflected by a dichroic mirror placed in the filter turret of the microscope and passes through an objective before reaching the sample. One major advantage of this maskless and contactless photopatterning setup is that any grayscale .pdf, .tif or .png file can be loaded into the Leonardo software and turned into the corresponding micropatterned geometry.

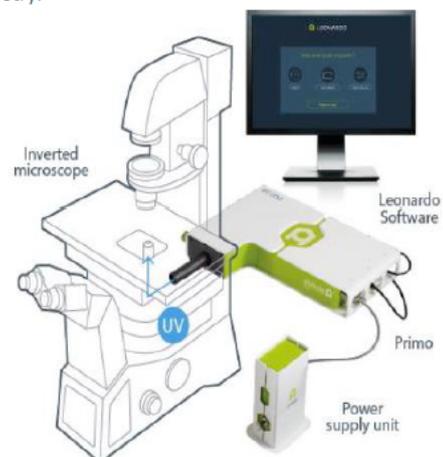


Figure 1 : PRIMO system is dock on an inverted microscope

PLPP gel micropatterning

The micropatterning of biomolecules with PRIMO is based on the LIMAP technology (2) and relies on the combination of structured UV-light and a specific photo-initiator (PLPP). We have developed and patented a new photo-initiator (PLPP Gel) that we used for these experiments. The main advantage of this photo-initiator is the patterning speed which is up to 30 times faster than PLPP. This allows us to make a larger patterned region for the neurons as it is essential for them to have a large spreading area. The micropatterning of grid shapes requires different steps explained above (Figure 2A).

Passivation

We used 18 mm coverslip cleaned with wax dots. Coverslips were plasma cleaned for 5 min in an atmospheric plasma cleaner (Harrick Plasma, Ithaca, NY, USA). The coverslips were then placed in a closed chamber with 3 Eppendorf caps filled with 100 μ l of (3-aminopropyl) triethoxysilane (Sigma-Aldrich) for 1 hr. Then, 150 μ l of mPEG-SVA (5Kda) dissolved at 100 mg/ml in carbonate buffer (10 mM, pH 8) was incubated by coverslip for 1 hr. The m-PEG is grafted to the silane by reaction between the SVA function and an amine, making the grid repulsive to cells and proteins (Figure 2.A2). The coverslip was washed profusely with mQ water and dried quickly with nitrogen or an air gun.

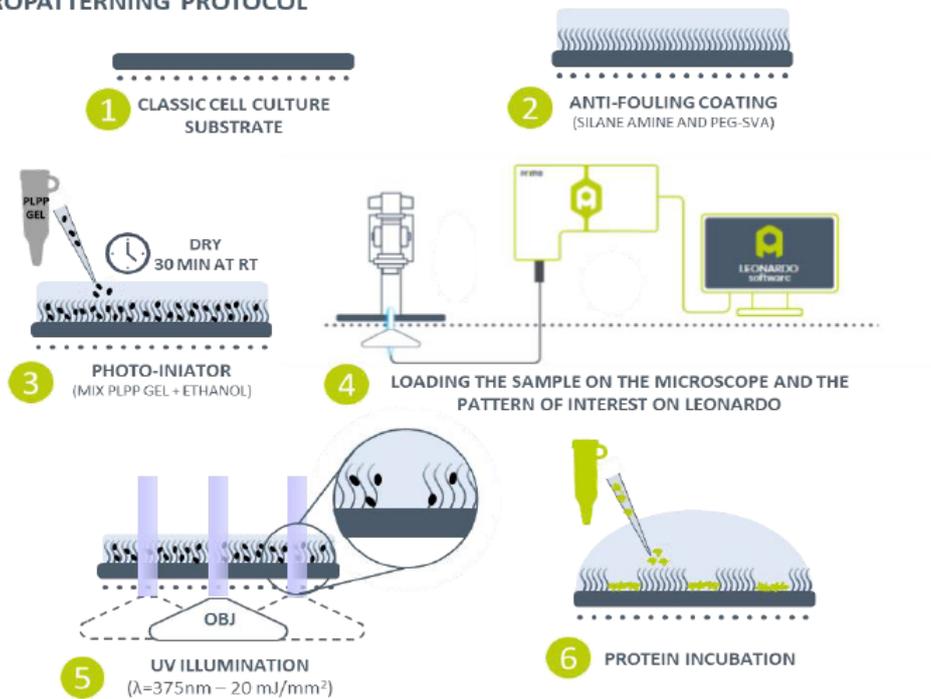
Patterning

A mix of 33 μ l of absolute ethanol and 2 μ l of PLPP gel was deposited on each coverslip, and let dry for 30 min at room temperature. Then, a transparent photo-initiator gel forms into the wells (Figure 2.A3). When the gel has completely dried out, the coverslip is ready to be patterned and is placed on the microscope. The pattern design is loaded into the Leonardo software (Figure 2.A4). The patterning is done using the PRIMO with a 375 nm UV light source. The micropatterns are projected with a UV dose of 20 mJ/mm². Depending on the adsorption of the patterned protein, the dose can be increased up to 50 mJ/mm². The combined action of UV light and PLPP Gel locally degrades the PEG anti-fouling coating by photo-scission (Figure 2.A5).

Protein incubation

After rinsing profusely with mQ water, the coverslip is quickly dried with nitrogen or an air gun. To correctly incubate and rinse the first protein, we used a PDMS flow chamber stencil (Figure 3A, PDMS stencil, Alvéole, France). The PDMS stencil is sandwiched between two plastic layers. To use it, we removed one of the plastic layers as well as the PDMS at the center of the flow chamber. The coverslip was flipped onto the PDMS chamber (wax dots between the plastic and the coverslip) while making sure to keep the entrance channels

A. MICROPATTERNING PROTOCOL



B. CULTURE PROTOCOL

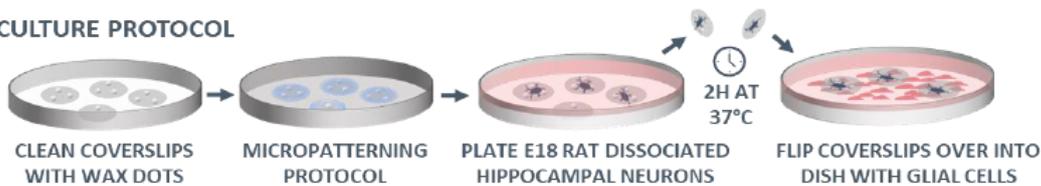


Figure 2. (A) 1. On classic coverslip 2. a PEG coating is performed to create a dense antifouling brush. 3. A solution of photo-initiator (PLPP gel) is added. 4. The UV-light (375 nm) is modulated according to an image loaded into LEONARDO software (where the parameters of the illumination are controlled). 5. A pattern of UV light is projected and the activated PLPP locally cleaves the PEG 6. making the substrate adhesive for proteins. (B) Micropatterning replaced classical coating done in conventional primary hippocampal neurons culture in Banker. Neurons are plated on patterned substrates and then the coverslips are flipped over into dish with glial cells

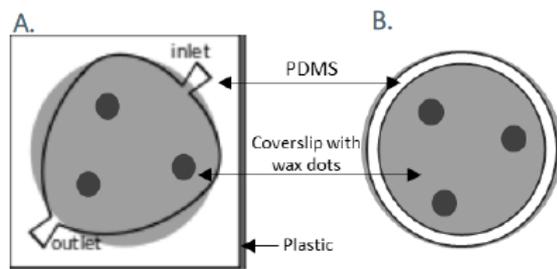


Figure 3. PDMS flow chamber stencil and PDMS for protein incubation

free of access. The liquid was added in the entrance located on the larger side of the chamber (inlet). We used a Kimtech paper on the outlet to flow the liquid while paying attention not to dewet the system. We rehydrated the slide with PBS for a few minutes. We incubated 90 μ l of protein and rinsed 3 times with PBS. For neuron micropatterning, different kinds of proteins can be used depending on the project. Proteins from the extracellular matrix (ECM) like Laminin can be directly incubated at a concentration around 25 μ g/ml. In most of the examples shown in this application note, we worked with recombinant synaptic adhesion proteins fused to an Fc-tag (15-50 μ g/ml). These proteins can then be specifically anchored to a micropattern coated with an anti-Fc antibody conjugated to a fluorophore (7) or by using multiple layers based on the streptavidin-biotin interaction before the antibody (9). The different layers are incubated for a few minutes at concentrations between 50-100 μ g/ml. The Fc-tagged protein is the only one incubated overnight at 4°C in a closed dish. The PDMS flow chamber is important at least for the first layer incubation and for the rinsing steps. It is mandatory for multi-protein micropatterning. But the other rinsing steps can be done with a simpler model of PDMS stencils such as a PDMS circle around the coverslip (Figure 3B). However, this design allows one to reduce the amount of proteins and to prevent liquid overflow during rinsing steps.

Multi-protein micropatterning

As shown in the original LIMAP protocol (2), the photopatterning protocol can be repeated several times to anchor different proteins of interest at different locations. With the PRIMO system, multi-protein patterning is facilitated by the Leonardo software, which allows easy alignment of the different geometries.

After the first pattern illumination, two choices are possible

for printing the second pattern. The first option is to dry the coverslip again and make a new PLPP gel layer and then repeat the protocol described below. However, the drying process and the use of ethanol with the PLPP gel can have an impact on certain fragile proteins. The second option is to print with the classic PLPP (in liquid form) which requires the use of a UV dose between 300 and 600 mJ/mm². An example of double micropatterning performed with the PLPP gel protocol shows that a low level of cross-contamination can occur between the first pattern of BSA-biotin + Streptavidin-Alexa647 and the second pattern of Laminin-Alexa488 (Figure 4.A).

Neurons seeding and culture

In Banker cultures, neurons normally grow on a homogeneous polylysine coating. Here, we replace this coating by micropatterns of adhesion proteins.

Seeding and culture

Before the seeding of the neurons, we rinsed the coverslips 3 times with PBS and one time with culture medium from glial cells (hereafter named conditioned medium). We placed the coverslips onto 60-mm dish with conditioned medium 30 min before seeding to equilibrate the substrate.

Dissociated hippocampal neurons from E18 Sprague-Dawley rat embryos of either sex were prepared as described (8). Cells were plated at a density of 3,000 cells by mm² of patterned surface by coverslip, on a dish with conditioned medium, and cultured at 37°C and 5% CO₂. Two hours after plating, coverslips were flipped onto 60-mm dishes containing a glial cell layer (Figure 2.B). 2 μ M Ara-C was added after 72 hrs.

Medium and astrocyte layers preparation

Neuron cultures were maintained in Neurobasal Plus medium (without red phenol) supplemented with 0.5 mM GlutaMAX and 1X B-27 Plus supplement (Thermo Fischer Scientific), 100 units mL⁻¹ penicillin, 100 μ g.mL⁻¹ streptomycin.

Astrocytes feeder layers were prepared from the same embryos, plated between 20,000 to 40,000 cells per 60-mm dish (according to the Horse Serum batch used) and cultured in MEM (Thermo Fisher Scientific) containing 4.5 g.l⁻¹ Glucose, 2mM GlutaMAX and 10% horse serum heat inactivated (Thermo Fischer Scientific) for 14 days. Four days before dissection and seeding, the medium in the glial dish is

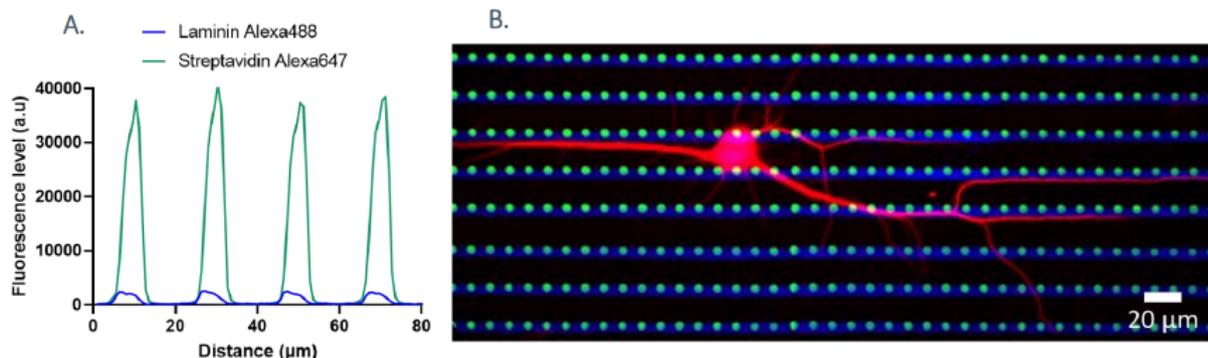


Figure 4. (A) Graph showing the fluorescence intensity levels for laminin-Alexa488 (Blue) and streptavidin-Alexa647 (Green) across a vertical line scan made through the micropatterns (B) DIV14 Hippocampal neuron labelling with MAP2 (red) on laminin-Alexa488 (line) and streptavidin-Alexa647 (Dots) micropattern substrates.

replaced with complete Neurobasal medium which gives conditioned medium after glial cells nutrients release.

Transfection

Calcium-phosphate transfection is a method based on the formation of calcium phosphate-DNA precipitates to facilitate the entry of the DNA into the cells via endocytosis (10). This protocol can be used with neuronal cultures (11).

We advise to use calcium phosphate transfection instead of other methods such as electroporation. Actually, the electroporation has to be done just before seeding the cells on the substrates, and it is quite stressful for the neurons. So, for increased neurons adhesion on patterned substrates, we prefer calcium phosphate transfection, done 7 days after seeding.

Protocol

Neurons were transfected at DIV 7 using 0.5-1 µg of DNA plasmids. Prior to transfection, 2 mL of the appropriate equilibrated media was added to each dish. The combination of different plasmids was diluted in TE buffer (1M Tris-HCl pH 7.5, 250 mM EDTA), then CaCl₂ (2.5 M CaCl₂ in 10 mM HEPES - pH 7.2) was added drop-wise to form the precipitates and this solution was transferred to the HEB solution (2xHEPES-buffered saline: 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.4 mM Na₂HPO₄, 12 mM glucose, 42 mM HEPES - pH 7.2). The coverslips of cultured neurons were then transferred to 12-well plates containing 200 µl/well of neurons medium and 50 µl of 5x

kynurenic acid (KA : 10 mM stock solution). We added 50 µL of the precipitate solution to each well and neurons were incubated for 1 hr at 37°C. Afterwards, cells were washed for 20 min at 37°C with 400 µl of equilibrated medium containing 2 mM KA and were then returned to their original culture dish until imaging (*Erreur ! Source du renvoi introuvable..A*).

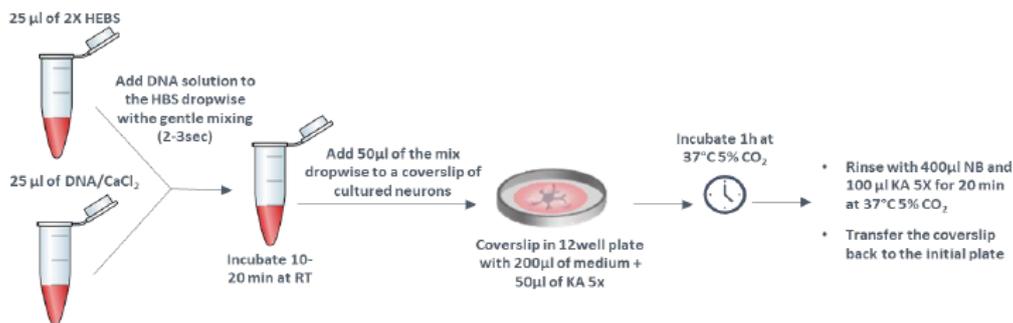
Fixation and staining.

Neurons were fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% during 10 min. A treatment with NH₄Cl 50mM during 10 min permitted to quench free aldehyde groups before permeabilization with PBS containing 0.2% Triton X-100 during 10 min. A blocking step with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) is made during 1 hr. Staining for the dendritic marker MAP2 (dilution 1/500) (Figure 4.B) or for SynCAM1 (1/400) (Figure 6) and revealed by secondary antibodies labelled with TRITC (1/1000) or Alexa488 (1/800) respectively.

Results & Conclusions

In this application note, we proposed a full micropatterning protocol widely accessible to neuroscientists. We showed the compatibility of our micropatterning protocol with the Banker culture protocol, very commonly used for primary hippocampal neurons. We demonstrated that we can successfully keep neurons in culture for weeks (Figure 6 lower part) allowing analysis to be carried out throughout

A. TRANSFECTION CALCIUM PHOSPHATE PROTOCOL



B.

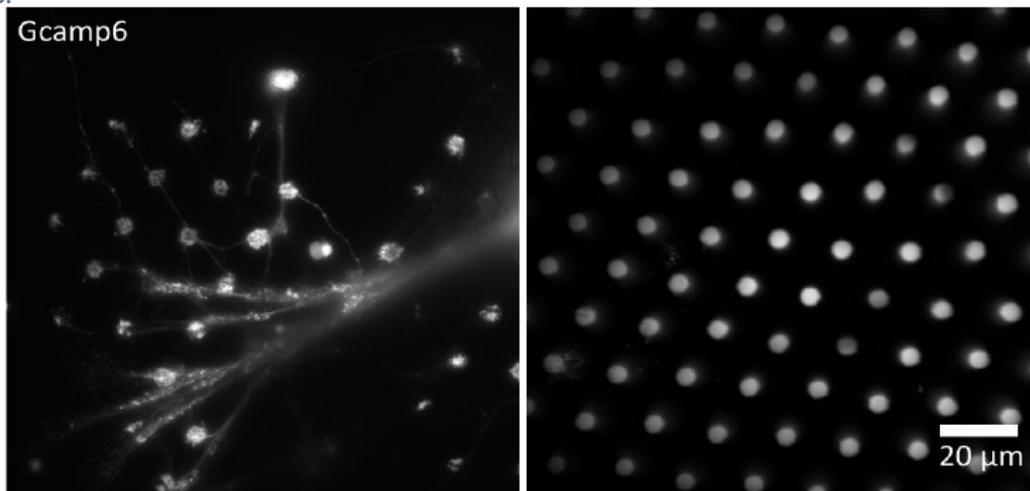


Figure 5.(A) Calcium phosphate protocol (B) Epifluorescence image of DIV18 rat hippocampal neurons on LRRTM2-Fc patterns transfected with Gcamp6 at DIV6

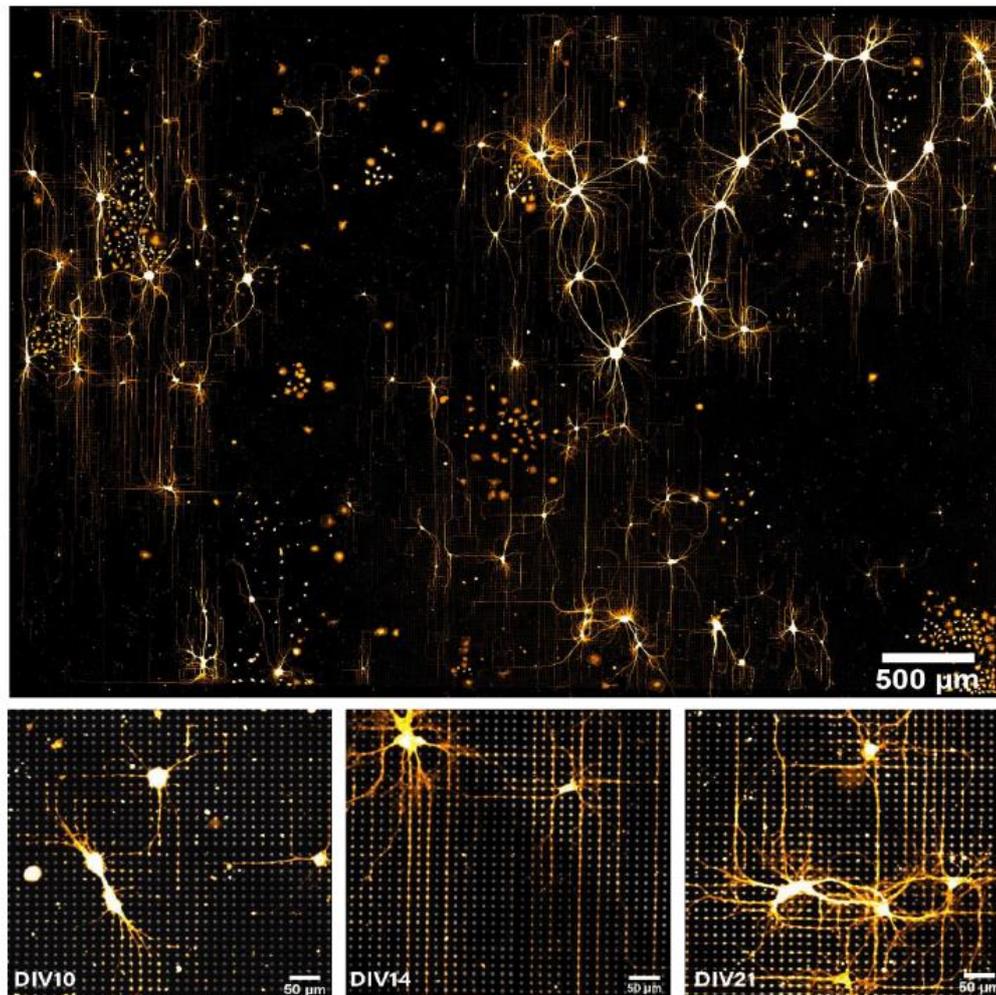


Figure 6. Epifluorescence mosaic of DIV14 hippocampal rat neurons on SynCAM1-Fc micropattern (5µm dots) with a final surface around 20 mm². Close up on epifluorescence images of hippocampal neurons at different days in vitro (DIV)

neuronal development.

One of the major advances in neuron micropatterning is the development of PLPP gel, which allows one to obtain large micropatterned areas in a few minutes (Figure 6 upper part). Indeed, neurons have a large spreading surface area and are very sensitive to low density cultures. It was therefore necessary to provide them with large micropatterned areas, which was tedious with classic PLPP.

The use of transfection technique on micropatterned neurons (Figure 5.B) opens new avenues for experiments which require live imaging for example using genetically encoded calcium indicators or fluorescent proteins. Together with PRIMO's capabilities to easily create multiprotein patterned substrates (Figure 4.B) or print gradients of proteins these methodologies open a wide range of possibilities in the development of new in vitro assays in Neuroscience.

Reference

1. Théry, M. (2010). Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *Journal of cell science*, 123(24), 4201-4213
2. Strale, P. O., Azioune, A., Bugnicourt, G., Lecomte, Y., Chahid, M., & Studer, V. (2016). Multiprotein printing by light-induced molecular adsorption. *Advanced Materials*, 28(10), 2024-2029.
3. Pasturel, A., Strale, P. O., & Studer, V. (2020). Tailoring common hydrogels into 3D cell culture templates. *Advanced Healthcare Materials*, 9(18), 2000519
4. Hardelauf, H., Waide, S., Sisnaiske, J., Jacob, P., Hausherr, V., Schöbel, N., Janasek, D., van Thriel, C., & West, J. (2014). Micropatterning neuronal networks. *The Analyst*, 139(13), 3256-3264.
5. Ryu, Jae Ryun et al. 2019. « A Monitoring System for Axonal Growth Dynamics Using Micropatterns of Permissive and Semaphorin 3F Chemorepulsive Signals ». *Lab on a Chip* 19(2): 291-305.
6. Garcia, M., Leduc, C., Lagardère, M., Argento, A., Sibarita, J. B., & Thoumine, O. (2015). Two-tiered coupling between flowing actin and immobilized N-cadherin/catenin complexes in neuronal growth cones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), 6997-7002.
7. Czöndör, K., Garcia, M., Argento, A., Constals, A., Breillat, C., Tessier, B., & Thoumine, O. (2013). Micropatterned substrates coated with neuronal adhesion molecules for high-content study of synapse formation. *Nature communications*, 4(1), 1-14.
8. Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature protocols*, 1(5), 2406-2415.
9. Schwarzenbacher, M., Kaltenbrunner, M., Brameshuber, M., Hesch, C., Paster, W., Weghuber, J., ... & Schütz, G. J. (2008). Micropatterning for quantitative analysis of protein-protein interactions in living cells. *Nature methods*, 5(12), 1053-1060.
10. Dudek, H., Ghosh, A., & Greenberg, M. E. (1998). Calcium phosphate transfection of DNA into neurons in primary culture. *Current protocols in neuroscience*, 3(1), 3-11.
11. Graham, F. L., & Van der Eb, A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 54(2), 536-539.

Title: Synaptogenic assays using primary neurons cultured on micropatterned substrates

Authors: Katalin Czöndör^{1,*}, Nathalie Piette^{1,2,*}, Béatrice Tessier¹, Vincent Studer^{1,\$}, Olivier Thoumine^{1,\$}

* these authors share first authorship

\$ co-senior authors

Affiliations:

1. Univ. Bordeaux, CNRS, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, IINS, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France

2. Alveole, 30 rue de Campio Formio, F-75013 Paris, France

Correspondence: olivier.thoumine@u-bordeaux.fr

Running head: Synapses on demand using micropatterned substrates

Abstract:

One of the difficulties for studying the mechanisms of synaptogenesis stems from the spatial unpredictability of contact formation between neurons, and the involvement of many parallel adhesive pathways mediating axon-dendrite recognition. To circumvent these limitations, we describe here a method allowing for the investigation of biomimetic synaptic contacts at controlled locations with high precision and statistics. Specifically, primary neurons are cultured on micropatterned substrates comprising arrays of micron-scale dots coated with purified synaptogenic adhesion molecules. Coating the substrates with the homophilic adhesion molecule SynCAM1 triggers the formation of functional presynaptic structures in axons, while neurexin-1 β elicits post-synapses in dendrites from neurons expressing the counter receptor neuroligin-1. This assay can be combined with various optical imaging techniques, including immunocytochemistry to screen the accumulation of synaptic components, long-term live cell recordings to probe the kinetics of neurite growth and synapse differentiation, as well as high resolution single molecule tracking.

Keywords: synapse formation, micropatterned substrates, adhesion molecules, neurexin, neuroligin, SynCAM.

1. Introduction

Assembly of the myriad of synapses between neurons during development of the central nervous system represents a pivotal process which determines the generation, maintenance and function of neural circuitries. At the level of individual axon/dendrite contacts, synaptogenesis is a complex multi-step process initiated by specific adhesion proteins (1, 2). Once the contact is stabilized, scaffolding molecules and functional receptors which are essential for the transmission of information from one neuron to the other, are recruited to contact sites (3). Importantly, the type of the presynaptic neurotransmitter machinery (glutamate versus GABA), and the corresponding postsynaptic receptors and scaffolding proteins assembled at the synaptic contact determines whether the synapse is excitatory or inhibitory. Once formed, synapses remain very dynamic, as they undergo both structural and functional alterations in response to activity changes in the neuronal network (4). Given such molecular complexity, heterogeneity and dynamics, unraveling the mechanisms underlying synaptogenesis and synapse function is highly challenging. Thus, the development of simplified experimental systems which aim at triggering synaptogenesis in a controlled way, and where the role of specific cell adhesion molecules can be isolated, are highly needed.

Indeed, adhesion molecules play an important role in the initial stages of synapse formation, by strengthening the contact between the pre- and the postsynaptic membranes, and by mediating a variety of cell signaling processes, including through the phosphorylation of specific protein binding motifs (5–8). Some adhesion molecules, such as the heterophilic neurexin/neurologin complex or the homophilic adhesion proteins SynCAMs, were also found to play key roles in inducing synapse assembly by recruiting essential synaptic molecules to contact sites (9). In the last two decades, several biomimetic assays were developed to demonstrate the ability of certain adhesion molecules to induce synapse formation, including co-cultures (10–13), synapse microarrays (14), microspheres (11, 15–17), and protein clusters (5, 18, 19). These existing methods share the principle of using synaptogenic adhesion molecules to induce the assembly of hemi-synapses, thus reducing the complexity of native synaptic contacts to a great extent. However, the spatial and temporal resolutions provided by these assays often do not allow high statistical production at the level of individual synaptic structures.

Here, we describe in technical details robust methods developed to spatially control synaptic differentiation, by culturing neurons on micropatterned substrates comprising arrays of individual micron-scale dots coated with adhesion proteins and surrounded by a cytophobic agent (20). The dots are specifically coated with SynCAM1 or neurexin1 β (Nrx1 β), which triggers the selective

differentiation of functional pre- or post-synapses, respectively. Coating of recombinant proteins is made via fluorescently-labeled secondary antibodies or streptavidin, allowing both proper orientation of the adhesive ectodomain and fluorescent visualization of the micropatterns. After this coating step, dissociated neurons are plated and cultured on the substrates as regular neuronal cultures. Neurite architecture is highly determined by the specific adhesion to the micron-scale dots, and the development of hemi-synapses is thus defined by the topology of the patterns, leading to the spatial control of synapse formation at a micron-scale resolution. Importantly, micropatterned substrates can be manipulated just as regular glass coverslips, and therefore be combined with a wide range of microscopy techniques including immunocytochemistry to screen the accumulation of synaptic components, long-term live cell recordings to probe the kinetics of synapse differentiation, local photo-activation to probe functional synaptic properties, and high-resolution single molecule tracking of membrane receptors. Considering the simple coating protocol, this assay can theoretically be adapted to a wide range of other newly reported synaptogenic adhesion proteins, including leucine rich repeat transmembrane proteins which also bind neurexins (21–23), opening the way to the targeted and selective study of the mechanisms underlying synapse formation with unprecedented spatial resolution and statistical power.

2. Materials

2.1 Culturing neurons on micropatterned substrates coated with adhesion proteins

1. Coating buffer: 0.2 M boric acid (Sigma-Aldrich B6768), pH 8.5.
2. Goat Anti-Human IgG, Fc γ fragment-specific, minimal cross reactivity with other species, unlabelled or conjugated to Alexa647 (Jackson ImmunoResearch, 109-005-098 and 109-605-098 respectively).
3. Recombinant proteins: Home-made Nr1 β -Fc for inducing post-synapses (24), and SynCAM1-Fc for inducing pre-synapses (25).
4. Plating medium: Minimum Essential Medium (MEM Gibco MEM 1X 21090-022), 2 mM GlutaMAX supplement 1X (Gibco 35050038), 4.5 g/l glucose (Sigma-Aldrich G8769), 10% horse serum (Gibco 26050088).
5. Neurobasal medium (without red phenol) (Gibco 12348017) + Neuromix (PAA ; 50x ; no longer commercialized) + 2 mM L-glutamine (PAA, M11-004, no longer commercialized) or Neurobasal-Plus + B27-Plus (Gibco A365340) + 1x GlutaMAX.

6. Effectene transfection reagent (Qiagen), if overexpression of the receptor for the coated ligand is necessary.

2.2 Experiments on fixed samples

1. Phosphate Buffer Solution (PBS, Euromedex ET-330).
2. Fixation buffer: Paraformaldehyde 4% (PFA), 4% sucrose in PBS.
3. Quenching buffer: 50 mM NH₄Cl in PBS.
4. Permeabilization buffer: 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich X100) in PBS.
5. Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich A7030).
6. Primary and secondary antibodies of interest: rat anti-HA (Roche 11867423001), mouse anti-PSD-95 (Thermo Scientific MA1-046), mouse anti-synaptotagmin1 luminal domain conjugated to Oyster 550 (Synaptic Systems 105311C5), mouse anti-synapsin (Synaptic Systems 106001), rabbit anti-SynCAM1 (Abcam 216585), donkey anti-rat-FITC (Jackson ImmunoResearch 712-095-153), donkey anti-mouse-Rhodamine (Jackson ImmunoResearch 715-295-150).
7. Mounting medium: Mowiol (Calbiochem) or equivalent.
8. Fluorescence microscope (Nikon Eclipse TiE or equivalent) equipped with a 20x/0.75 NA or 60x/1.40 NA oil immersion objective, appropriate filter sets from Semrock / Chroma, and a digital CMOS camera (ORCA-Flash 4.0, Hamamatsu).

2.3 Live cell imaging

1. Ludin open sample holder (Life Imaging Services), manufactured to fit the 20 x 20 mm square micropatterned coverslips.
2. Penicillin/Streptomycin (Gibco 15140-122).
3. For long-term imaging experiments: BioStation CT (Nikon).
4. For short-term imaging experiments (up to 5 hrs): an inverted microscope (Nikon TiE or equivalent) equipped with filter sets appropriate for the fluorophores used, 40x or 60x oil immersion objectives, a thermostatic box providing 37°C and 5% CO₂ (Life Imaging Systems) and CCD camera (CoolSnap, Roper Scientific, Evry, France).

2.4 Universal Point Acculumation In Nanoscopic Topography (*uPAINT*):

1. Tyrode solution: 108 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 15 mM Glucose, pH 7.4.
2. Monoclonal anti-GluA2 antibodies (gift of E. Gouaux, Vollum Institute, Portland OR, USA) conjugated to ATTO 647N (Attotec) according to the manufacturer protocol.
3. Microscope equipped with a 100 mW, 633 nm laser line and TIRF illumination arm (Nikon Ti-E Eclipse), 100X /1.49 NA oil immersion objective, dichroic mirror (Di01-R635, SemRock), 676/29 nm emission filter (SemRock) placed on a filter wheel (Suter) and an EM-CCD Camera (Evolve, Roper Scientific, Evry, France).

3. Methods

The method we initially exploited to obtain micropatterned substrates relied on the use of a photomask containing microfeatures to locally irradiate with deep UV light an antifouling substrate, making it locally adsorbing for proteins (26). This solution was directly offered by the company CYTOO (<https://cytoo.com>) with which we had a collaboration (Fig. 1a). Over the years the collaboration was discontinued, and we adopted another protocol to produce our own micropatterned substrates. This technique called *Light-Induced Molecular Adsorption of Proteins* (LIMAP) (27) is also based on the local ablation of a cytophobic substance by targeted UV light, but is maskless and contactless (Fig. 1b). Here, we will describe the two methods sequentially. Pros and cons of the two strategies, as well as alternative technologies to produce micropatterned substrates in the laboratory are given in Notes 1 and 2, respectively.

3.1 Preparing micropatterned glass substrates with the photomask method

In the first method, the UV insolation of the pattern geometry is made by using a photoresist mask (Fig. 1a). The photomask was based on a pre-defined geometry designed by ourselves and its production was custom-ordered to another company, but stayed the property of the purchaser. In this particular configuration, micropatterned substrates were made of 20 x 20 mm square glass coverslips and contained a hexagonal array of chemically-activated dots of 1.5 µm diameter, separated by 5 µm and surrounded by a cytophobic polyethylene glycol (PEG) layer (Fig. 1c). A slight dilation of the actual patterned area is possible (e.g. up to 2.5 µm), especially after several uses of the same mask. The dots on the substrates were further coated with 50 µg/mL poly-L-

lysine by the manufacturer, dried, and shipped at room temperature. They could be stored for up to 2 months at 4°C after production. Micropatterned substrates used for this assay are specifically designed with the aim of locally inducing synaptogenesis at the micron-scale, comparable with the size of native synapses. The specific coating of the substrates is done one day before plating the neurons, as described in the following steps (see **Note 3**).

3.2 Preparing micropatterned glass substrates with the maskless method

The LIMAP system is now commercialized under the name PRIMO by the company Alveole (<https://www.alveolelab.com>). In this technology, the shape of the micropatterns can be changed on demand by loading binary or grayscale Tiff images in the dedicated Leonardo software. Then, light from an expanded 375 nm laser beam is projected on a digital micromirror device (DMD) whose individual positions are controlled by the computer to create the imposed micropattern (**Fig. 1b**). UV light is then reflected on a dichroic mirror placed in the filter turret of a microscope and passes through a 20X/0.75 N.A. S-Fluor objective before reaching the sample, allowing us to make patterns with a precision on the order of a 1 µm (**Fig. 1d**).

For this protocol, we used 18-mm round clean coverslips that were first activated for 5 min in a plasma cleaner (Harrick Plasma), then placed for 1 hr in a closed dish containing (3-aminopropyl)-triethoxysilane (Sigma-Aldrich). Then 150 µL of 5 kDa mPEG-SVA (Laysan Bio, Inc) dissolved at 100 mg/mL in carbonate buffer (10 mM, pH 8) was incubated for one hour on the coverslip. Coverslips were then rinsed with distilled water and dried with a nitrogen flow. A mix of 33 µL absolute ethanol and 3 µL PLPP gel (photo-initiator) was deposited in each coverslip, and let dry for 30 min at RT, resulting in the formation of a transparent photo-initiator gel in the wells. The micropatterns were created on these coverslips using the PRIMO device docked on an inverted microscope (Nikon TiE Eclipse). The micropatterns were projected by PRIMO at a UV dose between 10-50 mJ/mm². The combined action of UV and PLPP gel locally degraded the PEG anti-fouling coating by photo-scission (**27**).

3.3 Coating the micropatterned glass substrates prepared with the photomask method

1. Polylysine-coated micropatterned substrates made with the mask-based method are first incubated with goat anti-human Fc antibody at 0.023 mg/mL final concentration diluted in coating buffer (**Fig. 2a, b**). This secondary antibody layer ensures the proper orientation of

the adhesive ectodomain of the protein (see **Note 4**). Importantly, a combination of unlabeled and Alexa-647 conjugated antibodies in a 9:1 ratio is used to allow for the fluorescent visualization of the micropatterns. Before incubation, the diluted antibodies are centrifuged for 10 min at 20,000 x g and 4°C to remove potential aggregates. To minimize antibody consumption, substrates are flipped onto a 160 µl drop of the antibody mixture on Parafilm (previously sterilized with UV for 1 hr). The substrates are then incubated with the antibody mix at RT for 2-5 hr.

2. The substrates are flipped into 6-well plates and carefully washed with coating buffer (see **Note 5**).
3. After washing, the substrates are incubated overnight at 4°C with 160 µL purified Nr_x1β-Fc to induce postsynaptic differentiation or with SynCAM1-Fc to promote presynaptic differentiation (both at 0.04 mg/mL in coating buffer; centrifuged for 10 min at 20,000 x g, 4°C) again on Parafilm covering 6-well plates (see **Notes 6 and 7**).
4. The second day, the substrates are placed into a new 6-well plate, washed 3 times with coating buffer and once with plating medium, and left for 1-2 hrs in the incubator (37°C, 5% CO₂) in 2 mL plating medium containing 10% horse serum. Indeed, we found that the adsorption of serum proteins was important for neuronal development and could not be omitted.

3.4 Coating the micropatterned glass substrates prepared with the maskless method

For the LIMAP technique, we refined our initial strategy combining anti-Fc antibody and Fc-tagged proteins, and designed a robust and amplified chain of molecular interactions based on the biotin-streptavidin interaction to immobilize larger quantities of synaptogenic proteins on the micropatterns allowing for long term cultures (**Fig. 2 a,c**).

1. After UV insolation, the gel of PLPP is rinsed with demineralized water and the coverslip is dried with air flow.
2. A film of poly-dimethyl-siloxane (PDMS, BISCO HT-6240, Rogers Corporation Carol Stream, IL, USA) with a 15 x 15 mm round hole in the middle was adjusted on each coverslip, thereby defining a central area for using a limited volume (100 µL) of proteins during incubation steps (see **Note 8**).
3. All proteins are solubilized in PBS, and 3 washes with PBS are made between each step. BSA-biotin (ThermoFisher Scientific, Pierce 29130) 100 µg/mL for 3 min; Streptavidin-AlexaFluor 405 or AlexaFluor 647 (ThermoFisher Scientific S32351 and

S21374, respectively) 50 µg/mL for 3 min; biotinylated goat anti-human Fc (Jackson Immunoresearch 109-065) 50 µg/mL for 10 min.

4. After washing, the substrates are incubated overnight at 4°C with purified SynCAM1-Fc at 50 µg/mL.
5. The second day, the substrates are placed into a 60 mm dish, washed 3 times with PBS and once with conditioned medium, and left for 1-2 hrs in the incubator (37°C, 5% CO₂).

3.5 Plating and culturing neurons on micropatterned substrates

Primary hippocampal neurons are prepared from embryonic day 18 (E18) Sprague-Dawley rats, as described previously (28).

1. Dissociated neurons are plated at a density of 100,000 cells/substrate (250 cells/mm² of coverslip) and are allowed to attach to the substrate for 2-4 hrs in plating medium.
2. 2-4 hrs after plating, the substrates are carefully washed with conditioned Neurobasal medium (culture medium), which was previously incubated for 4 days in dishes containing glial cell layer (see **Note 9**). The cells can be kept in this medium up to 10 days, however, a part of the medium needs to be replaced by new conditioned culture medium every 3-4 days.
3. On micropatterned substrates made with the LIMAP method, neurons could be kept for up to 21 days in vitro (DIV), yet with an alternative culture protocol. 3 or 4 paraffin dots are deposited on the coverslips before contactless micropatterning; neurons are seeded on the substrates as described before. After neurons have adhered (around 2 hrs), the coverslips are flipped onto the glial cell layer (**Fig. 2d**). Here glial cells are sufficient to replenish the medium continuously. This alternative culture method also limits the shear stress on the neurons during medium replacement.
4. In order to induce post-synapse formation with Nr_x1β-Fc coated micropatterns, neuroligin-1 (Nlg1), the heterophilic binding partner of Nr_x1β needs to be overexpressed in neurons (see **Note 10**). To this aim, neurons are transfected 3 days after plating using Effectene, according to the manufacturer's instructions. 1 µg DNA per substrate is used for a single transfection, and 2 µg total DNA are used for co-transfections (e.g. HA-Nlg1 and PSD-95-GFP). Conditioned culture medium is used for the transfection procedure (see **Note 11**).
5. In the case of SynCAM1-Fc coated substrates, the cells do not need to be transfected since endogenous SynCAM levels in neurons seem to be sufficient to induce presynaptic

development (20). This might be possible through the establishment of both homophilic and heterophilic interactions between various SynCAM isoforms (29).

3.6 Live cell and fixed cell image acquisition

Micropatterned substrates are suitable for several types of optical microscopy observations, just as regular 170 μm -thick glass coverslips. In the following section, we will focus on some of the possible applications aiming at studying the dynamics and the structure of synapse formation and function.

3.6.1. Phase contrast imaging of neurite development on micropatterned substrates

In order to monitor the growth of neurons on micropatterned substrates or to investigate the effect of the adhesion molecule specifically bound to the patterns on neurite development, the substrates are kept in a compact 37°C/CO₂ cell incubator and monitoring system (Nikon BioStation) after plating. This system provides consistent environmental control of temperature, humidity and gas concentration in combination with live cell imaging (Fig. 3).

1. After neurons have fully attached to the substrate (i.e. 4-6 hrs after plating), the substrates are mounted in a chamber suitable for imaging.
2. The cultures are kept in the plating medium containing antibiotics (Penicillin-Streptomycin), since the sterility of the culture in an open chamber cannot be ensured.
3. Images are taken every 10 min to monitor short-scale growing of neurites, while images taken every 1 hr allow observation of overall neurite elaboration over several days (Fig. 3b,c).

Studying the isolated role of specific interactions, like for example Nr_x/Nlg adhesion, is also possible by electroporating the neurons with HA-Nlg1 before plating them on substrates coated with Nr_x1 β -Fc. By co-expressing a fluorescent protein, such as eGFP, the growth of neurons overexpressing HA-Nlg1 can be selectively monitored by fluorescent imaging and the effect on neuronal development can be directly compared to non-expressing neurons from the same cultures (Fig. 3b).

3.6.2. Studying post-synapse assembly using Nr_x1 β coated micropatterns

In the following part, we describe an example protocol for investigating the development of excitatory post-synapses in neurons cultured on Nr_x1 β -Fc-coated micropatterned substrates prepared with the photomask method (Fig. 4a). Three days after plating neurons are transfected with HA-Nlg1, then fixed and immunostained 4 days later (Fig. 4b,c).

1. Cells are fixed in Fixation buffer at RT for 10 min, and carefully washed 3 times with PBS (see **Note 5**). To saturate the remaining active sites of the PFA, the culture is incubated for 15 min in Quenching buffer, followed by careful washing with PBS.
2. To label intracellular proteins, cultures are treated with permeabilization buffer for 5 min, followed by careful washing with PBS.
3. Non-specific binding is blocked by incubation with PBS containing 1% BSA, for 1h.
4. Neurons are first incubated for 1 h with primary antibodies, including rat anti-HA to stain HA-Nlg1 and mouse anti-PSD-95 to stain the major scaffolding protein of excitatory synapses. Primary antibodies are diluted 1:400 in PBS containing 1% BSA (see **Note 12**).
5. After washing carefully with PBS containing 1% BSA, neurons are incubated for 1 h with secondary antibodies: anti-rat-FITC and anti-mouse-Rhodamine at a 1:800 dilution (see **Note 13**).
6. Neurons are washed carefully once with PBS containing 1% BSA, then at least 3 times with PBS.
7. Substrates are mounted on glass slides in approximately 20 μ L Mowiol.
8. 16-bit images of the three fluorescence channels are acquired on an inverted epifluorescence microscope, equipped with the appropriate filter sets. A confocal laser scanning microscope can also be used here.

3.6.3. Single molecule tracking of AMPA receptors

Dynamic aspects of synapse organization, such as receptor diffusion can also be studied by carrying out single molecule tracking experiments in neurons cultured on micropatterned substrates prepared with the photomask method. As an example, we describe the protocol for tracking the lateral movement of endogenous AMPA receptors (AMPA receptors) in relation to Nr1/Nlg1 adhesions (**Fig. 5**). In general, we incubate neurons with antibodies against the GluA2 subunit of AMPA receptors, which are conjugated to photostable fluorophores. We keep the antibodies in solution to allow for constant labeling, while imaging neurons in oblique illumination to focus on antibodies bound to the cell surface, as described previously (**30, 31**). In this experiment, primary hippocampal neurons growing on Nr1 β -Fc-coated micropatterned substrates are transfected with HA-Nlg1 and Homer1c-GFP at Days *in vitro* (DIV) 3-4, and used for single molecule tracking experiments at DIV 7-8.

1. The substrate is mounted in Tyrode solution in an open observation chamber and placed on an inverted microscope equipped with an EMCCD camera, a thermostatic box providing air at 37°C, and an APO TIRF 100X/1.49 NA oil objective.

2. Antibodies against GluA2 subunit conjugated to ATTO 647N are added directly in the chamber to the Tyrode solution at a 1:6,000 dilution.

3. Samples are imaged using oblique illumination performed with the 633-nm line of a HeNe laser in order to allow the selective imaging of surface diffusing receptors.

4. Five stacks of 4,000 consecutive frames are obtained per cell, with an integration time of 50 ms.

5. The diffusion coefficient of single AMPAR trajectories is computed as described in paragraph 3.7.2. Note the reduction in the mobile AMPAR pool ($D > 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$) and corresponding increase in the immobile pool ($D < 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$) on Nr1 β -Fc coated micropatterns, reflecting the diffusional trapping of AMPARs at hemi post-synapses (**Fig. 5c**).

3.6.4. Studying neurite growth and pre-synapse differentiation using SynCAM1 coated micropatterns

The protocol described above for Nr1 β -Nlg1 adhesion can be easily adapted to study different synapse types, e.g. based on N-cadherin adhesion (**32**), or to investigate presynaptic differentiation, for example by staining SynCAM1 and synapsin (presynaptic marker) in neurons cultured on SynCAM1-Fc coated substrates prepared with the photomask method (**Fig. 6a-c**). Immunostaining reveals the accumulation of endogenous SynCAM1 on SynCAM1-Fc coated dots, and presence of molecules such as synapsin in the assembled hemi-synapse, but does not give information about the functionality. One way to address whether the pre-synapses developed on SynCAM1-Fc-coated micropatterns are functional is to label the active synapses by antibody-feeding assay (**Fig. 6d**).

1. Cells are incubated for 10 min at 37°C with anti-synaptotagmin luminal domain conjugated to Oyster 550 fluorophore, diluted 1:200 in culture medium.
2. Cells are carefully washed with warm conditioned medium to remove the excess antibodies which were not taken up by active pre-synapses.
3. Labeling of active synapses can be either visualized directly under the microscope, by mounting the substrate in Tyrode solution into the open chamber, or it can be fixed and observed later, with the possibility to immunostain another protein in parallel.

The combination of the LIMAP protocol with high protein coating density, and the use of paraffin spacers to allow a close contact between neurons and astrocytes, allows for the long term culture of neurons on micropatterned substrates. As with the substrates made with the photomask

method, neurons also exhibit patterned neurite arborization guided by SynCAM1-Fc coated micropatterns on substrates prepared with the maskless method (**Fig. 7**). However, we have not tested yet if there is pre-synaptic differentiation on SynCAM1-Fc coated dots in these specific coating and culture conditions.

3.7 Image analysis

3.7.1. Quantification of synaptic protein accumulation at micropatterns in fixed samples

We developed two independent criteria to measure the recruitment of synaptic proteins at micropatterns. The first procedure relies on quantifying an enrichment index measuring the ratio between fluorescence intensities of a given protein at micropatterns, compared to nearby regions on the same neurite segment. It was written as a program in Metamorph (Molecular Devices), but could be written in any other image analysis software. The second procedure quantifies the degree of colocalization of synaptic clusters with micropatterns, and uses a custom program developed as a plugin for Image J (NIH) (**19**). Both programs are available upon request.

3.7.1.1. Enrichment of synaptic proteins at micropatterns

The first technique is described for neurons growing on Nr α 1 β -Fc-coated micropatterns and immunostained for Nlg1 and PSD-95, but this protocol can be equally applied to any other synaptic protein. Here are the basic steps:

1. The potential background in the Nlg1, PSD-95 and micropattern images is subtracted.
2. A dendritic region is selected on the fluorescent image of Nlg1 staining and the corresponding area is also selected on the images highlighting the PSD-95 staining and the micropatterns.
3. The neurite outline is determined using the threshold function on the Nlg1 image.
4. A threshold is also applied to the image of the micropatterns, yielding the outlines as individual regions, which are then transferred to the Nlg1 and PSD-95 images.
5. Only micropatterns which overlap with the neurite area above threshold are used for further quantification, while patterns outside the neuron are eliminated.
6. The fluorescence intensity within each pattern for the area above threshold is determined on both Nlg1 and PSD-95 stained images, as well as the average fluorescence of the neuronal regions located outside the patterns.

7. An enrichment index is calculated by dividing the fluorescent intensities measured in neurite parts on the patterns by the average intensity measured from dendritic parts located outside patterns.
8. This procedure is repeated for three randomly chosen dendritic areas of each neuron, and values are averaged for each neuron. 10-20 neurons are quantified per condition. Enrichment factors above 1.2 are usually considered significant, and can go up to 1.8 or 2 in the case of very strong recruitments.

3.7.1.2 Apposition of synaptic clusters with micropatterns

The second procedure is explained for the localization of synapsin or PSD-95 clusters at SynCAM-Fc-coated micropatterns.

1. Synapsin or PSD-95 signals of axonal or dendritic segments, respectively, and Alexa-647 signals corresponding to micropatterns are separately segmented using a wavelet-analysis program (33).
2. The segmented images of synapsin or PSD-95 staining is overlaid with the segmented image of the micropattern.
3. The overlapping area of synaptic and micropattern signals is then calculated on the overlaid image, and the percentage of synapsin or PSD-95 signal overlapping more than 50% with a micropattern is determined and averaged on a per cell basis.
4. The value for a random distribution of puncta is calculated as the fractional area of micropatterns occupying the field of view, i.e. around 35%. Values well above this threshold are considered as significant.

3.7.2. Computation of AMPA receptor diffusion coefficients from single molecule trajectories

Detection of single AMPARs in the 4,000-image stacks is performed using an algorithm based on image wavelet segmentation and single particle centroid determination, written as a program running in the Metamorph® software (Molecular Devices), called PALM-Tracer and described earlier (34, 35). This program allows the identification of each molecule as an individual object, and connects successive positions within a certain diffusion distance (typically 2 pixels of 160 nm). The instantaneous diffusion coefficient, D , is calculated for each trajectory, from linear fits of the first 4 points of the mean square displacement (MSD) function versus time. The diffusion coefficient is then plotted on a logarithmic scale and allows the comparison of various biological conditions or compartments, such as here the dendritic regions inside or outside Nr α 1 β -Fc coated

micropatterns. Values of D smaller than $10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ typically reflect the trapping of AMPARs at post-synapses (31, 36).

3.8 Future perspectives offered by the LIMAP method

The LIMAP protocol offers two significant improvements compared to the method relying on the use of a photomask. First, it allows for a local control of the density of proteins that are coated on the micropatterns. Indeed, the 255 gray levels of the TIFF images loaded in the Leonardo software are computed into relative UV doses (Fig. 8a), thereby allowing for a local control of the patterning intensity and protein quantity (Fig. 8b,c). This property can be used for instance to investigate the relationship between the density of ligands grafted on the adhesive dots and the corresponding accumulation of counter-receptors expressed in the membrane of the cells that grow on micropatterned substrates, as well as the recruitment of pre- and post-synaptic scaffolding proteins associated to the functional assembly of synapses.

The second improvement of the LIMAP method is the possibility of multi-protein patterning. In fact, by repeating the patterning protocol sequentially, this system allows for several proteins to be micropatterned at different locations on the same substrates (27). This property can be exploited for instance to spatially segregate neurite adhesion from synapse development. We show here an example of micropatterned substrates containing lines coated with laminin intended to promote neurite outgrowth, and dots coated with streptavidin (followed by biotinylated anti-Fc antibodies and SynCAM1-Fc) intended to induce hemi-synapses (Fig. 8d,e). A neuron cultured on this type of substrate and labeled for MAP-2 is shown (Fig. 8f).

4. Notes

1. The photomask-based production of micropatterns used in this assay can be implemented in the laboratory, according to the protocol described previously (26), but it remains challenging, especially when micropatterns reach length scales of the order of a micron. In particular, the establishment of a tight contact between the photomask and the glass substrates can be difficult and may result in non-reproducible patterns. The other difficulty is that holes in the photomask can gradually get clogged, resulting in non-patterned areas on the substrates. Extensive

washing of the photomask is then required, or even its replacement by a new (and thus expensive) mask. On the other hand, as compared to photomask-based technologies where UV light is sent at once throughout the whole sample (i.e. a large coverslip of 10 x 10 cm, later cut into smaller pieces of 20 x 20 mm), one limitation of the LIMAP method is the efficiency. Indeed, the substrate insolation is done by projecting UV light in a mosaic of adjacent fields through a microscope objective, and can be quite time consuming. For example, it takes approximately 5 min to micropattern a typical area of 5 x 5 mm.

2. Other "soft lithographic" methods can be used to produce micropatterned substrates compatible with high resolution live cell imaging, and with similar geometries as ours. These include printing of adhesion proteins on silanized glass coverslips using a microfabricated un-alterable master pattern such as an elastomeric stamp (37), or UV cross-linking (38). Simpler and inexpensive techniques can be found, such as ink-jet printing methods, which consists in depositing microscopic adhesive droplets on a non-adhesive substrate such as one coated with polyethylene glycol, but the size resolution is usually poor (100-200 μm), although other studies report a few microns precision (39). An alternative approach called micro-photo-patterning used computer-controlled bi-photon laser photo-ablation of an anti-adhesive poly-vinyl-alcohol film, giving access to many different types of geometries (40).
3. In the case when fabrication of the substrates is not conducted in sterile conditions, the substrates need to be sterilized before coating, for example by exposing them to a UV lamp (365 nm) for 40 min under a laminar flow hood.
4. Attempts to directly conjugate a Cy5 fluorophore by NHS chemistry to accessible lysine groups on the Nr x 1 β -Fc protein resulted in a loss of function of Nr x 1 β , losing the ability to bind neuroligin-1 on the cell surface. Using the same strategy, SynCAM1-Fc conjugated to Cy5 showed reduced homophilic binding affinity compared to unconjugated SynCAM1-Fc. Hence the use of the antibody layer that binds the non-adhesive Fc part of the chimeric proteins.
5. It is very important to keep the substrates always wet, i.e. the liquid should never be completely removed from the substrates while washing. Because of the hydrophobic background, the dewetting of the surface generates strong forces which can lead to the disruption of the antibody layer on the substrate.
6. The recombinant proteins used for coating are classically produced and purified in the laboratory. However, one has to keep in mind that this procedure can take several months,

because the production has to be made in heterologous HEK 293T cells to provide the post-translational changes needed to preserve the adhesive function of the proteins. A detailed protocol explaining the procedure was described previously (24). Alternatively, those chimeric proteins can be purchased commercially (R&D systems, refs. 5268-NX for human Nr_x1 β -Fc and 1459-S4 for SynCAM1-10His, respectively, Fc tagged SynCAM1 being discontinued).

7. Alternatively, the substrates can be incubated with the antibody overnight at 4°C, and the next day with the adhesion protein for 2-4 hrs at RT.
8. Although both micropatterning methodologies are based on PEG degradation, the nature of the PEG coating and the photochemical reactions at work are different. In turn, the protein binding and the antifouling properties of the native PEG layer can be different. The major difference lies in the fact that neurons are able to adhere non-specifically outside the micropatterns with the photomask protocol, but less likely with the maskless LIMAP protocol where no polylysine was added. Indeed, some non-specific adhesion of axons to free polylysine on the micropatterns may itself participate to pre-synaptic differentiation (17).
9. Since the density of the culture is relatively low, it is very important to keep the neurons in conditioned medium obtained from glial cell cultures. Although the medium contains the Neuromix supplement, additional factors secreted by glial cells are essential for cell survival.
10. In our E18 rat hippocampal Banker cultures observed at DIV 7-15, the expression levels of endogenous Nlg1 seem fairly weak, as judged by the low level of surface staining obtained with Nr_x1 β -Fc, used in place of a good antibody against Nlg1 suitable for live cell labeling (24, 41). These expression levels seem insufficient to mediate a strong recognition of Nr_x1 β -Fc immobilized on micropatterns, and thereby post-synaptic differentiation. Another possibility is that the amount of Nr_x1 β -Fc that is adsorbed to the secondary antibody layer is not high enough to bind enough endogenous Nlg1 and mediate synaptic differentiation. Thus, there seems to be a limiting amount of either exogenous Nr_x1 β -Fc or endogenous Nlg1 that prevents post-synaptic differentiation, whereas endogenous SynCAMs seem to be in sufficient amounts to mediate pre-synaptic differentiation.
11. Alternatively, neurons can be electroporated prior to plating, which will typically result in a lower expression level and a higher ratio of cells overexpressing the given protein.
12. In order to minimize the volume of antibodies used, substrates can be placed on Parafilm, so that a drop of 200 μ L is sufficient to cover their surface.
13. When choosing secondary antibodies, it is important to avoid using the same fluorescent label which was used for visualizing the micropattern. In the given example, one also has to

be careful to use secondary antibodies for rat and mouse primary antibodies which are specifically developed for minimal cross-reactivity between host species. Such antibodies are available at Jackson Immunoresearch Labs.

5. Acknowledgements

We thank P. Scheiffele, T. Biederer, and S. Okabe for the generous gift of plasmids; E. Gouaux for the gift of the anti-GluA2 antibody and M. Sainlos for its fluorescent conjugation; C. Breillat for initial work on SynCAM1-Fc; Y. Rufin at the biochemical facility of the Bordeaux Neurocampus (Bioprot) for the purification of Fc-tagged proteins, F. Neca, Z. Karatas, S. Benquet, and M. Munier for molecular biology; E. Verdier and N. Retailleau at the Cell culture facility of the Institute; R. Sterling and J. Gilardin for logistics; A. Azioune for help on coating protocols, J.B. Sibarita, A. Kechkar, and C. Butler for the gift of the PALM-Tracer single molecule image analysis software; S. Lafosse and H. Delobel for the temporary loan of the Nikon BioStation.

This work received funding from the Fondation pour la Recherche Médicale (“Equipe FRM” DEQ20160334916), French Ministry of Research, Agence Nationale de la Recherche (grants « SyntheSyn » ANR-17-CE16-0028-01), ERA-NET Neuron “Synpathy” (ANR-15-NEUR-0007-04), Investissements d’Avenir Labex BRAIN (ANR-10-LABX-43), and grants from the Conseil Régional de Nouvelle-Aquitaine.

6. References

1. Kurshan PT and Shen K (2019) Synaptogenic pathways. *Curr Opin Neurobiol* 57:156–162
2. Südhof TC (2017) Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell* 171:745–769
3. Friedman H V, Bresler T, Garner CC, et al (2000) Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* 27:57–69
4. Blanpied TA, Kerr JM, and Ehlers MD (2008) Structural plasticity with preserved topology in the postsynaptic protein network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12587–92
5. Pouloupoulos A, Aramuni G, Meyer G, et al (2009) Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63:628–42
6. Giannone G, Mondin M, Grillo-Bosch D, et al (2013) Neurexin-1 β Binding to Neuroligin-1 Triggers the Preferential Recruitment of PSD-95 versus Gephyrin through Tyrosine Phosphorylation of Neuroligin-1. *Cell Rep* 3:1996–2007
7. Letellier M, Szíber Z, Chamma I, et al (2018) A unique intracellular tyrosine in neuroligin-1 regulates AMPA receptor recruitment during synapse differentiation and potentiation. *Nat Commun* 9:3979
8. Bembem MA, Shipman SL, Hirai T, et al (2013) CaMKII phosphorylation of neuroligin-1 regulates excitatory synapses. *Nat Neurosci* 17:56–64
9. Missler M, Südhof TC, and Biederer T (2012) Synaptic cell adhesion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005694
10. Scheiffele P, Fan J, Choih J, et al (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101:657–69
11. Graf ER, Zhang X, Jin SX, et al (2004) Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119:1013–1026
12. Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, et al (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297:1525–31
13. Ko J, Zhang C, Arac D, et al (2009) Neuroligin-1 performs neurexin-dependent and neurexin-independent functions in synapse validation. *EMBO J* 28:3244–55
14. Shi P, Scott MA, Ghosh B, et al (2011) Synapse microarray identification of small molecules that enhance synaptogenesis. *Nat Commun* 2:510
15. Dean C, Scholl FG, Choih J, et al (2003) Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat Neurosci* 6:708–16
16. Heine M, Thoumine O, Mondin M, et al (2008) Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroligin contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20947–52
17. Lucido AL, Sanchez FS, Thostrup P, et al (2009) Rapid assembly of functional presynaptic boutons triggered by adhesive contacts. *J Neurosci* 29:12449–12466
18. Barrow SL, Constable JR, Clark E, et al (2009) Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits

- PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Dev* 4:17
19. Mondin M, Labrousse V, Hosy E, et al (2011) Neurexin-neurologin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds. *J Neurosci* 31:13500–15
 20. Czöndör K, Garcia M, Argento A, et al (2013) Micropatterned substrates coated with neuronal adhesion molecules for high-content study of synapse formation. *Nat Commun* 4:2252
 21. Linhoff MW, Laurén J, Cassidy RM, et al (2009) An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. *Neuron* 61:734–49
 22. DeWit J, Sylwestrak E, O'Sullivan ML, et al (2009) LRRTM2 Interacts with Neurexin1 and Regulates Excitatory Synapse Formation. *Neuron* 64:799–806
 23. Liouta K, Chabbert J, Benquet S, et al (2021) Role of regulatory C-terminal motifs in synaptic confinement of LRRTM2. *Biol Cell* 113:492–506
 24. Mondin M, Tessier B, and Thoumine O (2013) Assembly of Synapses: Biomimetic Assays to Control Neurexin/Neurologin Interactions at the Neuronal Surface, In: *Current Protocols in Neuroscience*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA
 25. Breillat C, Thoumine O, and Choquet D (2007) Characterization of SynCAM surface trafficking using a SynCAM derived ligand with high homophilic binding affinity. *Biochem Biophys Res Commun* 359
 26. Azioune A, Carpi N, Tseng Q, et al (2010) Protein Micropatterns. A Direct Printing Protocol Using Deep UVs. *Methods Cell Biol* 97:133–146
 27. Strale P-O, Azioune A, Bugnicourt G, et al (2016) Multiprotein Printing by Light-Induced Molecular Adsorption. *Adv Mater* 28:2024–9
 28. Kaech S and Banker G (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1:2406–2415
 29. Fogel AI, Akins MR, Krupp AJ, et al (2007) SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion. *J Neurosci* 27:12516–30
 30. Giannone G, Hosy E, Levet F, et al (2010) Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophys J* 99:1303–10
 31. Nair D, Hosy E, Petersen JD, et al (2013) Super-Resolution Imaging Reveals That AMPA Receptors Inside Synapses Are Dynamically Organized in Nanodomains Regulated by PSD95. *J Neurosci* 33:13204–24
 32. Chazeau A, Garcia M, Czöndör K, et al (2015) Mechanical coupling between transsynaptic N-cadherin adhesions and actin flow stabilizes dendritic spines. *Mol Biol Cell* 26:859–873
 33. Racine V, Hertzog A, Jouanneau J, et al (2006) Multiple-target tracking of 3D fluorescent objects based on simulated annealing, In: *3rd IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*, pp. 1020–1023
 34. Izeddin I, Boulanger J, Racine V, et al (2012) Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Opt Express* 20:2081–95
 35. Kechkar A, Nair D, Heilemann M, et al (2013) Real-time analysis and visualization for single-molecule based super-resolution microscopy. *PLoS One* 8:e62918

ANNEXES

36. Czöndör K, Mondin M, Garcia M, et al (2012) Unified quantitative model of AMPA receptor trafficking at synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3522–7
37. Rozkiewicz DI, Kraan Y, Wertén MWT, et al (2006) Covalent microcontact printing of proteins for cell patterning. *Chem - A Eur J* 12:6290–6297
38. Fink J, Théry M, Azioune A, et al (2007) Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques. *Lab Chip* 7:672–680
39. Sanjana NE and Fuller SB (2004) A fast flexible ink-jet printing method for patterning dissociated neurons in culture. *J Neurosci Methods* 136:151–163
40. Doyle AD, Wang FW, Matsumoto K, et al (2009) One-dimensional topography underlies three-dimensional fibroblast cell migration. *J Cell Biol* 184:481–490
41. Chamma I, Letellier M, Butler C, et al (2016) Mapping the dynamics and nanoscale organization of synaptic adhesion proteins using monomeric streptavidin. *Nat Commun* 7:10773

Figure legends

Figure 1. Comparison of mask- and DMD-based micro-photopatterning technologies

Both methods rely on the use of glass coverslips coated with a cytophobic PEG reagent. **(a)** The first method consists in insulating the coverslip by projecting UV light from a lamp emitting at a wavelength of 180 nm through a quartz photomask containing microfeatures. **(b)** The second method allows for wide-field spatially-modulated UV light illumination from a 375 nm laser plugged on a microscope and pattern shape is controlled through a digital micromirror device. **(c, d)** Examples of hexagonal arrays of circular patterns created with the two techniques, respectively. Images show the secondary anti-Fc antibody conjugated to Alexa-647 or streptavidin Alexa-647 respectively.

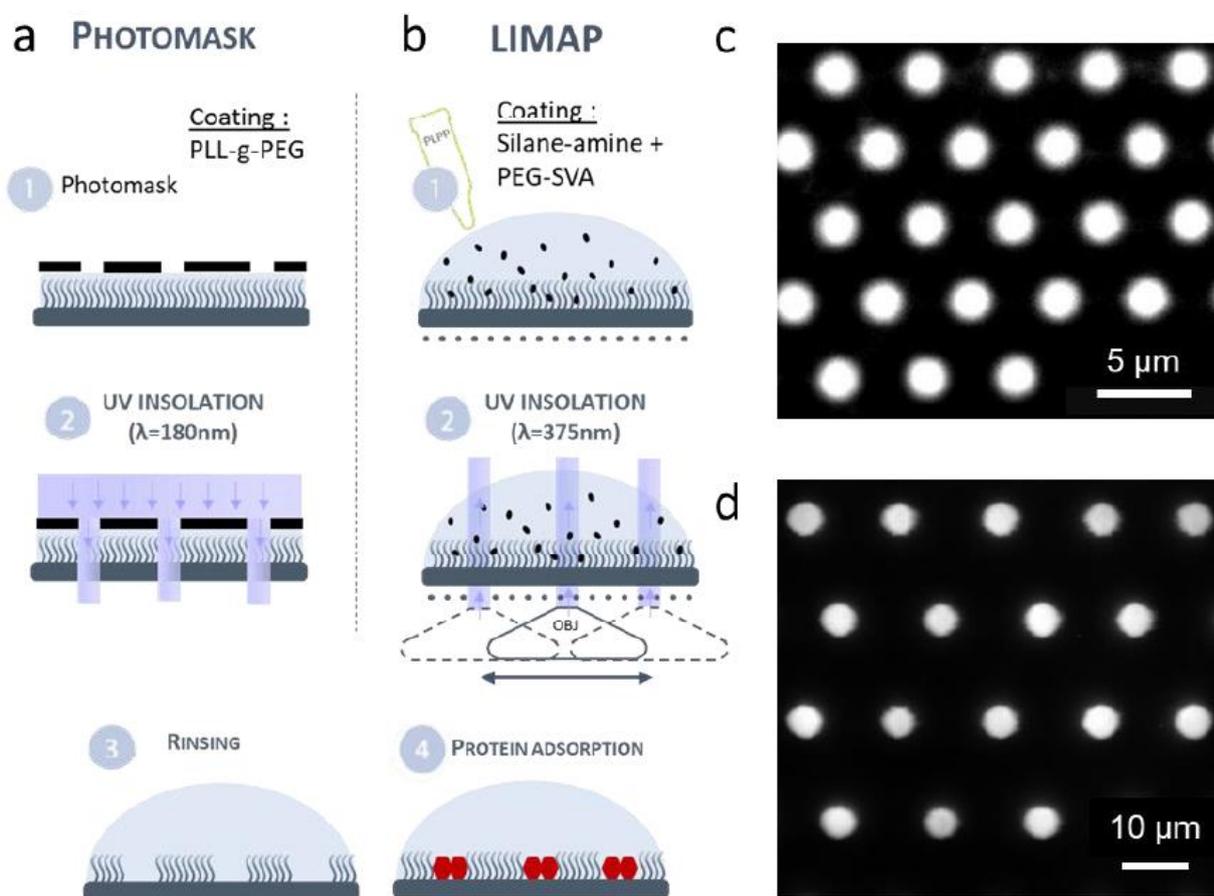


Figure 2. Protein coating and neuron culture protocols on micropatterned substrates

(a) Schematic view of the micropattern geometry. Micropatterned substrates contain a hexagonal array of adhesive dots (1.5 μm) surrounded by a cytophobic PEG reagent (light blue). Two different coating protocols are used depending on the method to produce micropatterned substrates. (b) In the mask-based method, poly-L-lysine coated dots are first coated with anti-human Fc antibodies conjugated to Alexa-647, then with either Fc-tagged Nr x 1 β or SynCAM1. (c) For the LIMAP method, the reactive dots are coated sequentially with biotinylated BSA, streptavidin Alexa-405 or 647, biotinylated anti-Fc antibody, then the Fc-tagged synaptogenic protein. (d) Illustration of the culture of dissociated rat hippocampal neurons on micropatterned substrates. In the method using a photomask, neurons were fed with conditioned medium harvested from parallel glial cell cultures, whereas in the LIMAP method, paraffin dots acting as spacers were stuck to the glass substrate, and coverslips were flipped onto a glial cell feeder layer, allowing for longer term culture.

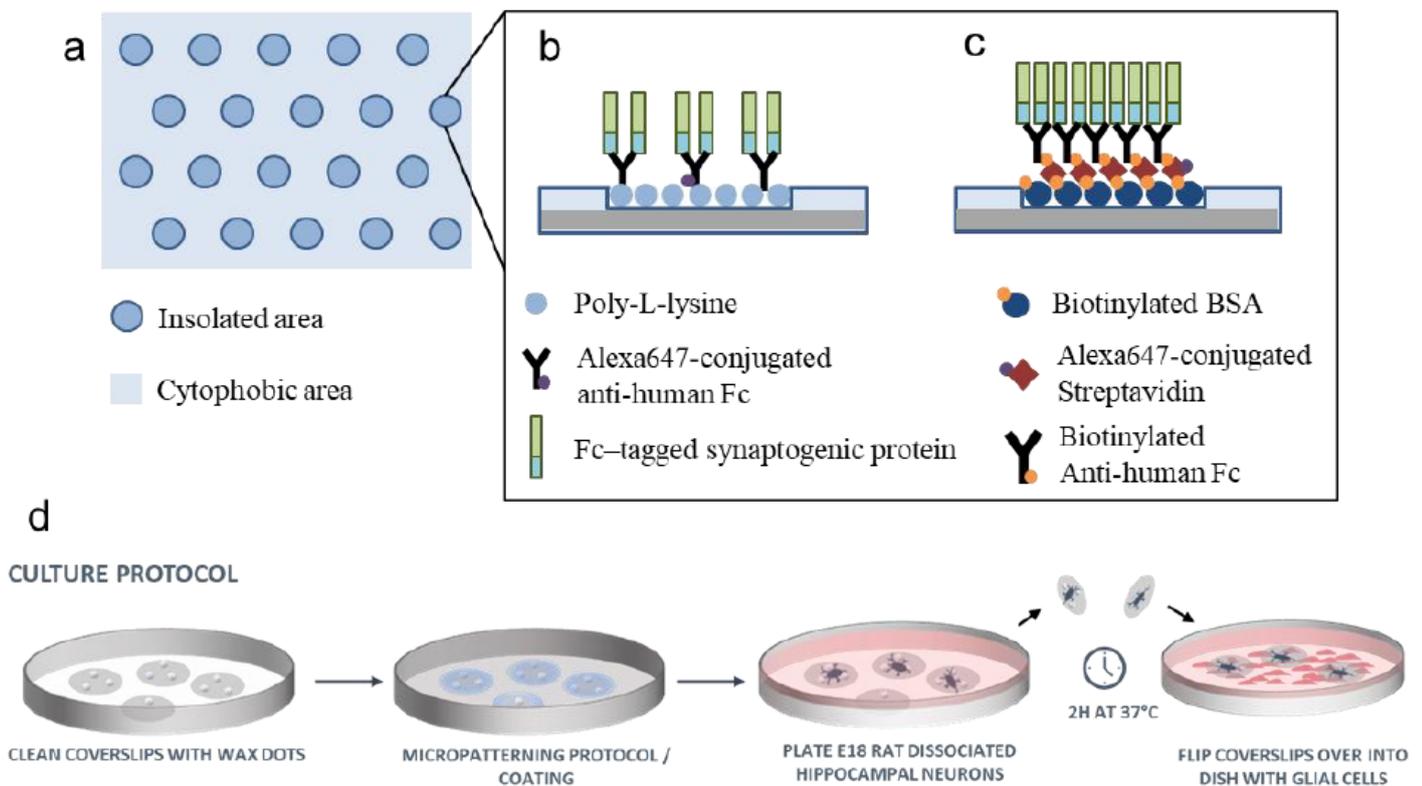


Figure 3. Neurite growth of neurons cultured on Nr_x1 β coated micropatterned substrates

(a) Phase contrast mosaic image of a neuronal culture growing on Nr_x1 β -Fc-coated micropatterned substrates for 3 days in vitro. **(b)** Phase contrast (left) and fluorescence image (middle) of a neuron expressing GFP and HA-Nlg1, and the corresponding image showing the Nr_x1 β -Fc coated micropattern (right). **(c)** Time lapse images of neurite growth, taking the rectangular area highlighted in (b). Note the motion of leading dendritic growth cones along the dots.

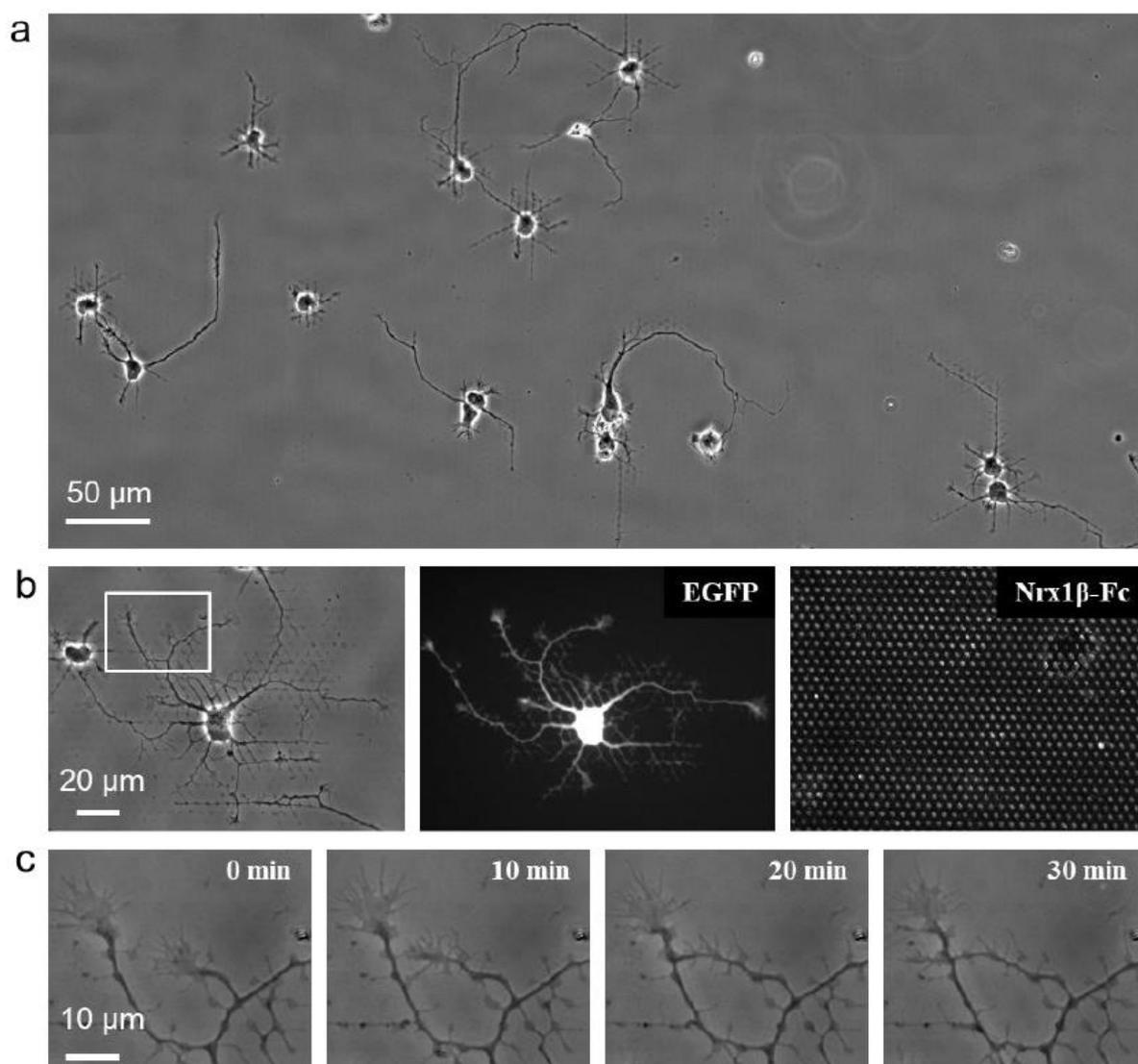


Figure 4. Dendritic arborization and postsynaptic differentiation in neurons cultured on Nr x 1 β -Fc-coated micropatterned substrates

(a) Schematic view of the molecular interactions between Nlg1 in the dendritic membrane and a Nr x 1 β -Fc coated dot, resulting in post-synapse development. (b) Neurons were plated on micropatterned substrates coated with Nr x 1 β -Fc, transfected with HA-Nlg1, and immunostained for anti-HA and endogenous PSD-95 at DIV 10. Note the development of a highly patterned dendritic arborization. (c) Insets from the rectangular area highlighted in (b) show the selective accumulation of Nlg1 (green) and PSD-95 (red) at Nr x 1 β -Fc-coated dots (blue).

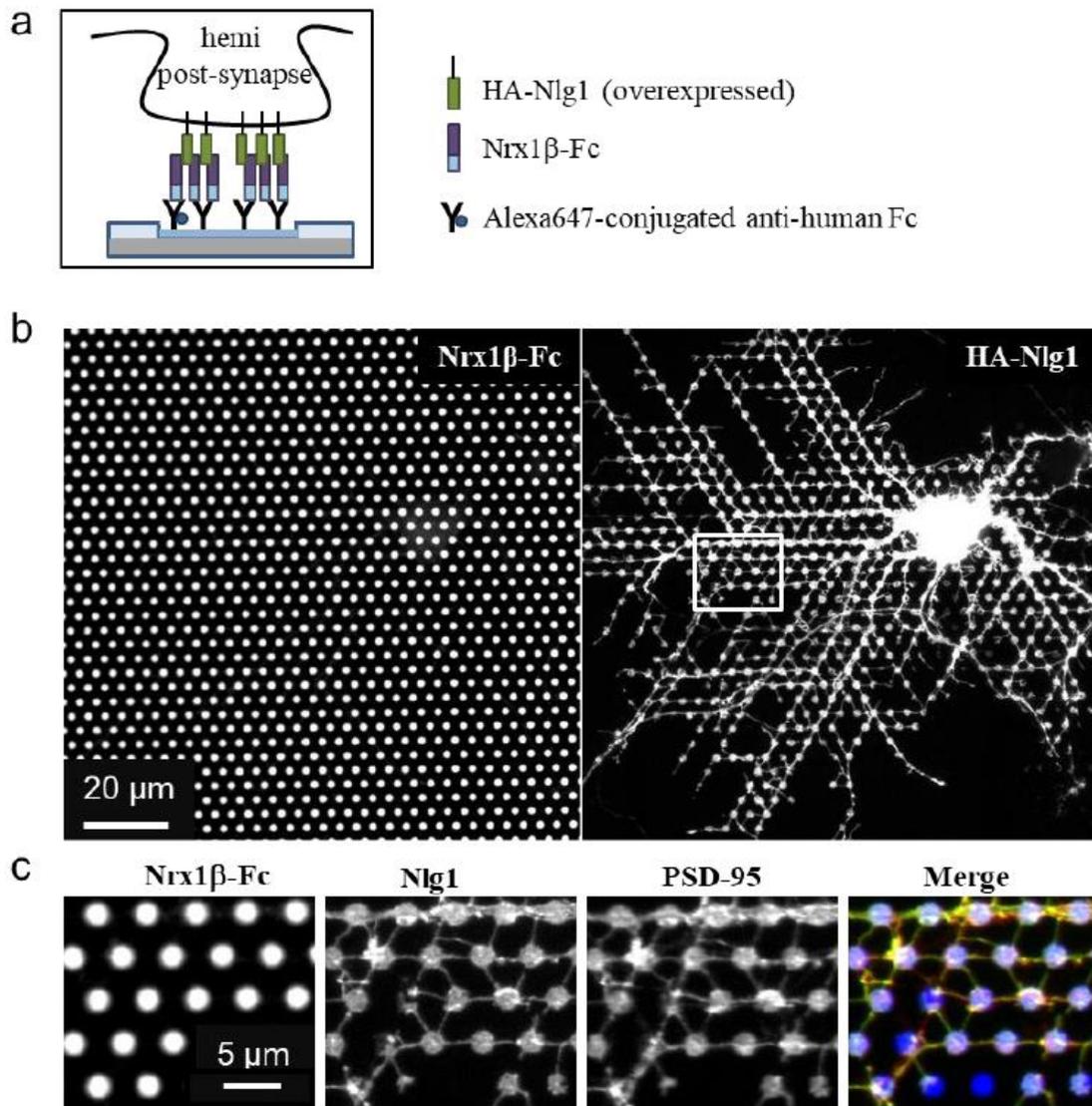


Figure 5. Trapping of surface-diffusing AMPA receptors at Nr x 1 β coated micropatterns

(a) Dendritic segment of a neuron co-transfected with HA-Nlg1 and Homer1C-GFP, cultured for 7 DIV on micropatterned substrates coated with Nr x 1 β -Fc (left). The diffusion of surface AMPARs was followed by stochastic labelling of GluA2 subunits, and trajectories of individual AMPARs were reconstructed based on recordings of 4,000 consecutive images (right). (b) Enlarged region taken from (a) (white box) showing reconstructed trajectories of GluA2 diffusion (green). Note the immobilization of AMPARs when entering the region of dendrites (left) overlapping with the Nr x 1 β -Fc coated dots (right), suggesting the trapping of AMPARs at post-synapses labeled by Homer1c-GFP (arrows). (c) Graph showing the distribution of the diffusion coefficient (D) of single GluA2 trajectories in logarithmic scale, when computed inside or outside the micropatterns. The grey area represents slowly mobile AMPARs ($D < 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$), most likely trapped at hemi-synapses induced by Nr x 1 β -Fc coated micropatterns, or at regular synapses outside micropatterns.

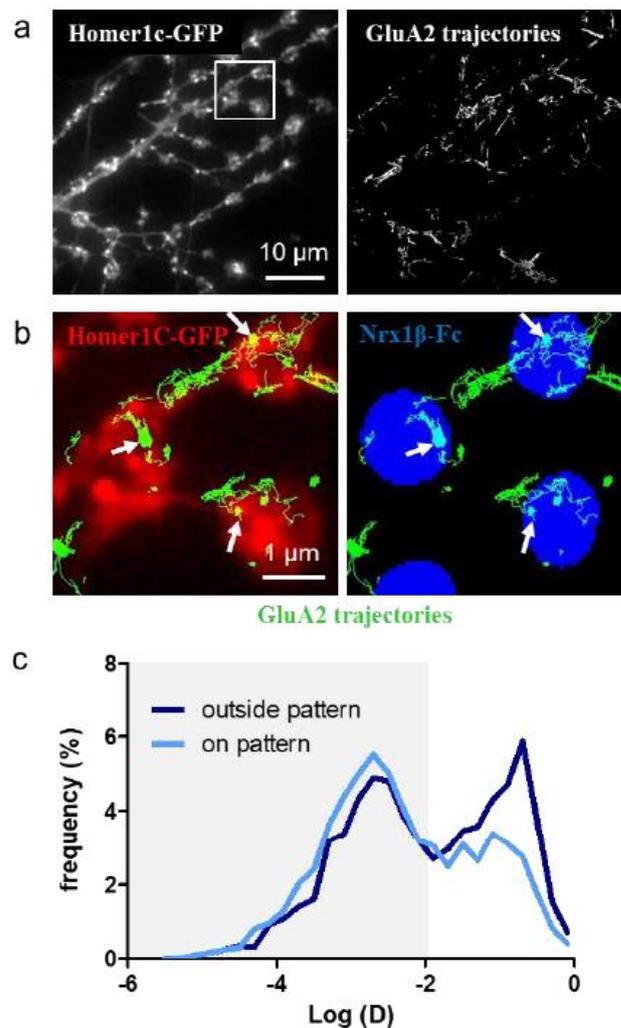


Figure 6. Axonal arborization and presynaptic differentiation in neurons cultured on SynCAM1-Fc coated micropatterns

(a) Schematic view of the molecular interactions between endogenous SynCAM1 in the axonal membrane axons and a SynCAM1-Fc coated dot, resulting in pre-synapse formation. (b) Neurons were plated on micropatterned substrates coated with SynCAM1-Fc (left), and immunostained for endogenous SynCAM1 (right) and synapsin at DIV 10. Note the development of a highly patterned axonal network. (c) Insets show the selective accumulation of SynCAM1 (red) and synapsin (green) at SynCAM1-Fc coated dots (blue). (d) Live labeling with antibodies to the synaptotagmin luminal domain indicates the location of active synapses. Cells were immunostained for endogenous SynCAM1 after fixation. Note the strong accumulation of endogenous SynCAM1 (red) and synaptotagmin (green) at the dots (blue).

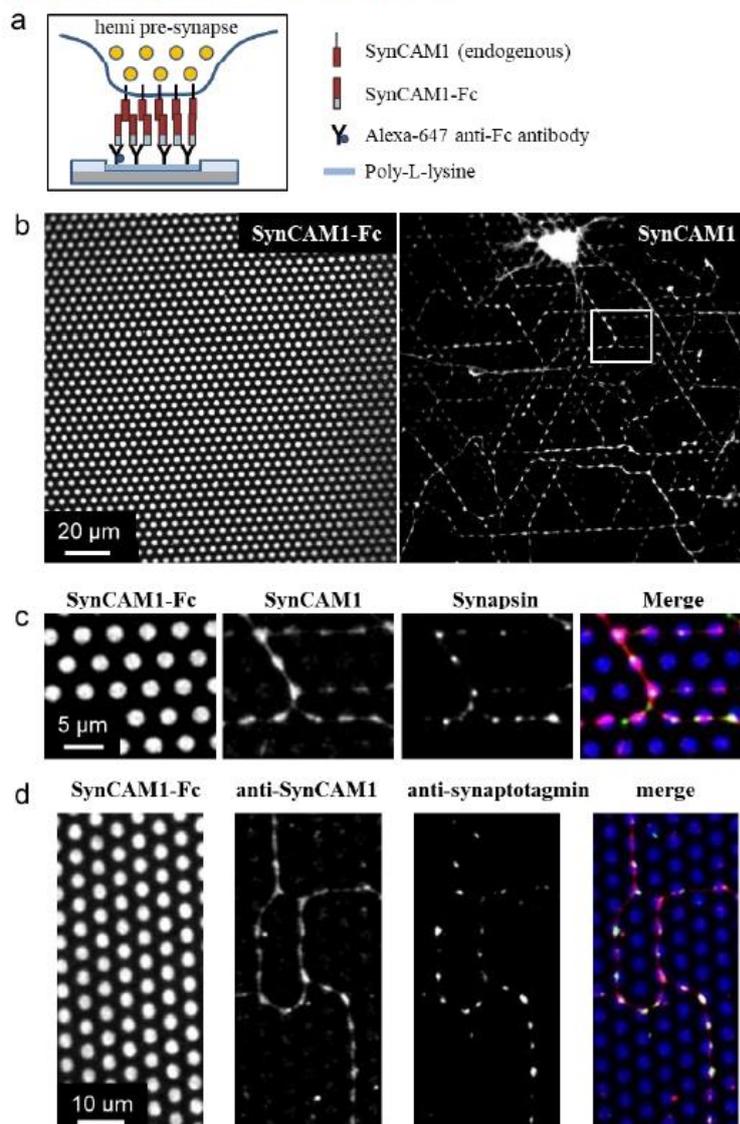


Figure 7. Long term cultures of neurons of SynCAM1-Fc coated substrates

(a, b) Neuronal development on micropatterned substrates produced with the LIMAP method and coated with SynCAM1-Fc, at two different ages (DIV 10 and 21, respectively). Neurons were immunostained for endogenous SynCAM1. Note that neurites follow the imposed micropatterns. (c, d) Corresponding images showing the micropatterned dots (5 μm separated by 10 μm), based on the streptavidin-Alexa647 fluorescence.

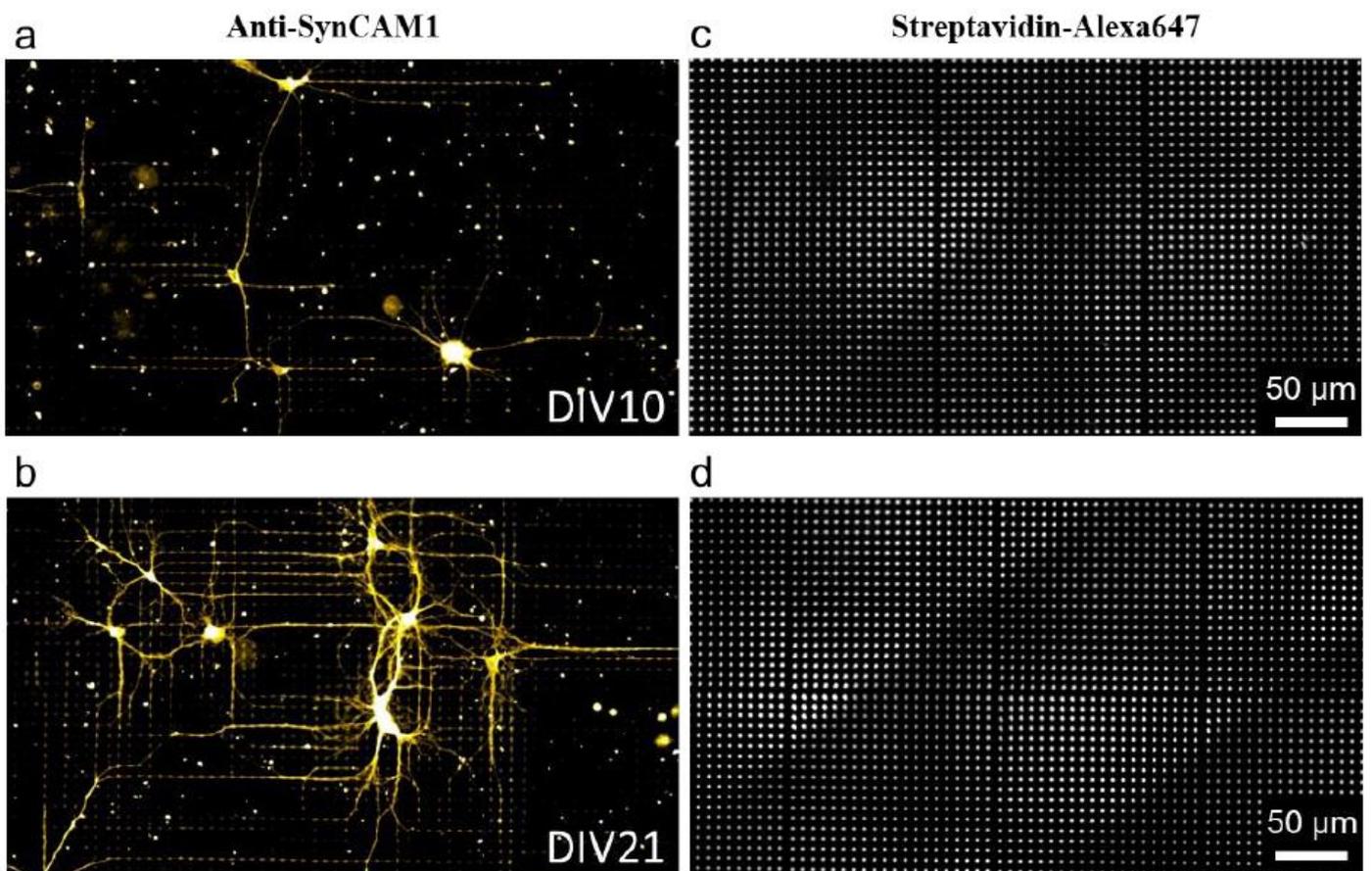
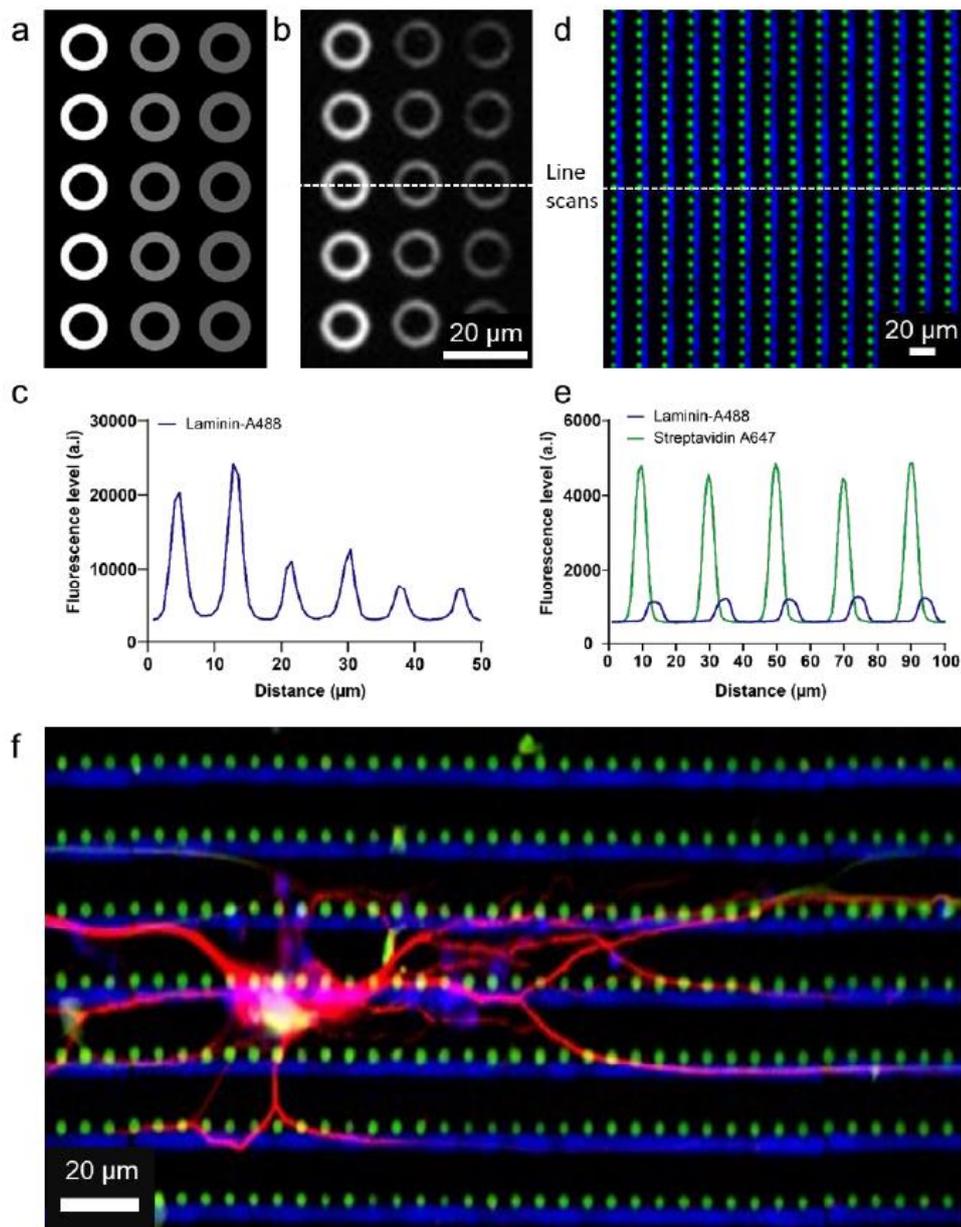


Figure 8. Control of protein density and dual-protein photopatterning using LIMAP

(a) Examples of doughnut geometries (Tiff image) entered in the software. (b) Resulting micropatterns filled with Alexa488-conjugated laminin. (c) Graph showing the fluorescence intensity line scan through the doughnuts of different intensities. (d) Dual micropatterns made sequentially with Alexa647 conjugated streptavidin (green dots) and Alexa488-conjugated laminin (blue lines), later coated with biotinylated anti-Fc antibody and SynCAM1-Fc. (e) Graph showing the fluorescence intensity levels for laminin-Alexa488 (blue) and streptavidin-Alexa647 (green) across a horizontal line scan made through the micropatterns. (f) Example of a DIV 14 neuron growing on this dual-micropatterned substrate and immunostained for MAP2 (red).



BIBLIOGRAPHIE

- Akimoto, T., & Yamamoto, E. (2017). Detection of transition times from single-particle-tracking trajectories. *Physical Review E*, *96*(5), 052138. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.96.052138>
- Alcor, D., Gouzer, G., & Triller, A. (2009). Single-particle tracking methods for the study of membrane receptors dynamics. *European Journal of Neuroscience*, *30*(6), 987-997. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06927.x>
- Alivisatos, A. P. (1996). Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science*, *271*(5251), 933-937. <https://doi.org/10.1126/science.271.5251.933>
- Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., & Rasenick, M. M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(2), 128-140. <https://doi.org/10.1038/nrn2059>
- Araç, D., Boucard, A. A., Özkan, E., Strop, P., Newell, E., Südhof, T. C., & Brunger, A. T. (2007). Structures of Neuroligin-1 and the Neuroligin-1/Neurexin-1 β Complex Reveal Specific Protein-Protein and Protein-Ca²⁺ Interactions. *Neuron*, *56*(6), 992-1003. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.12.002>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses : Glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, *22*(5), 208-215. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6)
- Arnold, A. M., Reismann, A. W. A. F., Sevcsik, E., & Schütz, G. J. (2020). Monte Carlo simulations of protein micropatterning in biomembranes : Effects of immobile nanofeatures with reduced diffusivity. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *53*(43), 435401. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aba297>
- Arnold, A. M., Sevcsik, E., & Schütz, G. J. (2016). Monte Carlo simulations of protein micropatterning in biomembranes : Effects of immobile sticky obstacles. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *49*(36), 364002. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/36/364002>
- Arumugam, S., & Bassereau, P. (2015). Membrane nanodomains : Contribution of curvature and interaction with proteins and cytoskeleton. *Essays in Biochemistry*, *57*, 109-119. <https://doi.org/10.1042/bse0570109>
- Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., & Webb, W. W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal*, *16*(9), 1055-1069. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(76\)85755-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(76)85755-4)
- Azioune, A., Storch, M., Bornens, M., Théry, M., & Piel, M. (2009). Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab on a Chip*, *9*(11), 1640. <https://doi.org/10.1039/b821581m>
- Baksh, M. M., Groves, J. T., Dean, C., Pautot, S., DeMaria, S., & Isacoff, E. (2005). Neuronal Activation by GPI-Linked Neuroligin-1 Displayed in Synthetic Lipid Bilayer Membranes. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, *21*(23), 10693-10698. <https://doi.org/10.1021/la051243d>
- Balakirev, M. Y., Porte, S., Vernaz-Gris, M., Berger, M., Arié, J.-P., Fouqué, B., & Chatelain, F. (2005). Photochemical Patterning of Biological Molecules Inside a Glass Capillary. *Analytical Chemistry*, *77*(17), 5474-5479. <https://doi.org/10.1021/ac0504619>
- Barrow, S. L., Constable, J. R., Clark, E., El-Sabeawy, F., McAllister, A. K., & Washbourne, P. (2009). Neuroligin1 : A cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA

BIBLIOGRAPHIE

- receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Development*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-17>
- Bartol, T. M., Jr, Bromer, C., Kinney, J., Chirillo, M. A., Bourne, J. N., Harris, K. M., & Sejnowski, T. J. (2015). Nanoconnectomic upper bound on the variability of synaptic plasticity. *eLife*, 4, e10778. <https://doi.org/10.7554/eLife.10778>
- Becker, N., Wierenga, C. J., Fonseca, R., Bonhoeffer, T., & Nägerl, U. V. (2008). LTD Induction Causes Morphological Changes of Presynaptic Boutons and Reduces Their Contacts with Spines. *Neuron*, 60(4), 590-597. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.018>
- Bekkers, J. M., & Stevens, C. F. (1991). Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), 7834-7838. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC52398/>
- Bélisle, J. M., Correia, J. P., Wiseman, P. W., Kennedy, T. E., & Costantino, S. (2008). Patterning protein concentration using laser-assisted adsorption by photobleaching, LAPAP. *Lab on a Chip*, 8(12), 2164. <https://doi.org/10.1039/b813897d>
- Bélisle, J. M., Kunik, D., & Costantino, S. (2009). Rapid multicomponent optical protein patterning. *Lab on a Chip*, 9(24), 3580. <https://doi.org/10.1039/b911967a>
- Belkaid, W., Thostrup, P., Yam, P. T., Juzwik, C. A., Ruthazer, E. S., Dhaunchak, A. S., & Colman, D. R. (2013). Cellular response to micropatterned growth promoting and inhibitory substrates. *BMC Biotechnology*, 13(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-86>
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., & Hess, H. F. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313(5793), 1642-1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>
- Biederer, T. (2006). Bioinformatic characterization of the SynCAM family of immunoglobulin-like domain-containing adhesion molecules. *Genomics*, 87(1), 139-150. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.08.017>
- Biederer, T., Kaeser, P. S., & Blanpied, T. A. (2017). Transcellular Nanoalignment of Synaptic Function. *Neuron*, 96(3), 680-696. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.006>
- Biederer, T., Sara, Y., Mozhayeva, M., Atasoy, D., Liu, X., Kavalali, E. T., & Südhof, T. C. (2002). SynCAM, a Synaptic Adhesion Molecule That Drives Synapse Assembly. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1072356>
- Bill, R. M., Henderson, P. J. F., Iwata, S., Kunji, E. R. S., Michel, H., Neutze, R., Newstead, S., Poolman, B., Tate, C. G., & Vogel, H. (2011). Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nature Biotechnology*, 29(4), 335-340. <https://doi.org/10.1038/nbt.1833>
- Bingham, D., Wernert, F., Moura, J. D. C., Boroni-Rueda, F., van Bommel, N., Caillol, G., Papandréou, M.-J., & Leterrier, C. (s. d.). *Distinct nano-structures support a multifunctional role of actin at presynapses*. 24.
- Blue, M. E., & Parnavelas, J. G. (1983). The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. I. Qualitative analysis. *Journal of Neurocytology*, 12(4), 599-616. <https://doi.org/10.1007/BF01181526>
- Bodian, D. (1966). Electron Microscopy : Two Major Synaptic Types on Spinal Motoneurons. *Science*, 151(3714), 1093-1094. <https://doi.org/10.1126/science.151.3714.1093>
- Bois-Reymond, E. D. (1884). *Untersuchungen über thierische elektricität : Bd. , 2. abth. III. Untersuchung. (Fortsetzung.) 1860-84.* G. Reimer.

- Bourne, J. N., Chirillo, M. A., & Harris, K. M. (2013). Presynaptic Ultrastructural Plasticity Along CA3→CA1 Axons During Long-Term Potentiation in Mature Hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 521(17), 3898-3912. <https://doi.org/10.1002/cne.23384>
- Branco, T., Staras, K., Darcy, K. J., & Goda, Y. (2008). Local Dendritic Activity Sets Release Probability at Hippocampal Synapses. *Neuron*, 59(3), 475-485. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.006>
- Brinkmann, F., Hirtz, M., Greiner, A. M., Weschenfelder, M., Waterkotte, B., Bastmeyer, M., & Fuchs, H. (2013). Interdigitated Multicolored Bioink Micropatterns by Multiplexed Polymer Pen Lithography. *Small*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/smll.201203183>
- Budreck, E. C., Kwon, O.-B., Jung, J. H., Baudouin, S., Thommen, A., Kim, H.-S., Fukazawa, Y., Harada, H., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Scheiffele, P., & Kim, J.-H. (2013). Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(2), 725-730. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214718110>
- Budreck, E. C., & Scheiffele, P. (2007). Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses: Synaptic localization of neuroligin-3. *European Journal of Neuroscience*, 26(7), 1738-1748. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05842.x>
- Burbulla, L. F., Beaumont, K. G., Mrksich, M., & Krainc, D. (2016). Micropatterning Facilitates the Long-Term Growth and Analysis of iPSC-Derived Individual Human Neurons and Neuronal Networks. *Advanced healthcare materials*, 5(15), 1894-1903. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500900>
- Burry, R. W. (1980). Formation of apparent presynaptic elements in response to poly-basic compounds. *Brain Research*, 184(1), 85-98. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90588-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90588-0)
- Burry, R. W. (1982). Development of apparent presynaptic elements formed in response to polylysine coated surfaces. *Brain Research*, 247(1), 1-16. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)91022-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)91022-8)
- Burry, R. W., & Hayes, D. M. (1986). Development and elimination of presynaptic elements on polylysine-coated beads implanted in neonatal rat cerebellum. *Journal of Neuroscience Research*, 15(1), 67-78. <https://doi.org/10.1002/jnr.490150107>
- Burry, R. W., Kniss, D. A., & Ho, R. H. (1985). Enhanced survival of apparent presynaptic elements on polylysine-coated beads by inhibition of non-neuronal cell proliferation. *Brain Research*, 346(1), 42-50. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91092-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91092-3)
- Buskermolen, A. B. C., Ristori, T., Mostert, D., van Turnhout, M. C., Shishvan, S. S., Loerakker, S., Kurniawan, N. A., Deshpande, V. S., & Bouten, C. V. C. (2020). Cellular Contact Guidance Emerges from Gap Avoidance. *Cell Reports Physical Science*, 1(5), 100055. <https://doi.org/10.1016/j.xcrp.2020.100055>
- Byron, O., & Vestergaard, B. (2015). Protein-protein interactions: A supra-structural phenomenon demanding trans-disciplinary biophysical approaches. *Current Opinion in Structural Biology*, 35, 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.09.003>
- Cahill, J. F., Kertesz, V., & Van Berkel, G. J. (2016). Laser dissection sampling modes for direct mass spectral analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30(5), 611-619. <https://doi.org/10.1002/rcm.7477>
- Carter, S. B. (1967). Haptotactic islands. *Experimental Cell Research*, 48(1), 189-193. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(67\)90298-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(67)90298-4)

BIBLIOGRAPHIE

- Chakraborty, S., Martinez-Sanchez, A., Beck, F., Toro-Nahuelpan, M., Hwang, I.-Y., Noh, K.-M., Baumeister, W., & Mahamid, J. (2022). *Cryo-electron tomography reveals enrichment and identifies microtubule lumenal particles in neuronal differentiation* [Preprint]. *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/2022.07.28.501854>
- Chamma, I., Letellier, M., Butler, C., Tessier, B., Lim, K.-H., Gauthereau, I., Choquet, D., Sibarita, J.-B., Park, S., Sainlos, M., & Thoumine, O. (2016). Mapping the dynamics and nanoscale organization of synaptic adhesion proteins using monomeric streptavidin. *Nature Communications*, *7*, 10773. <https://doi.org/10.1038/ncomms10773>
- Charrier, C., Ehrensperger, M.-V., Dahan, M., Lévi, S., & Triller, A. (2006). Cytoskeleton Regulation of Glycine Receptor Number at Synapses and Diffusion in the Plasma Membrane. *The Journal of Neuroscience*, *26*(33), 8502-8511. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1758-06.2006>
- Cheadle, L., & Biederer, T. (2012). The novel synaptogenic protein Farp1 links postsynaptic cytoskeletal dynamics and transsynaptic organization. *The Journal of Cell Biology*, *199*(6), 985-1001. <https://doi.org/10.1083/jcb.201205041>
- Chen, X., Liu, H., Shim, A. H. R., Focia, P. J., & He, X. (2008). Structural basis for synaptic adhesion mediated by neuroligin-neurexin interactions. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(1), 50-56. <https://doi.org/10.1038/nsmb1350>
- Chen, Z., Oh, D., Biswas, K. H., Zaidel-Bar, R., & Groves, J. T. (2021). *Probe the effect of clustering on EphA2 receptor signaling efficiency by subcellular control of ligand-receptor mobility* [Preprint]. *Biophysics*. <https://doi.org/10.1101/2021.02.16.431455>
- Cheng, Y. (2018). Membrane protein structural biology in the era of single particle cryo-EM. *Current Opinion in Structural Biology*, *52*, 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.08.008>
- Chenouard, N., Smal, I., de Chaumont, F., Maška, M., Sbalzarini, I. F., Gong, Y., Cardinale, J., Carthel, C., Coraluppi, S., Winter, M., Cohen, A. R., Godinez, W. J., Rohr, K., Kalaidzidis, Y., Liang, L., Duncan, J., Shen, H., Xu, Y., Magnusson, K. E. G., ... Meijering, E. (2014). Objective comparison of particle tracking methods. *Nature Methods*, *11*(3), 281-289. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2808>
- Chih, B., Afridi, S. K., Clark, L., & Scheiffele, P. (2004). Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Human Molecular Genetics*, *13*(14), 1471-1477. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh158>
- Choquet, D., & Triller, A. (2003). The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(4), 251-265. <https://doi.org/10.1038/nrn1077>
- Chow, I., & Poo, M. M. (1982). Redistribution of cell surface receptors induced by cell-cell contact. *Journal of Cell Biology*, *95*(2), 510-518. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.2.510>
- Chubykin, A. A., Liu, X., Comoletti, D., Tsigelny, I., Taylor, P., & Südhof, T. C. (2005). Dissection of Synapse Induction by Neuroligins: EFFECT OF A NEUROLIGIN MUTATION ASSOCIATED WITH AUTISM*. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(23), 22365-22374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410723200>
- Clavet-Fournier, V., Lee, C., Wegner, W., Brose, N., Rhee, J., & Willig, K. I. (2023). *Pre- and postsynaptic nanostructures increase in size and complexity after LTP induction* [Preprint]. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1101/2023.02.09.527812>
- Clegg, R. M. (s. d.). *Fluorescence resonance energy transfer*.
- Colin, A., Orhant-Prioux, M., Guérin, C., Savinov, M., Cao, W., Vianay, B., Scarfone, I., Roux, A., De La Cruz, E. M., Mogilner, A., Théry, M., & Blanchoin, L. (2023). Friction patterns

- guide actin network contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(39), e2300416120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2300416120>
- Comoletti, D., Flynn, R. E., Boucard, A. A., Demeler, B., Schirf, V., Shi, J., Jennings, L. L., Newlin, H. R., Südhof, T. C., & Taylor, P. (2006). Gene Selection, Alternative Splicing, and Post-translational Processing Regulate Neuroligin Selectivity for β -Neurexins. *Biochemistry*, 45(42), 12816-12827. <https://doi.org/10.1021/bi0614131>
- Comoletti, D., Flynn, R., Jennings, L. L., Chubykin, A., Matsumura, T., Hasegawa, H., Südhof, T. C., & Taylor, P. (2003). Characterization of the Interaction of a Recombinant Soluble Neuroligin-1 with Neurexin-1 β . *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50497-50505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306803200>
- Comoletti, D., Grishaev, A., Whitten, A. E., Tsigelny, I., Taylor, P., & Trehwella, J. (2007). Synaptic Arrangement of the Neuroligin/ β -Neurexin Complex Revealed by X-ray and Neutron Scattering. *Structure (London, England: 1993)*, 15(6), 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.04.010>
- Cooper, M. W., & Smith, S. J. (1992). A real-time analysis of growth cone-target cell interactions during the formation of stable contacts between hippocampal neurons in culture. *Journal of Neurobiology*, 23(7), 814-828. <https://doi.org/10.1002/neu.480230704>
- Corzo, J. (2006). Time, the forgotten dimension of ligand binding teaching. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 34(6), 413-416. <https://doi.org/10.1002/bmb.2006.494034062678>
- Csucs, G., Michel, R., Lussi, J. W., Textor, M., & Danuser, G. (2003). Microcontact printing of novel co-polymers in combination with proteins for cell-biological applications. *Biomaterials*, 24(10), 1713-1720. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00568-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00568-9)
- Czeslik, C. (s. d.). *Factors Ruling Protein Adsorption*.
- Czöndör, K., Garcia, M., Argento, A., Constals, A., Breillat, C., Tessier, B., & Thoumine, O. (2013). Micropatterned substrates coated with neuronal adhesion molecules for high-content study of synapse formation. *Nature Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms3252>
- Dahan, M., Lévi, S., Luccardini, C., Rostaing, P., Riveau, B., & Triller, A. (2003). Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking. *Science*, 302(5644), 442-445. <https://doi.org/10.1126/science.1088525>
- Dailey, M. E., & Smith, S. J. (1996). The Dynamics of Dendritic Structure in Developing Hippocampal Slices. *The Journal of Neuroscience*, 16(9), 2983-2994. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-09-02983.1996>
- Das, I., & Gupta, S. (2005). Polyethylene glycol degradation by UV irradiation. *Indian journal of chemistry. Sect. A: Inorganic, physical, theoretical & analytical*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Polyethylene-glycol-degradation-by-UV-irradiation-Das-Gupta/e41478303ec96d75e93ca24745fc2c61bb4c9842>
- De Jaco, A., Comoletti, D., Kovarik, Z., Gaietta, G., Radić, Z., Lockridge, O., Ellisman, M. H., & Taylor, P. (2006). A Mutation Linked with Autism Reveals a Common Mechanism of Endoplasmic Reticulum Retention for the α , β -Hydrolase Fold Protein Family. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9667-9676. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510262200>
- Dean, C., Scholl, F. G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., & Scheiffele, P. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nature Neuroscience*, 6(7), 708-716. <https://doi.org/10.1038/nn1074>

BIBLIOGRAPHIE

- Degtyar, V., Hafez, I. M., Bray, C., & Zucker, R. S. (2013). Dance of the SNAREs : Assembly and Rearrangements Detected with FRET at Neuronal Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 33(13), 5507-5523. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2337-12.2013>
- Delhaye, G. (2021). *Micro-impression d'anticorps pour des applications diagnostics et thérapeutiques en immunologie clinique* [These de doctorat, Aix-Marseille]. <https://www.theses.fr/2021AIXM0149>
- Demers, L. M., Ginger, D. S., Park, S.-J., Li, Z., Chung, S.-W., & Mirkin, C. A. (2002). Direct Patterning of Modified Oligonucleotides on Metals and Insulators by Dip-Pen Nanolithography. *Science*, 296(5574), 1836-1838. <https://doi.org/10.1126/science.1071480>
- Deng, Y., Efremov, A. K., & Yan, J. (2022). Modulating binding affinity, specificity, and configurations by multivalent interactions. *Biophysical Journal*, 121(10), 1868-1880. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.04.017>
- Derby, B. (2010). Inkjet Printing of Functional and Structural Materials : Fluid Property Requirements, Feature Stability, and Resolution. *Annual Review of Materials Research*, 40(1), 395-414. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-070909-104502>
- de Wit, J., Sylwestrak, E., O'Sullivan, M. L., Otto, S., Tiglio, K., Savas, J. N., Yates, J. R., Comoletti, D., Taylor, P., & Ghosh, A. (2009). LRRTM2 Interacts with Neurexin1 and Regulates Excitatory Synapse Formation. *Neuron*, 64(6), 799-806. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.019>
- Díaz-López, A., Rivas, C., Iniesta, P., Morán, A., García-Aranda, C., Megías, D., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A., Díaz-Rubio, E., Benito, M., & De Juan, C. (2005). Characterization of MDGA1, a novel human glycosylphosphatidylinositol-anchored protein localized in lipid rafts. *Experimental Cell Research*, 307(1), 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.02.016>
- Dietrich, C., Yang, B., Fujiwara, T., Kusumi, A., & Jacobson, K. (2002). Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophysical Journal*, 82(1 Pt 1), 274-284. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1302468/>
- Dillmore, W. S., Yousaf, M. N., & Mrksich, M. (2004). A Photochemical Method for Patterning the Immobilization of Ligands and Cells to Self-Assembled Monolayers. *Langmuir*, 20(17), 7223-7231. <https://doi.org/10.1021/la049826v>
- Dou, Y., Bowen, J., Liu, Y., & Gorovsky, M. A. (2002). Phosphorylation and an ATP-dependent process increase the dynamic exchange of H1 in chromatin. *The Journal of Cell Biology*, 158(7), 1161-1170. <https://doi.org/10.1083/jcb.200202131>
- Dreyer, R., Pfukwa, R., Barth, S., Hunter, R., & Klumperman, B. (2023). The Evolution of SNAP-Tag Labels. *Biomacromolecules*, 24(2), 517-530. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01238>
- Dudek, H., Ghosh, A., & Greenberg, M. E. (1998). Calcium Phosphate Transfection of DNA into Neurons in Primary Culture. *Current Protocols in Neuroscience*, 3(1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0311s03>
- Dyson, S. E., & Jones, D. G. (1980). Quantitation of terminal parameters and their interrelationships in maturing central synapses : A perspective for experimental studies. *Brain Research*, 183(1), 43-59. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90118-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90118-3)

- Eichinger, C. D., Hsiao, T. W., & Hlady, V. (2012). Multiprotein Microcontact Printing with Micrometer Resolution. *Langmuir*, 28(4), 2238-2243. <https://doi.org/10.1021/la2039202>
- Elegheert, J., Cvetkovska, V., Clayton, A. J., Heroven, C., Vennekens, K. M., Smukowski, S. N., Regan, M. C., Jia, W., Smith, A. C., Furukawa, H., Savas, J. N., de Wit, J., Begbie, J., Craig, A. M., & Aricescu, A. R. (2017). Structural Mechanism for Modulation of Synaptic Neuroligin-Neurexin Signaling by MDGA Proteins. *Neuron*, 95(4), 896-913.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.040>
- Engel, L., Gaietta, G., Dow, L. P., Swift, M. F., Pardon, G., Volkmann, N., Weis, W. I., Hanein, D., & Pruitt, B. L. (2019). *Extracellular matrix micropatterning technology for whole cell cryogenic electron microscopy studies* [Preprint]. Bioengineering. <https://doi.org/10.1101/657072>
- Erbaş, A., Olvera de la Cruz, M., & Marko, J. F. (2019). Receptor-Ligand Rebinding Kinetics in Confinement. *Biophysical Journal*, 116(9), 1609-1624. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.02.033>
- Ethell, I. M., & Pasquale, E. B. (2005). Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Progress in Neurobiology*, 75(3), 161-205. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.02.003>
- Fannon, A. M., & Colman, D. R. (1996). A Model for Central Synaptic Junctional Complex Formation Based on the Differential Adhesive Specificities of the Cadherins. *Neuron*, 17(3), 423-434. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80175-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80175-0)
- Fernández-Suárez, M., & Ting, A. Y. (2008). Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 929-943. <https://doi.org/10.1038/nrm2531>
- Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245-246. <https://doi.org/10.1038/340245a0>
- Filova, B., Reichova, A., Zatkova, M., Srancikova, A., Bukatova, S., Bacova, Z., & Bakos, J. (2020). Expression of synaptic proteins in the hippocampus is modulated by neonatal oxytocin treatment. *Neuroscience Letters*, 725, 134912. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134912>
- Fink, J., Théry, M., Azioune, A., Dupont, R., Chatelain, F., Bornens, M., & Piel, M. (2007). Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques. *Lab Chip*, 7(6), 672-680. <https://doi.org/10.1039/B618545B>
- Fogel, A. I., Akins, M. R., Krupp, A. J., Stagi, M., Stein, V., & Biederer, T. (2007). SynCAMs Organize Synapses through Heterophilic Adhesion. *The Journal of Neuroscience*, 27(46), 12516-12530. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2739-07.2007>
- Fogel, A. I., Li, Y., Giza, J., Wang, Q., Lam, T. T., Modis, Y., & Biederer, T. (2010). N-Glycosylation at the SynCAM (Synaptic Cell Adhesion Molecule) Immunoglobulin Interface Modulates Synaptic Adhesion *. *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 34864-34874. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.120865>
- Fogel, A. I., Stagi, M., Perez de Arce, K., & Biederer, T. (2011). Lateral assembly of the immunoglobulin protein SynCAM 1 controls its adhesive function and instructs synapse formation. *The EMBO Journal*, 30(23), 4728-4738. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.336>
- Friedrich, W., Knipping, P., & Laue, M. (1913). Interferenzerscheinungen bei Röntgenstrahlen. *Annalen der Physik*, 346(10), 971-988. <https://doi.org/10.1002/andp.19133461004>

BIBLIOGRAPHIE

- Fromherz, P., & Schaden, H. (1994). Defined Neuronal Arborizations by Guided Outgrowth of Leech Neurons in Culture. *European Journal of Neuroscience*, 6(9), 1500-1504. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1994.tb01011.x>
- Fuccillo, M. V., Földy, C., Gökce, Ö., Rothwell, P. E., Sun, G. L., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2015). Single-Cell mRNA Profiling Reveals Cell-Type Specific Expression of Neurexin Isoforms. *Neuron*, 87(2), 326-340. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.028>
- Fujita, E., Dai, H., Tanabe, Y., Zhiling, Y., Yamagata, T., Miyakawa, T., Tanokura, M., Momoi, M. Y., & Momoi, T. (2010). Autism spectrum disorder is related to endoplasmic reticulum stress induced by mutations in the synaptic cell adhesion molecule, CADM1. *Cell Death & Disease*, 1(6), Art. 6. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.23>
- Furshpan, E. J., MacLeish, P. R., O'Lague, P. H., & Potter, D. D. (1976). Chemical transmission between rat sympathetic neurons and cardiac myocytes developing in microcultures : Evidence for cholinergic, adrenergic, and dual-function neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(11), 4225-4229. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC431394/>
- Garcia, M., Leduc, C., Lagardère, M., Argento, A., Sibarita, J.-B., & Thoumine, O. (2015). Two-tiered coupling between flowing actin and immobilized N-cadherin/catenin complexes in neuronal growth cones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), 6997-7002. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423455112>
- Gates, B. D., Xu, Q., Stewart, M., Ryan, D., Willson, C. G., & Whitesides, G. M. (2005). New Approaches to Nanofabrication : Molding, Printing, and Other Techniques. *Chemical Reviews*, 105(4), 1171-1196. <https://doi.org/10.1021/cr030076o>
- Gautrot, J. E., Huck, W. T. S., Welch, M., & Ramstedt, M. (2010). Protein-Resistant NTA-Functionalized Polymer Brushes for Selective and Stable Immobilization of Histidine-Tagged Proteins. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2(1), 193-202. <https://doi.org/10.1021/am9006484>
- Gavard, J., Lambert, M., Grosheva, I., Marthiens, V., Irinopoulou, T., Riou, J.-F., Bershadsky, A., & Mège, R.-M. (2004). Lamellipodium extension and cadherin adhesion : Two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *Journal of Cell Science*, 117(2), 257-270. <https://doi.org/10.1242/jcs.00857>
- Getz, A. M., Ducros, M., Breillat, C., Lampin-Saint-Amaux, A., Daburon, S., François, U., Nowacka, A., Fernández-Monreal, M., Hosy, E., Lanore, F., Zieger, H. L., Sainlos, M., Humeau, Y., & Choquet, D. (2022). High-resolution imaging and manipulation of endogenous AMPA receptor surface mobility during synaptic plasticity and learning. *Science Advances*, 8(30), eabm5298. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm5298>
- Giannone, G., Mondin, M., Grillo-Bosch, D., Tessier, B., Saint-Michel, E., Czöndör, K., Sainlos, M., Choquet, D., & Thoumine, O. (2013). Neurexin-1 β Binding to Neuroligin-1 Triggers the Preferential Recruitment of PSD-95 versus Gephyrin through Tyrosine Phosphorylation of Neuroligin-1. *Cell Reports*, 3(6), 1996-2007. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.013>
- Ginger, D. S., Zhang, H., & Mirkin, C. A. (2004). The Evolution of Dip-Pen Nanolithography. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(1), 30-45. <https://doi.org/10.1002/anie.200300608>
- Goehring, N. W., Chowdhury, D., Hyman, A. A., & Grill, S. W. (2010). FRAP Analysis of Membrane-Associated Proteins : Lateral Diffusion and Membrane-Cytoplasmic Exchange. *Biophysical Journal*, 99(8), 2443-2452. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.08.033>

- Gopalakrishnan, M., Forsten-Williams, K., Cassino, T. R., Padro, L., Ryan, T. E., & Täuber, U. C. (2005). Ligand rebinding : Self-consistent mean-field theory and numerical simulations applied to surface plasmon resonance studies. *European Biophysics Journal*, 34(7), 943-958. <https://doi.org/10.1007/s00249-005-0471-2>
- Graf, E. R., Kang, Y., Hauner, A. M., & Craig, A. M. (2006). Structure Function and Splice Site Analysis of the Synaptogenic Activity of the Neurexin-1 β LNS Domain. *The Journal of Neuroscience*, 26(16), 4256-4265. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1253-05.2006>
- Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S.-X., Linhoff, M. W., & Craig, A. M. (2004). Neurexins Induce Differentiation of GABA and Glutamate Postsynaptic Specializations via Neuroligins. *Cell*, 119(7), 1013-1026. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.035>
- Graham, F. L., & van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52(2), 456-467. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90341-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90341-3)
- Gray, E. G. (1963). Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord. *Journal of Anatomy*, 97(Pt 1), 101-106.5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1244260/>
- Groc, L., Lafourcade, M., Heine, M., Renner, M., Racine, V., Sibarita, J.-B., Lounis, B., Choquet, D., & Cognet, L. (2007). Surface Trafficking of Neurotransmitter Receptor : Comparison between Single-Molecule/Quantum Dot Strategies. *The Journal of Neuroscience*, 27(46), 12433-12437. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3349-07.2007>
- Guyon, J., Strale, P.-O., Romero-Garmendia, I., Bikfalvi, A., Studer, V., & Daubon, T. (2021). Co-culture of Glioblastoma Stem-like Cells on Patterned Neurons to Study Migration and Cellular Interactions. *Journal of Visualized Experiments*, 168, 62213. <https://doi.org/10.3791/62213>
- Hafner, A.-S., Penn, A. C., Grillo-Bosch, D., Retailleau, N., Poujol, C., Philippat, A., Coussen, F., Sainlos, M., Opazo, P., & Choquet, D. (2015). Lengthening of the Stargazin Cytoplasmic Tail Increases Synaptic Transmission by Promoting Interaction to Deeper Domains of PSD-95. *Neuron*, 86(2), 475-489. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.013>
- Hall, L. D. (1964). Nuclear Magnetic Resonance. In M. L. Wolfrom (Éd.), *Advances in Carbohydrate Chemistry* (Vol. 19, p. 51-93). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60279-9](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60279-9)
- Hardelauf, H., Waide, S., Sinaiske, J., Jacob, P., Hausherr, V., Schöbel, N., Janasek, D., van Thriel, C., & West, J. (2014). Micropatterning neuronal networks. *The Analyst*, 139(13), 3256-3264. <https://doi.org/10.1039/C4AN00608A>
- Harris, K. M., Jensen, F. E., & Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages : Implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation [published erratum appears in J Neurosci 1992 Aug;12(8):following table of contents]. *Journal of Neuroscience*, 12(7), 2685-2705. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-07-02685.1992>
- Harris, K. M., & Sultan, P. (1995). Variation in the number, location and size of synaptic vesicles provides an anatomical basis for the nonuniform probability of release at hippocampal CA1 synapses. *Neuropharmacology*, 34(11), 1387-1395. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00142-5](https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00142-5)
- Harris, K., & Stevens, J. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus : Serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *The*

BIBLIOGRAPHIE

- Journal of Neuroscience*, 9(8), 2982-2997. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-08-02982.1989>
- Hata, Y., Butz, S., & Sudhof, T. (1996). CASK : A novel dlg/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuexins. *The Journal of Neuroscience*, 16(8), 2488-2494. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-08-02488.1996>
- Hata, Y., Davletov, B., Petrenko, A. G., Jahn, R., & Südhof, T. C. (1993). Interaction of synaptotagmin with the cytoplasmic domains of neuexins. *Neuron*, 10(2), 307-315. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90320-Q](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90320-Q)
- Heine, M., Thoumine, O., Mondin, M., Tessier, B., Giannone, G., & Choquet, D. (2008). Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neuexin/neuroligin contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20947-20952. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804007106>
- Henderson, N. T., Le Marchand, S. J., Hruska, M., Hippenmeyer, S., Luo, L., & Dalva, M. B. (2019). Ephrin-B3 controls excitatory synapse density through cell-cell competition for EphBs. *ELife*, 8, e41563. <https://doi.org/10.7554/eLife.41563>
- Hess, S. T., Girirajan, T. P. K., & Mason, M. D. (2006). Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical Journal*, 91(11), 4258-4272. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>
- Hirano, T., & Kasono, K. (1993). Spatial distribution of excitatory and inhibitory synapses on a Purkinje cell in a rat cerebellar culture. *Journal of Neurophysiology*, 70(4), 1316-1325. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.4.1316>
- Hirao, K., Hata, Y., Ide, N., Takeuchi, M., Irie, M., Yao, I., Deguchi, M., Toyoda, A., Sudhof, T. C., & Takai, Y. (1998). A Novel Multiple PDZ Domain-containing Molecule Interacting with N-Methyl-d-aspartate Receptors and Neuronal Cell Adhesion Proteins *. *Journal of Biological Chemistry*, 273(33), 21105-21110. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.21105>
- Hong, S., Zhu, J., & Mirkin, C. A. (1999). Multiple Ink Nanolithography : Toward a Multiple-Pen Nano-Plotter. *Science*, 286(5439), 523-525. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.523>
- Hoon, M., Soykan, T., Falkenburger, B., Hammer, M., Patrizi, A., Schmidt, K.-F., Sassoè-Pognetto, M., Löwel, S., Moser, T., Taschenberger, H., Brose, N., & Varoqueaux, F. (2011). Neuroligin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7), 3053-3058. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006946108>
- Hosur, R., Peng, J., Vinayagam, A., Stelzl, U., Xu, J., Perrimon, N., Bienkowska, J., & Berger, B. (2012). A computational framework for boosting confidence in high-throughput protein-protein interaction datasets. *Genome Biology*, 13(8), R76. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-8-r76>
- Hosy, E., Butler, C., & Sibarita, J.-B. (2014). Organization and dynamics of AMPA receptors inside synapses—Nano-organization of AMPA receptors and main synaptic scaffolding proteins revealed by super-resolution imaging. *Current Opinion in Chemical Biology*, 20, 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.017>
- Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines : Connecting dynamics to function. *Journal of Cell Biology*, 189(4), 619-629. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003008>

- Howes, O. D., & Onwordi, E. C. (2023). The synaptic hypothesis of schizophrenia version III : A master mechanism. *Molecular Psychiatry*, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02043-w>
- Hoy, J. L., Constable, J. R., Vicini, S., Fu, Z., & Washbourne, P. (2009). SynCAM1 recruits NMDA receptors via Protein 4.1B. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 42(4), 466-483. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.09.010>
- Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Messier, M., & Moomaw, C. (s. d.). *Neuroigin 1 : A Splice Site-Specific Ligand for I -Neurexins*. 9.
- Ichtchenko, K., Nguyen, T., & Südhof, T. C. (1996). Structures, Alternative Splicing, and Neurexin Binding of Multiple Neuroligins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(5), 2676-2682. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.5.2676>
- Irie, M. (1997). Binding of Neuroligins to PSD-95. *Science*, 277(5331), 1511-1515. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1511>
- Ito, T., Kasai, Y., Kumagai, Y., Suzuki, D., Ochiai-Noguchi, M., Irikura, D., Miyake, S., & Murakami, Y. (2018). Quantitative Analysis of Interaction Between CADM1 and Its Binding Cell-Surface Proteins Using Surface Plasmon Resonance Imaging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00086>
- Izeddin, I., Boulanger, J., Racine, V., Specht, C. G., Kechkar, A., Nair, D., Triller, A., Choquet, D., Dahan, M., & Sibarita, J. B. (2012). Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Optics Express*, 20(3), 2081. <https://doi.org/10.1364/OE.20.002081>
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I. C., Söderström, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., & Bourgeron, T. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*, 34(1), 27-29. <https://doi.org/10.1038/ng1136>
- Jones, E. G., & Powell, T. P. S. (1969). Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *Journal of Cell Science*, 5(2), 509-529. <https://doi.org/10.1242/jcs.5.2.509>
- Jun, S. B., Hynd, M. R., Dowell-Mesfin, N., Smith, K. L., Turner, J. N., Shain, W., & Kim, S. J. (2007). Low-Density Neuronal Networks Cultured using Patterned Poly-L-Lysine on Microelectrode Arrays. *Journal of neuroscience methods*, 160(2), 317-326. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.09.009>
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*, 1(5), 2406-2415. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.356>
- Kalaidzidis, Y. (2009). Multiple objects tracking in fluorescence microscopy. *Journal of Mathematical Biology*, 58(1-2), 57-80. <https://doi.org/10.1007/s00285-008-0180-4>
- Kapanidis, A. N., Uphoff, S., & Stracy, M. (2018). Understanding Protein Mobility in Bacteria by Tracking Single Molecules. *Journal of Molecular Biology*, 430(22), 4443-4455. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.002>
- Kastrup, L., Blom, H., Eggeling, C., & Hell, S. W. (2005). Fluorescence Fluctuation Spectroscopy in Subdiffraction Focal Volumes. *Physical Review Letters*, 94(17), 178104. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.94.178104>
- Kavanagh, D. M., Smyth, A. M., Martin, K. J., Dun, A., Brown, E. R., Gordon, S., Smillie, K. J., Chamberlain, L. H., Wilson, R. S., Yang, L., Lu, W., Cousin, M. A., Rickman, C., & Duncan, R. R. (2014). A molecular toggle after exocytosis sequesters the presynaptic syntaxin1a molecules involved in prior vesicle fusion. *Nature Communications*, 5(1), 5774. <https://doi.org/10.1038/ncomms6774>
- Kay, J. N. (2016). Radial migration : Retinal neurons hold on for the ride. *Journal of Cell Biology*, 215(2), 147-149. <https://doi.org/10.1083/jcb.201609135>

BIBLIOGRAPHIE

- Kechkar, A., Nair, D., Heilemann, M., Choquet, D., & Sibarita, J.-B. (2013). Real-Time Analysis and Visualization for Single-Molecule Based Super-Resolution Microscopy. *PLoS ONE*, *8*(4), e62918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062918>
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., & Phillips, D. C. (1958). A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*, *181*(4610), Art. 4610. <https://doi.org/10.1038/181662a0>
- Kessler, S. W. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent : Parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *115*(6), 1617-1624.
- Kim, E., Xia, Y., & Whitesides, G. M. (1995). Polymer microstructures formed by moulding in capillaries. *Nature*, *376*(6541), Art. 6541. <https://doi.org/10.1038/376581a0>
- Kim, J. A., Kim, D., Won, S. Y., Han, K. A., Park, D., Cho, E., Yun, N., An, H. J., Um, J. W., Kim, E., Lee, J.-O., Ko, J., & Kim, H. M. (2017). Structural Insights into Modulation of Neuroligin-Neuroigin Trans -synaptic Adhesion by MDGA1/Neuroigin-2 Complex. *Neuron*, *94*(6), 1121-1131.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.034>
- Kimura, H., & Cook, P. R. (2001). Kinetics of Core Histones in Living Human Cells : Little Exchange of H3 and H4 and Some Rapid Exchange of H2B. *The Journal of Cell Biology*, *153*.
- Klatt, O., Repetto, D., Brockhaus, J., Reissner, C., El khallouqi, A., Rohlmann, A., Heine, M., & Missler, M. (2021). Endogenous β -neurexins on axons and within synapses show regulated dynamic behavior. *Cell Reports*, *35*(11), 109266. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109266>
- Ko, J., Fuccillo, M. V., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2009a). LRRTM2 Functions as a Neurexin Ligand in Promoting Excitatory Synapse Formation. *Neuron*, *64*(6), 791-798. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.012>
- Ko, J., Fuccillo, M. V., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (2009b). LRRTM2 Functions as a Neurexin Ligand in Promoting Excitatory Synapse Formation. *Neuron*, *64*(6), 791-798. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.012>
- Kodoyianni, V. (2011). Label-free analysis of biomolecular interactions using SPR imaging. *BioTechniques*, *50*(1), 32-40. <https://doi.org/10.2144/000113569>
- Koppel, D. E., Axelrod, D., Schlessinger, J., Elson, E. L., & Webb, W. W. (1976). Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. *Biophysical Journal*, *16*(11), 1315-1329. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1334960/>
- Kretschmann, E. (s. d.). *Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächplasmaschwingungen*.
- Kumar, A., & Whitesides, G. M. (1993). Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol "ink" followed by chemical etching. *Applied Physics Letters*, *63*(14), 2002-2004. <https://doi.org/10.1063/1.110628>
- Kuo, C.-W., Shiu, J.-Y., Cho, Y.-H., & Chen, P. (2003). Fabrication of Nanoimprint Stamps by Nanosphere Lithography. *MRS Proceedings*, *776*, Q5.30. <https://doi.org/10.1557/PROC-776-Q5.30>
- 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. *Biophysical Journal*, *65*(5), 2021-2040. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81253-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81253-0)

- Kwon, H.-B., & Sabatini, B. L. (2011). Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature*, 474(7349), Art. 7349. <https://doi.org/10.1038/nature09986>
- Lagardère, M., Chamma, I., Bouilhol, E., Nikolski, M., & Thoumine, O. (2020). FluoSim : Simulator of single molecule dynamics for fluorescence live-cell and super-resolution imaging of membrane proteins. *Scientific Reports*, 10(1), 19954. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75814-y>
- Lagerholm, B. C., & Thompson, N. L. (1998). Theory for Ligand Rebinding at Cell Membrane Surfaces. *Biophysical Journal*, 74(3), 1215-1228. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77836-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77836-1)
- Laurén, J., Airaksinen, M. S., Saarma, M., & Timmusk, T. õnis. (2003). A novel gene family encoding leucine-rich repeat transmembrane proteins differentially expressed in the nervous system☆☆Sequence data from this article have been deposited with the DDBJ/EMBL/GenBank Data Libraries under Accession Nos. AY182024 (human LRRTM1), AY182026 (human LRRTM2), AY182028 (human LRRTM3), AY182030 (human LRRTM4), AY182025 (mouse LRRTM1), AY182027 (mouse LRRTM2), AY182029 (mouse LRRTM3), and AY182031 (mouse LRRTM4). *Genomics*, 81(4), 411-421. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00030-2)
- Lee, S.-J., Wei, M., Zhang, C., Maxeiner, S., Pak, C., Calado Botelho, S., Trotter, J., Sterky, F. H., & Südhof, T. C. (2017). Presynaptic Neuronal Pentraxin Receptor Organizes Excitatory and Inhibitory Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 37(5), 1062-1080. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2768-16.2016>
- Leïchlé, T., Saya, D., Pourciel, J.-B., Mathieu, F., Nicu, L., & Bergaud, C. (2006). Liquid loading of silicon-based cantilevers using electrowetting actuation for microspotting applications. *Sensors and Actuators A: Physical*, 132(2), 590-596. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2006.02.054>
- Leone, P., Comoletti, D., Ferracci, G., Conrod, S., Garcia, S. U., Taylor, P., Bourne, Y., & Marchot, P. (2010). Structural insights into the exquisite selectivity of neurexin/neuroigin synaptic interactions. *The EMBO Journal*, 29(14), 2461-2471. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.123>
- Letellier, M., Szíber, Z., Chamma, I., Saphy, C., Papasideri, I., Tessier, B., Sainlos, M., Czöndör, K., & Thoumine, O. (2018). A unique intracellular tyrosine in neuroigin-1 regulates AMPA receptor recruitment during synapse differentiation and potentiation. *Nature Communications*, 9, 3979. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06220-2>
- Lévi, S., Schweizer, C., Bannai, H., Pascual, O., Charrier, C., & Triller, A. (2008). Homeostatic Regulation of Synaptic GlyR Numbers Driven by Lateral Diffusion. *Neuron*, 59(2), 261-273. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.030>
- Li, H., Kang, D.-J., Blamire, M. G., & Huck, W. T. S. (2002). High-Resolution Contact Printing with Dendrimers. *Nano Letters*, 2(4), 347-349. <https://doi.org/10.1021/nl025503c>
- Li, N., & Ho, C.-M. (2008). Photolithographic patterning of organosilane monolayer for generating large area two-dimensional B lymphocyte arrays. *Lab on a Chip*, 8(12), 2105. <https://doi.org/10.1039/b810329a>
- Li Wei, Xu Zhen, & Shi, P. (2013). Micropatterning of bioactive ligands for high-throughput study neuronal network functions. *2013 13th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO 2013)*, 170-173. <https://doi.org/10.1109/NANO.2013.6720879>

BIBLIOGRAPHIE

- Liedberg, B., Nylander, C., & Lunström, I. (1983). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*, 4, 299-304. [https://doi.org/10.1016/0250-6874\(83\)85036-7](https://doi.org/10.1016/0250-6874(83)85036-7)
- Linhoff, M. W., Laurén, J., Cassidy, R. M., Dobie, F. A., Takahashi, H., Nygaard, H. B., Airaksinen, M. S., Strittmatter, S. M., & Craig, A. M. (2009). An Unbiased Expression Screen for Synaptogenic Proteins Identifies the LRRTM Protein Family as Synaptic Organizers. *Neuron*, 61(5), 734-749. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.017>
- Lisman, J. E., Raghavachari, S., & Tsien, R. W. (2007). The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(8), 597-609. <https://doi.org/10.1038/nrn2191>
- Liu, D. S., Loh, K. H., Lam, S. S., White, K. A., & Ting, A. Y. (2013). Imaging Trans-Cellular Neurexin-Neurologin Interactions by Enzymatic Probe Ligation. *PLoS ONE*, 8(2), e52823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052823>
- Löchte, S., Waichman, S., Beutel, O., You, C., & Piehler, J. (2014). Live cell micropatterning reveals the dynamics of signaling complexes at the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*, 207(3), 407-418. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406032>
- Lucido, A. L., Suarez Sanchez, F., Thostrup, P., Kwiatkowski, A. V., Leal-Ortiz, S., Gopalakrishnan, G., Liazoghli, D., Belkaid, W., Lennox, R. B., Grutter, P., Garner, C. C., & Colman, D. R. (2009). Rapid Assembly of Functional Presynaptic Boutons Triggered by Adhesive Contacts. *The Journal of Neuroscience*, 29(40), 12449-12466. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1381-09.2009>
- Luo, X., Aoun, L., Biarnes-Pelicot, M., Strale, P.-O., Studer, V., Valignat, M.-P., & Theodoly, O. (2019). Different integrins mediate haptotaxis of T lymphocytes towards either lower or higher adhesion zones. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/509240>
- Ly, C. V., & Verstreken, P. (2006). Mitochondria at the Synapse. *The Neuroscientist*, 12(4), 291-299. <https://doi.org/10.1177/1073858406287661>
- MacBeath, G., & Schreiber, S. L. (2000). Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science*, 289(5485), 1760-1763. <https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1760>
- Magde, D., Elson, E., & Webb, W. W. (1972). Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Physical Review Letters*, 29(11), 705-708. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.29.705>
- Manley, S., Gillette, J. M., Patterson, G. H., Shroff, H., Hess, H. F., Betzig, E., & Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature Methods*, 5(2), 155-157. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1176>
- Marianayagam, N. J., Sunde, M., & Matthews, J. M. (2004). The power of two : Protein dimerization in biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(11), 618-625. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.09.006>
- Marrone, D. F., & Petit, T. L. (2002). The role of synaptic morphology in neural plasticity : Structural interactions underlying synaptic power. *Brain Research Reviews*, 38(3), 291-308. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00147-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00147-3)
- Martin, T. A., Herman, C. T., Limpoco, F. T., Michael, M. C., Potts, G. K., & Bailey, R. C. (2011). Quantitative Photochemical Immobilization of Biomolecules on Planar and Corrugated Substrates : A Versatile Strategy for Creating Functional Biointerfaces. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(9), 3762-3771. <https://doi.org/10.1021/am2009597>

- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429(6993), Art. 6993. <https://doi.org/10.1038/nature02617>
- Meier, J., Vannier, C., Sergé, A., Triller, A., & Choquet, D. (2001). Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nature Neuroscience*, 4(3), 253-260. <https://doi.org/10.1038/85099>
- Meijer, M., Rehbach, K., Brunner, J. W., Classen, J. A., Lammertse, H. C. A., van Linge, L. A., Schut, D., Krutenko, T., Hebisch, M., Cornelisse, L. N., Sullivan, P. F., Peitz, M., Toonen, R. F., Brüstle, O., & Verhage, M. (2019). A Single-Cell Model for Synaptic Transmission and Plasticity in Human iPSC-Derived Neurons. *Cell Reports*, 27(7), 2199-2211.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.058>
- Meyer, G., Varoqueaux, F., Neeb, A., Oschlies, M., & Brose, N. (2004). The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses : A case study on neuroligin. *Neuropharmacology*, 47(5), 724-733. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.06.023>
- Michalet, X. (2010). Mean Square Displacement Analysis of Single-Particle Trajectories with Localization Error : Brownian Motion in Isotropic Medium. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 82(4 Pt 1), 041914. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3055791/>
- Miermans, C. A., Kusters, R. P. T., Hoogenraad, C. C., & Storm, C. (2017). Biophysical model of the role of actin remodeling on dendritic spine morphology. *PLOS ONE*, 12(2), e0170113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170113>
- Miernyk, J. A., & Thelen, J. J. (2008). Biochemical approaches for discovering protein–protein interactions. *The Plant Journal*, 53(4), 597-609. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03316.x>
- Missler, M., Zhang, W., Rohlmann, A., Kattenstroth, G., Hammer, R. E., Gottmann, K., & Südhof, T. C. (2003). α -Neurexins couple Ca^{2+} channels to synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 423(6943), Art. 6943. <https://doi.org/10.1038/nature01755>
- Molk, J. N., Schuyler, S. C., Liu, J. Y., Evans, J. G., Salmon, E. D., Pellman, D., & Bloom, K. (2004). The Differential Roles of Budding Yeast Tem1p, Cdc15p, and Bub2p Protein Dynamics in Mitotic Exit. *Molecular Biology of the Cell*, 15(4), 1519-1532. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-09-0708>
- Mondin, M., Labrousse, V., Hosy, E., Heine, M., Tessier, B., Levet, F., Poujol, C., Blanchet, C., Choquet, D., & Thoumine, O. (2011). Neurexin-Neuroligin Adhesions Capture Surface-Diffusing AMPA Receptors through PSD-95 Scaffolds. *Journal of Neuroscience*, 31(38), 13500-13515. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6439-10.2011>
- Montiel, D., Cang, H., & Yang, H. (2006). Quantitative Characterization of Changes in Dynamical Behavior for Single-Particle Tracking Studies. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(40), 19763-19770. <https://doi.org/10.1021/jp062024j>
- Moretto, E., Murru, L., Martano, G., Sassone, J., & Passafaro, M. (2018). Glutamatergic synapses in neurodevelopmental disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 84, 328-342. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.09.014>
- Mossman, K. D. (2005). Altered TCR Signaling from Geometrically Repatterned Immunological Synapses. *Science*, 310(5751), 1191-1193. <https://doi.org/10.1126/science.1119238>
- Motsch, V., Brameshuber, M., Baumgart, F., Schütz, G. J., & Sevcsik, E. (2019). A micropatterning platform for quantifying interaction kinetics between the T cell

BIBLIOGRAPHIE

- receptor and an intracellular binding protein. *Scientific Reports*, 9(1), 3288. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39865-0>
- Mozhayeva, M. G., Sara, Y., Liu, X., & Kavalali, E. T. (2002). Development of Vesicle Pools during Maturation of Hippocampal Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 654-665. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00654.2002>
- Mueller, F., Wach, P., & McNally, J. G. (2008). Evidence for a Common Mode of Transcription Factor Interaction with Chromatin as Revealed by Improved Quantitative Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Biophysical Journal*, 94(8), 3323-3339. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.123182>
- Murthy, V. N., Schikorski, T., Stevens, C. F., & Zhu, Y. (2001). Inactivity Produces Increases in Neurotransmitter Release and Synapse Size. *Neuron*, 32(4), 673-682. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00500-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00500-1)
- Nakada, C., Ritchie, K., Oba, Y., Nakamura, M., Hotta, Y., Iino, R., Kasai, R. S., Yamaguchi, K., Fujiwara, T., & Kusumi, A. (2003). Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nature Cell Biology*, 5(7), 626-632. <https://doi.org/10.1038/ncb1009>
- Nam, C. I., & Chen, L. (2005). Postsynaptic assembly induced by neurexin-neurologin interaction and neurotransmitter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(17), 6137-6142. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502038102>
- Neupert, C., Schneider, R., Klatt, O., Reissner, C., Repetto, D., Biermann, B., Niesmann, K., Missler, M., & Heine, M. (2015). Regulated Dynamic Trafficking of Neurexins Inside and Outside of Synaptic Terminals. *The Journal of Neuroscience*, 35(40), 13629-13647. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4041-14.2015>
- Niemelä, P. S., Miettinen, M. S., Monticelli, L., Hammaren, H., Bjelkmar, P., Murtola, T., Lindahl, E., & Vattulainen, I. (2010). Membrane Proteins Diffuse as Dynamic Complexes with Lipids. *Journal of the American Chemical Society*, 132(22), 7574-7575. <https://doi.org/10.1021/ja101481b>
- Nikitczuk, J. S., Patil, S. B., Matikainen-Ankney, B. A., Scarpa, J., Shapiro, M. L., Benson, D. L., & Huntley, G. W. (2014). N-cadherin regulates molecular organization of excitatory and inhibitory synaptic circuits in adult hippocampus in vivo : Novel roles for N-cadherin at mature forebrain synapses. *Hippocampus*, 24(8), 943-962. <https://doi.org/10.1002/hipo.22282>
- Ning-Ping Huang, †, Roger Michel, †, Janos Voros, †, Marcus Textor, †, Rolf Hofer, †, Antonella Rossi, †, Donald L. Elbert, ‡, Jeffrey A. Hubbell, ‡ and, & Nicholas D. Spencer*, †. (2000, décembre 21). *Poly(l-lysine)-g-poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces : Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption* (world) [Research-article]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/la000736+>
- Nishiyama, J. (2019). Plasticity of dendritic spines : Molecular function and dysfunction in neurodevelopmental disorders. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 73(9), 541-550. <https://doi.org/10.1111/pcn.12899>
- Nooren, I. M. A., & Thornton, J. M. (2003). NEW EMBO MEMBER'S REVIEW. *The EMBO Journal*, 22(14), 3486-3492. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg359>
- Norde, W. (1986). Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 25, 267-340. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(86\)80012-4](https://doi.org/10.1016/0001-8686(86)80012-4)

- Northrup, S. H., & Erickson, H. P. (1992). Kinetics of protein-protein association explained by Brownian dynamics computer simulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8), 3338-3342. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC48862/>
- Oh, W. C., Lutz, S., Castillo, P. E., & Kwon, H.-B. (2016). De novo synaptogenesis induced by GABA in the developing mouse cortex. *Science*, 353(6303), 1037-1040. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5206>
- Oscarsson, S. (1997). Factors affecting protein interaction at sorbent interfaces. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 699(1-2), 117-131. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00224-7)
- Ozgul, S., von Daake, S., Kakehi, S., Sereni, D., Denissova, N., Hanlon, C., Huang, Y. J., Everett, J. K., Yin, C., Montelione, G. T., & Comoletti, D. (2019). An ELISA-Based Screening Platform for Ligand–Receptor Discovery. In *Methods in Enzymology* (Vol. 615, p. 453-475). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.10.001>
- Paatero, A., Rosti, K., Shkumatov, A. V., Sele, C., Brunello, C., Kysenius, K., Singha, P., Jokinen, V., Huttunen, H., & Kajander, T. (2016). Crystal Structure of an Engineered LRRTM2 Synaptic Adhesion Molecule and a Model for Neurexin Binding. *Biochemistry*, 55(6), 914-926. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00971>
- Pagani, M., Barsotti, N., Bertero, A., Trakoshis, S., Ulysse, L., Locarno, A., Miseviciute, I., De Felice, A., Canella, C., Supekar, K., Galbusera, A., Menon, V., Tonini, R., Deco, G., Lombardo, M. V., Pasqualetti, M., & Gozzi, A. (2021). MTOR-related synaptic pathology causes autism spectrum disorder-associated functional hyperconnectivity. *Nature Communications*, 12(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26131-z>
- Pak, D. T. S., Yang, S., Rudolph-Correia, S., Kim, E., & Sheng, M. (2001). Regulation of Dendritic Spine Morphology by SPAR, a PSD-95-Associated RapGAP. *Neuron*, 31(2), 289-303. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00355-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00355-5)
- Palankar, R., Medvedev, N., Rong, A., & Delcea, M. (2013). Fabrication of Quantum Dot Microarrays Using Electron Beam Lithography for Applications in Analyte Sensing and Cellular Dynamics. *ACS Nano*, 7(5), 4617-4628. <https://doi.org/10.1021/nn401424y>
- Palay, S. L., McGee-Russell, S. M., Gordon, S., & Grillo, M. A. (1962). FIXATION OF NEURAL TISSUES FOR ELECTRON MICROSCOPY BY PERFUSION WITH SOLUTIONS OF OSMIUM TETROXIDE. *Journal of Cell Biology*, 12(2), 385-410. <https://doi.org/10.1083/jcb.12.2.385>
- Palsdottir, H., & Hunte, C. (2004). Lipids in membrane protein structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1666(1-2), 2-18. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.06.012>
- Park, J. A., Yoon, S., Kwon, J., Now, H., Kim, Y. K., Kim, W.-J., Yoo, J.-Y., & Jung, S. (2017). Freeform micropatterning of living cells into cell culture medium using direct inkjet printing. *Scientific Reports*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14726-w>
- Paul, F. E., Hosp, F., & Selbach, M. (2011). Analyzing protein–protein interactions by quantitative mass spectrometry. *Methods*, 54(4), 387-395. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.03.001>
- Pchitskaya, E., & Bezprozvanny, I. (2020). Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 31. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00031>

BIBLIOGRAPHIE

- Pereiro, I., Cors, J. F., Pané, S., Nelson, B. J., & Kaigala, G. V. (2019). Underpinning transport phenomena for the patterning of biomolecules. *Chemical Society Reviews*, 48(5), 1236-1254. <https://doi.org/10.1039/C8CS00852C>
- Perez de Arce, K., Schrod, N., Metzbower, S. W. R., Allgeyer, E., Kong, G. K.-W., Tang, A.-H., Krupp, A. J., Stein, V., Liu, X., Bewersdorf, J., Blanpied, T. A., Lucić, V., & Biederer, T. (2015). Topographic Mapping of the Synaptic Cleft into Adhesive Nanodomains. *Neuron*, 88(6), 1165-1172. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.011>
- Perrakis, A., Musacchio, A., Cusack, S., & Petosa, C. (2011). Investigating a macromolecular complex : The toolkit of methods. *Journal of Structural Biology*, 175(2), 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.05.014>
- Persson, F., Lindén, M., Unoson, C., & Elf, J. (2013). Extracting intracellular diffusive states and transition rates from single-molecule tracking data. *Nature Methods*, 10(3), 265-269. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2367>
- Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G., & North, A. C. T. (1960). Structure of Hæmoglobin : A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å. Resolution, Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*, 185(4711), Art. 4711. <https://doi.org/10.1038/185416a0>
- Phillips, G. R., Huang, J. K., Wang, Y., Tanaka, H., Shapiro, L., Zhang, W., Shan, W.-S., Arndt, K., Frank, M., Gordon, R. E., Gawinowicz, M. A., Zhao, Y., & Colman, D. R. (2001). The Presynaptic Particle Web : Ultrastructure, Composition, Dissolution, and Reconstitution. *Neuron*, 32(1), 63-77. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00450-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00450-0)
- Pinaud, F., Michalet, X., Iyer, G., Margeat, E., Moore, H.-P., & Weiss, S. (2009). Dynamic Partitioning of a GPI-Anchored Protein in Glycosphingolipid-Rich Microdomains Imaged by Single-Quantum Dot Tracking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(6), 691-712. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00902.x>
- Piner, R. D., Zhu, J., Xu, F., Hong, S., & Mirkin, C. A. (1999). « Dip-Pen » Nanolithography. *Science*, 283(5402), 661-663. <https://doi.org/10.1126/science.283.5402.661>
- Podobnik, M., Kraševc, N., Bedina Zavec, A., Naneh, O., Flašker, A., Caserman, S., Hodnik, V., & Anderluh, G. (2016). How to Study Protein-protein Interactions. *Acta Chimica Slovenica*, 424-439. <https://doi.org/10.17344/acsi.2016.2419>
- Poulopoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., Zhang, M., Paarmann, I., Fuchs, C., Harvey, K., Jedlicka, P., Schwarzacher, S. W., Betz, H., Harvey, R. J., Brose, N., Zhang, W., & Varoqueaux, F. (2009). Neuroligin 2 Drives Postsynaptic Assembly at Perisomatic Inhibitory Synapses through Gephyrin and Collybistin. *Neuron*, 63(5), 628-642. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.023>
- Poulopoulos, A., Soykan, T., Tuffy, L. P., Hammer, M., Varoqueaux, F., & Brose, N. (2012). Homodimerization and isoform-specific heterodimerization of neuroligins. *Biochemical Journal*, 446(2), 321-330. <https://doi.org/10.1042/BJ20120808>
- Qu, L., Akbergenova, Y., Hu, Y., & Schikorski, T. (2009). Synapse-to-synapse variation in mean synaptic vesicle size and its relationship with synaptic morphology and function. *The Journal of Comparative Neurology*, 514(4), 343-352. <https://doi.org/10.1002/cne.22007>
- Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N., & Kumar, G. N. S. (2014). Protein-Protein Interaction Detection : Methods and Analysis. *International Journal of Proteomics*, 2014, 147648. <https://doi.org/10.1155/2014/147648>

- Reissner, C., Klose, M., Fairless, R., & Missler, M. (2008). Mutational analysis of the neurexin/neuroligin complex reveals essential and regulatory components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(39), 15124-15129. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801639105>
- Renner, M. L., Cognet, L., Lounis, B., Triller, A., & Choquet, D. (2009). The excitatory postsynaptic density is a size exclusion diffusion environment. *Neuropharmacology*, *56*(1), 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.022>
- Renner, M., Schweizer, C., Bannai, H., Triller, A., & Lévi, S. (2012). Diffusion Barriers Constrain Receptors at Synapses. *PLoS ONE*, *7*(8), e43032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043032>
- Renner, M., Wang, L., Levi, S., Hennekinne, L., & Triller, A. (2017). A Simple and Powerful Analysis of Lateral Subdiffusion Using Single Particle Tracking. *Biophysical Journal*, *113*(11), 2452-2463. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.09.017>
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., & Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*, *17*(10), 1030-1032. <https://doi.org/10.1038/13732>
- Rigby, M., Grillo, F. W., Compans, B., Neves, G., Gallinaro, J., Nashashibi, S., Horton, S., Pereira Machado, P. M., Carbajal, M. A., Vizcay-Barrena, G., Levet, F., Sibarita, J.-B., Kirkland, A., Fleck, R. A., Clopath, C., & Burrone, J. (2023). Multi-synaptic boutons are a feature of CA1 hippocampal connections in the stratum oriens. *Cell Reports*, *42*(5), 112397. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112397>
- Rika, J., & Binkert, Th. (1989). Direct measurement of a distinct correlation function by fluorescence cross correlation. *Physical Review A*, *39*(5), 2646-2652. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.39.2646>
- Rizzoli, S. O., & Betz, W. J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(1), 57-69. <https://doi.org/10.1038/nrn1583>
- Robbins, E. M., Krupp, A. J., Perez de Arce, K., Ghosh, A. K., Fogel, A. I., Boucard, A., Südhof, T. C., Stein, V., & Biederer, T. (2010). SynCAM 1 Adhesion Dynamically Regulates Synapse Number and Impacts Plasticity and Learning. *Neuron*, *68*(5), 894-906. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.003>
- Roosen-Runge, F., Hennig, M., Zhang, F., Jacobs, R. M. J., Sztucki, M., Schober, H., Seydel, T., & Schreiber, F. (2011). Protein self-diffusion in crowded solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(29), 11815-11820. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107287108>
- Roppongi, R. T., Dhume, S. H., Padmanabhan, N., Silwal, P., Zahra, N., Karimi, B., Bomkamp, C., Patil, C. S., Champagne-Jorgensen, K., Twilley, R. E., Zhang, P., Jackson, M. F., & Siddiqui, T. J. (2020). LRRTMs Organize Synapses through Differential Engagement of Neurexin and PTP σ . *Neuron*, *106*(1), 108-125.e12. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.01.003>
- Roppongi, R. T., Karimi, B., & Siddiqui, T. J. (2017). Role of LRRTMs in synapse development and plasticity. *Neuroscience Research*, *116*, 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.10.003>
- Rudenko, G., Nguyen, T., Chelliah, Y., & Deisenhofer, J. (s. d.). *The Structure of the Ligand-Binding Domain of Neurexin I α : Regulation of LNS Domain Function by Alternative Splicing*.

BIBLIOGRAPHIE

- Ruska, E. (1987). The Development of the Electron Microscope and of Electron Microscopy (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 26(7), 595-605. <https://doi.org/10.1002/anie.198705953>
- Ryu, J. R., Kim, J. H., Cho, H. M., Jo, Y., Lee, B., Joo, S., Chae, U., Nam, Y., Cho, I.-J., & Sun, W. (2019). A monitoring system for axonal growth dynamics using micropatterns of permissive and Semaphorin 3F chemorepulsive signals. *Lab on a Chip*, 19(2), 291-305. <https://doi.org/10.1039/C8LC00845K>
- Sainlos, M., Tigaret, C., Poujol, C., Olivier, N. B., Bard, L., Breillat, C., Thiolon, K., Choquet, D., & Imperiali, B. (2011). Biomimetic divalent ligands for the acute disruption of synaptic AMPAR stabilization. *Nature Chemical Biology*, 7(2), 81-91. <https://doi.org/10.1038/nchembio.498>
- Saint-Michel, E., Giannone, G., Choquet, D., & Thoumine, O. (2009). Neurexin/Neuroigin Interaction Kinetics Characterized by Counting Single Cell-Surface Attached Quantum Dots. *Biophysical Journal*, 97(2), 480-489. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.04.044>
- Sako, Y., & Uyemura, T. (2002). Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy for Single-molecule Imaging in Living Cells. *Cell Structure and Function*, 27(5), 357-365. <https://doi.org/10.1247/csf.27.357>
- Sakurai-Yageta, M., Maruyama, T., Suzuki, T., Ichikawa, K., & Murakami, Y. (2015). Dynamic Regulation of a Cell Adhesion Protein Complex Including CADM1 by Combinatorial Analysis of FRAP with Exponential Curve-Fitting. *PLOS ONE*, 10(3), e0116637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116637>
- Santello, M., Cali, C., & Bezzi, P. (2012). Gliotransmission and the Tripartite Synapse. In M. R. Kreutz & C. Sala (Éds.), *Synaptic Plasticity : Dynamics, Development and Disease* (p. 307-331). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_14
- Santuy, A., Rodriguez, J. R., DeFelipe, J., & Merchán-Pérez, A. (2018). Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex. *Brain Structure and Function*, 223(1), 77-90. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1470-7>
- Sawin, K. E., & Nurse, P. (1997). Photoactivation of green fluorescent protein. *Current Biology*, 7(10), R606-R607. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00313-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00313-7)
- Saxton, M. J., & Jacobson, K. (1997). SINGLE-PARTICLE TRACKING: Applications to Membrane Dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 26(1), 373-399. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.26.1.373>
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., & Serafini, T. (2000). Neuroigin Expressed in Nonneuronal Cells Triggers Presynaptic Development in Contacting Axons. *Cell*, 101(6), 657-669. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80877-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80877-6)
- Schikorski, T., & Stevens, C. F. (1997). Quantitative Ultrastructural Analysis of Hippocampal Excitatory Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 17(15), 5858-5867. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05858.1997>
- Schlüter, O. M., Basu, J., Südhof, T. C., & Rosenmund, C. (2006). Rab3 Superprimers Synaptic Vesicles for Release : Implications for Short-Term Synaptic Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 26(4), 1239-1246. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3553-05.2006>
- Schmid, E. M., Bakalar, M. H., Choudhuri, K., Weichsel, J., Ann, H. S., Geissler, P. L., Dustin, M. L., & Fletcher, D. A. (2016). Size-dependent protein segregation at membrane interfaces. *Nature Physics*, 12(7), 704-711. <https://doi.org/10.1038/nphys3678>
- Schwarzenbacher, M., Kaltenbrunner, M., Brameshuber, M., Hesch, C., Paster, W., Weghuber, J., Heise, B., Sonnleitner, A., Stockinger, H., & Schütz, G. J. (2008). Micropatterning for

- quantitative analysis of protein-protein interactions in living cells. *Nature Methods*, 5(12), 1053-1060. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1268>
- Schwille, P., Meyer-Almes, F. J., & Rigler, R. (1997). Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophysical Journal*, 72(4), 1878-1886. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78833-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78833-7)
- Scott, M. A., Wissner-Gross, Z. D., & Yanik, M. F. (2012). Ultra-Rapid Laser Protein Micropatterning : Screening For Directed Polarization of Single Neurons. *Lab on a Chip*, 12(12), 2265-2276. <https://doi.org/10.1039/c2lc21105j>
- Seiradake, E., Jones, E. Y., & Klein, R. (2016). Structural Perspectives on Axon Guidance. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32(1), 577-608. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125008>
- Shah, N. B., & Duncan, T. M. (2014). Bio-layer Interferometry for Measuring Kinetics of Protein-protein Interactions and Allosteric Ligand Effects. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 84, 51383. <https://doi.org/10.3791/51383>
- Shapiro, L., Fannont, A. M., Kwong, P. D., & Thompson, A. (1995). *Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins*. 374.
- Shipman, S. L., & Nicoll, R. A. (2012). Dimerization of postsynaptic neuroligin drives synaptic assembly via transsynaptic clustering of neurexin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), 19432-19437. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217633109>
- Shirayoshi, Y., Hatta, K., Hosoda, M., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., & Takeichi, M. (1986). Cadherin cell adhesion molecules with distinct binding specificities share a common structure. *The EMBO Journal*, 5(10), 2485-2488. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04525.x>
- Sibarita, J.-B. (2014). High-density single-particle tracking : Quantifying molecule organization and dynamics at the nanoscale. *Histochemistry and Cell Biology*, 141(6), 587-595. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1214-1>
- Siddiqui, T. J., Pancaroglu, R., Kang, Y., Rooyackers, A., & Craig, A. M. (2010). LRRTMs and Neuroligins Bind Neurexins with a Differential Code to Cooperate in Glutamate Synapse Development. *Journal of Neuroscience*, 30(22), 7495-7506. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0470-10.2010>
- Sidhu, S. S., Fairbrother, W. J., & Deshayes, K. (2003). Exploring Protein-Protein Interactions with Phage Display. *ChemBioChem*, 4(1), 14-25. <https://doi.org/10.1002/cbic.200390008>
- Sikkema, K., Cross, G. S., Hanner, M. J., & Priddy, D. B. (s. d.). *Photo-degradable polystyrene Part I: enhancing the photo-degradability of polystyrene by the addition of photosensitizers*.
- Silverman, J. B., Restituito, S., Lu, W., Lee-Edwards, L., Khatri, L., & Ziff, E. B. (2007). Synaptic Anchorage of AMPA Receptors by Cadherins through Neural Plakophilin-Related Arm Protein-AMPA Receptor-Binding Protein Complexes. *The Journal of Neuroscience*, 27(32), 8505-8516. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1395-07.2007>
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 175(4023), 720-731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- Smith, C. S., Joseph, N., Rieger, B., & Lidke, K. A. (2010). Fast, single-molecule localization that achieves theoretically minimum uncertainty. *Nature Methods*, 7(5), 373-375. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1449>

BIBLIOGRAPHIE

- Smith, G. P. (1985). Filamentous Fusion Phage : Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*, 228(4705), 1315-1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>
- Song, J.-Y., Ichtchenko, K., Südhof, T. C., & Brose, N. (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 1100-1105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC15357/>
- Sorra, K. E., & Harris, K. M. (2000). Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10(5), 501-511. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:5<501::AID-HIPO1>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:5<501::AID-HIPO1>3.0.CO;2-T)
- Soumpasis, D. M. (1983). Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal*, 41(1), 95-97. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(83\)84410-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(83)84410-5)
- Spacek, J., & Harris, K. M. (1997). Three-Dimensional Organization of Smooth Endoplasmic Reticulum in Hippocampal CA1 Dendrites and Dendritic Spines of the Immature and Mature Rat. *Journal of Neuroscience*, 17(1), 190-203. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-01-00190.1997>
- Sposini, S., Rosendale, M., Claverie, L., Van, T. N. N., Jullié, D., & Perrais, D. (2020). Imaging endocytic vesicle formation at high spatial and temporal resolutions with the pulsed-pH protocol. *Nature Protocols*, 15(9), 3088-3104. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0371-z>
- Sprague, B. L., Pego, R. L., Stavreva, D. A., & McNally, J. G. (2004). Analysis of Binding Reactions by Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Biophysical Journal*, 86(6), 3473-3495. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.026765>
- Sprague, B., & McNally, J. (2005). FRAP analysis of binding : Proper and fitting. *Trends in Cell Biology*, 15(2), 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.12.001>
- Stacho, M., & Manahan-Vaughan, D. (2022). The Intriguing Contribution of Hippocampal Long-Term Depression to Spatial Learning and Long-Term Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2022.806356>
- Stagi, M., Fogel, A. I., & Biederer, T. (2010). SynCAM 1 participates in axo-dendritic contact assembly and shapes neuronal growth cones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 200911798. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911798107>
- Strale, P.-O., Azioune, A., Bugnicourt, G., Lecomte, Y., Chahid, M., & Studer, V. (2016). Multiprotein Printing by Light-Induced Molecular Adsorption. *Advanced Materials*, 28(10), 2024-2029. <https://doi.org/10.1002/adma.201504154>
- Südhof, T. C. (2017). Synaptic Neurexin Complexes : A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell*, 171(4), 745-769. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.024>
- Südhof, T. C. (2018). Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron*, 100(2), 276-293. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.040>
- Südhof, T. C. (2021). The cell biology of synapse formation. *Journal of Cell Biology*, 220(7), e202103052. <https://doi.org/10.1083/jcb.202103052>
- Sugita, S., Saito, F., Tang, J., Satz, J., Campbell, K., & Südhof, T. C. (2001). A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *The Journal of Cell Biology*, 154(2), 435-446. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105003>
- Tabdanov, E. D., Puram, V., Zhovmer, A., & Provenzano, P. P. (2018). Microtubule-Actomyosin Mechanical Cooperation during Contact Guidance Sensing. *Cell Reports*, 25(2), 328-338.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.030>

- Tabuchi, K., & Südhof, T. C. (2002). Structure and Evolution of Neurexin Genes : Insight into the Mechanism of Alternative Splicing. *Genomics*, 79(6), 849-859. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6780>
- Takács, V. T., Cserép, C., Schlingloff, D., Pósfai, B., Szőnyi, A., Sos, K. E., Környei, Z., Dénes, Á., Gulyás, A. I., Freund, T. F., & Nyiri, G. (2018). Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states. *Nature Communications*, 9(1), 2848. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05136-1>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tan, C. X., & Eroglu, C. (2021). Cell adhesion molecules regulating astrocyte–neuron interactions. *Current Opinion in Neurobiology*, 69, 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.03.015>
- Tanaka, H., Shan, W., Phillips, G. R., Arndt, K., Bozdagi, O., Shapiro, L., Huntley, G. W., Benson, D. L., & Colman, D. R. (2000). Molecular Modification of N-Cadherin in Response to Synaptic Activity. *Neuron*, 25(1), 93-107. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80874-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80874-0)
- Tang, A.-H., Chen, H., Li, T. P., Metzbower, S. R., MacGillavry, H. D., & Blanpied, T. A. (2016). A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature*, 536(7615), 210-214. <https://doi.org/10.1038/nature19058>
- Tardin, C., Cognet, L., Bats, C., Lounis, B., & Choquet, D. (2003). Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *The EMBO Journal*, 22(18), 4656-4665. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg463>
- Tarsa, L., & Goda, Y. (2002). Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 1012-1016. <https://doi.org/10.1073/pnas.022575999>
- Taverna, E., Götz, M., & Huttner, W. B. (2014). The Cell Biology of Neurogenesis : Toward an Understanding of the Development and Evolution of the Neocortex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 465-502. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155801>
- The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays. (1913). *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 89(610), 248-277. <https://doi.org/10.1098/rspa.1913.0083>
- Théry, M., Pépin, A., Dressaire, E., Chen, Y., & Bornens, M. (2006). Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 63(6), 341-355. <https://doi.org/10.1002/cm.20126>
- Théry, M., & Piel, M. (2009). Adhesive Micropatterns for Cells : A Microcontact Printing Protocol. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(7), pdb.prot5255. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5255>
- Thibault, C., Le Berre, V., Casimirus, S., Trévisiol, E., François, J., & Vieu, C. (2005). Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications. *Journal of Nanobiotechnology*, 3(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-7>
- Thomas, L. A., Akins, M. R., & Biederer, T. (2008). Expression and Adhesion Profiles of SynCAM Adhesion Molecules Indicate Distinct Neuronal Functions. *The Journal of comparative neurology*, 510(1), 47-67. <https://doi.org/10.1002/cne.21773>

BIBLIOGRAPHIE

- Thoumine, O., Ewers, H., Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Giannone, G., Poujol, C., Legros, P., Lounis, B., Cognet, L., & Choquet, D. (2008). Probing the Dynamics of Protein–Protein Interactions at Neuronal Contacts by Optical Imaging. *Chemical Reviews*, *108*(5), 1565-1587. <https://doi.org/10.1021/cr078204m>
- Thoumine, O., Lambert, M., Mège, R.-M., & Choquet, D. (2006). Regulation of N-Cadherin Dynamics at Neuronal Contacts by Ligand Binding and Cytoskeletal Coupling. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(2), 862-875. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0335>
- Thyparambil, A. A., Wei, Y., & Latour, R. A. (2015). Experimental characterization of adsorbed protein orientation, conformation, and bioactivity. *Biointerphases*, *10*(1), 019002. <https://doi.org/10.1116/1.4906485>
- Tokunaga, M., Imamoto, N., & Sakata-Sogawa, K. (2008). Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nature Methods*, *5*(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1038/nmeth1171>
- Tønnesen, J., & Nägerl, U. V. (2016). Dendritic Spines as Tunable Regulators of Synaptic Signals. *Frontiers in Psychiatry*, *7*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2016.00101>
- Toro-Nahuelpan, M., Zagoriy, I., Senger, F., Blanchoin, L., Théry, M., & Mahamid, J. (2020). Tailoring cryo-electron microscopy grids by photo-micropatterning for in-cell structural studies. *Nature Methods*, *17*(1), 50-54. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0630-5>
- Triller, A., & Choquet, D. (2005). Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes : And yet they do move! *Trends in Neurosciences*, *28*(3), 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.01.001>
- Tromp, A., Mowry, B., & Giacomotto, J. (2021). Neurexins in autism and schizophrenia—A review of patient mutations, mouse models and potential future directions. *Molecular Psychiatry*, *26*(3), 747-760. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00944-8>
- Tse-Wen Chang. (1983). Binding of cells to matrixes of distinct antibodies coated on solid surface. *Journal of Immunological Methods*, *65*(1-2), 217-223. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90318-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90318-6)
- Turcu, F., Tratsk-Nitz, K., Thanos, S., Schuhmann, W., & Heiduschka, P. (2003). Ink-jet printing for micropattern generation of laminin for neuronal adhesion. *Journal of Neuroscience Methods*, *131*(1), 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2003.08.001>
- Uchida, N., Honjo, Y., Johnson, K. R., Wheelock, M. J., & Takeichi, M. (1996). The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *Journal of Cell Biology*, *135*(3), 767-779. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.3.767>
- Uchizono, K. (1965). Characteristics of Excitatory and Inhibitory Synapses in the Central Nervous System of the Cat. *Nature*, *207*(4997), 642-643. <https://doi.org/10.1038/207642a0>
- Ullrich, B., Ushkaryov, Y. A., & Südhof, T. C. (1995). Cartography of neurexins : More than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron*, *14*(3), 497-507. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90306-2)
- Ushkaryov, Y. A., Petrenko, A. G., Geppert, M., & Südhof, T. C. (1992). Neurexins : Synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science (New York, N.Y.)*, *257*(5066), 50-56. <https://doi.org/10.1126/science.1621094>

- Van Der Want, J. J. L., & Nunes Cardozo, J. J. (1988). GABA immuno-electron microscopic study of the nucleus of the optic tract in the rabbit: GABA IMMUNO-ELECTRON MICROSCOPY IN THE NOT. *Journal of Comparative Neurology*, 271(2), 229-242. <https://doi.org/10.1002/cne.902710205>
- Van Horn, M. R., & Ruthazer, E. S. (2019). Glial regulation of synapse maturation and stabilization in the developing nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 54, 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.10.002>
- Van Rijnsoever, C., Oorschot, V., & Klumperman, J. (2008). Correlative light-electron microscopy (CLEM) combining live-cell imaging and immunolabeling of ultrathin cryosections. *Nature Methods*, 5(11), 973-980. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1263>
- Varoquaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Südhof, T. C., & Brose, N. (2006). Neuroligins Determine Synapse Maturation and Function. *Neuron*, 51(6), 741-754. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.003>
- Varoquaux, F., Jamain, S., & Brose, N. (2004). Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *European Journal of Cell Biology*, 83(9), 449-456. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00410>
- Vaughn, J. E. (1989). Review : Fine structure of synaptogenesis in the vertebrate central nervous system. *Synapse*, 3(3), 255-285. <https://doi.org/10.1002/syn.890030312>
- Vauquelin, G., & Charlton, S. J. (2010). Long-lasting target binding and rebinding as mechanisms to prolong in vivo drug action. *British Journal of Pharmacology*, 161(3), 488-508. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00936.x>
- Ventura, R., & Harris, K. M. (1999). Three-Dimensional Relationships between Hippocampal Synapses and Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 19(16), 6897-6906. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-16-06897.1999>
- Vereb, G., Szöllösi, J., Matkó, J., Nagy, P., Farkas, T., Vígh, L., Mátyus, L., Waldmann, T. A., & Damjanovich, S. (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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332550100>
- Vessey, J. P., & Karra, D. (2007). More than just synaptic building blocks : Scaffolding proteins of the post-synaptic density regulate dendritic patterning. *Journal of Neurochemistry*, 102(2), 324-332. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04662.x>
- Vink, J. N. A., Brouns, S. J. J., & Hohlbein, J. (2020). Extracting Transition Rates in Particle Tracking Using Analytical Diffusion Distribution Analysis. *Biophysical Journal*, 119(10), 1970-1983. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.09.033>
- von Eichborn, J., Dunkel, M., Gohlke, B. O., Preissner, S. C., Hoffmann, M. F., Bauer, J. M. J., Armstrong, J. D., Schaefer, M. H., Andrade-Navarro, M. A., Le Novere, N., Croning, M. D. R., Grant, S. G. N., van Nierop, P., Smit, A. B., & Preissner, R. (2012). SynSysNet : Integration of experimental data on synaptic protein–protein interactions with drug-target relations. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D834-D840. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1040>
- Waldbaur, A., Waterkotte, B., Schmitz, K., & Rapp, B. E. (2012). Maskless Projection Lithography for the Fast and Flexible Generation of Grayscale Protein Patterns. *Small*, 8(10), 1570-1578. <https://doi.org/10.1002/smll.201102163>
- Warmflash, A., Sorre, B., Etoc, F., Siggia, E. D., & Brivanlou, A. H. (2014). A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nature Methods*, 11(8), 847-854. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3016>

BIBLIOGRAPHIE

- Watson, J. L., Aich, S., Oller-Salvia, B., Drabek, A. A., Blacklow, S. C., Chin, J., & Derivery, E. (2021). High-efficacy subcellular micropatterning of proteins using fibrinogen anchors. *Journal of Cell Biology*, *220*(2), e202009063. <https://doi.org/10.1083/jcb.202009063>
- Welle, A., & Gottwald, E. (s. d.). *UV-Based Patterning of Polymeric Substrates for Cell Culture Applications*.
- Wheeler, B. C., Corey, J. M., Brewer, G. J., & Branch, D. W. (1999). Microcontact Printing for Precise Control of Nerve Cell Growth in Culture. *Journal of Biomechanical Engineering*, *121*(1), 73-78. <https://doi.org/10.1115/1.2798045>
- Willig, K. I., Kellner, R. R., Medda, R., Hein, B., Jakobs, S., & Hell, S. W. (2006). Nanoscale resolution in GFP-based microscopy. *Nature Methods*, *3*(9), 721-723. <https://doi.org/10.1038/nmeth922>
- Wishart, T. M., Parson, S. H., & Gillingwater, T. H. (2006). Synaptic Vulnerability in Neurodegenerative Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *65*(8), 733-739. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000228202.35163.c4>
- Wissner-Gross, Z. D., Scott, M. A., Ku, D., Ramaswamy, P., & Fatih Yanik, M. (2011). Large-scale analysis of neurite growth dynamics on micropatterned substrates. *Integrative Biology*, *3*(1), 65-74. <https://doi.org/10.1039/c0ib00058b>
- Wu, Y., Honig, B., & Ben-Shaul, A. (2013). Theory and Simulations of Adhesion Receptor Dimerization on Membrane Surfaces. *Biophysical Journal*, *104*(6), 1221-1229. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.02.009>
- Wu, Y., Vendome, J., Shapiro, L., Ben-Shaul, A., & Honig, B. (2011). Transforming binding affinities from three dimensions to two with application to cadherin clustering. *Nature*, *475*(7357), 510-513. <https://doi.org/10.1038/nature10183>
- Xenarios, I. (2002). DIP, the Database of Interacting Proteins : A research tool for studying cellular networks of protein interactions. *Nucleic Acids Research*, *30*(1), 303-305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.303>
- Xu, J., Lynch, M., Huff, J. L., Mosher, C., Vengasandra, S., Ding, G., & Henderson, E. (2004). Microfabricated Quill-Type Surface Patterning Tools for the Creation of Biological Micro/Nano Arrays. *Biomedical Microdevices*, *6*(2), 117-123. <https://doi.org/10.1023/B:BMMD.0000031748.13353.10>
- Xu, K., Zhong, G., & Zhuang, X. (2013). Actin, spectrin and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6118), 10.1126/science.1232251. <https://doi.org/10.1126/science.1232251>
- Yamagata, A., Goto-Ito, S., Sato, Y., Shiroshima, T., Maeda, A., Watanabe, M., Saitoh, T., Maenaka, K., Terada, T., Yoshida, T., Uemura, T., & Fukai, S. (2018). Structural insights into modulation and selectivity of transsynaptic neurexin–LRRTM interaction. *Nature Communications*, *9*(1), 3964. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06333-8>
- Yamagata, M., Duan, X., & Sanes, J. R. (2018). Cadherins Interact With Synaptic Organizers to Promote Synaptic Differentiation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 142. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00142>
- Yeow, M. B. L., & Peterson, E. H. (1991). Active zone organization and vesicle content scale with bouton size at a vertebrate central synapse. *Journal of Comparative Neurology*, *307*(3), 475-486. <https://doi.org/10.1002/cne.903070310>
- Zhang, P., Lu, H., Peixoto, R. T., Pines, M. K., Ge, Y., Oku, S., Siddiqui, T. J., Xie, Y., Wu, W., Archer-Hartmann, S., Yoshida, K., Tanaka, K. F., Aricescu, A. R., Azadi, P., Gordon, M. D., Sabatini, B. L., Wong, R. O. L., & Craig, A. M. (2018). Heparan Sulfate Organizes

- Neuronal Synapses through Neurexin Partnerships. *Cell*, 174(6), 1450-1464.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.002>
- Zhao, S., Fan, W., Guo, X., Xue, L., Berninger, B., Salierno, M. J., & del Campo, A. (2018). Microenvironments to study migration and somal translocation in cortical neurons. *Biomaterials*, 156, 238-247. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.042>
- Zheng, Z., Daniel, W. L., Giam, L. R., Huo, F., Senesi, A. J., Zheng, G., & Mirkin, C. A. (2009). Multiplexed Protein Arrays Enabled by Polymer Pen Lithography: Addressing the Inking Challenge. *Angewandte Chemie*, 121(41), 7762-7765. <https://doi.org/10.1002/ange.200902649>
- Zhu, H., & Snyder, M. (2001). Protein arrays and microarrays. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(1), 40-45. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00170-8)
- Zhu, S., Noviello, C. M., Teng, J., Walsh, R. M., Kim, J. J., & Hibbs, R. E. (2018). Structure of a human synaptic GABAA receptor. *Nature*, 559(7712), Art. 7712. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0255-3>
- Zimmerman, S. B., & Minton, A. P. (1993). Macromolecular crowding: Biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22, 27-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.22.060193.000331>
- Ziv, N. E., & Smith, S. J. (1996). Evidence for a Role of Dendritic Filopodia in Synaptogenesis and Spine Formation. *Neuron*, 17(1), 91-102. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80283-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80283-4)
- Zuber, B., Nikonenko, I., Klausner, P., Muller, D., & Dubochet, J. (2005). The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19192-19197. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509527102>