Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Cerveau, Cognition, Comportement

Présentée par Süzel Horellou

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre Et Marie Curie

Etude du cycle des vésicules synaptiques en microscopie électronique sans fixateur

Soutenue publiquement le 25 septembre 2014 devant un jury composé de :

Madame le Docteur Isabelle DUSART	Présidente
Madame le Docteur Hélène BOUDIN	Rapporteur
Monsieur le Docteur François DARCHEN	Rapporteur
Monsieur le Docteur Jean-Louis BESSEREAU	Examinateur
Monsieur le Docteur Antoine TRILLER	Examinateur
Monsieur le Docteur Serge MARTY	Directeur de thèse

Laboratoire de Biologie Cellulaire de la Synapse,
Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure
46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France ; http://www.ibens.ens.fr/

A Jacqueline



L&o, Hippocampe

Remerciements

En tout premier lieu je tiens à remercier Serge Marty, mon directeur de thèse, pour la qualité de son encadrement, sa pédagogie, sa patience, sa disponibilité. Merci pour les connaissances que tu m'as apportées, pour les discussions, les rigolades, pour ton soutien, ta compréhension, tes conseils… Je sais que j'ai fait des envieux, et à juste titre, en t'ayant pour directeur de thèse.

Merci à Antoine Triller de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir encouragée, soutenue et conseillée tout au long de ces 4 ans de thèse.

Je remercie les membres de mon jury, Mesdames Hélène Boudin et Isabelle Dusart, et Messieurs François Darchen et Jean-Louis Bessereau d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit et de participer à ma soutenance.

Merci à Olivier Pascual pour le travail d'électrophysiologie et l'expertise apportées à ce travail de thèse avec une patience immense et une constante bonne humeur. Merci à Philippe Rostaing pour les discussions, conseils techniques et encouragements ; je n'aurais pas pu rêver de meilleures ressources matérielles, intellectuelles et humaines pour me former en microscopie électronique. Merci à Benjamin Mathieu pour le programme Labview et l'aide avec les aspects informatiques du projet. Merci à Gérard Parésys pour la conception du générateur, pour les ressources électroniques et pour l'accueil toujours chaleureux dans l'atelier (même après les destructions malencontreuses de matériel…). Merci à Guillaume Dugué de nous avoir fourni les DELs qui ont été utilisées tout au long du projet de développement technique, ainsi qu'à Stéphane Supplisson pour les discussions sur les aspects physiologiques de la terminaison présynaptique. Je me sens privilégiée d'avoir pu travailler avec vous tous.

Merci à Xavier Heiligenstein, Graça Raposo et Ilse Hurbain de l'Institut Curie pour leur aide sur la préparation des échantillons pour la congélation sous haute pression. En particulier, merci Xavier pour les discussions, les conseils techniques et bien évidemment les CryoCapsules ; ç'a été un plaisir de collaborer avec toi (longue vie à CryoCapCell !).

Merci à Lili Wang, Pam Rodriguez, Yann Nadjar, Sabrina Colasse, Alain Bessis pour toute l'aide et les conseils apportés pour les dissections, cultures de neurones et autres PCR.

Un grand merci à Nadège D'Arraujo et Sylvie Clain pour leur aide dans les méandres administratifs, pour leur réactivité et leur sympathie.

Merci à toute l'équipe de Biologie Cellulaire de la Synapse ainsi qu'aux thésards et autres postdocs de l'IBENS ; je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite.

Merci à Leo et son acolyte pour le dessin, merci à tous, copains, famille, enseignants, collègues, qui m'avez soutenue, portée voire supportée, de près, de loin, et depuis l'autre bout du monde.

Enfin, je souhaite également remercier ici Audrey Devidal, l'encadrante de l'autre volet de ma thèse, celui que j'ai passé dans les bureaux de la Direction de la Recherche et du Transfert de Technologie, tout en haut de la Tour de Jussieu mais les yeux rivés sur Roscoff. Merci de m'avoir formée, de m'avoir fait confiance ; merci pour les encouragements, les discussions, les moments de rigolade et l'avenir professionnel qui s'ouvre à moi.

Table des Matières

Remerciements 7
Table des Matières 9
Résumé 13
Résumé en anglais 14
Liste des abréviations 15
Liste des figures 19

Introduction 21
I. Structure de la terminaison présynaptique 26
A. Structure et fonction de la synapse : tour d'horizon historique 26
B. Structure des terminaisons présynaptiques 32
1. Organisation du bouton axonal 32
2. Les vésicules synaptiques 37
3. Organisation de la zone active 39
II. Fonctionnement de la zone active 43
A. Mécanisme de libération du neurotransmetteur 43
1. Fusion des vésicules à la zone active 43
2. Probabilité de libération du neurotransmetteur 44
3. Assemblage du complexe SNARE et rôle dans la fusion 46
4. Rôle de RIM 49
B. Mécanismes d'ancrage et d'amorçage des vésicules à la zone active 52
1. Rôle du complexe SNARE dans l'ancrage et l'amorçage des VSs 52
2. Rôle de RIM dans l'ancrage et l'amorçage des VSs 54
III. Plasticité à long terme de la libération du neurotransmetteur 55
A. Différentes formes de plasticité de la terminaison présynaptique 55

B. Homéostasie de la terminaison présynaptique 57
C. Mécanisme de l'homéostasie des terminaisons présynaptiques 58
D. Etude du mécanisme de régulation du nombre de vésicules synaptiques ancrées 60
1. Intérêt du modèle de blocage chronique de l'activité neuronale dans des tranches d'hippocampe 61
2. Intérêt de l'immobilisation par congélation sous haute pression 63
IV. Mode d'endocytose des VSs 65
A. Mécanismes d'endocytose 65
1. Techniques d'étude de l'endocytose 65
2. Endocytose dépendante de la Clathrine 67
3. Endocytose de type « kiss and run" 71
4. Endocytose de type "bulk" 73
B. Développement d'une nouvelle approche pour l'observation du ou des mécanismes d'endocytose « en aigü » 75
1. Stimulation optique de neurones par des méthodes d'optogénétique 77
2. « Capture » d'images d'endocytose grâce au couplage d'une stimulation optique avec l'immobilisation rapide par congélation sous haute pression 79
Résultats 81
I. Etude de la régulation de l'ancrage des vésicules synaptiques en microscopie électronique sans fixateur 83
A. Introduction 83
B. Article : Adaptive and non adaptive changes in activity deprived synapses 87
II. Couplage d'une stimulation optique et de la congélation de neurones pour l'étude du cycle des vésicules synaptiques 101
A. Mises au point de la stimulation optogénétique 103
1. Matériel et méthodes 103
2. Résultats 108
B. Modifications de la machine et des supports de congélation sous haute pression 110
1. Conception d'un support de congélation lumineux 110

2. Intégration d'un système de stimulation dans l'HPM 111
3. Commandes du couplage stimulation – congélation 111
C. Utilisation des CryoCapsules pour le couplage stimulation-congélation des neurones 114
1. Matériel et méthodes 116
2. Résultats préliminaires 118

Discussion 119

I. Régulation de la taille de la jonction synaptique et du nombre de vésicules ancrées 121

II. Régulation de la probabilité de libération du neurotransmetteur 123

III. Développements nécessaires pour l'observation du cycle des vésicules synaptiques après stimulation et congélation 125

Bibliographie 129

Résumé

Les synapses chimiques sont des structures spécialisées permettant une transmission d'information unidirectionnelle, d'un élément présynaptique vers un élément postsynaptique. L'organisation des terminaisons présynaptiques permet la conversion d'un potentiel d'action en signal chimique. Elles se présentent sous la forme de varicosités axonales contenant des vésicules synaptiques (VSs) qui concentrent le neurotransmetteur (NT). Une partie des VSs sont apposées (ancrées) à une région de la membrane plasmique, la zone active (ZA ; Bennett et al. 1992, Siksou et al. 2009). La ZA est située face à l'accumulation postsynaptique des récepteurs au NT. La dépolarisation d'une terminaison par un potentiel d'action active des canaux calciques dépendants du voltage. L'influx de calcium qui en résulte entraîne la fusion d'une fraction des VSs ancrées avec la membrane plasmique en moins d'une milliseconde, permettant la libération de NT (Sabatini et Regehr 1996, Lisman et al. 2007). Une endocytose compensatoire permet ensuite la reformation de VSs (Rizzoli et Betz, 2005). Des questions se posent encore quant à ce trafic régulé. Nous avons étudié la régulation de l'ancrage des VSs et développé un outil pour analyser le cycle des VSs en microscopie électronique (ME).

La première partie de mon travail de thèse a porté sur la régulation du nombre de VSs ancrées à la ZA. Notre objectif était de savoir si l'ancrage était régulé spécifiquement ou en coordination avec les autres paramètres morphologiques du bouton, et de déterminer le rôle de Rab3-Interacting Molecules (RIMs), protéines centrales de la ZA, dans cette régulation. La régulation de l'ancrage a été étudiée sur un modèle de cultures organotypiques de tranches d'hippocampe dont l'activité est bloquée 3 jours par l'application de tétrodotoxine. Ces tranches ont été immobilisées par congélation sous haute pression (CHP) pour être observées en ME sans les artefacts induits par les fixations aldéhydiques. Le blocage d'activité entraîne une augmentation du nombre de VSs ancrées, de la taille de la ZA, et du nombre de récepteurs postsynaptiques au glutamate de type GluA2. Le nombre de VSs total dans le bouton et la taille du bouton ne changent pas. En immunocytochimie Nous n'avons pas observé de modification de la quantité moyenne de protéines RIM1/2 dans les terminaisons présynaptiques sous l'effet du blocage d'activité. Enfin, les enregistrements électrophysiologiques ne révèlent pas de modification de fréquence des courants excitateurs miniatures malgré l'augmentation du nombre de VSs ancrées. Ces résultats montrent une régulation spécifique de la taille de la jonction synaptique par l'activité neuronale et indiquent que le nombre de VSs ancrées n'est par régulé par la quantité de RIM.

La deuxième partie de mon travail a consisté à développer un outil d'étude du cycle des VSs. En effet, la ME ne permet pas d'observer des évènements dynamiques, tandis que la résolution spatiale des microscopes optiques est insuffisante pour observer directement les VSs. Nous avons voulu associer une stimulation optogénétique de neurones avec leur immobilisation rapide par CHP, afin de pouvoir observer en ME les VSs à des temps précis après la stimulation. Nous avons travaillé sur des cultures dissociées de neurones d'hippocampe de rat. Ces neurones ont été infectés avec un Adeno-Associated Virus exprimant une protéine, la ChannelRhodopsine2, pour les rendre activables par des stimulations lumineuses. Une collaboration avec Leica Microsystems a permis de modifier l'appareil de congélation (HPM) pour (i) stimuler les neurones dans l'HPM, et (ii) synchroniser cette stimulation avec la congélation. Ce nouvel outil devrait permettre dans le futur une analyse du trafic des VSs à très haute résolution temporelle et spatiale.

Résumé en anglais

Chemical synapses are highly specialized structures that convey information unidirectionnally, from a presynaptic to a postsynaptic element. Presynaptic terminals convert action potentials into chemical signals. These axonal varicosities contain synaptic vesicles (SVs) filled with neurotransmitter (NT) molecules. A fraction of the SVs are apposed (docked) to a part of the plasma membrane called the active zone (AZ; Bennett et al. 1992, Siksou et al. 2009b). The AZ is located in front of the postsynaptic accumulation of NT receptors. Depolarization of a terminal by an AP activates voltage dependent calcium channels. The resulting calcium influx induces the fusion of a fraction of the docked SVs in less than a millisecond, which release their NT content (Sabatini & Regehr 1996, Lisman et al. 2007). New SVs are then produced through a process of compensatory endocytosis (Rizzoli & Betz, 2005). Unanswered questions remain about the mechanism of this regulated traffic of SVs. We studied the regulation of SVs docking and developed a tool to analyze the cycle of SVs with electron microscopy (EM).

The first part of my PhD work was focused on the regulation of the number of docked SVs at the AZ. Our objective was to determine whether SVs docking was regulated specifically or together with other morphological parameters of the bouton. We also investigated the role of Rab3-Interacting Molecules (RIMs), central proteins of the AZ, in this regulation. We worked on organotypic culture of hippocampal slices in which we blocked neuronal activity with tetrodotoxin for 3 days. Slices were immobilized using high pressure freezing (HPF) to avoid artifacts due to chemical fixation, and studied with EM. Activity blockade induced an increase in the number of docked SVs, in the size of the AZ and in the number of GluA2 postsynaptic glutamate receptors. However, the total number of SVs in the bouton and the size of the bouton did not change. With immunocytochemistry we did not detect any change in the mean amount of RIM in presynaptic terminals after chronic activity blockade. Furthermore, electrophysiology recordings showed no increase of the mean frequency of mEPSCs despite the increase in the number of docked SVs. Together these results show a specific regulation of the size of the presynaptic junction by neuronal activity, and indicate that the amount of RIMs does not regulate the number of docked SVs.

The second part of my work consisted in the development of a new tool to study the cycle of SVs. Indeed, EM does not allow the visualization of dynamic phenomenon, whereas optical microscopes do not have a sufficient spatial resolution to observe SVs with the required precision. We wanted to associate optogenetic stimulations of neurons with their rapid immobilization by HPF, in order to visualize SVs at precise moments after stimulation. We worked on rats hippocampal dissociated neurons cultures. These neurons were infected with an Adeno-Associated Virus encoding a light sensitive protein channel, the ChannelRhodopsin2, in order to be able to activate them with light stimulations. We collaborated with Leica Microsystems to modify our high pressure machine (HPM), so that we can (i) stimulate the neurons within the HPM, and (ii) synchronize this stimulation with the freezing. In the future, this new tool this system should allow us to analyze the traffic SVs with high temporal and spatial resolution.

Liste des abréviations

A : Ampère
ACSF : Artificial CerebroSpinal Fluid
AMPA : α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ARN : Acide Ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate

BAR : Bin–Amphiphysin–Rvs
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

C.elegans : *Caenorhabiditis elegans*
C1 : Domaine de liaison au diacylglycérol
C2 : Domaine pouvant lier deux ions calcium
CA1 : Cornu Ammonis 1
Ca^{2+} : Calcium
CA3 : Cornu Ammonis 3
CamKII : Protéine kinase calcium-calmoduline dépendante
CaV : Canal calcique dépendant du voltage
CDK55 : Cyclin-dependent kinase 5
CHP : Congélation sous Haute Pression
CLEM : Correlative Light Electron Microscopy
C-terminal : domaine carboxy-terminal

DEL : Diode Electro-Luminescente
DLT : Dépression à Long Terme
DPS : Densité postsynaptique

EPSC : Excitatory PostSynaptic Current

F-BAR : FCH-BAR, ou EFC pour Extended FCH Homology
FCHo : Fer/Cip4 homology domain only proteins

GABA : γ-aminobutyric acid
GFP : Green Fluorescent Protein
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

GTP : Guanosine Triphosphate
GTPase : Guanosine Triphosphate (GTP) hydrolase enzyme

h : Heure
HPM : High-Pressure freezing Machine
Hsc70 : Heat-Shock Cognate protein 70
Hz : Hertz

K^+ : Potassium
KCl : Chlorure de potassium
kDa : Kilo Dalton
KO : Knock-Out

M : Molaire
ME : Microscopie Electronique
mEPSC : Miniature Excitatory PostSynaptic Current
mL : Millilitre
mM : Milli Molaire
mOs : MilliOsmole
ms : milliseconde
Munc13 : Munc-13 mammalian homologue of *C.elegans* UNC-13 (uncoordinated) protein
Munc18 : Munc-13 mammalian homologue of *C.elegans* UNC-18 (uncoordinated) protein

NeuN : Neuronal Nuclei
nm : Nanomètre
NMDA : N-Methyl-D-aspartic acid
NSF : N-ethylmaleimide-sensitive factor
NT : Neurotransmetteur
N-terminal : NH2 terminal

PA : Potentiel d'Action
PBS : Phosphate Buffer Solution
pH : Potential for hydrogen ion concentration
PKA : Protein Kinase A
PKC : Protein Kinase C
Pl : Probabilité de Libération du neurotransmetteur
PLT : Potentialisation à Long Terme
PPM : Potentiel de Plaque Motrice

PPMm : Potentiel de Plaque Motrice miniature
Rab : Member of the RAS oncogene family
RIM : Rab3 interacting molecule
RIM-BP : RIM Binding Protein
RRP : Readily Releasable Pool

s : seconde
SH3 : Src 3 Homology.
SNAP-25 : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein 25
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein (SNAP) Receptor
SNC : Système Nerveux Central
SV2 : Synaptic Vesicle protein 2

TrKB : Tropomyosin related kinase B
TTX : Tétrodotoxine
V : Volt
VAMP : Vesicle Associated Membrane Protein
V-ATPase : Vacuolar type H+-ATPase
VGLUT : Vesicular Glutamate Transporter
VS : Vésicule Synaptique

W : Watt

YFP : Yellow Fluorescent Protein

ZA : Zone Active
Zn : Zinc

µL : Microlitre
µm : Micromètre
µM : Micro Molaire
µs : Microseconde

Liste des figures

Figure 1 : Schéma du fonctionnement de la transmission synaptique 24

Figure 2 : Dessins de Santiago Ramon y Cajal dans l'Histologie du système nerveux de l'Homme et des Vertébrés..... 27

Figure 3 : Micrographie d'une jonction neuromusculaire de reptile 29

Figure 4 : Mise en évidence du recyclage des VSs..... 31

Figure 5 : Mise en évidence et modèle du réseau de filaments du bouton présynaptique. 33

Figure 6 : Comparaison de la morphologie de synapses excitatrice d'hippocampe après fixation chimique et après CHP..... 34

Figure 7 : Description du réseau de filaments du bouton présynaptique..... 36

Figure 8 : Modélisation d'une VS et des protéines associées 38

Figure 9 : Etude en tomographie du matériel dense de la ZA..... 41

Figure 10 : Corrélation de la taille de la ZA au nombre de VSs ancrées et au nombre de CaV.... 42

Figure 11 : Visualisation de l'exocytose à la jonction neuromusculaire de grenouille en ME..... 44

Figure 12 : Corrélations de la Pl à la taille de la ZA et au nombre de VSs ancrées à la ZA 46

Figure 13 : Schéma de l'assemblage du complexe SNARE 47

Figure 14 : Représentation schématique des domaines d'interaction de la protéine RIM et de leurs fonctions potentielles 50

Figure 15 : Rôle de RIM dans l'assemblage du complexe SNARE..... 51

Figure 16 : Mise en évidence du rôle de Munc13 dans l'ancrage des VSs à la ZA 53

Figure 17 : Représentation schématique des interactions de RIM avec les protéines de la ZA .. 54

Figure 18 : Augmentation spécifique de la quantité de RIM aux terminaisons présynaptiques après un blocage chronique d'activité..... 60

Figure 19 : Organisation des synapses établies par les collatérales de Schaffer dans une coupe transversale d'hippocampe..... 63

Figure 20 : Comparaison des effets de l'immobilisation par fixation chimique et de l'immobilisation par CHP sur le bouton synaptique 64

Figure 21 : Etude en ME de l'endocytose dépendante de la Clathrine..... 68

Figure 22 : Mise en évidence du rôle de la Clathrine dans la reformation des VSs à la jonction neuromusculaire de Drosophile 70

Figure 23 : Etude en ME du mécanisme de « kiss and run »..... 71

Figure 24 : Mécanisme théorique du recyclage des VSs par "kiss and run" 73

Figure 25 : Etude en ME du mécanisme d'endocytose de type « bulk » 74

Figure 26 : Illustration du dispositif de stimulation-congélation mis au point par John Heuser et Tom Reese..... 76

Figure 27 : Contrôle de l'activité neuronale par approche optogénétique (Zhang et al. 2008) .. 79

Figure 28 : Principe expérimental du dispositif du couplage de stimulations lumineuses de neurones ChR2 positifs avec leur immobilisation rapide par CHP 80

Figure 29 : Principe de l'activation de la ChannelRhodopsine2 exprimée à la membrane d'un neurone..... 102

Figure 30 : Séquence de l'AAV-ChR2 utilisé..... 105

Figure 31 : DEL Kingbright APA 1606 et circuit assemblé pour réaliser les premiers tests de stimulation 107

Figure 32 : Neurones infectés par l'AAV-ChannelRhodopsine2 observés au microscope en fluorescence..... 108

Figure 33 : Enregistrements électrophysiologiques effectués par Olivier Pascual 109

Figure 34 : Schéma et photo du support de congélation lumineux 110

Figure 35 : Système de stimulation à l'intérieur de l'HPM..... 111

Figure 36 : Schéma et photo du dispositif assemblé..... 112

Figure 37 : Programme Labview permettant la synchronisation de la stimulation et de la congélation 113

Figure 38 : Description des CryoCapsules..... 115

Figure 39 : Micrographies de neurones cultivés et congelés dans des CryoCapsules avec à droite une vue de synapse à fort grossissement..... 118

Figure 40 : Etude de l'endocytose et de l'exocytose après stimulation et congélation de neurones exprimant une ChannelRhodopsine2 127

Introduction

Introduction

Les synapses chimiques sont des structures cellulaires extrêmement spécialisées permettant de transmettre l'information neuronale de façon unidirectionnelle. Elles représentent la majorité des synapses des systèmes nerveux central et périphérique. Elles se composent d'un élément présynaptique et d'un élément postsynaptique (Fig. 1). L'élément présynaptique, aussi appelé terminaison ou bouton présynaptique, est une varicosité membranaire contenant des vésicules appelées Vésicules Synaptiques (VSs). Ces VSs renferment des molécules de neurotransmetteur. Une partie des VSs est apposée à la membrane plasmique, face à l'élément postsynaptique. Cette portion de membrane est appelée zone active (ZA). L'élément postsynaptique présente à sa membrane, face à la terminaison présynaptique, des récepteurs canaux au neurotransmetteur. Lorsqu'un potentiel d'action dépolarise la terminaison, il induit une entrée de calcium. L'augmentation de la concentration de calcium provoque l'exocytose d'une fraction des VSs ancrées au niveau de la ZA, qui libèrent leur contenu en neurotransmetteur. Les molécules de neurotransmetteur vont alors pouvoir se fixer sur les récepteurs postsynaptiques et déclencher leur ouverture. Cette ouverture initie un courant ionique dans le compartiment postsynaptique. Si la somme des courants provenant des synapses établies sur le neurone postsynaptique est supérieure au seuil, un nouveau potentiel d'action est déclenché. Après la libération de neurotransmetteur, des VSs sont reformées par endocytose et rechargées en neurotransmetteur, évitant ainsi la déplétion de la terminaison. La synapse est donc l'élément clé de la transmission de l'information nerveuse et la continuité du cycle des VSs est indispensable à son bon fonctionnement.

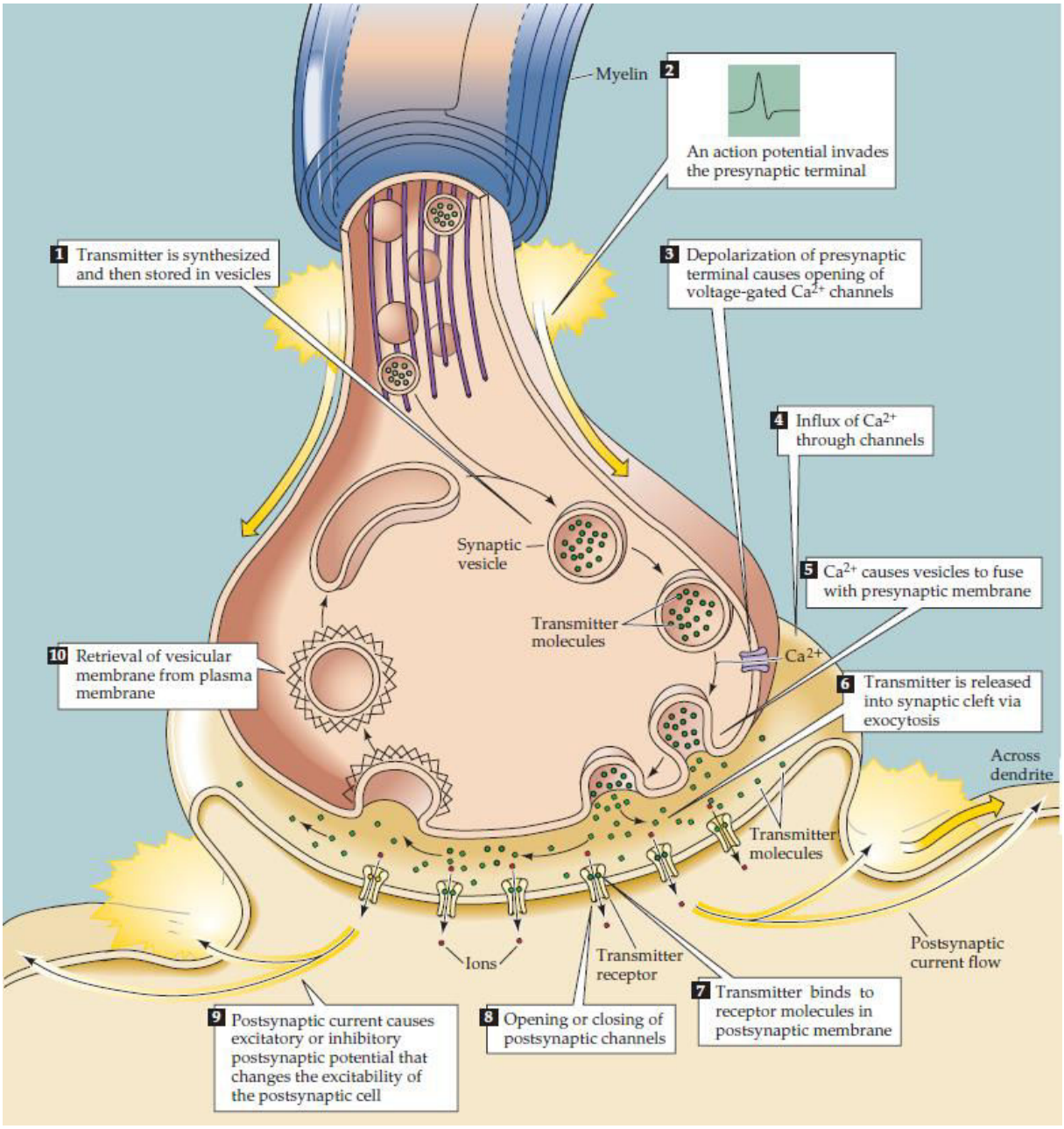


Figure 1 : Schéma du fonctionnement de la transmission synaptique (Purves et al. 2001).

Durant mon travail de thèse je me suis intéressée au cycle des VSs et à sa régulation. D'une part, nous nous sommes focalisés sur la régulation de l'ancrage des VSs à la ZA. Nous avons étudié cette régulation dans des tranches d'hippocampe de souris en microscopie électronique après congélation sous haute pression. D'autre part, nous avons développé un système combinant stimulation optique et immobilisation par congélation afin de pouvoir visualiser les

évènements d'endocytose en microscopie électronique. Avant de présenter les résultats de ces travaux, je détaillerai en introduction la structure de la terminaison présynaptique et les techniques qui ont permis sa description. Je décrirai ensuite le fonctionnement de la terminaison et sa plasticité, en me focalisant sur le mécanisme de l'ancrage des VSs à la ZA et son importance dans la neurotransmission. Enfin, je décrirai les mécanismes d'endocytose proposés à ce jour et les difficultés liées à l'étude du recyclage des VSs.

I. Structure de la terminaison présynaptique

La structure du système nerveux et les neurones en particulier ont fait l'objet de nombreux travaux tout au long des 19ème et 20ème siècles. Il faut cependant attendre les premières observations en microscopie électronique, autour de 1950, pour obtenir une confirmation visuelle de l'existence des synapses. La morphologie et les ultrastructures synaptiques ont alors pu être décrites en détail. Ces travaux ont apporté de précieuses informations sur la transmission de l'information nerveuse. Le développement ultérieur de techniques de microscopie électronique a permis une description fine de la structure et de l'organisation de la terminaison présynaptique.

A. Structure et fonction de la synapse : tour d'horizon historique

La connaissance du système nerveux a progressé au fil d'avancées techniques, en particulier du développement des techniques de microscopie. En 1826, l'ajout d'objectifs achromatiques aux microscopes existants permet une amélioration du grossissement et de la netteté des images observées. Pour la première fois, les corps cellulaires des cellules nerveuses ainsi que leurs prolongements peuvent être observés. Les prolongements sont décrits par Dieters et Schultze (Finger 1994), qui distinguent un prolongement principal, l'axone, et de multiples petits prolongements qui seront désignés ensuite par le terme « dendrite ». En 1873, nouvelle avancée majeure ; Camillo de Golgi met au point une nouvelle technique de coloration à base de nitrate d'argent. Cette technique a pour avantage de ne marquer qu'une partie des cellules au sein d'un tissu, et de marquer complètement ces cellules. Elle permet à Golgi de visualiser nettement la morphologie des neurones, et en particulier de décrire les relations entre le soma et les prolongements.

En 1880, Ramon y Cajal utilise la technique de Golgi sur du tissu nerveux et décrit de façon remarquablement précise la circuiterie de différentes structures, en particulier celle de l'hippocampe (Fig. 2). A cette période subsiste encore une controverse entre les partisans de la continuité et ceux de la contiguïté des cellules nerveuses. En effet, un certain nombre de

biologistes, dont Golgi, pensent que le tissu nerveux est constitué de cellules formant un réseau continu dont les prolongements sont fusionnés entre eux. A l'inverse, Cajal et d'autres de ses collègues défendent l'hypothèse d'une discontinuité morphologique des cellules nerveuses ; la cellule nerveuse est alors définie comme une entité individuelle et l'unité anatomique et physiologique de base du tissu nerveux. Waldeyer, biologiste influent, donne le nom de neurones à ces cellules et formule la « doctrine du neurone » en 1891. Les points de contacts entre neurones sont appelés synapses par Sherrington en 1897, qui postule que la communication inter-neuronale se fait au niveau de ces points de contact. D'autre part, sur la base de ses observations des circuits sensoriels, Cajal fait l'hypothèse de la transmission de l'information sous forme d'un influx unidirectionnel, axone vers dendrite, qu'il appelle « polarisation dynamique du neurone ». Les concepts de discontinuité des neurones, de synapses et de polarité fonctionnelle vont rester à l'état de théorie jusqu'au milieu du 20ème siècle.

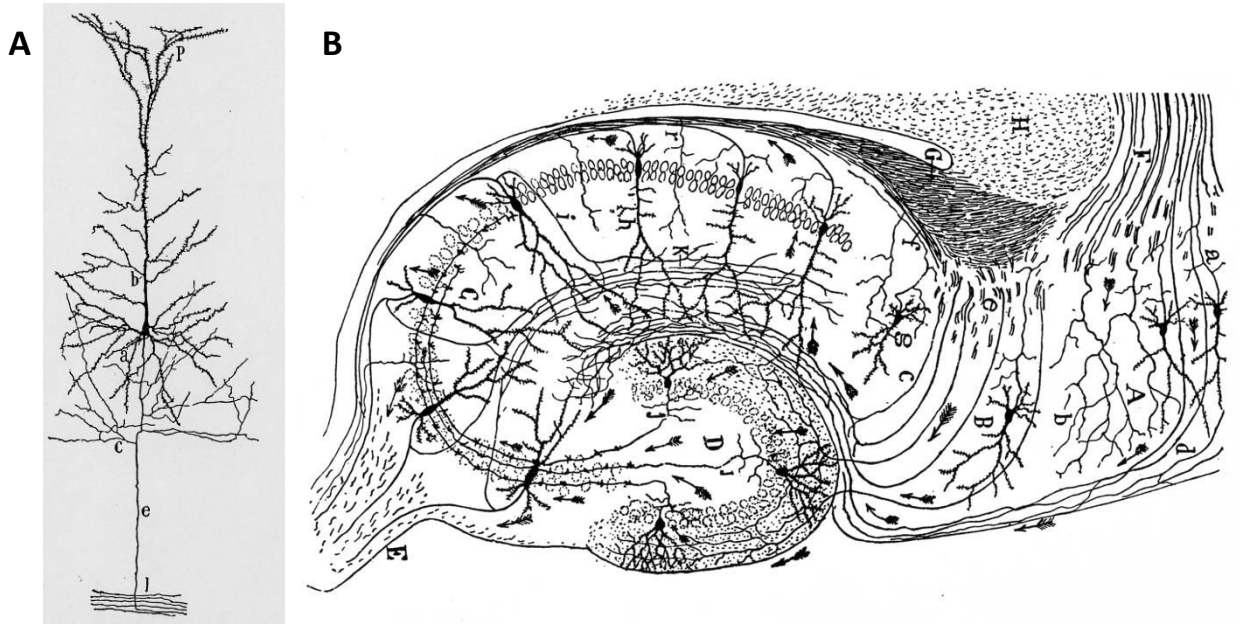


Figure 2 : Dessins de Santiago Ramon y Cajal dans l'Histologie du système nerveux de l'Homme et des Vertébrés.

A. Dessin d'un neurone pyramidal : (e) Axone principal, (b) Ramifications dendritiques.

B. Illustration de la polarité de la transmission nerveuse au niveau des neurones d'hippocampe (les flèches indiquent le sens de l'influx nerveux).

Il faut attendre les travaux de René Couteaux (Couteaux 1944) sur la jonction neuromusculaire pour que l'existence morphologique des synapses, et par conséquent la discontinuité des neurones, soit démontrée. En utilisant un colorant appelé Janus Green B, Couteaux parvient à observer un espace, appelé « gouttière synaptique » entre la terminaison nerveuse et l' « appareil subneural », qui correspond à la structure post-synaptique du myocyte.

Le premier microscope électronique construit par Ernst Ruska en 1931 et développé industriellement par la suite permet rapidement d'observer des échantillons avec une meilleure résolution qu'avec les microscopes optiques disponibles à cette époque. Les microscopes optiques utilisent le rayonnement de photons de lumière visible. Leur pouvoir de résolution est donc limité par la longueur d'onde de ce type de rayonnement. La longueur d'onde d'un électron étant beaucoup plus petite que celle d'un photon, les microscopes électroniques permettent d'obtenir une résolution bien meilleure, particulièrement adaptée à l'étude de structures subcellulaires telles que les synapses. La mise au point de méthodes de coloration des tissus biologiques, utilisant des particules denses aux électrons qui se fixent aux composants cellulaires, ainsi que de techniques d'inclusion des échantillons et de coupe fine permet aux biologistes de tirer avantage de cette technique. Ainsi, pour la première fois les synapses du système nerveux central peuvent être observées (De Robertis & Bennett 1955, Robertson 1956, Palay & Palade, 1954). La microscopie électronique (ME) permet alors de décrire la morphologie des synapses et d'en détailler les ultrastructures (Fig. 3). La synapse apparaît comme une jonction serrée comparable par certaines caractéristiques aux jonctions que l'on trouve entre d'autres types cellulaires. Elle appose deux membranes plasmiques, reliées entre elles par des protéines de liaison, et séparées par une fente synaptique contenant du matériel dense organisé en plaque. La spécificité principale des synapses en tant que jonctions adhérentes est leur polarité. Elles se composent d'un élément présynaptique et d'un élément postsynaptique morphologiquement distincts. Dans le système nerveux central (SNC), l'élément présynaptique est en général un axone et l'élément postsynaptique, un dendrite.

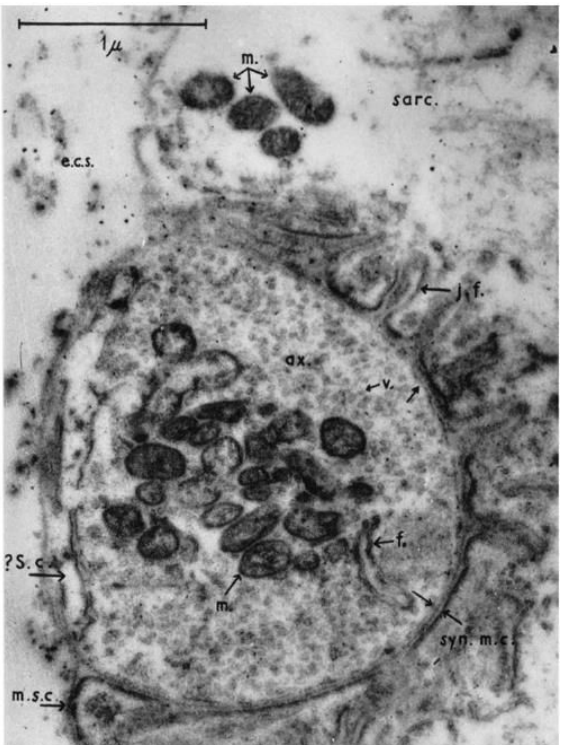


Figure 3 : Micrographie d'une jonction neuromusculaire de reptile ; (v) vésicules synaptiques, (m) mitochondries, (j.f.) replis de la membrane postsynaptique (Robertson 1956).

La terminaison présynaptique présente un élargissement appelé bouton présynaptique. On distingue deux types de boutons suivant leur position sur l'axone : les boutons terminaux, lorsque l'axone établit une synapse à son extrémité distale, et les boutons en passant qui se présentent sous la forme de varicosités le long de l'axone (Peters et al 1991). Ces boutons renferment quelques mitochondries ainsi qu'un grand nombre de vésicules (Palay & Palade 1954, De Robertis & Bennet 1955, Robertson 1956). Or quelques années auparavant, en 1952, Katz enregistre au moyen d'électrodes intracellulaires le potentiel de membrane de l'élément postsynaptique à la jonction neuromusculaire, appelé plaque motrice (Del Castillo & Katz 1954a, Del Castillo & Katz 1954b). Il enregistre des variations du potentiel de membrane de la plaque motrice (PPM) en réponse à une stimulation, et des variations de même forme mais d'amplitude réduite en l'absence de stimulation, appelées PPM miniatures (PPMm). Lorsque l'amplitude de la réponse à une stimulation est réduite à son minimum en abaissant la concentration extracellulaire de calcium, Il observe que l'amplitude d'un PPM correspond à un

multiple de l'amplitude du PPMm. Il en déduit que chaque PPM correspond à l'addition de plusieurs PPMm et fait l'hypothèse d'une libération de neurotransmetteur sous forme de paquets ou quanta, chaque paquet correspondant en postsynaptique à un PPMm. Les vésicules synaptiques (VSs) visualisées en ME aux terminaisons présynaptiques apparaissent comme le corrélat structural de l'hypothèse de libération quantale de neurotransmetteur et leur découverte vient corroborer les travaux de Katz. Les VSs sont alors définies comme les unités de transmission d'une quantité de neurotransmetteur finie. Les travaux de Whittaker dans les années 60 permettent ensuite de confirmer formellement la présence de neurotransmetteur dans les VSs (Whittaker 1971).

Le mécanisme de libération de neurotransmetteur par les vésicules est en partie élucidé en 1973 par les travaux de Heuser et Reese d'une part, et Ceccarelli d'autre part (Ceccarelli et al. 1973, Heuser & Reese 1973). Leurs travaux respectifs, couplant stimulation électrique de préparation nerf-muscle de grenouille et observation en ME de la jonction neuromusculaire, leur permettent d'observer la terminaison synaptique à différents temps après sa stimulation. Ils proposent alors deux modèles relativement similaires du fonctionnement de la terminaison présynaptique. Dans les deux modèles, la stimulation déclenche la fusion d'une partie des vésicules avec la membrane du bouton. Les vésicules libèrent ainsi leur contenu en neurotransmetteur, puis se reforment à partir de cette même membrane et sont rechargées en neurotransmetteur. La reformation des VSs à partir de la membrane plasmique a pu être mise en évidence par la capture d'un traceur ajouté au milieu extracellulaire (Fig. 4). Pour Heuser et Reese, cette reformation se produit à distance de la ZA après fusion complète de la VS avec celle-ci. Pour Ceccarelli et collègues, la reformation a lieu à la ZA après la formation d'un pore de fusion transitoire entre les membranes de la VS et de la ZA.

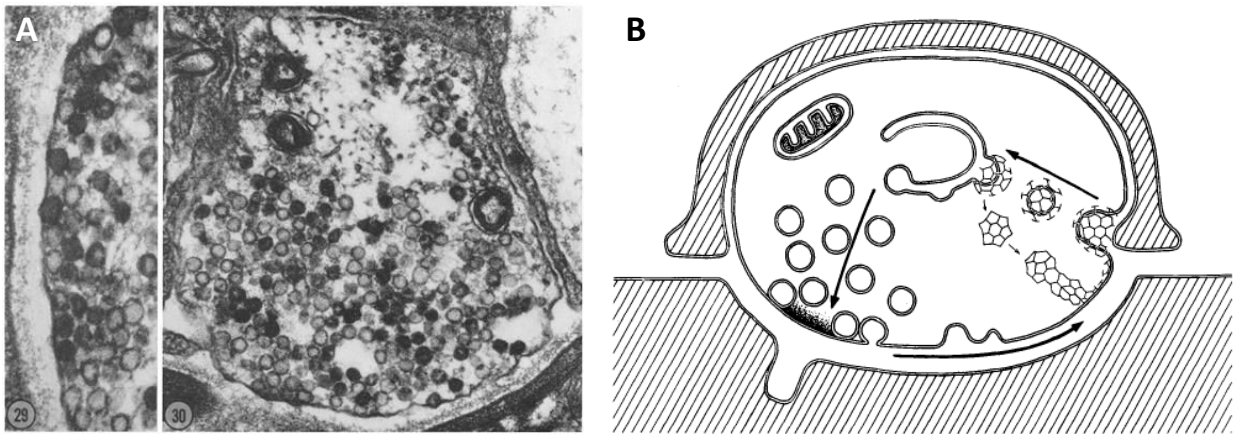


Figure 4 : Mise en évidence du recyclage des VSs (Heuser & Reese 1973).

A. Micrographies de jonctions neuromusculaires de grenouille après stimulation en présence des marqueurs denses aux électrons ; les VSs reformées après une stimulation apparaissent marquées.

B. Modèle du cycle des VSs proposé par Heuser et Reese.

En face post-synaptique, du côté cytoplasmique de la membrane, apparaît un amas de particules appelé densité post-synaptique (DPS). Cette densité correspond à un échafaudage protéique permettant l'accumulation de récepteurs au neurotransmetteur. Les travaux en ME, en particulier ceux de Gray à partir de 1959, permettent de caractériser de plus en plus finement les synapses de diverses structures du système nerveux central (Gray, 1964). Il caractérise en particulier, dans le cortex cérébral, deux grandes classes de synapses selon l'aspect de leur DPS. Il distingue des synapses symétriques, présentant une DPS très fine. Ces synapses s'établissent surtout sur les troncs dendritiques et les somas, et la plupart sont inhibitrices et libèrent du GABA ou de la glycine. Les synapses asymétriques possèdent une DPS proéminente, et s'établissent en majorité sur des structures en forme d'épines issues des troncs dendritiques. Ce sont des synapses excitatrices, qui libèrent principalement du glutamate.

Les synapses ont ainsi été identifiées comme les éléments clés de la transmission de l'information nerveuse. En particulier, c'est l'organisation structurale et moléculaire des terminaisons présynaptiques qui permet la conversion d'un potentiel d'action en un signal chimique.

B. Structure des terminaisons présynaptiques

1. Organisation du bouton axonal

La ME est à la base des premières descriptions dans les années 50 de la structure des terminaisons présynaptiques, et de la découverte des VSs. Classiquement, l'observation de structures biologiques en ME requiert une étape de fixation chimique de l'échantillon, une incubation dans un colorant dense aux électrons et un enrobage dans une résine. Lorsque la résine est polymérisée, l'échantillon peut être coupé finement pour être observé. Les techniques de coupe ne permettent d'abord pas d'obtenir des sections suffisamment fines pour observer en détail les structures présentes à l'intérieur du bouton. Le développement d'ultramicrotomes associés à l'utilisation de couteaux de diamant rend possible la préparation de section de 100 à 200 nm (Fernandez-Moran 1953, Porter & Blum 1953, Gay & Anderson 1954, Sjostrand 1958). L'amélioration constante de cette technique permet aujourd'hui d'obtenir des sections de 30 nm d'épaisseur.

La préparation de sections d'échantillons en ultramicrotomie a aussi permis d'imager en ME des séries consécutives de sections (sections sériées) pour étudier en trois dimensions (3D) les structures cellulaires et subcellulaires. En Neurosciences, cette technique a été d'une importance majeure pour décrire la connectivité des neurones et la morphologie des structures subneuronales (Harris & Stevens 1988, Harris & Stevens 1989). Cependant, elle permet d'obtenir au mieux une résolution de 30 nm en z (l'épaisseur de la coupe), ce qui reste insuffisant pour caractériser les structures moléculaires de la terminaison (Grimm et al. 1997). De plus, les fixateurs aldéhydiques utilisés pour immobiliser les structures tendent à agréger les filaments protéiques et à déformer les membranes, ce qui pose problème pour décrire les structures les plus fines de la terminaison (Rostaing et al. 2006).

Différentes méthodes de préparation des échantillons ont alors été progressivement mises au point afin de préserver les détails de la terminaison avant de l'observer en ME. Le « slam-freezing » est une des premières méthodes d'immobilisation par congélation. Il consiste à appliquer à l'échantillon un impact sur un bloc de métal refroidi à -270°C (Heuser, Reese et al. 1979). L'association du refroidissement rapide et de la pression créée par l'impact permet

d'immobiliser rapidement les structures. La combinaison basse température/haute pression permet à l'eau contenue dans la partie superficielle des échantillons d'atteindre un stade de vitrification, plutôt que d'être cristallisée sous forme de glace. En effet, la formation de cristaux de glace altère les structures par son action mécanique. Les échantillons sont ensuite cryofracturés pour exposer l'intérieur des terminaisons. Pour observer les assemblages moléculaires, l'eau est ensuite retirée sur 20 à 30 nm de profondeur par sublimation superficielle. Après une étape d'ombrage avec un alliage de métaux, on obtient une réplique métallique de la structure de la terminaison, qui peut être observée en ME. Cette technique a permis pour la première fois d'observer le réseau de filaments structurant la répartition des vésicules dans le bouton (Landis et al. 1988, Hirokawa et al. 1989). Les vésicules apparaissent retenues dans un réseau de filaments d'actine et de microtubules et attachées les unes aux autres par des filaments fins d'environ 40 nm de long (Fig. 5). La nature de ces filaments a été partiellement élucidée grâce à l'étude des terminaisons présynaptiques de souris Synapsine simple et triple KO (Takei et al. 1995, Gitler et al. 2004). On observe dans ces terminaisons une perte de 50% des VSs. Ces résultats, associés à la présence de Synapsine aux terminaisons et sa capacité à se lier aux VSs indiquent que la Synapsine participe largement à l'accumulation des VSs dans le bouton (De Camilli et al. 1983).

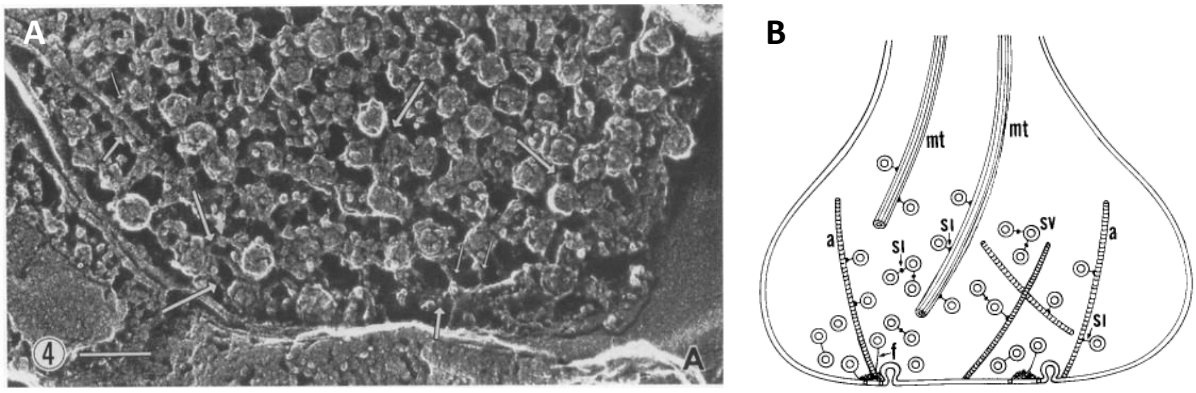


Figure 5 : Mise en évidence et modèle du réseau de filaments du bouton présynaptique. Les flèches indiquent des filaments liant les VSs entre elles (Hirokawa et al. 1989).

A. Micrographie d'un bouton synaptique de fibre moussue de cervelet de rat après congélation rapide et cryofracture (Flèches : filaments reliant les VSs entre elles). Barre d'échelle : 100 nm.

B. Modèle d'organisation des filaments du bouton présynaptique (mt : microtubules, a : filament d'actine, si : Synapsine, sv : vésicule synaptique).

La congélation sous haute pression (CHP) utilise le même principe que le slam-freezing : une congélation rapide par un jet d'azote sous très haute pression appliqué dans un appareil spécifique (High Pressure Machine, HPM). Cependant la pression de 2100 bars appliquée à l'échantillon dans l'HPM permet de réduire encore davantage la formation de cristaux de glace, et ainsi de vitrifier l'échantillon, mais sur une épaisseur plus grande, d'au moins 5 µm (Siksou et al. 2009). L'échantillon peut ensuite être déshydraté, fixé au tétroxyde d'osmium à très basse température puis être enrobé dans une résine et coupé très finement (30 nm) pour être analysé en ME. Cette technique permet d'observer les synapses sans les artéfacts induits par les fixateurs aldéhydiques, avec une résolution de 30 nm en z (Fig. 6).

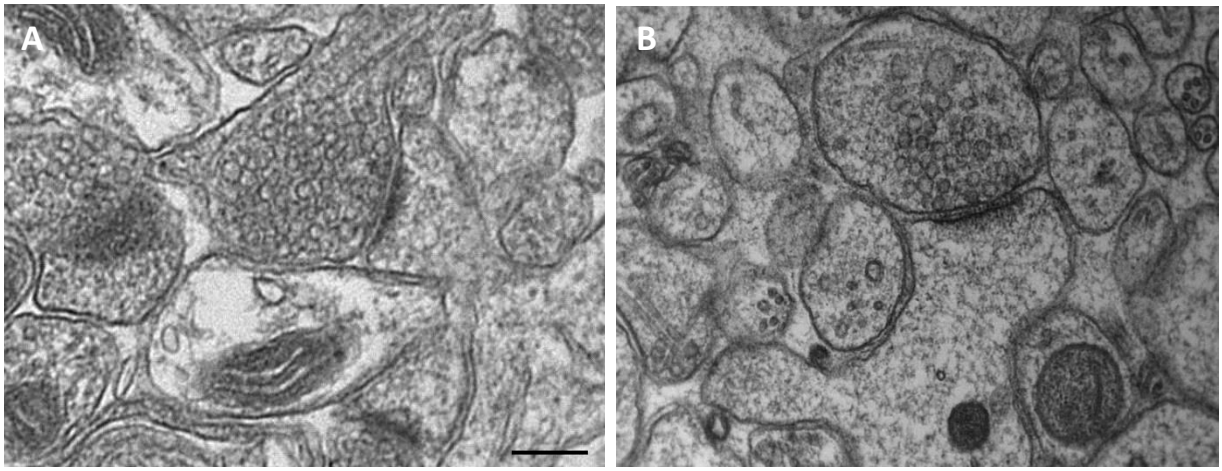


Figure 6 : Comparaison de la morphologie de synapses excitatrices d'hippocampe après fixation chimique et après CHP. Barre d'échelle : 200 nm.

A. Micrographie d'une synapse immobilisée par fixation aldéhydique.

B. Micrographie d'une synapse immobilisée par CHP.

Noter que le bouton synaptique a une forme plus arrondie et que les VSs apparaissent moins agrégées après CHP.

L'étude des terminaisons présynaptiques, en 3D et à une résolution suffisante pour observer les structures moléculaires a nécessité de nouveaux développements techniques. La tomographie électronique a été adaptée à l'étude de spécimens biologiques dans les années 80. Elle consiste à acquérir en ME des micrographies d'un échantillon inclus dans une section de résine de 100 à 300 nm d'épaisseur sous une succession progressive d'angles d'inclinaison

(Baumeister et al. 1999, Fernandez-Busnadiego et al. 2010). Les images ainsi acquises sont ensuite réalignées et traitées informatiquement pour obtenir une reconstruction 3D de la structure d'intérêt. Cette technique d'imagerie permet d'obtenir une résolution d'environ 5 nm en z (Siksou et al. 2009).

Après immobilisation par congélation, l'échantillon peut également être maintenu à très basse température (-140°C) dans un état hydraté pour être observé directement en cryotomographie (tomographie à très basse température). Cette technique permet d'éviter les artéfacts éventuels induits par les étapes de déshydratation et de coloration, mais nécessite de travailler sur des échantillons très fins (moins de 500 nm), ce qui exclut l'étude de tissus.

Ces deux techniques de tomographie ont permis d'analyser l'organisation du réseau des filaments et des VSs dans les terminaisons (Fig. 7 ; Siksou et al. 2007, Fernandez-Busnadiego et al. 2010). Les VSs apparaissent interconnectées entre elles par des filaments de 30 nm de longueur, composés pour partie de Synapsine. Chaque VS est reliée en moyenne à 1 à 3 autres VSs. D'autres types de filaments d'une longueur de 60 nm et de nature non identifiée relient également certaines VSs à la membrane plasmique au niveau du site de libération du neurotransmetteur. La terminaison présynaptique contient donc un réseau de filaments dense et complexe qui participe au recrutement, au maintien et à l'organisation des VSs dans le bouton.

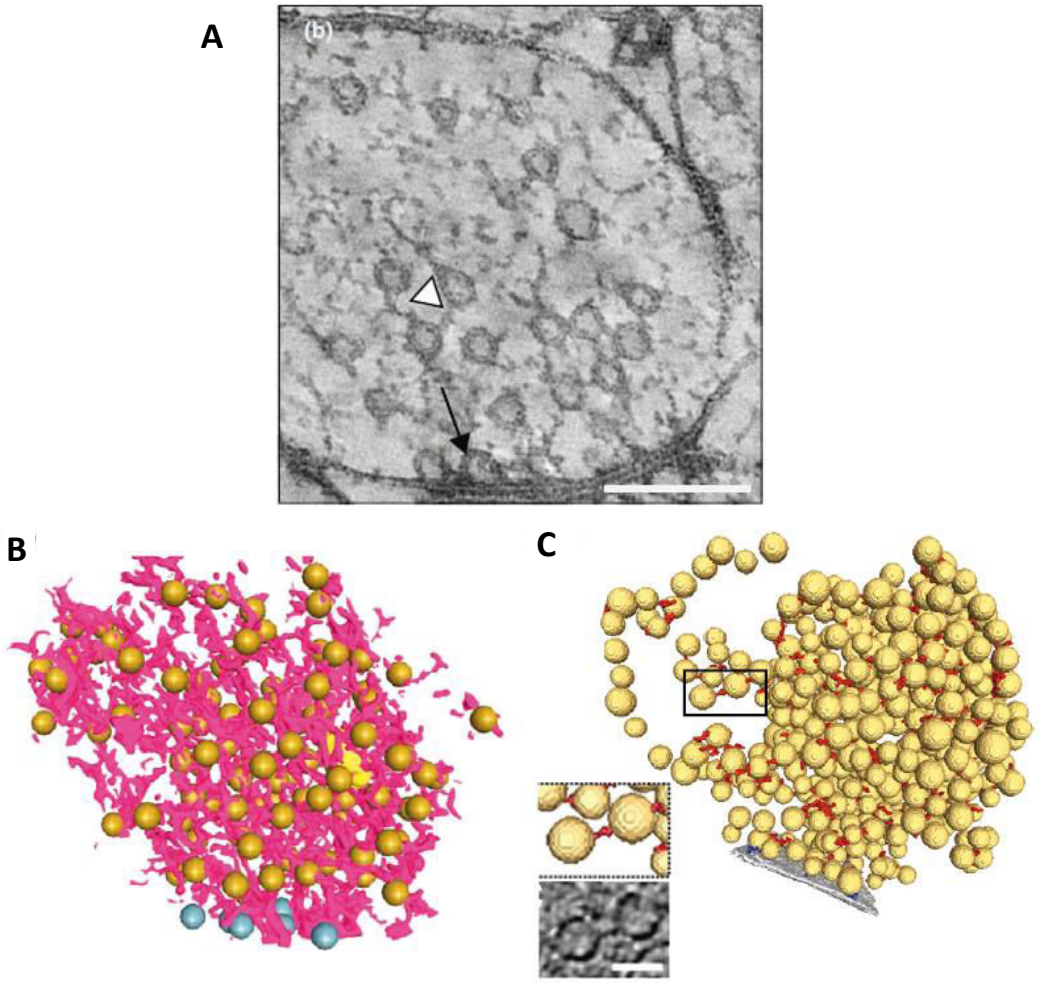


Figure 7 : Description du réseau de filaments du bouton présynaptique (A, B : Siksou et al. 2007 ; C : Fernandez-Busnadiego et al. 2010).

A. Section virtuelle issue d'un tomogramme d'un bouton synaptique d'une synapse excitatrice d'hippocampe de souris (Tête de flèche : filament, Flèche : VS ancrée à la ZA). Barre d'échelle : 200 nm.

B. Reconstruction du contenu du bouton à partir du tomogramme (Rose : filaments, Sphères jaunes : VSs, Sphères bleues : VSs ancrées à la ZA).

C. Reconstitution du contenu d'un bouton après cryotomographie (Rouge : filaments, Sphères jaunes : VSs). Barre d'échelle : 50 nm.

2. Les vésicules synaptiques

Les vésicules synaptiques sont les organelles renfermant le neurotransmetteur, du glutamate dans le cas d'une majorité des synapses excitatrices du SNC (Purves et al. 2004). Elles ont d'abord été décrites comme ayant une morphologie variable suivant le type de synapse observée (Peters et al. 1991) : sphériques aux synapses excitatrices et pléiomorphiques (mélange de vésicules sphériques et aplaties) aux synapses inhibitrices. Cependant, il a été montré que les VSs des terminaisons excitatrices ou inhibitrices s'aplatissent à mesure que la tonicité de la solution de fixation augmente (Valdivia 1971). D'autre part, après immobilisation par congélation rapide sans fixateur aldéhydique, toutes les VSs des synapses apparaissent sphériques et d'un diamètre compris entre 30 et 50 nm (Nakajima & Reese 1983, Tatsuoka & Reese 1989). Ces résultats indiquent que l'effet osmotique des fixateurs aldéhydiques induit une déformation membranaire des VSs. L'immobilisation par congélation apparaît donc nécessaire pour étudier la morphologie des VSs.

D'un point de vue biochimique, la membrane des VSs présente un ratio protéine/lipide extrêmement élevé (60/40 en termes de masse ; Poudel & Bai 2014). On comptabilise 600 domaines transmembranaires par vésicule, ce qui suggère que la majorité de la surface membranaire est couverte de protéines. Ces protéines sont de plus très diverses ; 80 protéines différentes ont pu être identifiées par des approches de protéomique à partir de fractions de VSs purifiées (Fig. 8 ; Takamori et al. 2006). Une partie de ces protéines (protéines SNARE, Synaptotagmine, Rab3…) est impliquée dans les étapes du trafic des VSs ; elles seront décrites en détail dans les paragraphes suivants. Une autre partie des protéines vésiculaires permet la capture et le stockage du neurotransmetteur : aux synapses glutamatergiques, ces protéines sont les transporteurs du glutamate V-GluT 1 et 2, alimentés par un gradient électrochimique. Ce gradient est entretenu par une ATPase de type V, une pompe à proton dépendante de l'ATP. Cet équipement protéique permet aux VSs d'assurer la continuité du cycle de libération-recyclage.

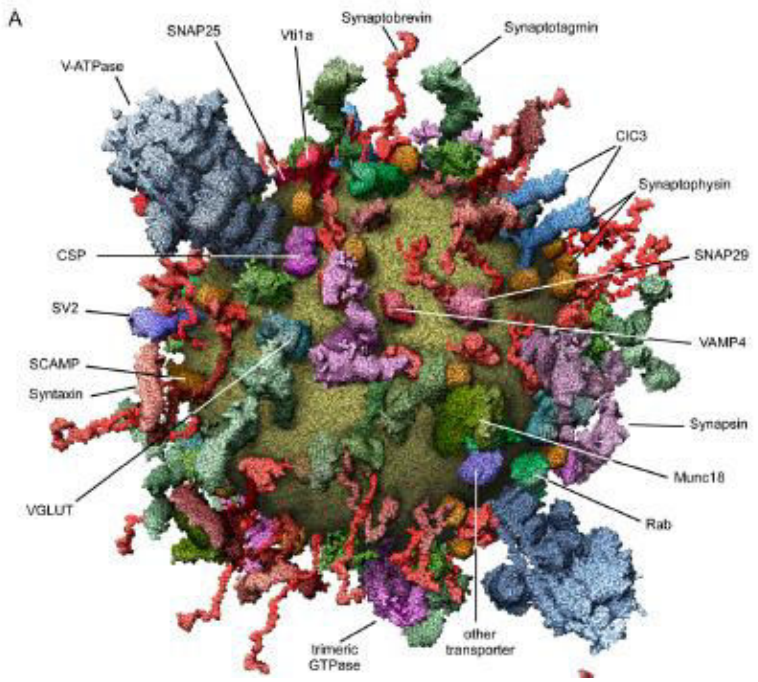


Figure 8 : Modélisation d'une VS et des protéines associées à partir de données morphologiques, protéomiques et structurales (Takamori et al. 2006)

3. Organisation de la zone active

La zone active est une structure spécialisée du bouton présynaptique, caractérisée en détail grâce à différentes études en ME (Palay 1956, Birks et al. 1960, Couteaux & Pecot-Dechavassine 1970). C'est une portion de membrane de 200 à 500 nm de diamètre en général pour les petites synapses excitatrices établies sur des épines. Cette membrane est associée à un réseau de macromolécules sur sa face cytoplasmique et est située en directe opposition à la DPS. Une partie des vésicules du bouton (10% pour ce type de synapse) se trouve en contact avec cette membrane, en rapport étroit avec le réseau de macromolécules. Ces vésicules associées à la membrane de la ZA sont dites « ancrées » à la ZA (Fig. 9A, B). La nature du contact entre ces vésicules et la membrane a fait l'objet d'une controverse. En effet, plusieurs études biophysiques proposent un modèle d'intermédiaire d'hémifusion entre la membrane vésiculaire et la membrane de la ZA, pour expliquer les aspects énergétiques du mécanisme de fusion complète des membranes lors de l'exocytose (Kesavan et al. 2007, Chernomordik & Kozlov 2008). En outre, une étude réalisée en tomographie électronique montre des figures d'hémifusion à la ZA de synapses corticales (Zampighi et al. 2006). Cependant, les synapses et synaptosomes immobilisés par congélation, sans fixateur aldéhydique, et observés en tomographie montrent clairement une apposition de la membrane des vésicules en contact avec la ZA, et non une hémifusion (Siksou et al. 2009, Fernandez-Busnadiego et al. 2010). L'utilisation de fixateur aldéhydique peut expliquer les figures d'hémifusion observées. En effet, il a été montré que les aldéhydes induisent la fusion de vésicules avec la membrane plasmique (Smith & Reese 1980), et induisent des déformations membranaires (Rostaing et al. 2006). Les hémifusions pourraient donc résulter de l'activité du fixateur sur les membranes des VSs et de la ZA.

Le réseau de macromolécules sur la face cytoplasmique de la ZA a d'abord été décrit grâce à l'utilisation de colorations à l'acide phosphotungstique ou au bismuth iodide avant l'étape d'enrobage (Gray 1963, Bloom & Aghajanian 1966, Pfenninger et al. 1969, Triller &Korn 1985). Ces colorants, denses aux électrons, se fixent uniquement au matériel protéique et permettent donc d'étudier en ME la répartition du matériel protéique de la ZA. En utilisant ces techniques, le réseau de macromolécules de la ZA apparaît comme une structure hexagonale d'amas de

matériel dense, appelée grille présynaptique, attachée à la membrane. Les vésicules ancrées sont disposées régulièrement entre ces amas (Peters et al. 1991, Triller & Korn 1985). Cependant, cette organisation n'est pas visible sur les échantillons immobilisés sans fixateur aldéhydique par des méthodes de congélation rapide. Les échantillons de cortex cerebelleux observés en ME après congélation rapide et cryofracture montrent que les molécules associées à la ZA se présentent sous la forme d'un réseau de filaments fins connectés au VSs proches de la ZA (Landis et al. 1988, Hirokawa et al. 1989). Landis et Reese font alors l'hypothèse que l'utilisation de fixateur chimique agrège les filaments entre eux et induit la formation d'amas autour des vésicules ancrées.

L'organisation du matériel dense de la ZA observée par Landis, Reese et Hirokawa a été confirmée et caractérisée finement par l'étude de boutons synaptiques de tranches d'hippocampe en tomographie électronique après CHP et cryosubstitution (Siksou et al. 2007, Siksou et al. 2009). Les tomogrammes ainsi que les reconstructions en 3D du bouton montrent que les vésicules ancrées sont regroupées à proximité d'amas de matériel dense, et reliées à ces structures par de courts filaments (Fig. 9). Une étude ultérieure réalisée en cryotomographie sur des préparations de synaptosomes a confirmé la présence de ces filaments et l'absence d'organisation régulière du matériel dense de la ZA (Fernandez Busnadiego et al. 2010).

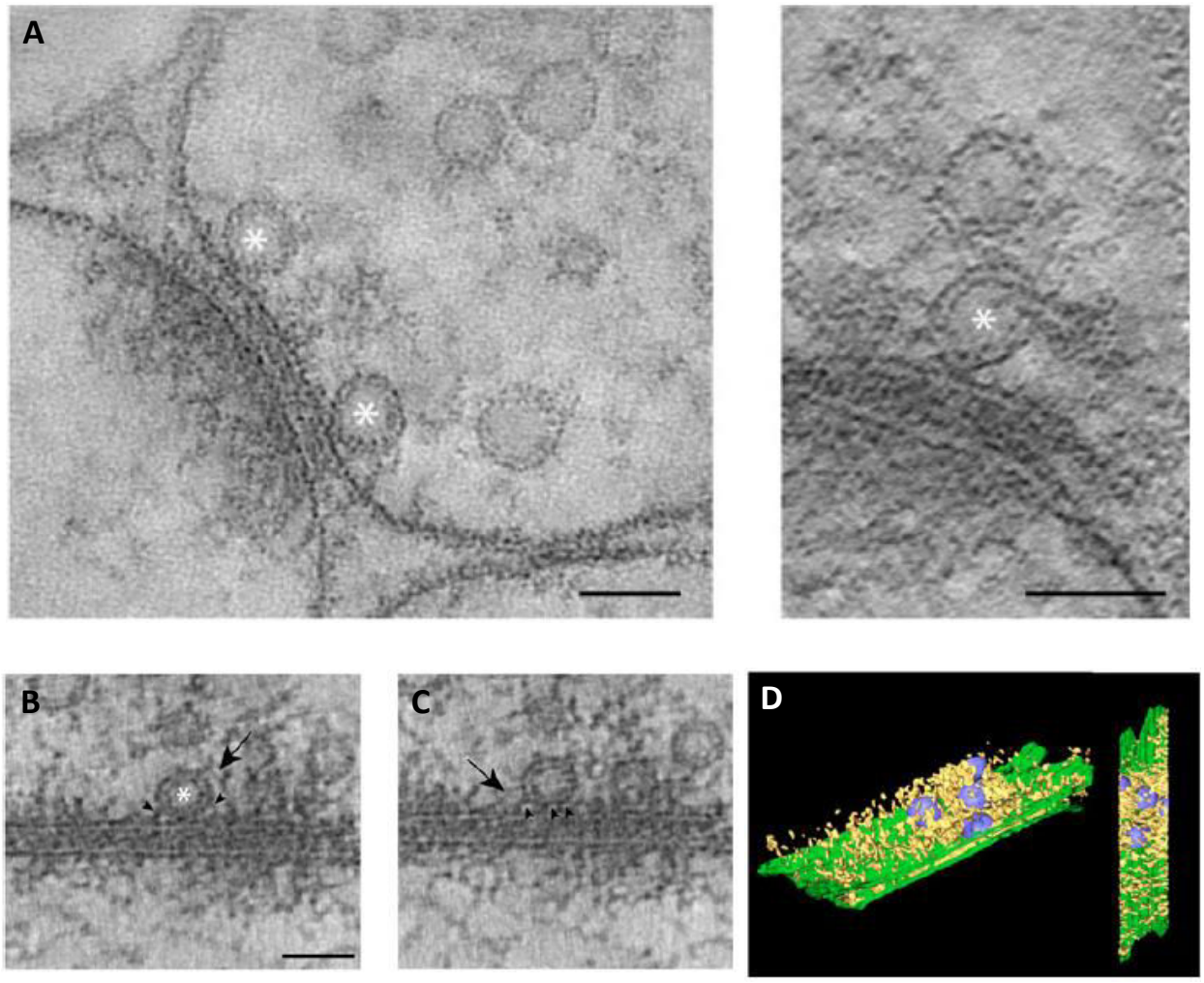


Figure 9 : Etude en tomographie du matériel dense de la ZA (Siksou et al. 2009).

A. Deux sections virtuelles de tomogramme de ZA d'une synapse excitatrice d'hippocampe (Etoiles : VSs ancrées).

B. et C. Deux sections virtuelles issues d'un même tomogramme (Etoile : VS ancrée, Flèches longues : filaments reliant les VSs au matériel dense de la ZA, Têtes de flèches : petits filaments entre une VS ancrée et la membrane plasmique).

C. Reconstitution de la ZA, vues oblique et de face (Bleu : VSs ancrées, Jaune : filaments, Vert : membrane).

Barres d'échelle : 50 nm.

De plus, la taille de la ZA est positivement corrélée au nombre de VSs ancrées (Fig. 10 ; Murthy et al. 2001, Holderith et al. 2012). Une étude réalisée en cryofracture et

immunohistochimie a également mis en évidence une corrélation positive entre la taille de la ZA et le nombre de CaV de type 2.1 à la terminaison (Fig. 10 ; Holderith et al. 2012). Ces canaux sont de plus exclusivement localisés à la ZA. Les CaV présents à la membrane de la ZA permettent une augmentation locale et rapide de la concentration de calcium à proximité des VSs ancrées lors de l'arrivée d'un potentiel d'action à la terminaison. Ils sont les garants d'une transmission rapide et fiable, et la ZA pourrait donc être impliquée dans leur organisation. Enfin, la taille de la ZA est corrélée à la taille de la DPS (Harris & Stevens 1989). La taille de la DPS est elle-même corrélée au nombre de récepteurs au glutamate de type AMPA (Takumi et al. 1999). Ainsi, la taille de la jonction synaptique (ZA et DPS) semble être un facteur déterminant de l'efficacité de la transmission synaptique.

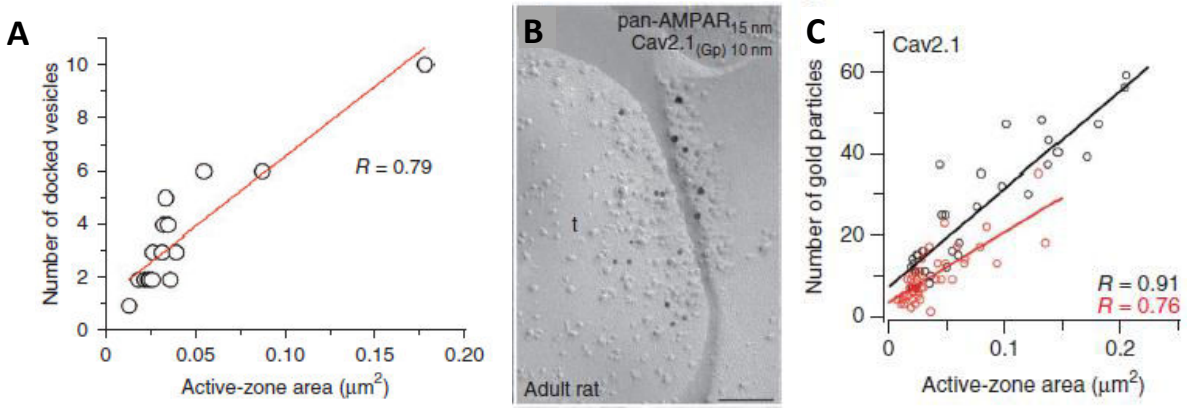


Figure 10 : Corrélation de la taille de la ZA au nombre de VSs ancrées et au nombre de CaV (Holderith et al. 2012).

A : Corrélation du nombre de VSs ancrées à la taille de la ZA.

B : Immunolocalisation des CaV après cryofracture d'une synapse de la couche CA3 de l'hippocampe (t : terminaison présynaptique)) ; barre d'échelle : 100 nm.

C : Corrélation du nombre de CaV à la terminaison à la taille de la ZA (Noir : animal 1, Rouge : animal 2).

II. Fonctionnement de la zone active

Le réseau de macromolécules complexe de la zone active organise et régule la libération de neurotransmetteur dans la fente synaptique. Il assure différentes fonctions cruciales pour la transmission nerveuse : c'est le lieu de l'ancrage des vésicules synaptique face à la DPS, ancrage pré requis pour la fusion d'une vésicule et la libération de neurotransmetteur. Son organisation permet de coupler l'entrée de calcium dans le bouton, suite à l'arrivée d'un potentiel d'action, à la fusion d'une partie des VSs ancrées. Enfin, les molécules de la ZA participent également à la plasticité à court et long terme de la terminaison présynaptique. La ZA permet donc d'assurer une transmission fiable, efficace et régulable (Sudhof 2012). Nous allons d'abord présenter le mécanisme de fusion des VSs avec la membrane plasmique à la ZA, puis le mécanisme de recrutement des VSs à la ZA, préalablement à la fusion.

A. Mécanisme de libération du neurotransmetteur

1. Fusion des vésicules à la zone active

L'arrivée d'un potentiel d'action à la terminaison présynaptique induit une dépolarisation de la membrane du bouton. Cette dépolarisation provoque l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage présents dans la membrane plasmique. L'augmentation locale de calcium intracellulaire entraîne des évènements de fusion synchronisés avec l'arrivée du potentiel d'action, et l'exocytose est alors dite évoquée. Des évènements de fusion peuvent également se produire stochastiquement, en l'absence de potentiel d'action ; on parle dans ce cas de libération spontanée.

La fusion des vésicules à la ZA été visualisée en ME à la jonction neuromusculaire de grenouille (Heuser & Reese 1981) ainsi que plus récemment sur des synapses de neurones hippocampaux de rat en culture (Watanabe et al. 2013). Dans ces deux études, les auteurs appliquent une stimulation à la préparation avant de l'immobiliser par congélation afin de « capturer » des images de fusion à la ZA. Ils observent des figures en Omega correspondant à des VSs en fusion avec la membrane plasmique, dans un délai de quelques ms après la

stimulation (Fig. 11). Ce délai est probablement dû aux conditions expérimentales. En effet, des données électrophysiologiques indiquent que le délai entre l'arrivée du potentiel d'action et la fusion des VSs est inférieur à 1ms (Sabatini & Regehr 1996).

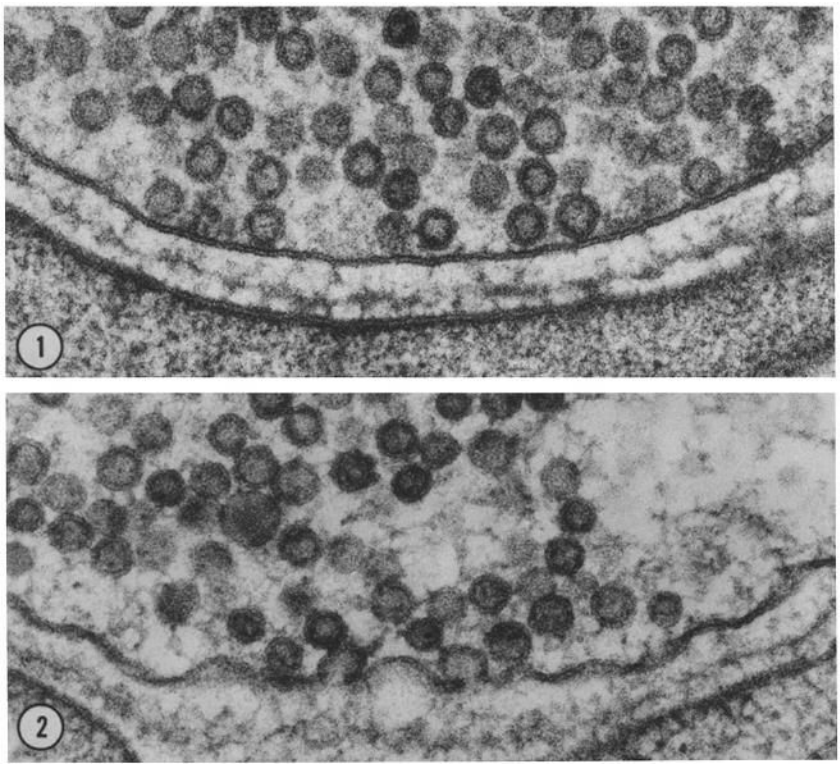


Figure 11 : Visualisation de l'exocytose à la jonction neuromusculaire de grenouille en ME (Heuser & Reese 1981).

1. Micrographie d'une terminaison non stimulée.

2. Micrographie d'une terminaison stimulée ; la membrane plasmique présente des déformations correspondant à des figures de fusion et la terminaison contient un nombre réduit de VSs comparativement à la figure 1.

2. Probabilité de libération du neurotransmetteur

La probabilité de libération (Pl) à l'échelle d'une terminaison présynaptique est définie comme la probabilité de fusion d'une ou plusieurs VSs à la zone active en réponse à un potentiel d'action. C'est un des paramètres déterminants de l'efficacité de la transmission. Elle peut être évaluée grâce à des techniques de microscopie optique à l'aide de différents

colorants fluorescents, ajoutés au milieu extracellulaire et chargés à l'intérieur des VSs par une première série de stimulations (Betz & Bewick 1992, Granseth et al. 2006, Yang & Calakos 2013). Les stimulations suivantes induisent des évènements d'exocytose qui peuvent être visualisés grâce à la libération du colorant contenu dans les VSs. Le niveau de fluorescence donne accès à une indication du nombre d'évènements de libération. On peut ainsi en déduire la probabilité d'évènements de libération par potentiel d'action. Une autre méthode s'appuie sur les évènements calciques induits par la libération de neurotransmetteur au niveau des épines postsynaptiques (Emptage et al. 1999). Elle consiste à stimuler à basse fréquence des neurones remplis d'un indicateur calcique fluorescent. Les augmentations de fluorescence détectées au niveau des épines dendritiques traduisent une augmentation de la concentration postsynaptique de calcium. Chaque élévation de calcium en réponse à un potentiel d'action reflète un ou plusieurs évènements de libération évoquée de neurotransmetteur. Le nombre d'augmentation de la fluorescence par stimulation indique alors directement la Pl de la synapse observée. En ME on peut évaluer la Pl en stimulant un neurone en présence de colorant dans le milieu extracellulaire (Murthy et al. 1997). On peut ainsi compter le nombre de VSs reformées pour un nombre donné de stimulations. Ces méthodes ont permis d'évaluer qu'il y a entre 0.3 et 0.8 VSs libérées par potentiel d'action aux synapses excitatrices d'hippocampe. D'un point de vue structural, la Pl est corrélée positivement à la taille de la ZA et au nombre de VSs ancrées (Fig. 12 ; Murthy et al. 2001, Branco et al. 2010, Holderith et al. 2012).

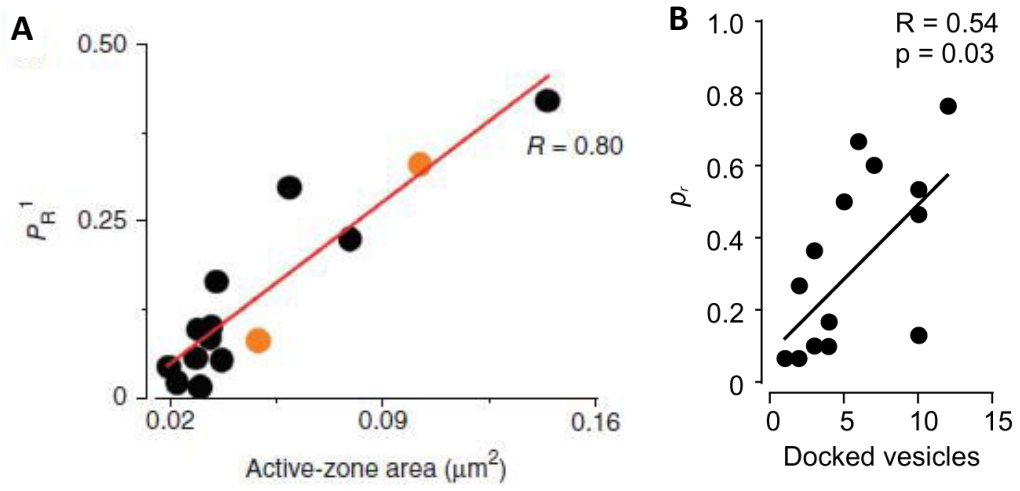


Figure 12 : Corrélations positives de la Pl à la taille de la ZA (A, Holderith et al. 2012) et au nombre de VSs ancrées à la ZA (B, Branco et al. 2010).

3. Assemblage du complexe SNARE et rôle dans la fusion

Les protéines SNARE (pour « soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor ») sont nécessaires à différents processus de fusion de vésicules dans les cellules eucaryotes (Rothman 1994). Ces protéines ont pour particularité de posséder un ou plusieurs domaines SNARE, des domaines « coiled-coil » formant des hélices alpha qui peuvent s'associer entre elles.

Le rôle essentiel des protéines SNARE dans l'exocytose des VSs a été découvert grâce à l'étude de l'effet des neurotoxines botulique et tétanique sur le fonctionnement synaptique. Différents sous-types de ces toxines clivent spécifiquement la Synaptobrévine2, SNAP25 ou la Syntaxine1, trois protéines des terminaisons présynaptiques du SNC, tout en bloquant les évènements de fusion (Link et al. 1992, Blasi et al. 1993a, Blasi et al. 1993b). Ces protéines ont ensuite été identifiées comme des protéines de la famille SNARE (Sollner et al. 1993). La Syntaxine1 et SNAP-25 sont associées à la membrane plasmique, tandis que la Synaptobrévine2 ou « vesicle-associated membrane protein 2» (VAMP2) est une protéine de la membrane

vésiculaire (Fig. 13). Ces trois protéines interagissent pour former un complexe à 4 hélices qui maintient la VS en contact étroit avec la membrane plasmique au niveau de la ZA, dans une conformation favorisant la fusion ultérieure des membranes.

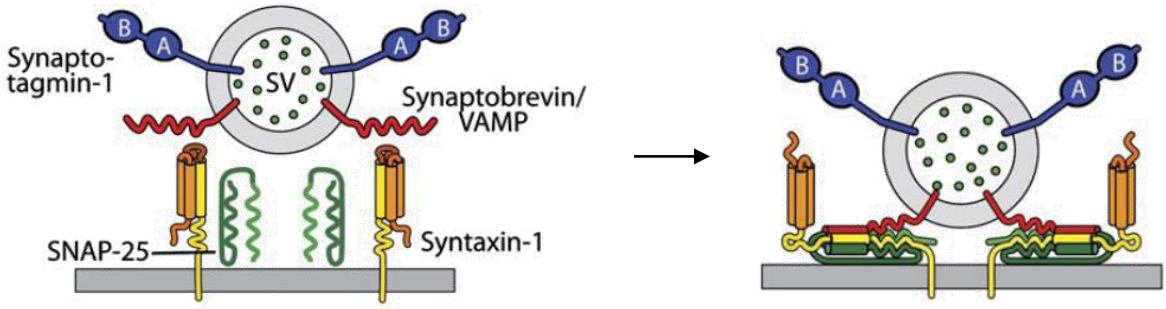


Figure 13 : Schéma de l'assemblage du complexe SNARE (Tang et al. 2006).

D'autres molécules de la ZA sont impliquées dans le mécanisme de fusion des VSs. Les protéines Munc18 et Munc13 sont indispensables à l'exocytose et agiraient en permettant l'assemblage du complexe SNARE (Sudhof 2012). Le gène unc18 et son rôle dans le fonctionnement de la terminaison présynaptique ont été identifiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. L'homologue de la protéine Unc18 chez la souris, Munc18, est indispensable à la libération du neurotransmetteur (Verhage et al. 2000). Paradoxalement, il a été montré qu'elle interagit avec la Syntaxine, en maintenant celle-ci dans une configuration fermée ne pouvant pas interagir avec SNAP25 et la Synaptobrévine (Hata et al. 1993, Jahn & Fasshauer 2012). Son rôle reste encore mal compris ; en effet, la délétion du gène munc18 est létale y compris pour des neurones en culture, ce qui rend l'étude de sa fonction particulièrement compliquée (Heeroma et al. 2004).

Comme pour Munc18, le gène unc13 a été identifié dans un premier temps chez *Caenorhabditis elegans* (Brenner 1974). Trois gènes homologues ont ensuite été mis en évidence chez les mammifères, munc13-1, 13-2 et 13-3 (Brose et al. 1995). La famille de protéines Munc13 est exprimée aux terminaisons nerveuses et est essentielle à la libération de neurotransmetteur. Le rôle de Munc13 dans l'exocytose a fait l'objet d'une série d'études

réalisées sur différents modèles : *Caenorhabditis elegans* (Richmond et al. 1999), *Drosophila melanogaster* (Aravamudan et al. 1999) et la souris (Varoqueaux et al. 2002). Chez ces 3 espèces, la délétion de unc13, Dunc13 et Munc13, respectivement, provoque un blocage total de l'exocytose évoquée et spontanée. Ces études ont permis de conclure au rôle essentiel de Munc13 et ses homologues dans la fusion des VSs à la ZA. Le mécanisme d'action de Munc13 reste pour le moment à l'état de modèle hypothétique. Les protéines Munc13 ont pour particularité de posséder un domaine MUN et un domaine C2A indépendant du calcium. La mise en évidence d'interactions de Munc13 avec Munc18, et du domaine MUN avec la forme fermée de la Syntaxine1, suggère que Munc13 permet à la Syntaxine1 de passer de sa conformation fermée à une forme ouverte, permettant l'assemblage du complexe SNARE (Sudhof 2013). Ainsi, les effets d'une inactivation de unc13 chez *Caenorhabditis elegans* sont abolis par l'expression d'une forme constitutivement ouverte de la Syntaxine (Richmond et al. 2001).

La Synaptotagmine1 est une protéine transmembranaire des VSs (Matthew et al. 1981). En face cytoplasmique, elle contient deux domaines C2 qui interagissent avec les ions calcium. Cette interaction permet à la Synaptotagmine1 de se lier aux phospholipides membranaires (Brose et al. 1992). Elle interagit également avec le complexe SNARE en se liant à la Syntaxine1 (Sollner et al. 1993). Des études de la transmission chez des animaux KO pour la Synaptotagmine1 ont permis de montrer que cette protéine est nécessaire à l'exocytose dépendante du calcium. D'autre part, la réduction de l'affinité de la Synaptotagmine1 au calcium par des manipulations génétiques entraîne une diminution des évènements de fusion dépendant du calcium (Fernandez-Chacon et al. 2001). L'ensemble de ces données suggère que la Synaptotagmine1 joue le rôle de senseur calcique dans l'exocytose évoquée (Rizo et al. 2006).

La Complexine a été identifiée en raison de son affinité pour le complexe SNARE (McMahon et al. 1995). Elle agirait comme un cofacteur de l'activité de la Synaptotagmine1 dans l'exocytose évoquée. En effet, les animaux KO pour la Complexine présentent une diminution de l'exocytose évoquée et une augmentation de l'exocytose spontanée (Reim et al. 2001). La

Complexine interviendrait en amont de la Synaptotagmine : en se liant au complexe SNARE, elle stabiliserait celui-ci dans une forme métastable qui ne peut pas engager la fusion de la VS à la membrane de la ZA. La liaison de calcium à la Synaptotagmine libèrerait la Complexine du complexe SNARE (Giraudo et al. 2006, Tang et al. 2006). L'interaction entre la Synaptotagmine et la Complexine permettrait ainsi de coupler la libération des VSs à l'entrée de calcium dans la terminaison et d'inhiber les évènements de libération asynchrone.

Le mécanisme exact de la fusion des membranes de la ZA et des VSs reste encore mal compris. L'assemblage du complexe SNARE et des protéines associées exercerait une tension mécanique suffisante pour entraîner la fusion des membranes (Kesavan et al. 2007, Bretou et al. 2008). Il en résulterait l'ouverture d'un pore de fusion qui pourrait s'élargir par la suite. Après la fusion, le complexe SNARE est désassemblé par la liaison d'une ATPase, la NSF, avec SNAP25 (Rizo & Rosenmund 2008). L'ensemble des protéines impliquées dans la fusion peut alors à nouveau participer à l'exocytose des VSs.

4. Rôle de RIM

Les protéines RIM (Rab3 Interacting Molecule) sont des protéines multi-domaines identifiées comme des protéines de la ZA grâce à leur interaction avec la protéine vésiculaire Rab3 (Wang et al. 1997). Le génome des Vertébrés comporte 4 gènes codant pour des protéines RIM, chacune pouvant être exprimé sous 1 à 3 isoformes différentes : α, β et γ (Wang & Sudhof 2003, Kaeser 2011). A la terminaison présynaptique, seule la protéine RIM1, forme majoritaire, et la protéine RIM2 sont exprimées. Sous leur isoforme α, elles possèdent un grand nombre de domaines d'interaction avec les protéines de la ZA (Fig. 14 ; Coppola et al. 2001, Kaeser et al. 2011) :

- une hélice alpha, domaine d'interaction avec Rab3
- un domaine en doigt de zinc N-terminal qui interagit avec le domaine C2A de Munc13
- un domaine PDZ qui se lie aux canaux calciques dépendant du voltage (CaV) de type N, P et Q

- un domaine C2A qui interagit avec SNAP25 et la Synaptotagmine1
- une séquence riche en proline qui lie la RIM Binding Protein (RIM-BP)
- un domaine C2B C-terminal interagissant également avec qui interagit avec SNAP25 et la Synaptotagmine1

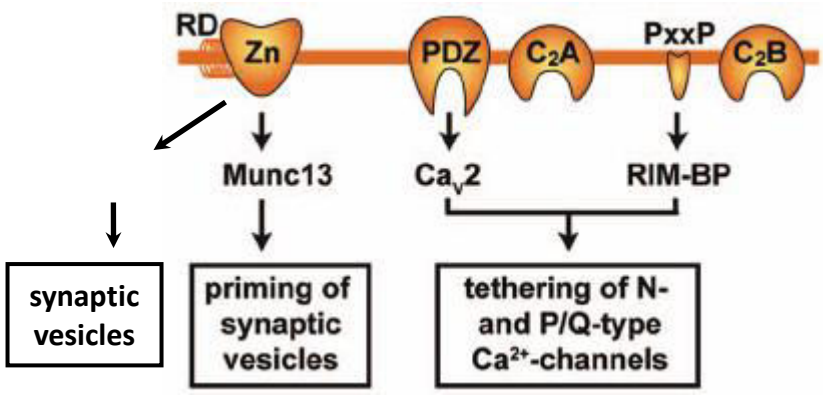


Figure 14 : Représentation schématique des domaines d'interaction de la protéine RIM et de leurs fonctions potentielles. Le « priming » ou amorçage des VSs est décrit dans le chapitre suivant (Kaeser 2011).

Les isoformes β et γ sont exprimées sous le contrôle de promoteurs différents et possèdent moins de domaines d'interaction. RIM1β et RIM2β comportent une courte séquence β–spécifique, des domaines PDZ et C2A centraux, et un domaine C2B C-terminal : elles ne peuvent donc pas interagir avec Munc13 et Rab3. RIM2γ possède uniquement un domaine C2B.

RIM intervient indirectement dans le mécanisme de libération, via différentes interactions avec les molécules impliquées dans la fusion des VSs. En l'absence de la protéine RIM, Munc13 est présente à la terminaison sous la forme d'homodimère, liée par l'interaction des domaines C2A N terminaux (Fig. 14A ; Lu et al. 2006, Deng et al. 2011). Cette forme ne peut pas interagir avec la Syntaxine1. L'interaction du domaine C2A de Munc13 avec le domaine en doigt de zinc de RIM provoque la dissociation de l'homodimère ; les monomère Munc13 peuvent alors participer à l'assemblage du complexe SNARE. D'autre part, les domaines d'interaction aux CaV et RIM-BP permettent la formation d'un complexe tripartite qui est impliqué dans le recrutement des CaV à proximité du complexe SNARE. Cette localisation des CaV permet une augmentation rapide de la concentration de calcium, suffisante pour déclencher la fusion de

VSs (Hibino et al. 2002, Han et al. 2011). RIM interagit également avec la protéine Rab3, une GTPase présente exclusivement à la membrane des VSs, dans sa conformation liée au GTP (Fischer von Mollard et al. 1990). Rab3 a un rôle de régulateur de la fusion évoquée des VSs ; elle pourrait être impliquée dans la formation du complexe SNARE ainsi que dans la régulation de la sensibilité de l'exocytose au calcium (Johannes et al. 1996, Yamaguchi et al. 2002, Schluter et al. 2004). Il a été montré que RIM forme avec Munc13 et Rab3 un complexe tripartite ; le rôle de ce complexe dans la régulation de la fusion évoquée est encore méconnu (Dulubova et al. 2005). L'ensemble des interactions décrites dans ce chapitre est résumé par la figure 15 B, tirée d'une revue de Thomas Sudhof (Sudhof 2013).

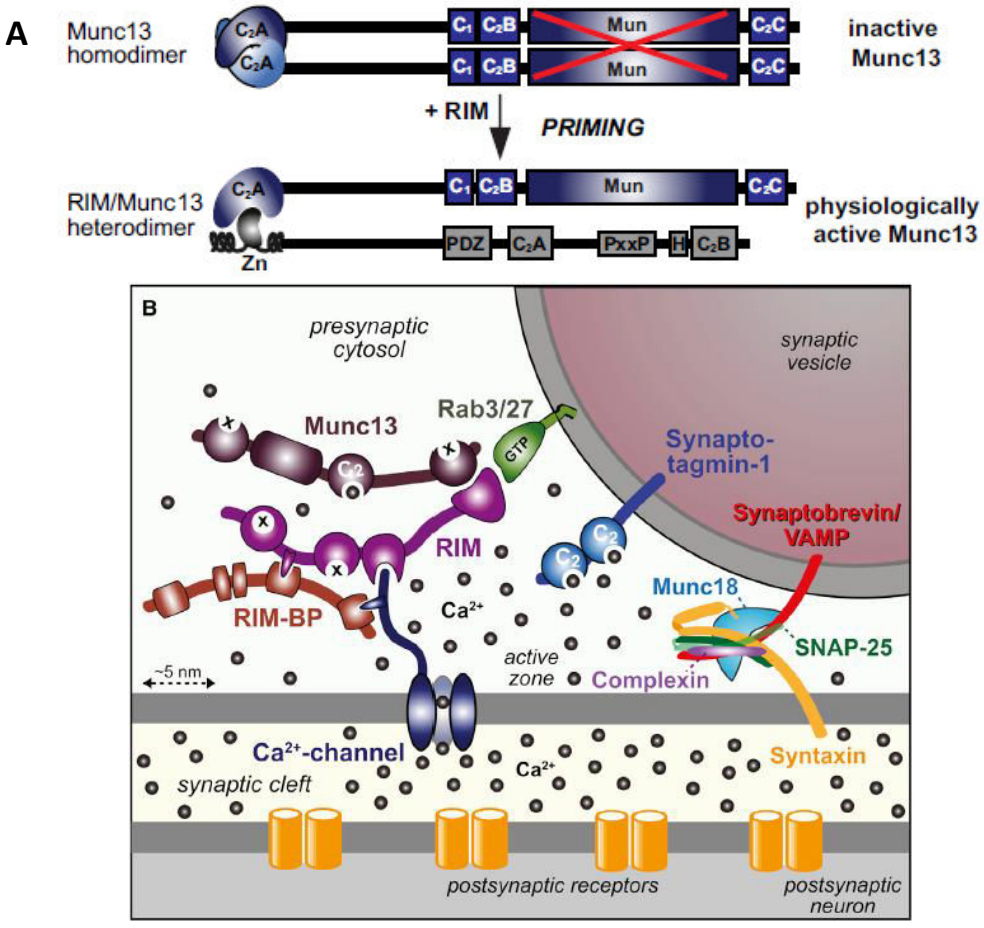


Figure 15 : Rôle de RIM dans l'assemblage du complexe SNARE.

A. Représentation schématique de l'interaction des protéines RIM et Munc13 permettant l'activation de Munc13 et son interaction avec les protéines SNARE (Deng et al. 2011).

B. Représentation schématique des protéines de la ZA. Noter le rôle central de la protéine RIM (Sudhof 2013).

B. Mécanismes d'ancrage et d'amorçage des vésicules à la zone active

On distingue généralement deux étapes précédant la fusion des VSs. L'ancrage désigne l'apposition des VSs à la membrane de la ZA ; cette apposition est visible en ME. L'amorçage, ou « priming », rend les VSs ancrées compétentes à la fusion ; l'ensemble des VSs amorcées est appelé « Readily Releasable Pool » (RRP). Le nombre de VSs dans le RRP est généralement évalué en électrophysiologie, dans des conditions qui forcent la libération de l'ensemble des VSs amorcées (solution de sucrose ou forte concentration de KCl). Le lien entre les stades d'ancrage et d'amorçage est encore débattu, en partie en raison de la disparité des techniques employées pour les étudier. Nous allons présenter des données de la littérature impliquant le complexe SNARE et les protéines RIM dans l'ancrage et l'amorçage des VSs.

1. Rôle du complexe SNARE dans l'ancrage et l'amorçage des VSs

Outre son rôle dans la fusion, l'assemblage du complexe SNARE pourrait en partie être responsable de l'ancrage des VSs. En effet, sa structure à 4 hélices maintient les VSs liées à la membrane plasmique de la ZA, en amont de la fusion.

Les premières études de l'ancrage des VSs suggéraient que celui-ci se produisait indépendamment du complexe SNARE. En effet, la morphologie des terminaisons présynaptiques d'animaux unc13, Dunc13 ou Munc13 KO étudiée en ME après fixation aldéhydique ne présentait pas de défaut particulier, et notamment pas de différence du nombre de VSs ancrées à la ZA (Richmond et al. 1999, Aravamudan et al. 1999, Varoqueaux et al. 2002). Ces résultats indiquaient que Munc13, et donc le complexe SNARE, agiraient en aval de l'ancrage, lors de l'étape d'amorçage. Cependant, l'étude de terminaisons présynaptiques de *Caenorabditis elegans* unc13 KO et de souris Munc13-1/2 DKO après CHP a mis en évidence une diminution, voire une absence d'ancrage des VSs à la ZA (Weimer et al. 2006, Siksou et al. 2009, Stigloher et al. 2011). En particulier, l'étude en tomographie électronique des terminaisons de neurones excitateurs d'hippocampe de souris Munc13-1/2 KO a montré que les VSs ne sont plus ancrées, mais restent à une distance d'environ 10 nm de la membrane plasmique de la ZA

(Fig. 16 ; Siksou et al. 2009). L'utilisation de fixateurs aldéhydiques déforme les compartiments cellulaires (Rostaing et al. 2006). Il est donc probable que leur utilisation dans les premières études ne permettait pas de mettre en évidence le défaut d'ancrage des VSs. Les études ultérieures réalisées en tomographie électronique après CHP montrent donc que Munc 13 est nécessaire à l'ancrage des VSs, préalablement à la fusion. L'ancrage et l'amorçage des VSs ont ainsi un mécanisme moléculaire commun et pourraient être deux aspects, morphologique et fonctionnel, d'un même mécanisme.

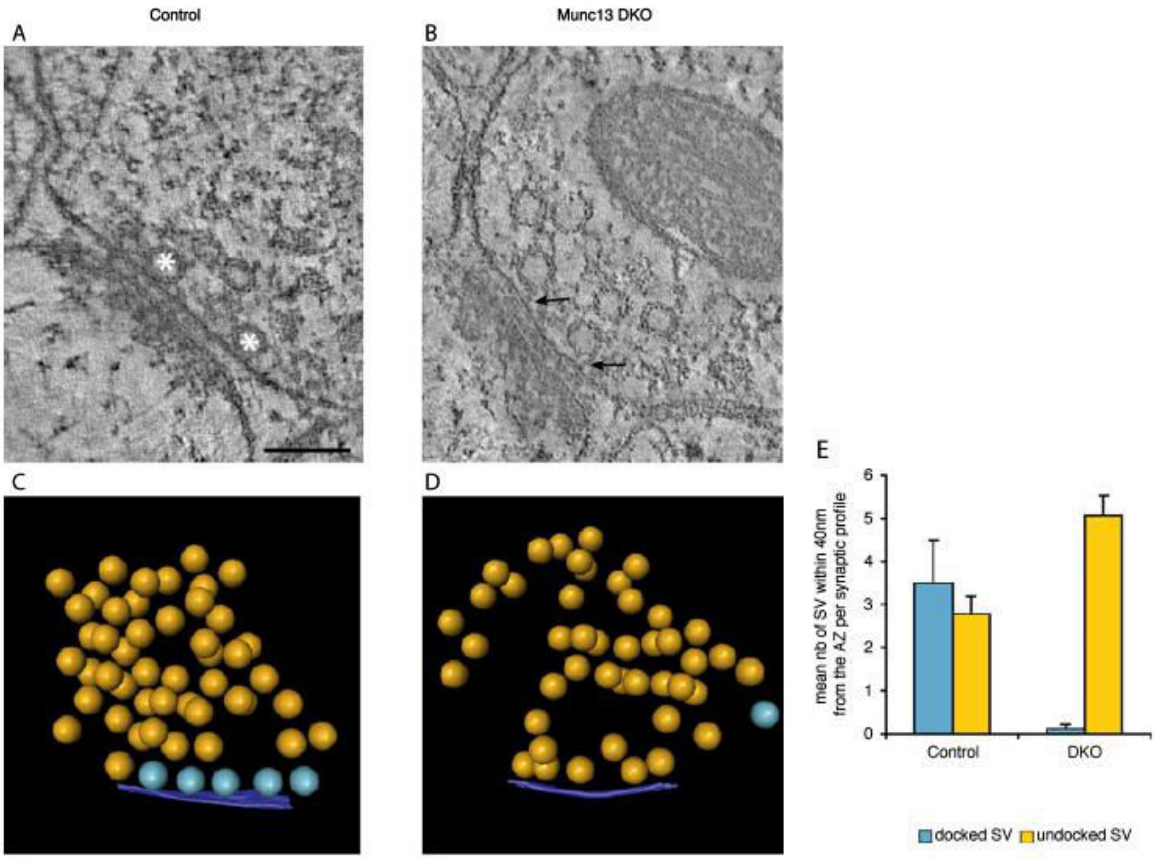


Figure 16 : Mise en évidence du rôle de Munc13 dans l'ancrage des VSs à la ZA (Siksou et al. 2009).

A. et B. Tomogrammes de ZA de synapses excitatrices d'hippocampe d'animaux contrôles et d'animaux Munc13 1/2 KO (Etoiles : VSs ancrées, Flèches : filaments reliant les VSs à la ZA). Barre d'échelle : 100 nm.

C. et D. Reconstitution à partir des tomogrammes précédents de la répartition des VSs dans le bouton (Sphères jaunes : VSs non ancrées, Sphères bleues : VSs ancrées, Surface bleue : membrane de la ZA).

E. Analyse quantitative de l'ancrage chez les animaux Munc13 1/2 KO comparativement aux animaux contrôles.

2. Rôle de RIM dans l'ancrage et l'amorçage des VSs

La famille RIM comporte un seul gène homologue chez *Caenorhabditis elegans*, unc10, dont l'expression est nécessaire à l'ancrage des VSs (Weimer et al. 2006). La délétion de RIM1 et 2 au calice de Held chez la souris réduit significativement le nombre de vésicules ancrées à la ZA (Han et al. 2011), ce qui suggère que RIM participe également au mécanisme d'ancrage des VSs chez la souris. En accord avec ces données, la quantité de protéines RIM à la ZA est corrélée à la taille de la ZA et donc au nombre de VSs ancrées (Holderith et al. 2012). Le rôle de RIM dans l'ancrage pourrait être expliqué par son interaction avec les protéines Munc13 et Rab3 : la formation du complexe tripartite pourrait contribuer au rapprochement des VSs de la membrane de la ZA en favorisant la formation du complexe SNARE (Fig. 17).

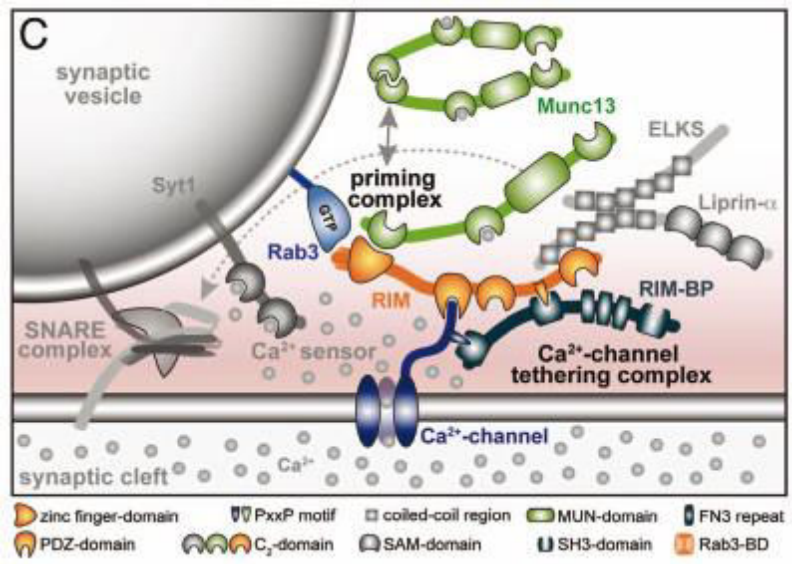


Figure 17 : Représentation schématique des interactions de RIM avec les protéines de la ZA (Kaeser 2011)

III. Plasticité à long terme de la libération du neurotransmetteur

La plasticité à long terme de la transmission synaptique a une importance cruciale dans différents processus neurobiologiques. Des changements de l'efficacité synaptique sont impliquée notamment dans les mécanismes de mémorisation et de régulation de l'activité des circuits en conditions physiologique ou pathologique (Vitureira & Goda 2013). Les différents types de plasticité à long terme impliquent, en face postsynaptique, une variation du nombre de récepteurs au neurotransmetteur ou de l'efficacité de ces récepteurs, et à la terminaison présynaptique, une variation de la Pl. Nous allons présenter les différentes formes de plasticité des terminaisons présynaptiques, avant de nous concentrer sur la plasticité homéostasique qui a été notre premier sujet d'étude. Nous finirons par une introduction à cette première étude.

A. Différentes formes de plasticité de la terminaison présynaptique

La plasticité à long terme des synapses en réponse à des patrons d'activité spécifiques a été particulièrement bien étudiée dans ses aspects postsynaptiques, mais de nombreux travaux mettent également en évidence des modifications présynaptiques. La potentialisation à long terme (PLT), et la dépression à long terme (DLT) sont des mécanismes d'augmentation ou de diminution chronique, respectivement, de l'efficacité synaptique (Bliss & Lomo 1973, Stanton & Sejnowski 1989).

Deux formes de PLT présynaptiques ont été identifiées dans le SNC des mammifères. Une composante présynaptique de la PLT a été mise en évidence aux synapses des collatérales de Schaffer de l'hippocampe, dans différents modèles expérimentaux (McNaughton 1982, Emptage et al. 2003, Enoki et al. 2009). Cette composante présynaptique se traduit par une augmentation de la Pl, déclenchée par l'activation de récepteurs postsynaptiques NMDA au glutamate (Harris & Teyler 1984). D'autres synapses, en particulier les synapses des fibres moussues de l'hippocampe et du cervelet, présentent une forme de PLT présynaptique et qui n'implique pas l'activation de récepteurs postsynaptiques. Cette forme de PLT nécessite l'activation d'une protéine kinase présynaptique, la PKA (Zalutsky & Nicoll 1990, Huang et al.

1995). Les protéines présynaptiques RIM1α et Rab3 sont également nécessaires à l'établissement de cette PLT (Castillo et al. 2002), ce qui implique que la PLT présynaptique est établie par l'intermédiaire de l'interaction Rab3-RIM1α. D'autre part, les animaux RIM1α KO présentent des défauts d'apprentissage et de mémoire, indiquant que RIM1α pourrait être un acteur essentiel de la plasticité synaptique à long terme (Calakos et al. 2004).

Le mécanisme d'expression de la DLT impliquerait également des évènements présynaptiques. Dans des modèles de cultures de neurones d'hippocampe dissociés, l'établissement de la DLT induit une diminution du RRP (Goda & Stevens 1998). Dans des tranches d'hippocampe l'induction d'une DLT aux synapses établies par les collatérales de Schaffer diminue la fréquence des courants postsynaptiques miniatures (mEPSCs), suggérant une composante présynaptique dans l'expression de la DLT à ces synapses (Bolshakov & Siegelbaum 1994). Ces résultats ont été confirmés plus récemment avec des méthodes d'observation de la transmission synaptique à des synapses individuelles (Enoki et al. 2009).

L'homéostasie de la jonction synaptique est une forme différente de plasticité. La déprivation chronique d'activité synaptique provoque une augmentation compensatoire de l'efficacité des synapses. Ce phénomène a été découvert in vitro, sur des cultures de neurones dissociés (Lissin et al. 1998, O'Brien et al. 1998, Turrigiano et al. 1998). La plasticité homéostasique se traduit en postsynaptique par une augmentation de l'amplitude des mEPSCs, due à une accumulation de récepteurs au neurotransmetteur à la membrane post-synaptique. Plus récemment, l'existence de ce phénomène a été démontrée in vivo, dans les neurones du champ CA1 de l'hippocampe de souris et dans des neurones du cortex visuel (Echegoyen et al. 2007, Hengen et al. 2013, Keck et al. 2013). Inversement, une augmentation de l'activité du réseau neuronal induite par des traitements pharmacologiques ou des stimulations électriques entraîne une diminution chronique de l'excitabilité des neurones (Moulder et al. 2004, Branco et al. 2008). L'homéostasie serait nécessaire à la stabilisation de l'activité globale des circuits nerveux, notamment après l'induction de PLT ou de DLT à certaines synapses (Vitureira & Goda 2013). C'est un mécanisme qui serait également important dans des conditions pathologiques telles que les évènements d'épilepsie, d'hypoxie, ou d'ischémie qui élèvent la concentration de

potassium extracellulaire et induisent une hyperexcitabilité des neurones. La diminution homéostatique de l'excitabilité neuronale permettrait de limiter la toxicité liée à une libération excessive de glutamate (Hogins et al. 2011).

B. Homéostasie de la terminaison présynaptique

Des composantes présynaptiques ont été mises en évidence dans des modèles d'homéostasie induite par un blocage chronique d'activité. Au niveau du bouton, le blocage chronique induit une augmentation de la Pl, qui se traduit par une augmentation de la fréquence des mEPSCs et des signaux calciques induits par l'activité, ainsi que du taux de recyclage des VSs (Thiagarajan et al. 2005, Pozo & Goda 2010, Vitureira et al. 2012).

Les changements morphologiques qui sous-tendent l'homéostasie présynaptique ont principalement été étudiés sur des cultures de neurones dissociés. Les effets de déprivations chroniques d'activité par l'application de bloquants de l'activité neuronale ont été visualisés en ME après fixation chimique (Murthy et al. 1997, Murthy et al. 2001). Ces études montrent une augmentation globale de l'ensemble des paramètres morphologiques de la terminaison présynaptique. La taille du bouton, le nombre total de VSs dans le bouton, la taille de la ZA ainsi que le nombre de VSs ancrées sont corrélés et augmentent après un minimum de 3 jours de blocage. L'ensemble de ces paramètres morphologiques apparait de plus corrélé à la Pl aux synapses individuelles. Ces résultats corroborent le « principe de taille des ultrastructures », qui postule que la taille d'une synapse et de ses ultrastructures déterminent son efficacité (Pierce & Lewin 1994, Lazarevic et al. 2013). Ce principe a cependant été remis en question par des études récentes (Branco et al. 2010, Holderith et al. 2012). L'étude des relations entre les paramètres morphologiques de synapses hippocampiques et leur efficacité, en culture ou en tranches, montrent une triple corrélation entre la Pl d'une synapse, la taille de sa ZA et le nombre de VSs ancrées. Cependant, la taille du bouton et le nombre de VSs contenues dans le bouton varient indépendamment de la Pl. Malgré la divergence des résultats concernant la

morphologie globale de la synapse, l'ensemble de ces études démontrent que la taille de la ZA et le nombre de VSs ancrées sont des corrélats de la PI.

C. Mécanisme de l'homéostasie des terminaisons présynaptiques

Les mécanismes qui sous-tendent les adaptations homéostasiques aux synapses restent assez mal compris. Différents processus moléculaires impliqués ont pu être identifiés (Lazarevic et al. 2013).

L'adaptation des terminaisons présynaptiques à une inactivité chronique étant dépendante de récepteurs postsynaptiques, elle implique des facteurs secrétés. Le BDNF est un facteur trophique agissant comme un messager rétrograde entre les compartiments post et présynaptique. Il est synthétisé et libéré localement, au niveau dendritique, en réaction à un blocage chronique des récepteurs AMPA (Jakawich et al. 2010). La liaison du BDNF aux récepteurs de type TrKB du bouton présynaptique active différentes voies de signalisation et a pour effet une augmentation de fréquence des mEPSCs. De façon similaire, aux synapses glutamatergiques d'hippocampe, le monoxyde d'azote produit par le compartiment postsynaptique peut diffuser librement à travers les membranes vers le compartiment présynaptique, et activer différentes voies de signalisation (Garthwaite et al. 1988, Hardingham et al. 2013). Le piégeage du monoxyde d'azote extracellulaire en condition de blocage d'activité induit une réduction de la fréquence des mEPSCs, ce qui en fait également un bon candidat dans le mécanisme d'homéostasie présynaptique induite par un changement d'activité postsynaptique (Lindskog et al. 2010).

Dans la terminaison présynaptique, un des acteurs moléculaires important serait la CDK5, une protéine kinase dont la concentration diminue en réponse à un blocage d'activité (Kim & Ryan 2010). De plus, l'inhibition de cette kinase a pour effet une augmentation de la transmission synaptique. Différentes hypothèses quant à son mode d'action ont été proposées. CDK5 phosphoryle la Synapsine, protéine qui participe au réseau de filaments reliant les VSs

entre elles (Matsubara et al. 1996). Ces phosphorylations pourraient modifier la mobilité des VSs et permettre le recrutement de VSs supplémentaires à la ZA. CDK5 interagit d'autre part avec des protéines essentielles à la libération, en particulier Munc18 et les CaV de type N et pourrait donc être directement impliqué dans la régulation de l'activité des protéines de la ZA (Fletcher et al. 1999, Su et al. 2012).

Des régulations moléculaires ont également été décrites au niveau des VSs. Un blocage chronique de l'activité dans des cultures de neurones corticaux entraîne une augmentation de l'expression du transporteur de glutamate VGluT1, induisant une augmentation de la quantité de glutamate chargée dans les VSs et libérée lors de l'exocytose (Wilson et al. 2005). Dans des cultures de neurones d'hippocampe dissociés, l'augmentation d'activité en réaction au blocage est associée à une diminution de l'interaction de la Synaptophysine et de la Synaptobrévine2 (Bacci et al. 2001). La liaison de ces deux molécules vésiculaires empêche la Synaptobrévine2 de s'engager dans la formation du complexe SNARE ; le blocage d'activité pourrait donc favoriser le recrutement de davantage de VSs à la ZA.

Un blocage chronique d'activité induit d'autre part des modifications de l'organisation des molécules de la ZA. Des modifications des niveaux d'immunoréactivité de molécules de la ZA ont été reportées à l'échelle de synapses individuelles (Fig. 18 ; Lazarevic et al. 2011). En particulier, les quantités de Munc13 diminuent tandis que celles de Synaptotagmine1, des CaV de type P et Q et de RIM augmentent. Remarquablement, les quantités de protéines RIM apparaissent augmentées dans une sous-population de synapses et corrélées aux niveaux d'activité des synapses individuelles. RIM apparaît donc comme un acteur particulièrement intéressant dans les régulations induites par des déprivations d'activité.

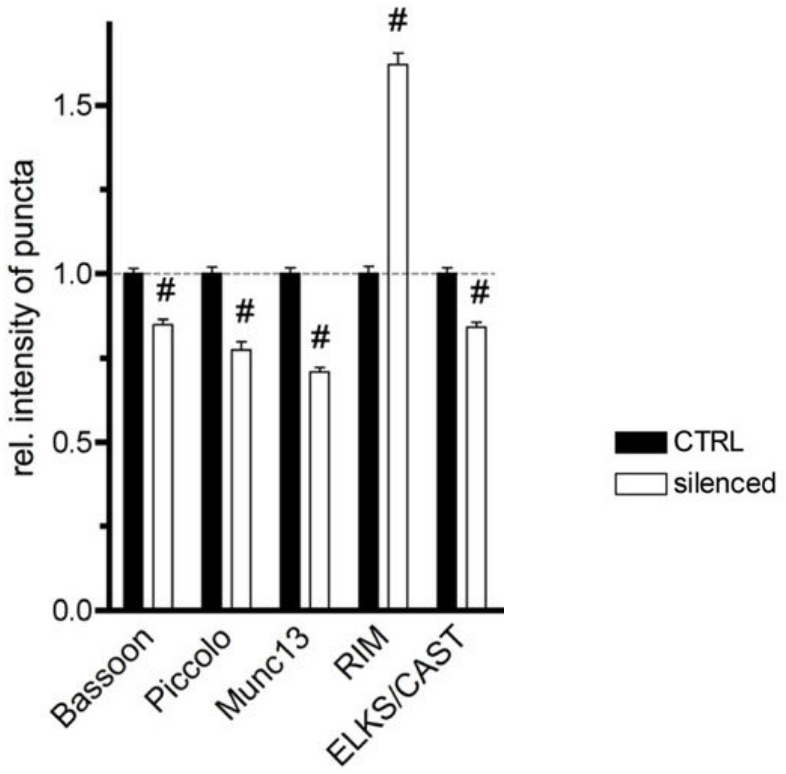


Figure 18 : Augmentation spécifique de la quantité de RIM aux terminaisons présynaptiques après un blocage chronique d'activité (Lazarevic et al. 2011).

D. Etude du mécanisme de régulation du nombre de vésicules synaptiques ancrées

Le nombre de VSs ancrées à la ZA apparaît comme un paramètre important de la détermination de la Pl ; cependant le mécanisme de la régulation de l'ancrage est encore méconnu. En termes de morphologie, on ignore si le nombre de VSs ancrées varie de façon corrélée aux autres paramètres morphologiques (taille du bouton présynaptique, nombre total de VSs), ou s'il fait l'objet d'une régulation spécifique. D'un point de vue moléculaire, parmi les molécules de la ZA, la protéine RIM apparaît comme un candidat particulièrement intéressant. La quantité de RIM à la ZA est corrélée à la taille de la ZA et au nombre de VSs ancrées

(Holderith et al. 2012). L'ablation de RIM 1 et 2 au calice de Held induit une perte de 75% des VSs ancrées (Han et al. 2011). RIM 1α joue d'autre part un rôle primordial dans la régulation à long terme de l'activité synaptique lors de phénomènes tels que l'établissement de la PLT et les mécanismes d'apprentissage (Schoch et al. 2002, Powell et al. 2004). De plus, la quantité de RIM 1/2 est augmentée à la synapse après un blocage chronique d'activité neuronale (Lazarevic et al. 2011). Or RIM interagit avec les molécules impliquées dans la formation du complexe SNARE, notamment Munc13, nécessaire à l'ancrage. Des modifications de la quantité de protéines RIM1/2 à la ZA pourraient donc sous-tendre les régulations du nombre de VSs ancrées.

Nous nous sommes donc posé deux questions :

1° Le nombre de VSs ancrées est-il régulé spécifiquement ou en lien avec l'ensemble des autres paramètres morphologiques du bouton présynaptique ?

2° Quel est le rôle de la protéine RIM dans la régulation de l'ancrage ?

Pour y répondre, nous avons analysé les effets d'un blocage chronique d'activité sur les terminaisons présynaptiques de tranches organotypiques d'hippocampe de souris. Afin de pouvoir quantifier avec précision le nombre de VSs ancrées, les cultures de tranches ont été immobilisées par CHP.

1. Intérêt du modèle de blocage chronique de l'activité neuronale dans des tranches d'hippocampe

L'hippocampe est un modèle d'étude des mécanismes de plasticité à long terme, notamment en raison de son rôle dans la mémorisation. Les mécanismes de PLT, DLT et de l'homéostasie ont ainsi été particulièrement étudiés aux synapses excitatrices de l'hippocampe.

Un blocage chronique de l'activité neuronale d'au moins 3 jours dans des cultures dissociées de neurones d'hippocampe a pour effet une augmentation du nombre de VSs ancrées à la ZA (Murthy et al. 2001). Le blocage chronique d'activité neuronale, avec la réaction

homéostasique qu'il déclenche, est donc un modèle particulièrement intéressant pour étudier les mécanismes sous-jacents à la régulation de l'ancrage.

Les tranches organotypiques d'hippocampe ont différents avantages sur les cultures dissociées de neurones hippocampiques. In vivo, les terminaisons présynaptiques de CA1 présentent un processus de maturation pendant les premiers stades de développement post-natal (Rose et al. 2013). Cette maturation ne se produit pas dans des cultures dissociées de neurones d'hippocampe alors qu'elle se produit dans des cultures de tranches. La proportion de VSs libérées et la vitesse de recyclage est ainsi plus importante dans des tranches qu'en culture dissociée. Ces données indiquent que les neurones de tranches organotypiques sont plus matures que les neurones dissociés en culture. En outre, les tranches d'hippocampe en culture conservent une organisation organotypique (Stoppini et al. 1991, Buchs et al. 1993). Les neurones restent organisés en couches, similairement à leur organisation dans l'hippocampe entier. Le maintien de la connectivité entre ces couches permet d'analyser des populations de synapses homogènes. Enfin, les propriétés de plasticité à long terme (PLT, DLT et homéostasie) des synapses sont conservées (Muller et al. 1993, Tyler & Pozzo-Miller 2003, Mellentin et al. 2006).

Nous nous sommes concentrés sur les synapses excitatrices établies sur les épines dendritiques des neurones de CA1 par les fibres collatérales de Schaffer, provenant de CA3 (Fig. 19). Ces synapses se caractérisent par une DPS proéminente et un compartiment postsynaptique de petite taille ne contenant pas de mitochondries ou de microtubules (Peters et al. 1991). Outre leurs propriétés de plasticité, ces synapses présentent une homogénéité morphologique qui les rend particulièrement adéquates pour notre étude.

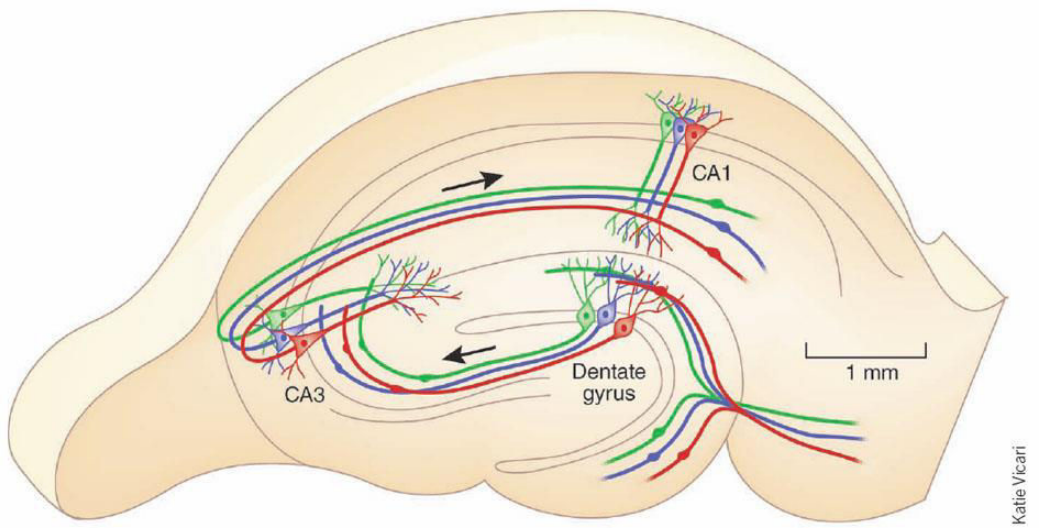


Figure 19 : Organisation des synapses établies par les collatérales de Schaffer dans une coupe transversale d'hippocampe (Moser 2011).

2. Intérêt de l'immobilisation par congélation sous haute pression

Nous avons utilisé la CHP pour immobiliser les tranches d'hippocampe à l'issue de 2 semaines de culture, une durée qui permet leur maturation (Buchs et al. 1993, Muller et. al 1993). La CHP permet une immobilisation par congélation très rapide, en 10 ms, des structures membranaires et protéiques, préalablement à l'ajout de fixateur chimique. Après congélation, les échantillons sont déshydratés à froid, éventuellement colorés et fixés par ajout d'osmium et remontés en température. L'inclusion dans une résine plastique permet de réaliser des sections ultrafines, jusqu'à 30 nm, permettant notamment l'étude de l'ancrage en ME.

Cette méthode présente de nombreux atouts dans le cadre d'études de la morphologie synaptique. L'immobilisation à froid permet d'éviter les phénomènes de choc osmotique induits par les fixateurs chimiques. Elle permet ainsi de préserver les volumes ainsi que la forme des membranes plasmiques et vésiculaires (Fig. 20 ; Tatsuoka & Reese 1989, Rostaing et al. 2006, Siksou et al. 2013). Au niveau de la ZA, la CHP permet de préserver la localisation des VSs par rapport à la membrane plasmique (Weimer et al. 2006, Siksou et al. 2009), contrairement aux

fixateurs chimiques classiques qui peuvent induire des hémifusions, voire une exocytose des VSs ancrées (Smith & Reese 1980, Zampighi et al. 2006). D'autre part, les fixateurs aldéhydiques ont tendance à agréger les protéines en créant des ponts entre elles (Hayat 1989). Ce phénomène est particulièrement apparent au niveau de la ZA où les fixations chimiques entraînent l'agrégation de protéines entre les VSs ancrées. Les protéines de la ZA prennent alors l'apparence d'une grille présynaptique, qui n'est pas observée après congélation (Landis et al. 1988). Ces pontages peuvent donc modifier la localisation subcellulaire des protéines et déformer les échafaudages protéiques. La CHP est ainsi mieux adaptée à l'étude de la répartition des VSs ancrées et des échafaudages protéiques impliqués dans les différentes étapes du cycle vésiculaire.

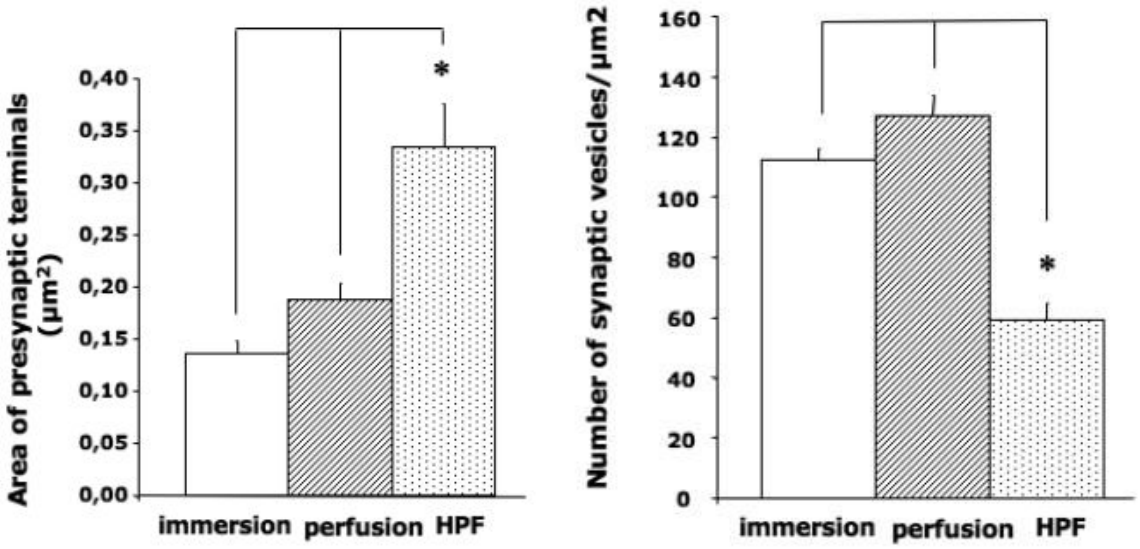


Figure 20 : Comparaison des effets de l'immobilisation par fixation chimique (soit par immersion de tranches, soit par perfusion) et de l'immobilisation par CHP sur la surface des terminaisons présynaptiques et sur la répartition des VSs dans le bouton synaptique, mesurées sur des micrographies électroniques du champ CA1 de l'hippocampe (Rostaing et al. 2006).

IV. Mode d'endocytose des VSs

Après l'exocytose d'une vésicule, l'excès de membrane et de protéines ajouté à la membrane plasmique doit être recyclé afin d'éviter la déplétion du bouton en VSs, maintenir la morphologie de la terminaison présynaptique et assurer la continuité de la transmission (Royle & Lagnado 2003). Le mécanisme de reformation des VSs a fait l'objet de nombreux travaux en microscopie électronique, microscopie optique et électrophysiologie. Trois modes d'endocytose ont été proposés : une reformation de vésicules à partir de la membrane plasmique à l'extérieur de la ZA, aidée par un échafaudage de Clathrine ; une recapture rapide des VSs au site d'exocytose après une fusion incomplète, appelée « kiss and run » ; et un retrait en bloc de larges portions de membranes après une stimulation de forte intensité (« bulk endocytosis »). Les résultats de l'ensemble des travaux restent cependant difficile à réconcilier, en raison notamment de divergences en terme de cinétique du recyclage. Nous allons d'abord présenter ces différents modes d'endocytose, puis nous introduirons la deuxième partie de notre travail. Cette deuxième partie avait pour objectif de développer un nouvel outil permettant d'analyser le mécanisme de reformation des VSs.

A. Mécanismes d'endocytose

1. Techniques d'étude de l'endocytose

La ME a donné accès à de nombreuses informations sur la morphologie des VSs durant l'endocytose. La stimulation de tissu nerveux en présence de peroxydase du raifort dans le milieu extracellulaire permet de charger ce composé dans les vésicules ou les invaginations d'endocytose (Heuser & Reese 1973, Ceccarelli et al. 1973). Une réaction enzymatique induite par l'ajout de diaminobenzidine et de peroxyde d'hydrogène forme des précipités denses aux électrons au niveau des ultrastructures contenant la peroxydase. Cette technique a permis d'identifier les compartiments membranaires de la terminaison présynaptique impliqués dans le recyclage. Cependant, la ME ne permet pas de travailler sur des neurones vivants et ne donne donc pas accès à un suivi dynamique des VSs.

De nombreuses expériences ont été réalisées en microscopie à fluorescence afin de suivre le décours temporel de l'endocytose des VSs après leur libération (Smith et al. 2008). Elles consistent généralement à charger une molécule fluorescente à l'intérieur des VSs par une première série de stimulation, puis à suivre les changements de fluorescence après les stimulations suivantes. Une méthode particulièrement élégante consiste à faire exprimer par des neurones la SynaptopHluorine, une molécule fluorescente sensible au pH, attachée à un domaine luminal de la protéine vésiculaire Synaptobrévine (Gandhi & Stevens 2003). Cette technique tire parti de l'acidité maintenue par la pompe à protons à l'intérieur de la VS. Lorsque la synapse est au repos, le pH à l'intérieur de la VS est bas et le signal fluorescent est faible. Après la fusion d'une VS, la pHluorine est en contact avec le milieu extracellulaire, moins acide, et le signal fluorescent augmente. Le pH et la fluorescence de la VS diminuent lorsque la VS est endocytosée et réacidifiée. Le suivi temporel des variations de fluorescence donne alors accès au délai d'endocytose.

Enfin, une autre technique consiste à mesurer en électrophysiologie la capacitance de la membrane plasmique d'un neurone (Neher & Marty 1982). La capacitance étant proportionnelle à la surface de membrane, sa mesure donne accès aux changements de surface de membrane au cours du temps. Lors de la fusion d'une VS par exocytose, la surface de membrane et donc la capacitance augmentent. Lorsqu'une portion de membrane est détachée lors d'évènements d'endocytose, la capacitance diminue. Cette technique n'est cependant applicable qu'à des synapses de très grande taille telles que le Calice de Held ou les synapses à ruban.

L'ensemble de ces techniques mettent en évidence pour la plupart des synapses la coexistence d'évènements d'endocytose rapide (constante de temps d'environ 1s) et lente (constante de temps supérieure à 10s ; Smith et al. 2008). La composante lente est généralement identifiée comme une endocytose dépendante de la Clathrine et la composante rapide, comme des évènements de « kiss and run ».

2. Endocytose dépendante de la Clathrine

L'endocytose dépendante de la Clathrine a été visualisée pour la première fois en ME, sur des synapses de moelle épinière de têtard (Rosenbluth & Wissig 1964). Des invaginations formées par la membrane plasmique apparaissent recouvertes de « manteaux » de matériel protéique. L'observation en ME de préparation nerf-muscle de grenouille après une stimulation électrique à 10 Hz pendant 1 minute a mis en évidence le rôle de l'endocytose aidée par un « manteau » protéique dans le cycle de libération-reformation des VSs (Fig. 21 ; Heuser & Reese 1973). Une minute après la stimulation, les auteurs observent une diminution du nombre de VSs dans le bouton et l'apparition d'invagination de la membrane plasmique à distance de la ZA. Une partie de ces invaginations est recouverte d'un manteau de matériel dense. Les auteurs notent également l'apparition d'endosomes. Après une période de repos, le nombre de VSs dans la terminaison revient à sa valeur de départ. Si la stimulation est effectuée en présence de peroxydase du raifort, une partie des VSs présentes dans la terminaison sont marquées. Une seconde stimulation entraîne une diminution du nombre de VSs marquées. L'ensemble de ces résultats indiquent que la membrane ajoutée à la membrane plasmique de la ZA pendant l'exocytose est retirée sous forme de vésicules recouvertes de matériel protéique. Ces vésicules d'endocytose fusionnent avec un endosome intermédiaire à partir duquel les VSs sont reformées. Le matériel dense recouvrant les vésicules a été identifié plus tard par une étude biochimique comme étant composé de Clathrine (Pearse 1976).

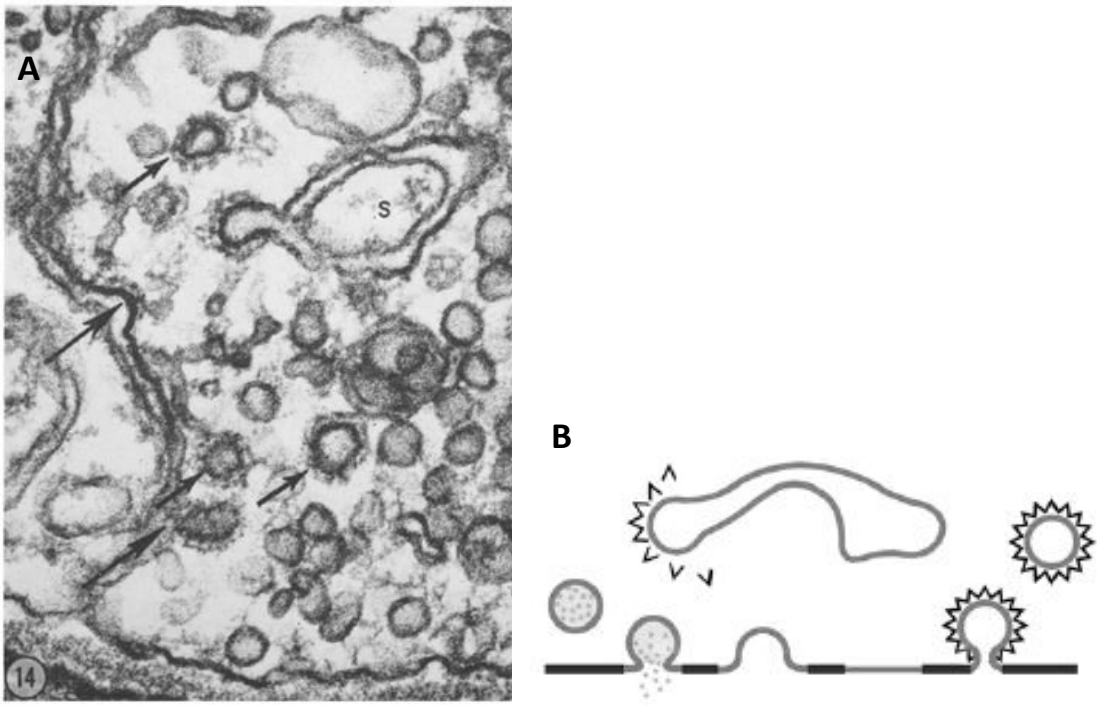


Figure 21 : Etude en ME de l'endocytose dépendante de la Clathrine.

A. Mise en évidence en microscopie électronique de VSs recouvertes de matériel dense (Flèches) à la jonction neuromusculaire de grenouille après stimulation (Heuser & Reese 1973).

B. Proposition de mécanisme de l'endocytose dépendante de la Clathrine basée sur les données morphologiques (Royle & Lagnado 2003).

L'endocytose aidée par un « manteau » protéique est un mécanisme commun à l'ensemble des Eucaryotes pour différents processus de production de vésicules (Rothman 1994). D'un point de vue moléculaire, le mécanisme d'endocytose dépendante de la Clathrine à la terminaison présynaptique implique une voie de signalisation complexe, faisant intervenir une trentaine de protéines différentes (McMahon & Boucrot 2011). La première étape serait la formation d'un complexe d'initiation impliquant des protéines FCHO, qui contiennent un domaine F-BAR se liant aux courbures de membranes peu accentuées (Henne et al. 2010). Il aurait pour rôle d'amplifier la courbure de la membrane avant le recrutement de la Clathrine (Fig. 22).

Le complexe recruterait ensuite des protéines adaptatrices, qui se lient aux protéines vésiculaires présentes à la membrane après exocytose. Ces adaptateurs permettent donc de recruter les protéines nécessaires à la reformation de VSs fonctionnelles. Un des adaptateurs majeurs à la synapse est la protéine AP2 qui se lie à la Synaptotagmine, à la protéine vésiculaire SV2, ainsi qu'aux transporteurs des neurotransmetteurs (Jorgensen et al. 1995, Haucke & De Camilli 1999, Bonifacino & Traub 2003). AP180 est un autre adapteur crucial ; il se lie à la Synaptobrévine (Nonet et al. 1999). L'ensemble des adapteurs forme une première couche moléculaire qui permet le recrutement de Clathrine.

Avant son assemblage, la Clathrine est présente dans le cytosol des neurones sous sa forme monomérique, appelée triskellion. Le recrutement des triskellions induit leur polymérisation, et forme une deuxième couche protéique venant stabiliser / accentuer l'invagination de membrane. La formation d'une VS à partir de cette invagination nécessite une étape de scission qui fait intervenir la Dynamine, une GTPase, dans sa forme liée au GTP. L'hydrolyse du GTP induit un changement de conformation de la Dynamine qui serait à l'origine de la scission des membranes (van der Bliek & Meyerowitz 1991, Roux et al. 2006). Le manteau de Clathrine est finalement désassemblé de la VS par une ATPase, la HSC70, aidée par un cofacteur, l'Auxiline (Morgan et al. 2001). Les VSs sont alors réacidifiées et remplies de neurotransmetteur par l'activité des protéines de transport.

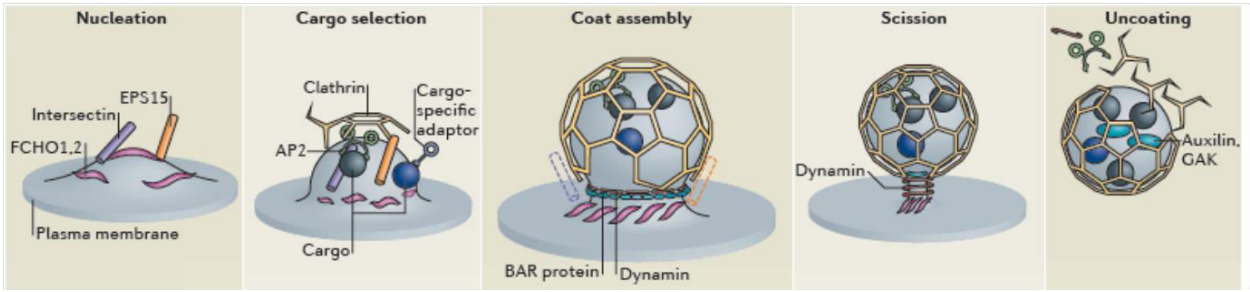


Figure 22 : Représentation schématique du mécanisme d'endocytose dépendante de la Clathrine (McMahon & Boucrot 2011).

Le rôle de la Clathrine à la synapse a été mis en évidence par différentes méthodes (Dittman & Ryan 2009). L'induction d'évènements de libération de VSs par des stimulations provoque

une accumulation d'intermédiaires d'endocytose recouverts de Clathrine observables en ME. De nombreux travaux utilisent des stratégies d'interférence avec la Clathrine telles que l'injection de molécules inhibitrices, ou des manipulations génétiques de la Clathrine (Jockusch et al. 2005, Heerssen et al. 2008). L'inhibition ou la délétion de la Clathrine est associée à un suivi optique du recyclage des VSs et une caractérisation des synapses en ME. A certaines synapses, comme à la jonction neuromusculaire de Drosophile, ces expériences mettent en évidence une disruption totale du recyclage des VSs en l'absence de Clathrine (Fig. 23 ; (Shupliakov et al. 1997). Aux synapses hippocampiques, le délai entre la libération d'une VS et le retrait par endocytose Clathrine-dépendante est compris entre 10 et 15 secondes après la libération d'une VSs. L'ablation partielle de la Clathrine par l'utilisation d'ARN interférents provoque un ralentissement, voire un blocage du recyclage des VSs (Granseth et al. 2006, Zhu et al. 2009). Par ailleurs, le blocage ou la délétion de la Dynamine induit la formation de vésicules recouvertes de Clathrine et attachées à la membrane plasmique, visibles en ME (Macia et al. 2006, Raimondi et al. 2011).

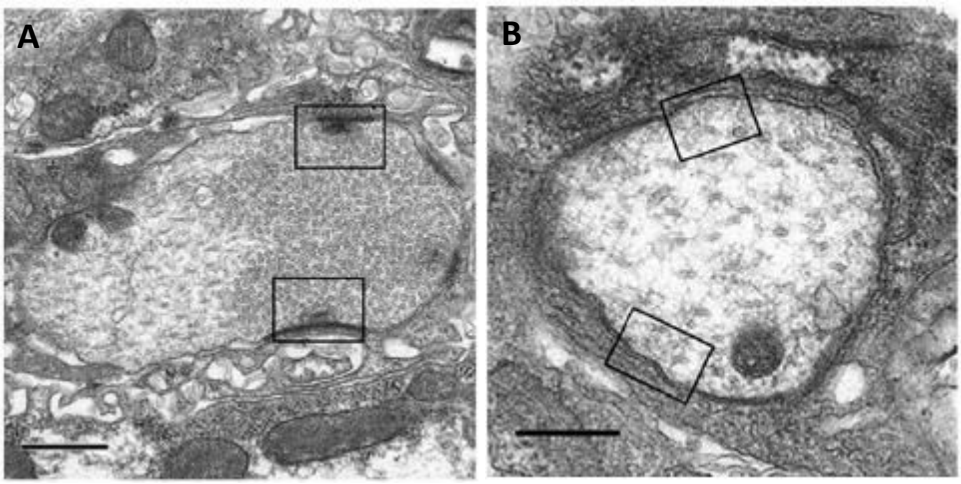


Figure 23 : Mise en évidence du rôle de la Clathrine dans la reformation des VSs à la jonction neuromusculaire de Drosophile (Rectangles : ZA ; Heerssen et al. 2008).

A. Bouton de Drosophile contrôle, 1 minute après l'application de 6000 stimulations électriques à une fréquence de 8 Hz.

B. Bouton de de Drosophile dont la séquence de Clathrine a été modifiée pour pouvoir être photoinactivée, après le même protocole de stimulation - récupération. Noter la déplétion en VSs du bouton.

Barres d'échelle : 500 nm.

3. Endocytose de type "kiss and run"

Un deuxième type d'endocytose pourrait intervenir aux synapses dans des conditions de stimulation physiologique. Le premier indice de l'existence d'une endocytose rapide non dépendante de la Clathrine provient d'une étude en ME de la jonction neuromusculaire de grenouille stimulée à faible fréquence (Ceccarelli et al. 1973). Après une série de stimulations à 2 Hz pendant plusieurs heures, les terminaisons ne présentent pas d'altération notable. En particulier, aucune structure membranaire n'apparaît recouverte de Clathrine. Le nombre de VSs reste relativement constant, ce qui indique un recyclage rapide après l'exocytose. De plus, lorsque les terminaisons sont incubées dans une solution de peroxydase du raifort, une grande partie des VSs marquées apparaissent à proximité de la zone de libération de neurotransmetteur (Fig. 24). Ces observations suggèrent une reformation des VSs au site de libération. Le modèle proposé par les auteurs est le suivant : lors de l'exocytose durant des stimulations à basse fréquence, les membranes de la VS et de la ZA fusionnent transitoirement en formant un pore permettant la libération du neurotransmetteur. Le port se referme, la VSs est détachée rapidement de la membrane et remplie de neurotransmetteur. Ce mécanisme a été appelé plus tard « kiss and run » (Fesce et al. 1994).

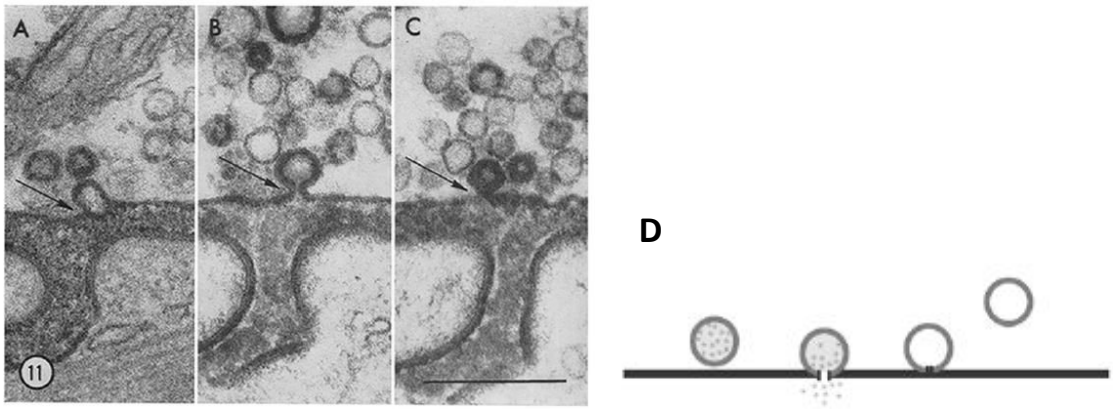


Figure 24 : Etude en ME du mécanisme de « kiss and run ».

A, B et C. Micrographies de jonction neuromusculaire de grenouille observée après stimulation, montrant la formation d'un port de fusion entre les membranes de la VS et de la ZA (Flèches ; Ceccarelli et al. 1973). Noter la présence d'un précipité dense aux électrons révélant la présence de peroxydase à la jonction synaptique et dans la VS. Barre d'échelle : 200 nm.

D. Proposition de mécanisme du recyclage par « kiss and run » basé sur les données morphologiques (Royle & Lagnado 2008).

Des expériences de mesure de capacitance de membrane et de suivi de fluorescence en microscopie optique ont effectivement mis en évidence l'existence d'un recyclage en 1 seconde des VSs exocytosées, qui correspondrait à des évènements de « kiss and run » (Alabi & Tsien 2013). D'autre part, la délétion ou l'inhibition de la Clathrine et de la Dynamine ne bloquent pas l'ensemble des évènements d'endocytose à toutes les synapses, ce qui suggère l'existence d'un autre mécanisme. Ce mécanisme de recyclage pourrait avoir lieu aux synapses hippocampiques (Klingauf et al. 1998). Ce modèle est attractif pour plusieurs raisons. C'est d'abord un processus rapide, dont la cinétique concorde avec les résultats ne pouvant être expliqués par une endocytose dépendante de la Clathrine. De plus, les VSs ne perdent pas leur identité. Cela évite la nécessité d'un triage des protéines vésiculaires incluses dans la membrane plasmique pour reformer une VS après fusion complète. L'existence de ce mécanisme reste cependant controversée (Dittman & Ryan 2009). En effet, de nombreuses contradictions apparaissent dans les résultats des études menées à ce jour sur le délai de l'endocytose. De plus, certains auteurs mettent en évidence de possibles biais dans l'interprétation des expériences de mesure de capacitance et de fluorescence, qui sont 2 méthodes de suivi indirectes.

Le mécanisme moléculaire qui interviendrait lors d'un évènement de « kiss and run » reste encore peu décrit (Alabi & Tsien 2013). La formation du pore de fusion et sa fermeture feraient intervenir les protéines du complexe SNARE, assemblées dans une conformation de type « relâchée » (Fig. 25). Le mécanisme serait d'autre part dépendant de la concentration de calcium à l'intérieur de la terminaison (Ales et al. 1999, Bretou et al. 2008).

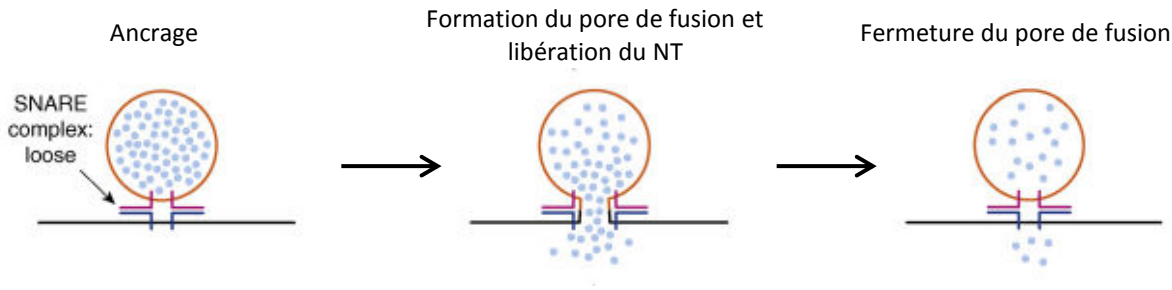


Figure 25 : Mécanisme théorique du recyclage des VSs par "kiss and run" (adapté de Smith et al. 2008).

4. Endocytose de type "bulk"

Une troisième forme d'endocytose, dite « bulk », se produit après une induction de la libération de VSs par une solution hypertonique (sucrose), une forte concentration de KCl dans le milieu ou par un train de stimulations à très haute fréquence. Ce processus a été décrit en ME (Heuser & Reese 1973, Miller & Heuser 1984, Takei et al. 1996). Après une libération massive de VSs provoquée par de fortes stimulations, de larges invaginations de membrane plasmique apparaissent à la terminaison (Fig. 26). La fission de ces invaginations de la membrane plasmique génère des endosomes intermédiaires à l'intérieur du bouton, qui disparaissent à mesure que des VSs sont reformées. Des études après incubation dans la peroxydase du raifort indiquent que les VSs proviennent bien des structures endosomales. Ce mécanisme a également été mis en évidence par des mesures de capacitance ainsi qu'en microscopie optique, à l'aide de marqueurs fluorescents chargés dans les invaginations durant la stimulation (Holt et al. 2003, Clayton et al. 2008). Elle est observable aux synapses du système nerveux central ainsi qu'aux jonctions neuromusculaires, et apparaît comme un mécanisme compensatoire après l'ajout d'une grande surface de membrane vésiculaire à la membrane plasmique de la terminaison présynaptique.

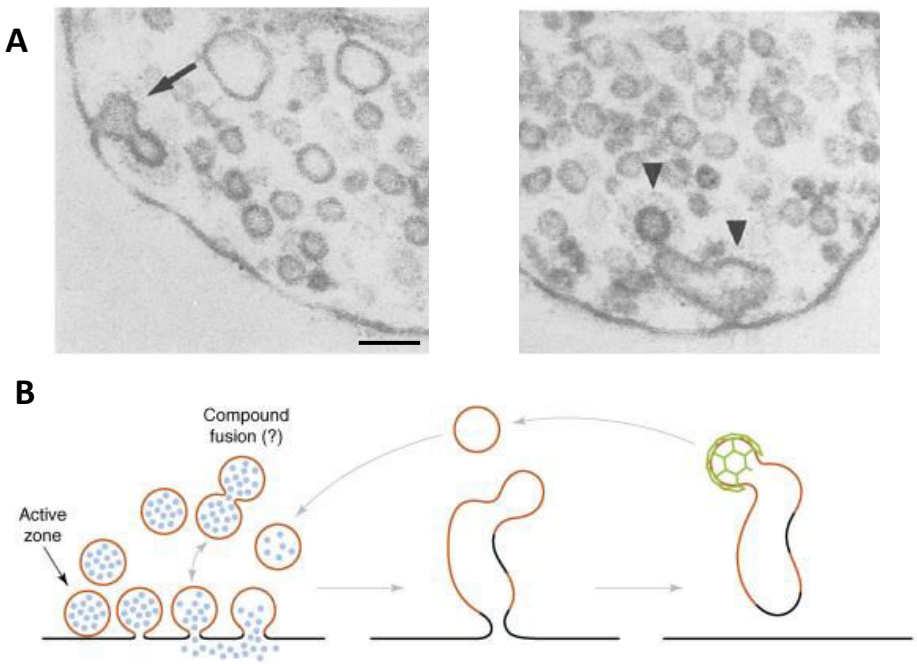


Figure 26 : Etude en ME du mécanisme d'endocytose de type « bulk ».

A. Micrographies montrant de larges invaginations de la membrane plasmique d'un bouton synaptique de neurone d'hippocampe de rat en culture, après 10 minutes d'incubation dans une solution fortement concentrée en potassium (Takei et al. 1996). Barre d'échelle : 100 nm.

B. Proposition de mécanisme de l'endocytose de type « bulk » basée sur les données morphologiques (Smith et al. 2008).

Les aspects moléculaires de l'endocytose de type « bulk » restent largement méconnus. Elle pourrait en partie résulter d'un phénomène mécanique. En effet, une augmentation importante du ratio surface / volume de la terminaison est susceptible d'entraîner une déformation de la membrane et de générer l'apparition de larges invaginations (Torri-Tarelli et al. 1987). Cependant des acteurs moléculaires ont pu être identifiés comme nécessaires au déclenchement de ce type d'endocytose. Un senseur calcique de faible affinité, la Calmoduline, est activé lors d'une accumulation importante de calcium à la terminaison (Clayton & Cousin 2009). La Calmoduline active une phosphatase, la Calcineurine, dont la Dynamine est un des substrats. Le blocage de l'activité GTPase de la Dynamine a pour effet un arrêt de la génération d'endosomes et de VSs durant des patrons d'activité intense (Clayton et al. 2009). De plus, des mutations ponctuelles de sites de phosphorylation de la Dynamine inhibent sélectivement

l'endocytose de type « bulk » (Ferguson et al. 2007). Ces résultats indiquent que la déphosphorylation de la Dynamine par la Calcineurine est un des processus clés de l'induction de l'endocytose de type « bulk ». Le rôle de protéines contenant un domaine F-BAR a également été mis en évidence dans la génération des larges invaginations. Le mécanisme de reformation de VSs à partir des endosomes intermédiaires est en revanche actuellement à l'état d'hypothèses (Saheki & De Camilli 2012). Plusieurs mécanismes sont envisagés. La formation de VSs à partir des endosomes intermédiaires pourrait être aidée par un manteau protéique de type Clathrine. Les VSs pourraient également être générées par la seule action mécanique de protéines BAR sur les membranes endosomales. Enfin, après leur formation, les endosomes pourraient re-fusionner avec la membrane plasmique, après quoi interviendrait une endocytose classique dépendante de la Clathrine.

B. Développement d'une nouvelle approche pour l'observation du ou des mécanismes d'endocytose « en aigu »

En l'absence de techniques de visualisation directe et à haute résolution de la terminaison présynaptique, le mécanisme d'endocytose aux synapses centrales reste très débattu. Pour pouvoir discriminer directement l'endocytose dépendante de la Clathrine et les évènements de « kiss and run », ou d'endocytose de type « bulk », il faudrait pouvoir visualiser les VSs à très haute résolution spatiale et temporelle après l'activation des neurones.

Depuis les années 50, la ME a été la technique privilégiée pour l'étude des structures intracellulaires (Peters et al. 1991). En effet, elle offre une résolution spatiale de l'ordre de 10 nm, tandis que les méthodes d'imagerie optique ultra-résolutive permettent de discerner des éléments distants au minimum de 40 nm. L'observation en ME de neurones ou de tissu nerveux nécessite cependant d'inclure ceux-ci dans de la résine, afin de les protéger de la détérioration par le flux d'électrons ; on observe donc des cellules « mortes ». La microscopie optique permet d'obtenir des images de cellules vivantes, mais à une résolution spatiale insuffisante pour caractériser finement les structures intracellulaires. La visualisation de la dynamique de

structures de très petite taille telles que les VSs, d'un diamètre de 40 nm, apparaît donc techniquement difficile.

Ce paradoxe technique a été dépassé par Heuser et Reese en 1979, à l'aide d'un dispositif permettant de stimuler puis d'immobiliser très rapidement une préparation nerf-muscle de grenouille (Heuser et al. 1979). Un support labile fait tomber l'échantillon sur une plaque de métal refroidie à l'hélium liquide (Fig. 27). Durant le temps de la descente de l'échantillon, une stimulation électrique est appliquée à un point précis de la chute, permettant d'inférer le délai entre la stimulation et l'immobilisation. De cette façon, de nombreuses figures de fusion de VSs ont pu être observées à la membrane de la ZA.

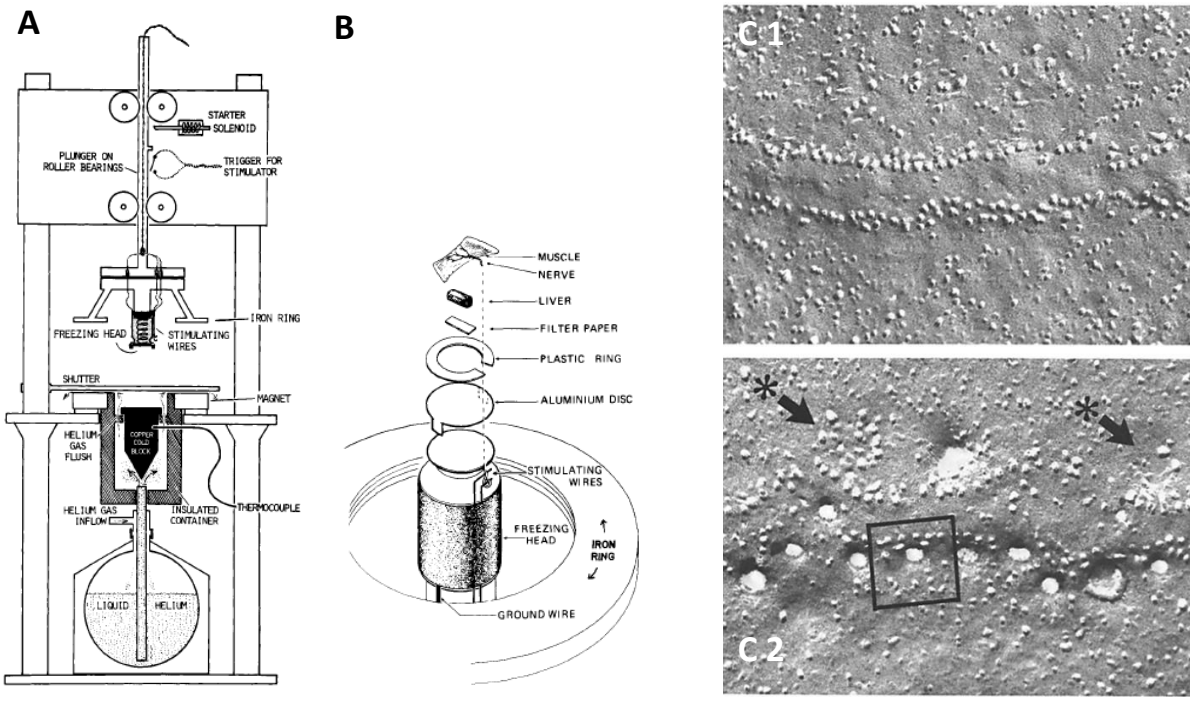


Figure 27 : Illustration du dispositif de stimulation-congélation mis en place par John Heuser et Tom Reese (Heuser et al. 1979 ; Heuser & Reese, 1981).

A Schéma du dispositif.

B Préparation de l'échantillon (préparation nerf-muscle)

C Micrographies d'un échantillon non stimulé (1) et d'un échantillon stimulé (2).

Nous avons repris ce principe expérimental en l'adaptant à l'étude de l'endocytose aux synapses du système nerveux central. Pour cela, nous avons développé une technique associant des stimulations optiques et une immobilisation par CHP, synchronisées très précisément par commande informatique.

1. Stimulation optique de neurones par des méthodes d'optogénétique

L'optogénétique est une technique récente tirant parti des propriétés de protéines canaux d'algues, les opsines (Nagel et al. 2002). L'activation par une stimulation lumineuse de longueur d'onde spécifique induit un changement de conformation du canal, qui présente alors une perméabilité sélective à certains ions. L'optogénétique consiste à faire exprimer ces protéines à la membrane de cellules afin d'en contrôler les flux d'ions entrants ou sortants. Des outils de génie génétique ont permis d'exprimer dans des neurones de mammifère une de ces opsines, la ChannelRhodopsine2 (ChR2), issue de l'algue verte *Chlamydomonas rheinardtii* (Boyden et al. 2005). La ChR2 est un canal cationique activable par des stimulations lumineuses d'une longueur d'onde de 465 nm (lumière bleue ; Fig. 28). L'ouverture du canal entraîne un flux d'ions entrant qui peut être détecté en électrophysiologie. Si cette dépolarisation est suffisante, un potentiel d'action est déclenché. Une série de flashs lumineux de fréquence allant jusque 40 Hz permet d'induire un train de potentiels d'action de même fréquence. La construction génétique encodée dans les neurones comprend généralement la séquence de la ChR2 sous contrôle d'un promoteur spécifique à une population de neurones, permettant de cibler la photostimulation. La ChR2 est fusionnée à une protéine fluorescente de type GFP, afin de pouvoir contrôler la présence de la protéine aux membranes neuronales. L'utilisation de vecteurs viraux (lentivirus, adeno-associated virus) permet d'intégrer la séquence par ajout du virus dans le milieu de culture de neurones dissociés ou par injection in vivo.

Des développements ultérieurs ont permis l'amélioration et la diversification des outils d'optogénétique (Mattis et al. 2012). Ces développements incluent des travaux d'ingénierie génétique sur la séquence de la ChannelRhodopsine et l'exploitation d'autres types d'opsines (Zhang et al. 2008). Ils se sont focalisés sur différentes propriétés des protéines canaux. Des

travaux sur la séquence de la ChR2 ont amélioré l'efficacité de son expression dans les neurones de mammifères. Plusieurs séquences promotrices sont à présent disponibles et permettent d'exprimer la ChR2 dans différentes populations de neurones et à différents stades de développement. Les propriétés de cinétique d'ouverture et de fermeture du canal ont également fait l'objet de développements importants : la ChETA est par exemple une ChannelRhodopsine ultra-rapide, qui supporte des stimulations allant jusqu'à 200 Hz (Gunaydin et al. 2010). Différentes opsines exprimables dans des neurones permettent désormais d'obtenir des conductances spécifiques. La haloRhodopsine (NpHR) est un canal chlorique ; son activation entraîne une hyperpolarisation du neurone et inhibe l'induction de potentiels d'action (Fig. 27 ; (Gradinaru et al. 2008). La CatCh est un dérivé de la ChannelRhodopsine perméable uniquement aux ions calcium (Kleinlogel et al. 2011). Enfin, des lignées transgéniques de souris exprimant la ChannelRhodopsine dans différentes sous populations de neurones sont désormais disponibles. L'ensemble de ces travaux permettent de disposer d'une palette d'outils de contrôle peu invasifs de l'activité neuronale, utilisables in vitro comme in vivo.

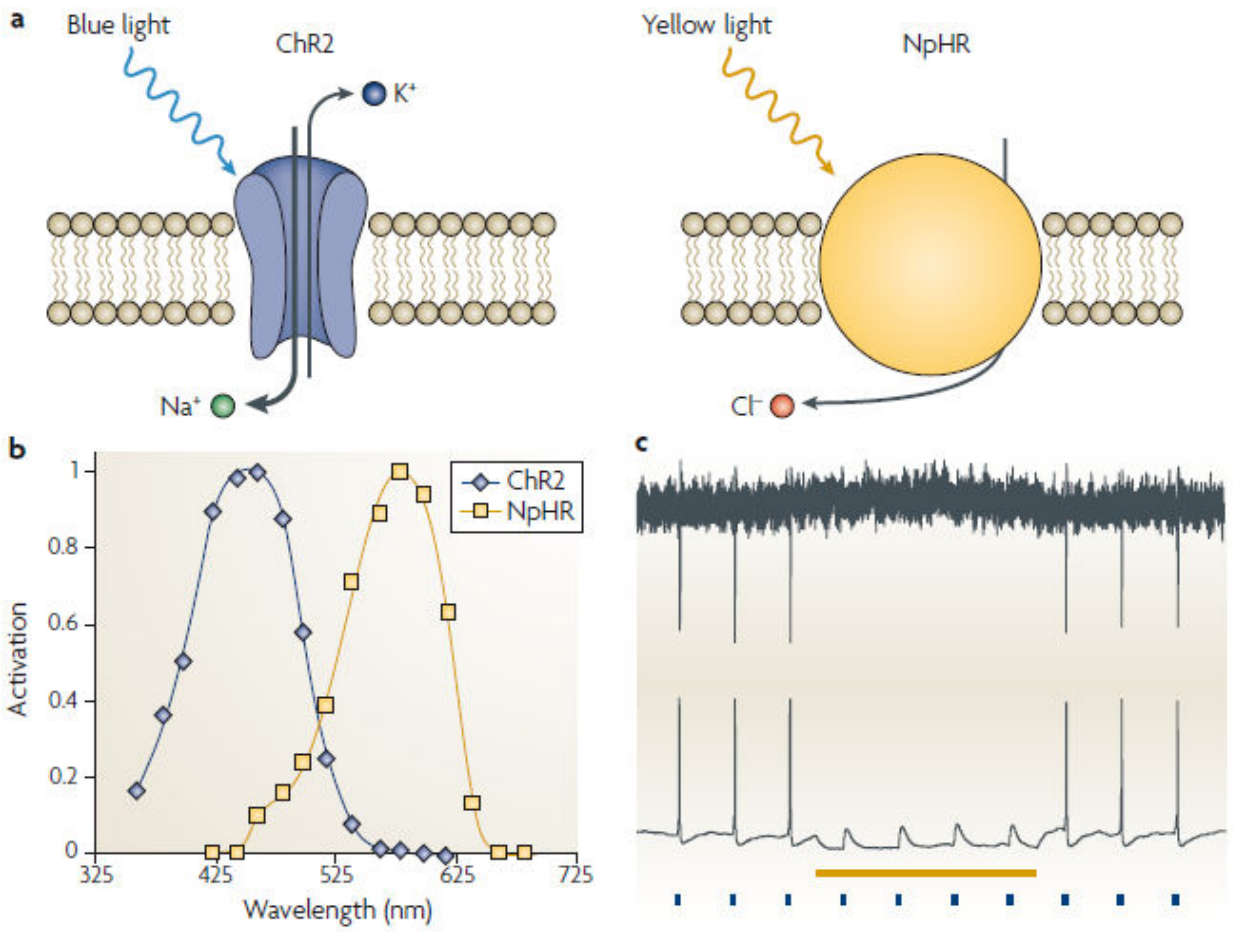


Figure 28 : Contrôle de l'activité neuronale par approche optogénétique (Zhang et al. 2008).

2. « Capture » d'images d'endocytose grâce au couplage d'une stimulation optique avec l'immobilisation rapide par congélation sous haute pression

Le délai d'apparition de l'endocytose, la morphologie des invaginations et leur distance à la ZA permettent de différencier les mécanismes d'endocytose (Royle & Lagnado 2003). L'endocytose dépendante de la Clathrine se produit entre 10 et 15s après l'exocytose, à distance de la ZA, et est caractérisée par la formation de vésicules recouvertes de matériel dense. Les évènements de « kiss and run » devraient apparaître dans un délai d'une seconde à la ZA. Enfin, l'endocytose de type « bulk » est identifiable par la surface importante des invaginations de la membrane plasmique.

Afin de pouvoir visualiser des évènements d'endocytose aux terminaisons de synapses centrales, nous avons développé un outil permettant de coupler une stimulation optique de neurones avec une immobilisation rapide par CHP (Fig. 29). La stimulation optique nous permet d'activer avec une bonne précision temporelle une population de neurones excitateurs d'hippocampe de rat exprimant une ChR2. La CHP a pour atout d'immobiliser les neurones très rapidement, en 10 ms, soit avec une résolution temporelle largement suffisante pour analyser l'endocytose. La bonne préservation des structures membranaires et des échafaudages protéiques avec cette technique sera également un facteur crucial pour pouvoir caractériser avec précision la morphologie des figures d'endocytose, et les localiser respectivement à la ZA.

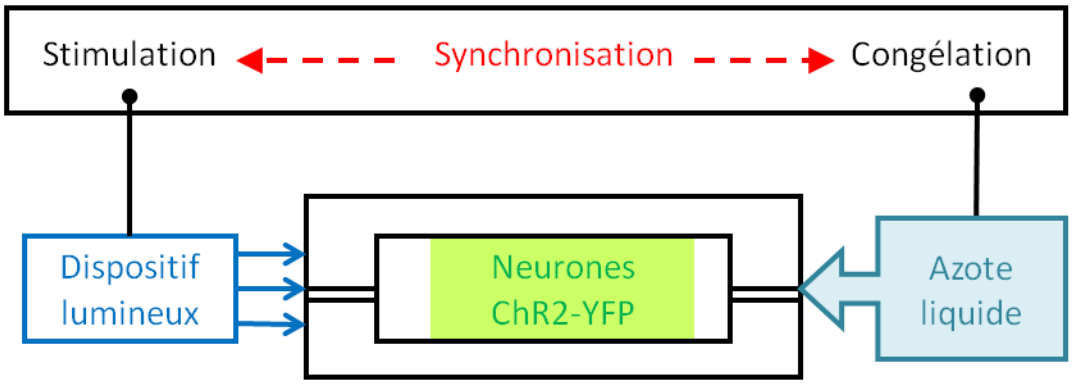


Figure 29 : Principe expérimental du dispositif du couplage de stimulations lumineuses de neurones ChR2 positifs avec leur immobilisation rapide par CHP.

Résultats

Résultats

I. Etude de la régulation de l'ancrage des vésicules synaptiques en microscopie électronique sans fixateur

A. Introduction

Le nombre de VSs ancrées à la ZA pourrait être un paramètre déterminant de la probabilité de libération de neurotransmetteur mais son mécanisme de régulation reste encore peu connu. Un blocage de 3 jours par la tétrodotoxine (TTX) induit une augmentation homéostasique du nombre de VSs ancrées à la ZA (Murthy et al. 2001). Cette augmentation s'accompagne d'une augmentation de la fréquence des mEPSCs. Ce phénomène d'augmentation de l'ancrage pourrait résulter d'une augmentation globale de l'ensemble des paramètres morphologiques de la terminaison (taille de la ZA, nombre total de VSs dans le bouton, taille du bouton), en accord avec le « Principe de taille des ultrastructures » (Pierce & Lewin 1994). Cependant, d'autres études montrent une décorrélation entre ces paramètres morphologiques (Branco et al. 2010, Holderith et al. 2012). Pour ces études récentes, seuls le nombre de VSs ancrée et la taille de la ZA apparaissent corrélés, et sont de plus les seuls paramètres corrélés avec la Pl aux synapses individuelles. Nous nous sommes donc demandé quels paramètres morphologiques sont régulés lors de l'augmentation du nombre de VSs ancrées en conditions de blocage d'activité. Pour répondre à cette question, nous avons effectué un blocage chronique d'activité (3 jours de TTX) dans des tranches organotypiques d'hippocampe et nous avons quantifié puis étudié la morphologie des synapses excitatrices établies sur les neurones de la couche CA1. Les tranches ont été immobilisées par CHP, cryosubstituées et enrobées dans des résines afin de pouvoir réaliser des sections de 50 nm d'épaisseur, permettant de visualiser les VSs ancrées en ME sans les artéfacts induits par les fixateurs aldéhydiques.

D'un point de vue moléculaire, la protéine RIM apparaît comme un candidat particulièrement intéressant dans le mécanisme de régulation du nombre de VSs ancrées. Elle interagit à la fois avec les molécules du complexe SNARE ainsi qu'avec Rab3, une protéine

vésiculaire, et pourrait donc favoriser l'interaction des VSs avec les protéines de la membrane à la ZA (Kaeser 2011). De plus, l'ablation de l'isoforme RIM1α chez des souris induit une diminution du nombre de VSs ancrées (Han et al. 2011). Enfin, un blocage chronique d'activité augmente spécifiquement la quantité de protéine RIM à certaines synapses dans des neurones dissociés (Lazarevic et al. 2011). Afin de déterminer si une régulation de la quantité de RIM pourrait effectivement être responsable de l'augmentation du nombre de VSs ancrées lors d'un blocage chronique d'activité, nous avons réalisé une analyse quantitative en immunocytochimie après CHP. Nous avons également quantifié en immunocytochimie les variations de quantité des récepteurs postsynaptiques au glutamate et étudié les corrélats électrophysiologiques par des enregistrements de la fréquence et de l'amplitude des mEPSCs.

Les résultats obtenus révèlent une augmentation significative de la densité de synapses dans le champ CA1 des tranches, du nombre de VSs ancrées, de la taille de la ZA ainsi que du nombre de récepteurs postsynaptiques au glutamate après blocage de l'activité. En revanche, la taille du bouton et le nombre total de VSs dans le bouton ne varient pas. La quantité moyenne de protéine RIM1/2 aux synapses ne varie pas mais sa répartition est modifiée ; la quantité de RIM1/2 apparaît homogénéisée dans l'ensemble des terminaisons. Etonnamment, la fréquence et l'amplitude moyennes des mEPSCs ne sont pas modifiées. Cependant les amplitudes des mEPSCs sont redistribuées vers leurs valeurs extrêmes.

Ces résultats montrent une régulation spécifique de la jonction synaptique après blocage de l'activité. On constate en effet une augmentation de l'ancrage des VSs, de la taille de la ZA et de la quantité de récepteurs postsynaptiques au glutamate, sans effet sur la taille des boutons présynaptiques ou le nombre total de VSs. Par contre, on n'observe pas d'augmentation de l'immunoréactivité pour la protéine RIM. Ainsi, la quantité de protéine RIM ne semble pas réguler l'ancrage des VSs.

De façon surprenante, nous n'avons pas mesuré d'augmentation de la fréquence moyenne des mEPSCs malgré l'augmentation du nombre de synapses et de VSs ancrées. Ce résultat indique que le nombre de VSs ancrées ne détermine pas la Pl dans nos conditions expérimentales. L'absence de variation de fréquence des mEPSCs est en revanche corrélée à

l'absence de changement de la quantité moyenne de protéines RIM aux synapses. Ces résultats suggèrent un rôle primordial de RIM dans la régulation de la Pl, en aval de l'ancrage.

De plus, l'amplitude moyenne des mEPSCs n'est pas augmentée malgré une augmentation significative de la quantité de récepteurs postsynaptiques au glutamate. Cependant, les valeurs des amplitudes des mEPSCs sont redistribuées. Les enregistrements électrophysiologiques présentent davantage de signaux de grande amplitude, ce qui est en accord avec l'augmentation du nombre de récepteurs postsynaptiques au glutamate. Ils montrent également davantage de signaux de faible amplitude, ce qui explique que la valeur moyenne ne change pas. Ce dernier résultat indique un échantillonnage plus efficace des synapses présentant de faibles amplitudes. En conditions contrôle, les synapses présentant des mEPSCs de faible amplitude, c'est-à-dire peu de récepteurs au glutamate, ont une petite DPS, et en présynaptique, sont caractérisées par une faible Pl et une faible quantité de protéines RIM (Takumi et al. 1999, Holderith et al. 2012). Or, si la quantité de moyenne de RIM n'est pas augmentée après le blocage chronique d'activité, les quantités de protéines RIM aux synapses sont redistribuées et apparaissent homogénéisées. Cette homogénéisation des quantités de RIM aux synapses doit entraîner une augmentation de la quantité de RIM aux petites synapses, qui en contenaient le moins préalablement au blocage. Le meilleur échantillonnage des synapses présentant de faibles amplitudes pourrait donc s'expliquer par une augmentation de la Pl due à l'augmentation des quantités de RIM à ces synapses. Ces résultats suggèrent un rôle fondamental de la protéine RIM dans la régulation de l'efficacité de la transmission au niveau présynaptique.

B. Article : Adaptive and non adaptive changes in activity deprived synapses

II. Couplage d'une stimulation optique et de la congélation de neurones pour l'étude du cycle des vésicules synaptiques

L'endocytose est une étape cruciale du cycle des VSs, qui permet la reformation de vésicules fonctionnelles après un évènement d'exocytose. Elle est indispensable à la continuité de la transmission synaptique. Malgré de nombreux travaux réalisés au moyen de différentes techniques, son mécanisme reste encore mal connu. Deux types de mécanismes ont été proposés dans la littérature : un mécanisme rapide de « kiss and run » et un mécanisme lent dépendant de la Clathrine. D'autre part, des stimulations de forte intensité semblent entraîner un 3ème mécanisme, une endocytose de type « Bulk », qui se caractérise par un retrait de larges portions de membrane plasmique et la formation d'endosomes dans la terminaison.

Le mécanisme d'intégration des VSs nouvellement reformées à l'intérieur du réseau de filaments de la terminaison est largement méconnu (Denker & Rizzoli 2010). On ignore également comment de nouvelles VSs sont dirigées vers la ZA préalablement à l'ancrage. Des mécanismes de transport actif par les filaments du cytosquelette ont pu être mis en évidence par certaines études (Ryan 1999, Verstreken et al. 2005), tandis que d'autre travaux montrent l'existence de mécanismes de diffusion (Holt, Cooke et al. 2004, Gaffield, Rizzoli et al. 2006). Un détachement partiel des filaments de Synapsine reliant les VSs entre elles pourrait également intervenir lors de l'activité synaptique (Chi et al. 2001, Gaffield & Betz 2007).

Afin de répondre à ces questions sur le cycle des VSs, il faudrait pouvoir visualiser en ME les VSs et les filaments présynaptiques à différentes étapes du cycle. Notre idée a été de reprendre le principe de l'expérience d'Heuser et Reese (Heuser et al. 1979) : activer les synapses et les immobiliser par congélation à différents temps après leur activation, pour suivre les VSs lors de leur cycle (Fig. 30).

Nous avons tout d'abord mis au point un système de stimulation des neurones pouvant être intégré dans la machine de congélation sous haute pression (HPM). L'idée de départ a été d'introduire un système de stimulation électrique à l'intérieur de l'HPM. Des tests de stimulation ont été réalisés à l'extérieur de la machine, sur des tranches d'hippocampe, par application de courant directement au niveau des capsules métalliques de congélation.

L'enregistrement des neurones par des techniques d'électrophysiologie n'a montré aucune activation en réponse à l'application de ces stimulations électriques. L'explication la plus probable est que le milieu de culture dans lequel baigne l'échantillon biologique court-circuite le courant, qui ne passe pas par les cellules mais autour d'elles. Nous avons donc opté pour une autre stratégie de stimulation. Le développement d'outils d'optogénétique permet de faire exprimer à des neurones un canal ionique issu d'algue, activable par des stimulations lumineuses (Boyden et al. 2005). Nous avons alors travaillé sur des cultures dissociées de neurones d'hippocampe de rat infectées avec un Adeno-Associated Virus (AAV) exprimant la ChannelRhodopsine2 (ChR2) afin de les rendre activables par des stimulations lumineuses (Fig. 29). La ChR2 est sous contrôle d'un promoteur CamKII, de façon à être exprimée uniquement dans les neurones excitateurs. Des mesures d'électrophysiologie ont confirmé l'induction de potentiels d'action dans ces cultures, en réponse à des stimulations lumineuses produites par des diodes électroluminescentes (DELs) bleues. Ces DELs ont été spécifiquement sélectionnées pour leur petite taille, de façon à ce qu'elles soient intégrables dans le dispositif de stimulation-congélation, à l'intérieur de l'HPM.

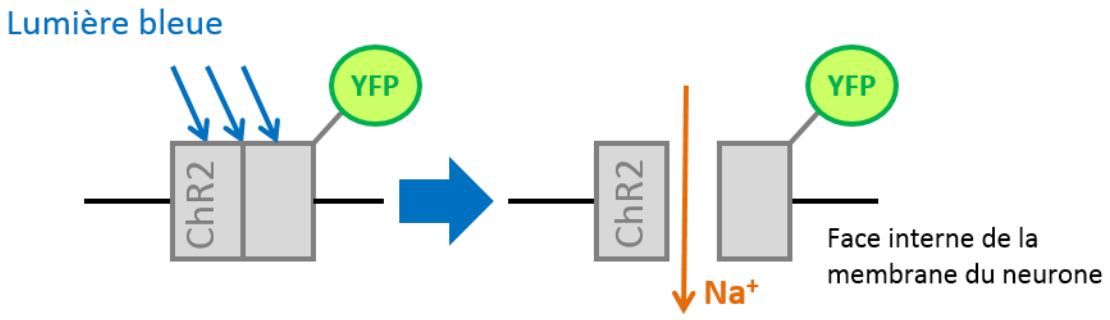


Figure 30 : Principe de l'activation de la ChannelRhodopsine2 exprimée à la membrane d'un neurone.

Dans un deuxième temps, une collaboration avec Leica Microsystems a permis de modifier l'HPM afin de coupler stimulation et congélation à l'intérieur de l'appareil. Nous avons d'une part conçu un support de congélation intégrant les DELs testées en électrophysiologie. D'autre

part, des électrodes ont été insérées à l'intérieur de la machine, de façon à ce qu'elles puissent activer les DELs. Un boîtier de dérivation des commandes de l'HPM et des électrodes de stimulation a été ajouté au système pour pouvoir piloter la stimulation et la congélation via un ordinateur. Benjamin Mathieu, responsable de la plateforme d'imagerie optique de l'IBENS, a conçu un programme informatique permettant de choisir les paramètres de stimulation (fréquence et durée des flashs lumineux, nombre de répétitions de la stimulation) et le délai entre la stimulation et la congélation.

Nous avons enfin adapté notre méthode de culture de neurones à des supports développés par Xavier Heiligenstein à l'Institut Curie, les CryoCapsules (Heiligenstein et al. 2014). Celles-ci sont conçues pour optimiser la congélation des cellules en favorisant une montée en pression et une descente de la température très rapides au niveau de l'échantillon. Elles permettent également de minimiser les manipulations de l'échantillon afin d'améliorer la reproductibilité des expériences.

A. Mises au point de la stimulation optogénétique

Nous avons dans un premier temps mis au point un protocole permettant de stimuler des neurones avec un système intégrable et activable dans l'HPM. Nous avons travaillé sur des cultures de neurones dissociés exprimant une ChR2. Des enregistrements électrophysiologiques ont permis de vérifier que ces neurones étaient activables par des DELS qui peuvent être intégrées dans les supports de congélation.

1. Matériel et méthodes

Culture de neurones

Un jour avant la culture, des inserts en verre de 12 mm de diamètre (Marienfeld GmbH & Co. KG0111520) ont été disposés au fond d'une boîte 24 puits et recouverts d'une solution aqueuse de Polyornithine (Poly-DL-ornithine, Sigma P-8638) concentrée à 80 µg / mL. Des

femelles gestantes (Sprague Dawley, RjHan:SD, élevage Janvier) ont été euthanasiées au CO_2 et les embryons prélevés au jour embryonnaire 18.5 (E18.5). Après décapitation, les cerveaux ont été prélevés et les hippocampes disséqués et rincés dans le milieu de dissection (HBSS, Gibco 14180-046 ; 20mM HEPES pH7.4, Gibco 15630-049). Après dissection et rinçage, les hippocampes ont été incubés pendant 10 minutes à 37°C dans une solution de milieu de dissection contenant 0.25% de trypsine (Gibco 25090-028). Après rinçage dans le milieu de dissection, les hippocampes ont été dissociés mécaniquement par pipetage. La solution de Polyornithine a été aspirée préalablement à l'ensemencement. Après comptage à l'aide d'une cellule de Malassez, les cellules ont été diluées dans le milieu d'attachement (MEM, Gibco 21090 ; 2 mM L-Glutamine, Invitrogen 21103049 ; 1 mM Na-pyruvate, Gibco 11360-039, 0.1% sérum de cheval inactivé par chauffage et filtré, PAA B15-122) pour être ensemencées à une concentration de 2.10^5 cellules par mL, 0.5 mL par puits. Trois à 4 heures après l'ensemencement, le milieu d'attachement a été aspiré et remplacé par 0.5 mL de milieu de culture (Neurobasal, Gibco 21103-049 additionné de : 0.04% de supplément B27, Gibco 17504-044 ; 2 mM L-Glutamine, Invitrogen 21103049 ; 0.05% Pénicilline / Streptavidine, Gibco 15140114). Une fois par semaine, 100 µL de milieu de culture ont été ajoutés dans chaque puits.

Infection des neurones avec un « Adeno-Associated virus » exprimant la ChannelRhodopsine2

Le vecteur utilisé pour l'infection est un Adeno-Associated Virus (AAV) de sérotype 2/9 conçu dans le laboratoire de Karl Deisseroth (Stanford, EU) et produit au Vector Core de l'Université de Pennsylvanie (Fig. 31). Il porte une séquence codant pour la ChannelRodopsine2 (ChR2) humanisée, ce qui optimise l'expression du transgène dans les cellules de mammifères. Cette séquence est associée à une séquence codant pour la « Yellow Fluorescent Protein » (YFP), permettant l'expression d'une protéine de fusion ChR2-YFP et donc la visualisation des neurones infectés. Ces séquences sont sous contrôle d'un promoteur CamKII, spécifique des neurones excitateurs. Les cultures dissociées de neurones d'hippocampe de rat ont été infectées par ajout du virus dans le milieu de culture 7 jours après la mise en culture. La

solution de virus a été utilisée à un titre de 10^{12} unités de virus par mL de milieu de culture. Les cultures ont été utilisées deux semaines après infection.

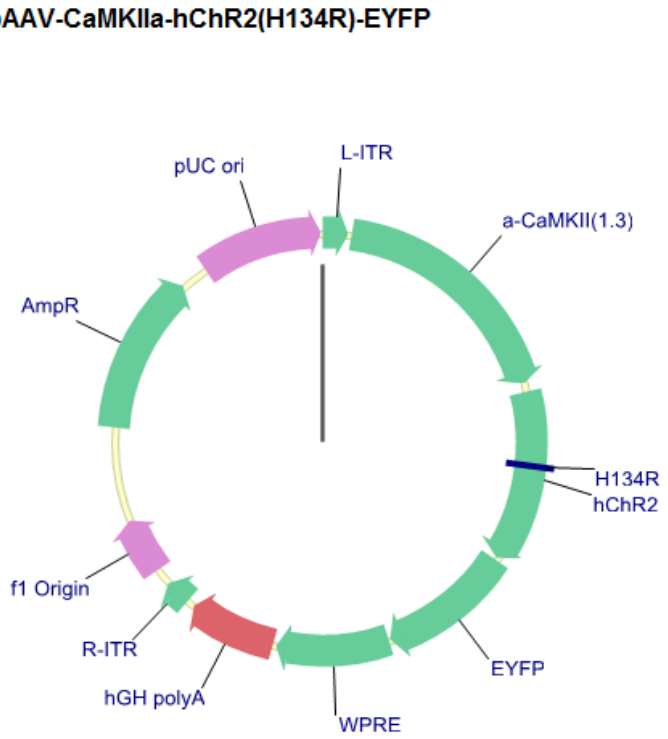


Figure 31 : Séquence de l'AAV-ChR2 utilisé (http://www.everyvector.com/sequences/show_public/11039).

Immunocytochimie

Afin d'analyser le taux d'infection des neurones par l'AAV-hChR2-YFP, nous avons réalisé un marquage des cultures avec un anticorps dirigé contre un antigène présent spécifiquement dans le noyau des neurones (anticorps monoclonal de souris anti Neuronal Nuclei, Millipore MAB377). Nous avons fixé chimiquement les cellules de deux inserts de verre par incubation pendant 10 minutes dans une solution tamponnée 0.12 M phosphate (0.9% NaCl, pH 7,4 ; PBS) contenant 4% de paraformaldéhyde. Après 3 rinçages de 20 minutes dans du PBS, les cellules ont été perméabilisées dans du PBS contenant du 0.1% de triton, puis rincées 3 fois 10 minutes dans du PBS. Elles ont été incubées dans du PBS contenant 5% d'Albumine de sérum bovin pendant 30 minutes afin de bloquer les sites non-spécifiques, puis incubées 3h dans l'anticorps primaire dilué au 1/250 dans du PBS. Les cellules ont ensuite été rincées 3 fois 10 minutes dans

du PBS, incubées 1h30 dans l'anticorps secondaire (Chèvre anti souris couplé au Cy3, 115-165-146 AffiniPure IgG, Jackson Immuno Research Inc., West Grove, EU) dilué au 1/500 dans du PBS et rincées 3 fois 10 minutes dans du PBS. Les inserts supportant les cellules ont été montés dans du milieu de montage Aqua-Poly/Mount (Polysciences Inc. 18606) sur une lame de verre et observés à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DMRD.

Les photos ont été prises avec une caméra MicroMax (Princeton Intrument Inc., Princeton, EU) et le logiciel MetaVue (MetaVue Inc., Madison, EU), puis visualisées à l'aide d'Image J. Les comptages de colocalisation ont été réalisés sur 32 clichés de 289 cellules cultivées 21 jours et infectées 14 jours, réparties sur 2 inserts.

Mise au point du dispositif de stimulation lumineuse

Les diodes électroluminescentes (DELs) utilisées pour stimuler les neurones sont des DELs Kingbright 1.6x0.6mm KPA/PBC blue (Fig. 32 A ; Right Angle SMD Chip LED Lamp ; Kingbright Elec. Co, Taipei, Taiwan). Leur petite taille permet de les intégrer dans le support de congélation. Ces DELs produisent une lumière de longueur d'onde dominante de 465nm et d'intensité égale à 230 millicandela.

Nous avons construit un circuit avec 5 DELs de telle sorte que leur surface totale couvre un maximum de la surface de la chambre de congélation (Fig. 32 B). Nous les avons montées en parallèle afin de minimiser la tension à appliquer aux bornes du circuit pour obtenir l'intensité voulue dans chaque DEL. Une résistance de 27 ohms a été montée en série pour stabiliser le courant. Afin d'optimiser l'intensité lumineuse produite, nous avons appliqué à chaque DEL un courant de 30 mA pour une puissance de 100 mW. Le circuit électrique lumineux a été alimenté par un générateur de fonctions TTi TG2000 20 MHz DDS (TTi Inc, Fort Worth, EU) nous permettant d'obtenir des flashs lumineux de fréquence et de durée réglables.

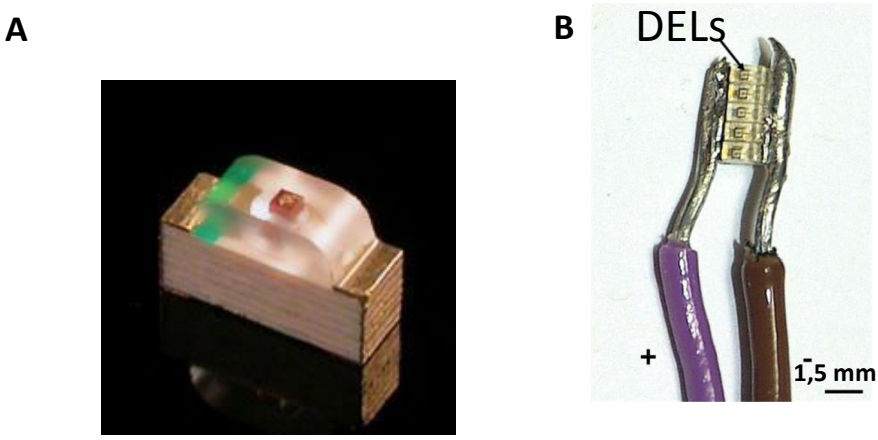


Figure 32 : DEL Kingbright APA 1606 et circuit assemblé pour réaliser les premiers tests de stimulation.

Electrophysiologie

Nous avons testé la réponse des cellules infectées avec la ChR2 à des stimulations par ce dispositif lumineux. Ce travail a été réalisé par Olivier Pascual, électrophysiologiste au laboratoire. Le générateur de fonctions nous a permis de délivrer des flashs lumineux de 5 ms à une fréquence de 1 Hz et sur une durée totale de 10 secondes. Olivier a enregistré la réponse de neurones infectés en mode « current clamp », en ajustant le potentiel de membrane à -57 mV, au-dessous du seuil de déclenchement des potentiels d'action. Les enregistrements ont été réalisés dans une solution d'ACSF additionnée d'inhibiteurs des récepteurs au glutamate AMPA et NMDA (136 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1.3 mM $MgCl_2$, 10 mM Hepes, 10 mM D-glucose, 50 µM DAP-V, 50 µM NBQX ; pH 7.4-7.5). L'ajout d'inhibiteur permet d'éviter un effet de réseau qui aurait pour conséquence de perturber la précision temporelle des réponses aux stimulations

2. Résultats

Expression de la ChannelRhodopsine2 dans des cultures de neurones dissociés de rat

Nous avons évalué le taux d'infection par un marquage immunocytochimique NeuN des neurones. Les comptages montrent que tous les neurones identifiés par le marquage immunocytochimique avec des anticorps dirigés contre l'antigène NeuN présentent une fluorescence YFP, indiquant une infection de 100% de ces neurones (Fig. 33).

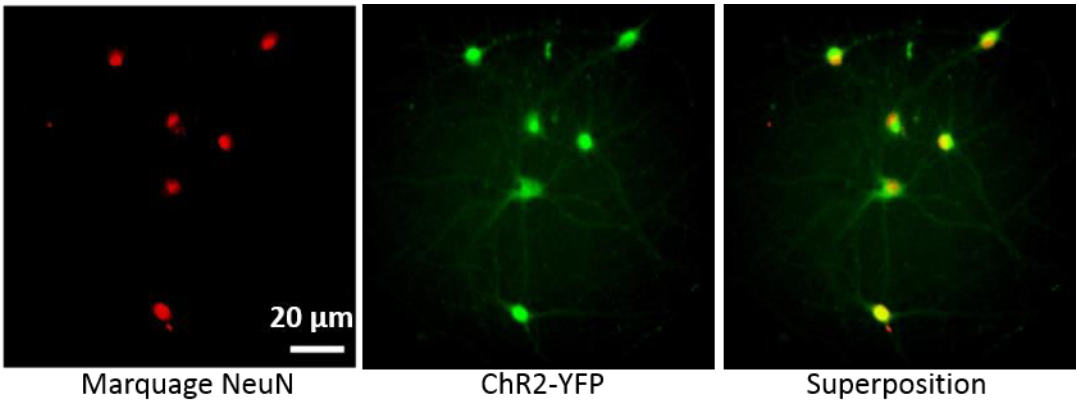


Figure 33 : Neurones infectés par l'AAV-ChannelRhodopsine2 observés au microscope en fluorescence

Stimulation des neurones par les DELs

Nous avons vérifié que nous pouvions activer les neurones exprimant la ChannelRhodopsine2 à l'aide de notre circuit lumineux de test. L'activité des neurones en réponse aux stimulations a pu être confirmée par des enregistrements électrophysiologiques en current clamp effectués par Olivier Pascual, chercheur au laboratoire (Fig. 34).

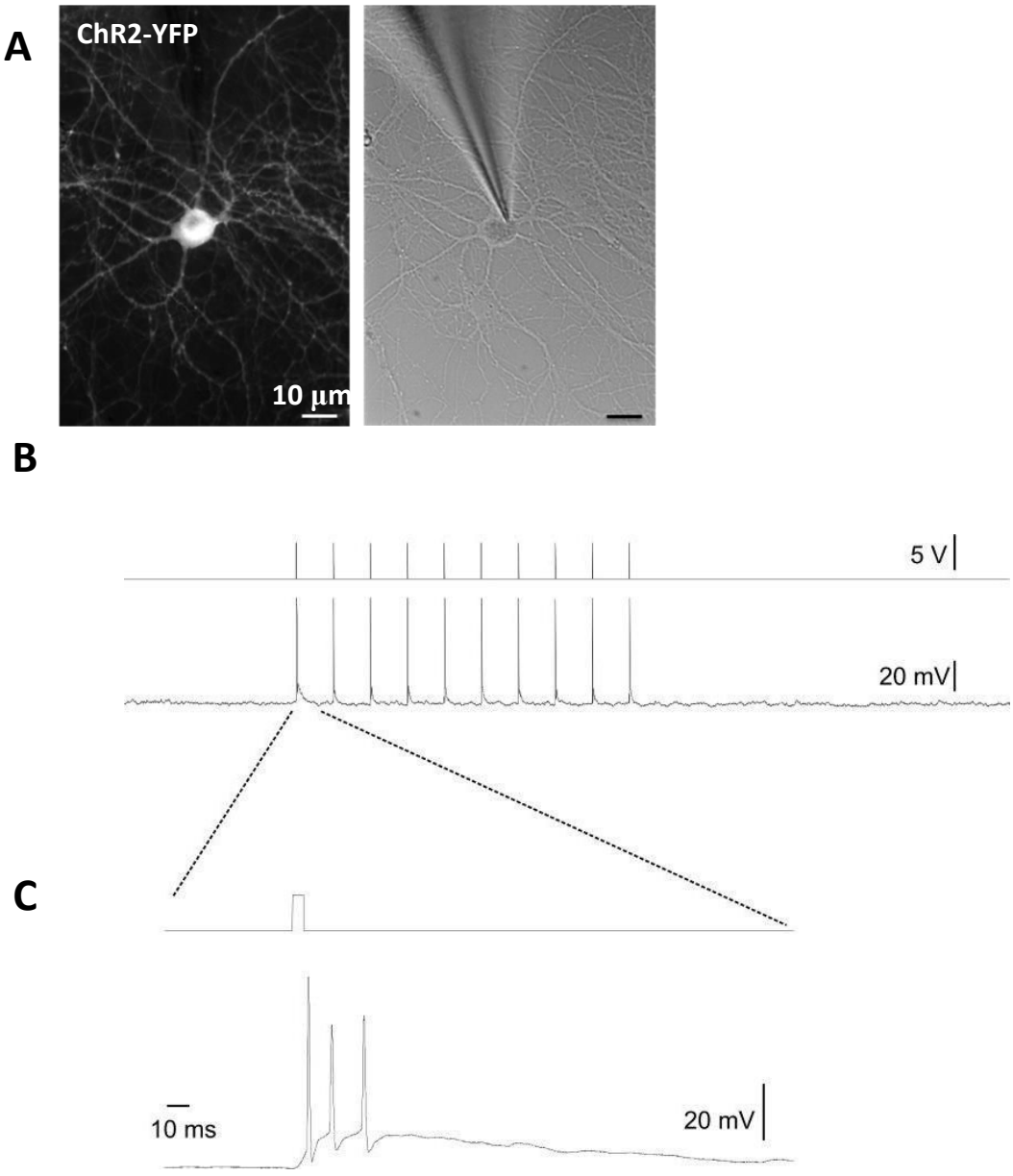


Figure 34 : Enregistrements électrophysiologiques effectués par Olivier Pascual.

A. Neurone enregistré (Gauche : vue en microscopie en fluorescence ; Droite : neurone contacté par la pipette d'enregistrement).

B. Graphes résultant de l'enregistrement électrophysiologique (Haut : flashes lumineux ; Bas : Réponse du neurone en potentiel de membrane) ; 10 flashs de 5 ms à 10 Hz ont été appliqués.

C. Focus sur la réponse à un unique flash lumineux (Haut : flashes lumineux ; Bas : Réponse du neurone en potentiel de membrane).

B. Modifications de la machine et des supports de congélation sous haute pression

Nous allons maintenant présenter les développements réalisés pour pouvoir stimuler les échantillons dans l'HPM et coordonner cette stimulation avec la CHP. En collaboration avec Leica Microsystems, nous avons conçu un support de congélation lumineux activable par des électrodes insérées dans l'HPM. Nous avons de plus, avec l'aide d'ingénieurs de l'IBENS, mis au point un système de commande et de synchronisation de la stimulation et de la congélation.

1. Conception d'un support de congélation lumineux

Après validation du dispositif lumineux, nous avons réalisé en collaboration avec Reinhardt Lihl (Recherche et Développement Leica Microsystems) un support de congélation intégrant dans un circuit 3 DELs KingBright testées en électrophysiologie reliées à des connecteurs (Fig. 35). Les DELs sont placées sous l'emplacement dédié à l'échantillon biologique de sorte que la stimulation soit la plus efficace possible.

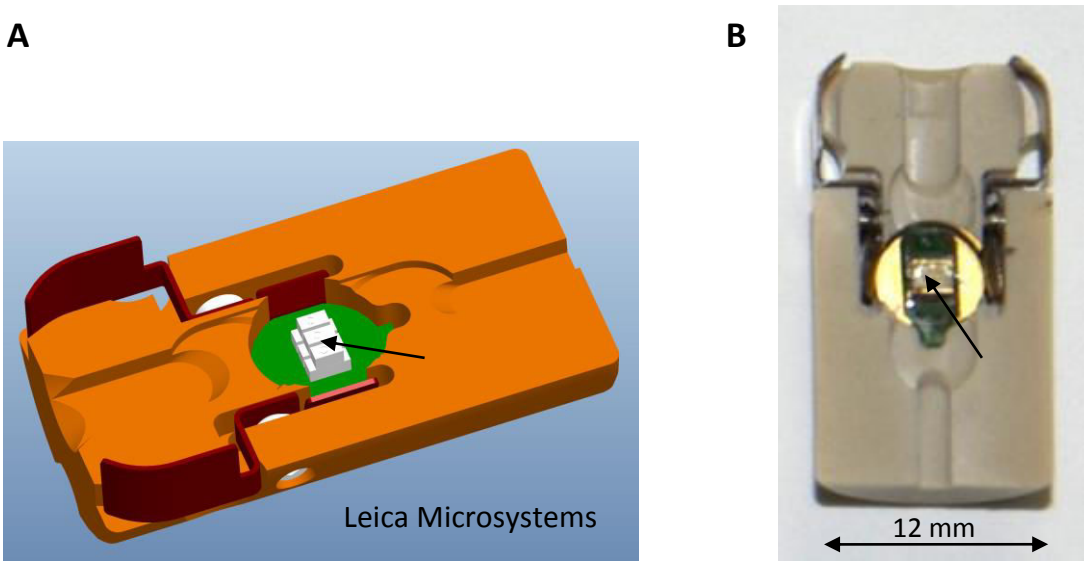


Figure 35 : Schéma (A) et photo (B) du support de congélation lumineux (Flèches : DELs).

2. Intégration d'un système de stimulation dans l'HPM

Sur notre demande, la R&D Leica a inséré dans la machine un circuit comportant deux électrodes pour permettre d'activer les DELs. Lorsque le support contenant l'échantillon est introduit dans l'HPM, les connecteurs de ce support viennent au contact des électrodes (Fig. 36).

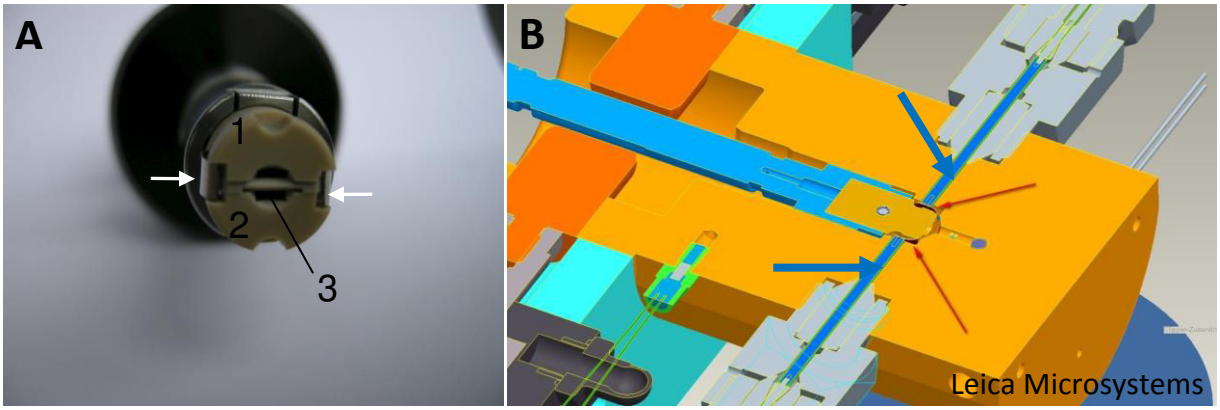


Figure 36 : Système de stimulation à l'intérieur de l'HPM.

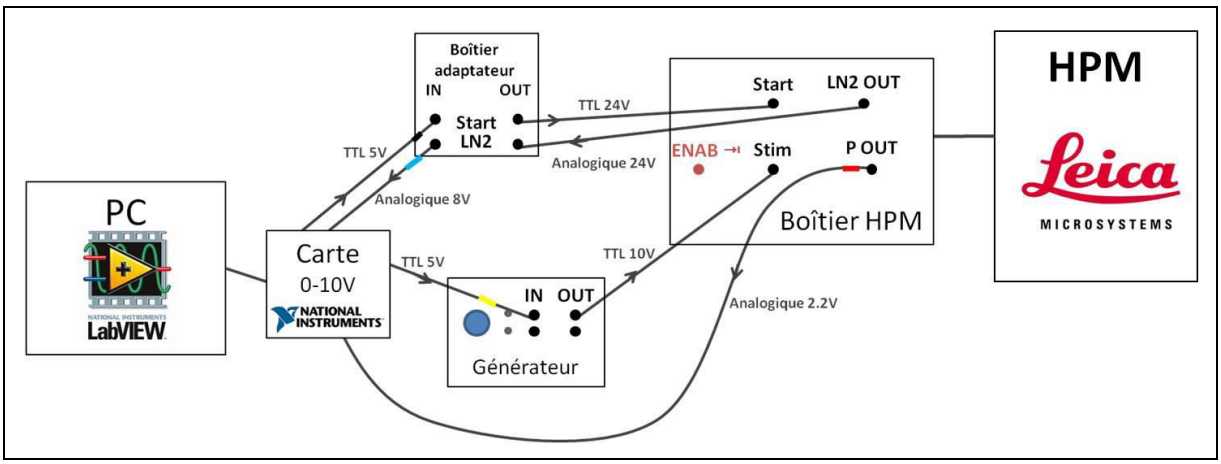
A. Support assemblé (1 : demi cylindre lumineux, 2 : demi-cylindre classique, 3 : plaque dans laquelle est maintenu l'échantillon, Flèches : connecteurs).

B. Vues du support inséré dans l'HPM au contact des électrodes (Flèches rouges : connecteurs, Flèches bleues : électrodes) ; Leica Microsystems.

3. Commandes du couplage stimulation – congélation

Les commandes des électrodes et de la congélation ont été dérivées par Leica Microsystems vers un boîtier afin de pouvoir synchroniser la stimulation et la congélation. La congélation est déclenchée en commandant l'ouverture d'une valve électromagnétique retenant l'azote liquide sous pression. La mesure de montée en pression au niveau de l'échantillon a également été dérivée vers le boîtier, nous permettant de vérifier a posteriori le moment de la congélation.

Nous avons fabriqué un boîtier adaptateur permettant de convertir les signaux de 24 V sortant et entrant de l'HPM en signaux 5 V et 8 V, pouvant être acquis par une carte multifonction. Un générateur de courant adapté à l'activation des DELs au maximum de leur puissance a été fabriqué avec l'aide de Gérard Parésys, ingénieur responsable de la plateforme d'électronique de l'IBENS (Fig. 37).



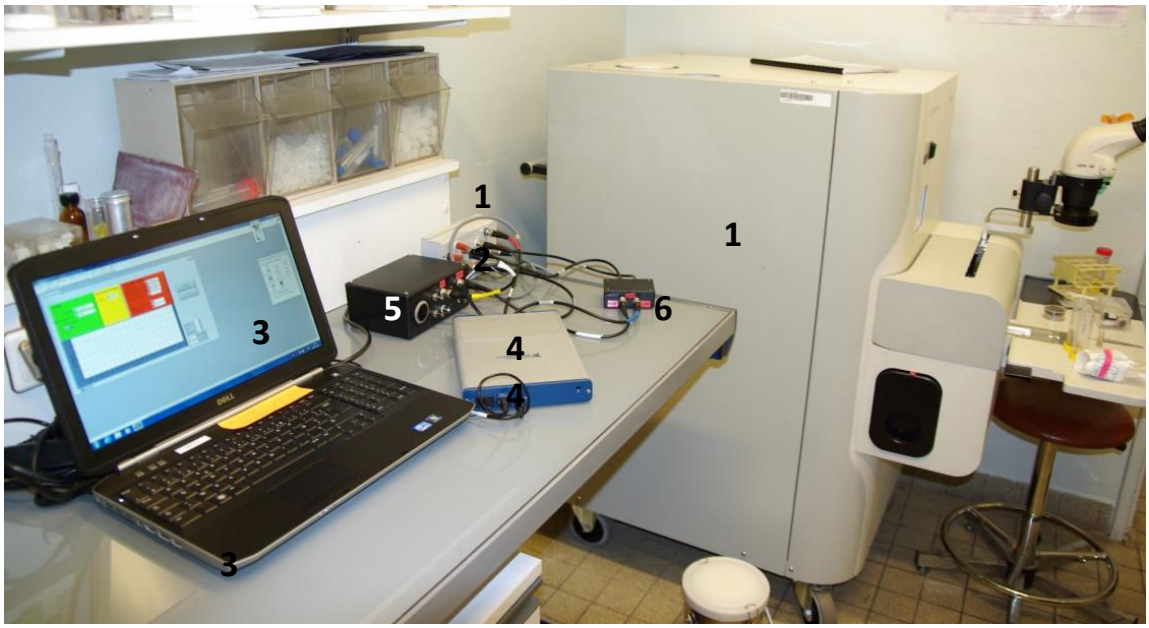


Figure 37 : Schéma (A) et photo (B) du dispositif assemblé, qui comporte :

- **La machine (1) dans laquelle ont lieu la stimulation et la congélation.**
- **Le boîtier de commandes de l'HPM et des électrodes (2).**
- **L'ordinateur (3) et la carte interface (4) qui contrôlent les commandes de stimulation, de congélation et acquièrent les signaux sortant de l'HPM.**
- **Le générateur (5) qui alimente le circuit lumineux du support.**
- **Le boîtier adaptateur (6) qui convertit les signaux entrant et sortant de l'HPM.**

Benjamin Mathieu a réalisé un programme informatique à l'aide du logiciel Labview. Ce programme permet de déclencher de façon synchronisée la stimulation lumineuse et la congélation par l'HPM. Il permet également de récupérer, sous forme d'un graphique, les signaux de stimulation lumineuse et ceux d'ouverture de la valve et de montée de pression. Nous pouvons programmer la durée et la fréquence des stimulations, le nombre de stimulations ainsi que le délai entre la stimulation et l'ouverture de la valve retenant l'azote (Fig. 38 A). Il y a en effet un délai entre l'ouverture de la valve et la congélation de l'échantillon dû principalement au temps de cheminement de l'azote dans l'appareil. Ce délai est d'environ 70 ms. Le graphique de sortie permet de vérifier a posteriori le délai réel entre la stimulation lumineuse et la montée de pression dans le compartiment contenant l'échantillon (Fig. 38 B).

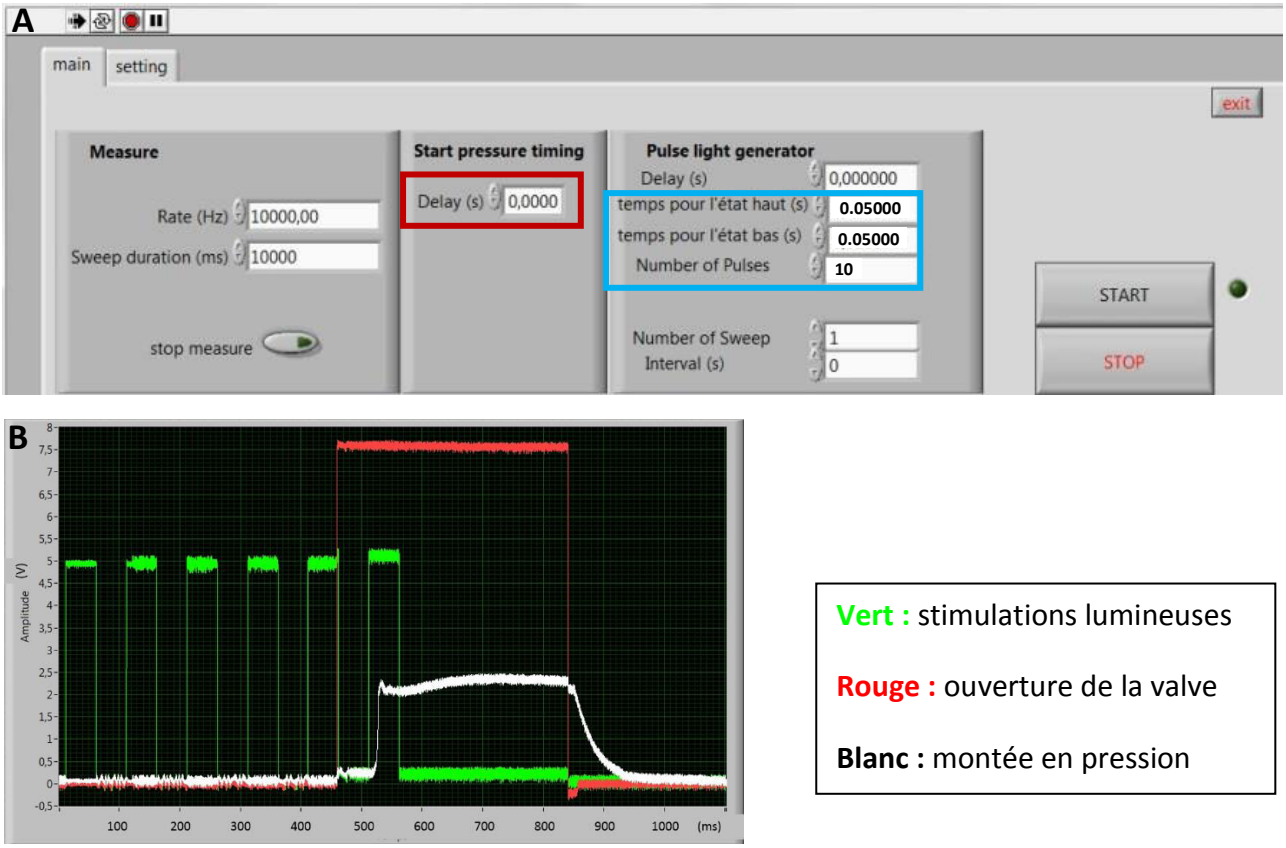


Figure 38 : Programme Labview permettant la synchronisation de la stimulation et de la congélation.

A. Face avant du programme permettant de choisir le délai entre la stimulation et la congélation (cadre rouge), la fréquence, la durée et le nombre de stimulations (cadre bleu) et de déclencher la stimulation – congélation (START).

B. Graphique de sortie.

C. Utilisation des CryoCapsules pour le couplage stimulation-congélation des neurones

Pour la stimulation et la congélation de cultures de neurones, nous avons dans un premier temps utilisé le système destiné à la microscopie corrélative optique-électronique (Correlative Light and Electron Microscopy, CLEM) commercialisé par Leica Microsystems. Ce système comprend un insert en saphir de 3 mm de diamètre sur lequel sont cultivées les cellules. Avant la CHP, un anneau métallique (« spacer ») et un saphir de couverture sont superposés sur l'insert. Ce « sandwich » est maintenu dans le support de congélation à l'aide de deux pièces métalliques circulaires, permettant d'exposer les neurones aux stimulations lumineuses. A l'issue de 3 semaines de culture, les inserts ont donc été assemblés dans le support Leica, insérés dans l'HPM et la stimulation et la congélation ont été déclenchées depuis l'ordinateur. Les inserts ont ensuite été cryosubstitués et inclus dans une résine araldite. L'expérience a été répétée 8 fois sur 51 inserts au total. Malgré une bonne survie des neurones durant la culture, seuls 7 des 51 inserts ont permis d'observer des neurones bien congelés, avec des ultrastructures bien visibles en ME. Les autres inserts présentent des cellules apparemment déshydratées ou aucune cellule.

Etant donné le très faible rendement de ces expériences, nous avons cherché à utiliser un support différent pour congeler les neurones en culture. Une collaboration avec Xavier Heiligenstein, post doctorant dans l'équipe de Graça Raposo à l'Institut Curie, nous a permis d'utiliser un système qu'il a récemment développé, les Cryocapsules (commercialisées par la société CryoCapCell, Paris ; Heiligenstein et al. 2014). Ces capsules permettent de cultiver et congeler des cellules sous haute pression dans un même support. Elles sont composées d'un insert de saphir de 3 mm de diamètre recouvert d'un quadrillage de carbone, sur lequel est posé un « spacer » en or de 50 nm d'épaisseur (Fig. 39). L'ensemble est maintenu par un support cylindrique en plastique. Lors de la culture, les capsules sont disposées au fond des puits et utilisées de la même façon que les inserts de verre (protocole au chapitre A.1.). Pour la congélation, elles sont refermées par un saphir de couverture et insérées dans des plaquettes spéciales qui les maintiennent hermétiquement fermées. Ces plaquettes sont adaptées aux supports de congélation Leica Microsystems et permettent de procéder directement à la CHP.

Les CryoCapsules permettent de plus de congeler les cellules dans un très faible volume de milieu ce qui favorise une montée de pression et une descente de température très rapides au niveau des cellules. Ces deux paramètres sont cruciaux pour une bonne vitrification des échantillons, sans formation de cristaux de glace.

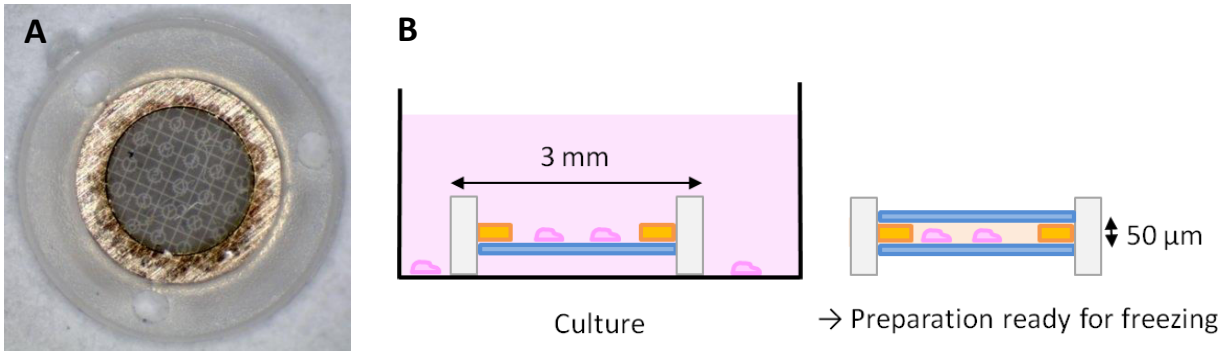


Figure 39 : Description des CryoCapsules.

A. Photo d'une Cryocapsule avec, de l'extérieur vers l'intérieur, le support en plastique, le spacer en or et l'insert de saphir.

B. Schéma d'utilisation des CryoCapsules : les cellules sont cultivées sur la capsule qui est refermée par un saphir de couverture avant la congélation (Gris : support en plastique, Orange : spacer en or, Bleu : saphirs insert et de couverture, Rose : cellules dissociées).

Une première série d'expériences a été réalisée en utilisant des cultures de neurones comme précédemment (protocole décrit au chapitre A.1.). En raison d'une mauvaise survie des neurones infectés dans les capsules, nous avons dû adapter notre protocole de culture de neurones dissociés à ce support. Nous avons alors travaillé sur des co-cultures de neurones et d'astrocytes. Les astrocytes permettent en effet d'apporter un support trophique aux neurones. Nous avons obtenu une bonne survie des neurones dans ces conditions, et avons pu effectuer des essais de stimulation congélation de ces préparations.

1. Matériel et méthodes

Co-culture de neurones/astrocytes sur des CryoCapsules

Préparation des capsules

Les capsules ont été incubées à 60°C pendant 48h afin que le revêtement de carbone adhère au saphir. Les capsules ont été rincées à l'eau puis conservées dans de l'alcool à 70%. Le jour avant la culture, elles ont été disposées dans une boîte 24 puits et recouvertes d'une solution aqueuse de Polyornithine à 1.5 µg / mL (Poly-DL-ornithine, Sigma P-8638). La boîte a été incubée à 37°C jusqu'à la culture.

Culture d'astrocytes de cortex de rat

Des femelles gestantes (Sprague Dawley, RjHan:SD, élevage Janvier) ont été euthanasiées au CO_2 et les embryons prélevés à E18.5. Après décapitation, les cerveaux ont été prélevés et les cortex disséqués et rincés dans le milieu de dissection (voir chapitre A.1.). Après dissection et rinçage, les cortex ont été incubés pendant 10 minutes à 37° dans une solution de milieu de dissection contenant 0.25% de trypsine. Après rinçage dans le milieu de dissection, les cortex ont été transférés dans le milieu d'attachement (voir chapitre A.1.), et dissociés mécaniquement par pipetage. La solution a ensuite été filtrée à l'aide d'un tamis cellulaire (diamètre 70 µm, Falcon 352350). Après comptage des cellules à l'aide d'une cellule de Mallassez, les cellules ont été diluées à une concentration de 3.10^5 cellules par mL de milieu d'attachement (Voir chapitre A.1.). Après aspiration de la solution de Polyornithine, 0.5 mL de la solution d'astrocytes a été ensemencé dans chaque puits de culture contenant une CryoCapsule. Le milieu d'attachement a été entièrement renouvelé après 1 jour et 3 jours de culture.

Culture et infection des neurones

Les neurones ont été préparés comme décrit au chapitre A.1. et ensemencés sur des cultures d'astrocytes de 2 semaines. Pour l'ensemencement, le milieu a été remplacé par 0.5 mL de solution de neurones à 2.10^5 cellules / mL dans le milieu d'attachement. Ce milieu a été remplacé par du milieu de culture 3 à 4h après l'ensemencement (voir chapitre A.1.). Cent µL

de milieu de culture ont été ajoutés dans chaque puits après 7 jours et 14 jours. La solution d'AAV ChR2 a été ajoutée après 7 jours de façon à obtenir une concentration de 10^{12} particules virale par mL de milieu de culture. Les neurones ont été cultivés 3 semaines.

Stimulation-congélation des cultures sur CryoCapsules

Les CryoCapsules ont été prélevées dans une boîte de petri rempli d'ACSF (140 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 4 mM CaCl2, 1 mM MgCl2, 10 mM Hepes, 10 mM D-glucose; pH 7.3, 300 mOsm) à 37°C. Les capsules ont été fermées par un saphir de couverture directement dans l'ACSF. Les capsules ont ensuite été insérées dans une plaquette de congélation adaptée. La plaquette de congélation a été placée entre un support lumineux et un support classique afin d'être inséré dans l'HPM. La stimulation et la congélation ont été déclenchées depuis l'ordinateur.

Nous avons stimulé les neurones par un unique flash lumineux de 10 ms, avec un délai entre le déclenchement de la stimulation et de l'ouverture de la valve d'azote de 25 ms, afin d'avoir un délai entre la stimulation et la congélation de 100 ms. Après la stimulation-congélation, les capsules ont été récupérées dans un Dewar d'azote liquide et immédiatement transférées dans une solution d'acétone contenant 0.1% d'acide tannique dans l'appareil de cryosubstitution (protocole décrit en Matériels et Méthodes de l'article présenté en première partie des résultats). Après l'étape de cryosubstitution, les capsules ont été incluses dans une résine araldite et polymérisées à 60°C durant 48h. Une fois la résine durcie, la partie circulaire en plastique a été retirée à l'aide d'une lame, puis la résine recouvrant le saphir décapée à l'aide d'une lame de rasoir afin d'exposer le saphir. Un choc thermique avec de l'azote liquide a permis de décoller le saphir et le « spacer » en or de la résine.

Nous avons réalisé des sections ultrafines (50 ou 70 nm) récupérées sur des grilles de cuivre et colorées comme décrit dans l'article. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Tecnai 12 (Philips Electronics, Amsterdam, Pays-Bas) fonctionnant avec un voltage de 80 kV. Les images de neurones et de synapses ont été acquises avec une caméra Dualvision 300 W (Gatan, Evry, France).

2. Résultats préliminaires

Quatre des 5 co-cultures de neurones et astrocytes non infectées, cultivées et stimulées-congelées dans les CryoCapsules présentent une morphologie indicatrice d'une très bonne congélation (Fig. 40). Aucun cristal de glace n'est visible sur l'ensemble des sections et les structures membranaires sont bien arrondies. Les VSs, en particulier les VSs ancrées à la ZA apparaissent très clairement dans les boutons.

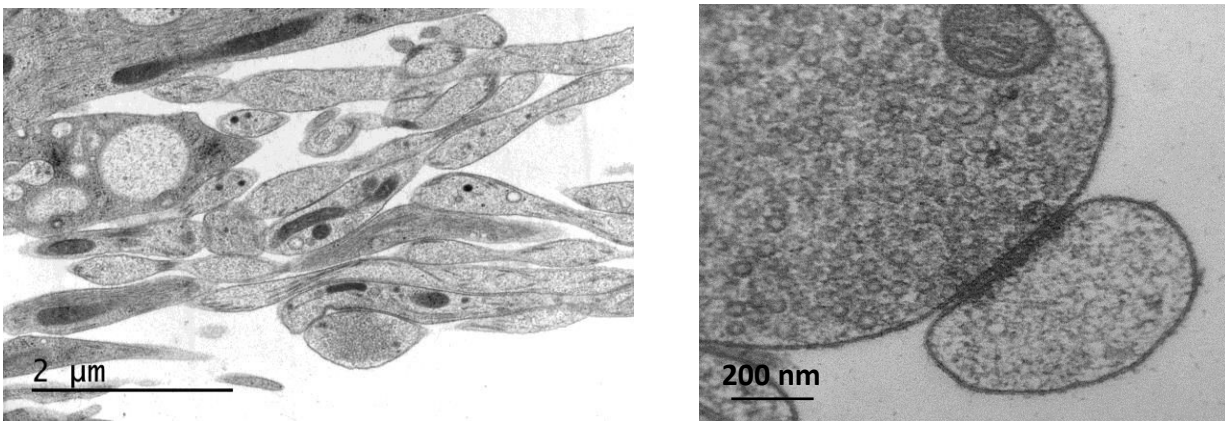


Figure 40 : Micrographies de neurones cultivés et congelés dans des CryoCapsules avec à droite une vue de synapse à fort grossissement.

Le protocole de co-culture sur les CryoCapsules nous a donc permis d'optimiser à la fois la survie des neurones, le rendement et la qualité de la congélation. L'ensemble des outils mis au point devrait donc permettre de suivre les VSs à différents temps après stimulation, et d'analyser ainsi le cycle des VSs.

Discussion

Discussion

Mon travail de thèse a porté sur le cycle des VSs dans les terminaisons présynaptiques. Nous avons tiré parti de la très haute résolution spatiale fournie par la ME, et de la préservation de la morphologie des structures membranaires grâce à l'immobilisation des neurones par congélation sous haute pression, pour étudier différentes étapes du cycle.

Nous avons d'une part étudié, dans des cultures organotypiques d'hippocampe, le mécanisme de régulation du nombre de VSs ancrées à la ZA en conditions de blocage chronique d'activité. Nous nous sommes intéressés aux variations des paramètres morphologiques de la terminaison après blocage, et avons étudié le rôle potentiel de la protéine RIM dans la régulation de l'ancrage. D'autre part, nous avons développé un outil pour visualiser en ME les VSs à différentes étapes de leur cycle après une stimulation. Nous avons mis au point un ensemble de méthodes permettant d'associer une stimulation optogénétique de cultures de neurones dissociés à une immobilisation rapide par congélation sous haute pression.

Dans un premier temps, je discuterai les mécanismes potentiels de régulation de la taille de la jonction synaptique et du nombre de VSs ancrées au regard des résultats obtenus dans mon travail de thèse. J'aborderai ensuite le mécanisme de régulation de la probabilité de libération du neurotransmetteur. Enfin, je discuterai de l'intérêt et des limites du couplage de stimulations optogénétiques avec la congélation sous haute pression pour étudier le cycle des VSs.

I. Régulation de la taille de la jonction synaptique et du nombre de vésicules ancrées

Nos travaux ont montré qu'un blocage chronique de l'activité neuronale par l'application de tétrodotoxine dans des cultures organotypiques d'hippocampe entraîne une augmentation spécifique de la taille de la jonction synaptique. Le nombre de VSs ancrées à la ZA, la taille de la

ZA et le nombre de récepteurs postsynaptiques au glutamate augmentent. En revanche, La taille du bouton synaptique ainsi que le nombre total de VSs dans les boutons ne varient pas. Nous allons présenter les mécanismes potentiels de l'augmentation de taille de la jonction synaptique, et comment cette augmentation pourrait entraîner un recrutement plus important de VSs ancrées.

Différentes molécules sont impliquées dans les interactions entre les compartiments pré- et postsynaptiques et pourraient donc jouer un rôle dans la régulation de la taille de la jonction synaptique. Parmi elles, certaines ont été impliquées dans les mécanismes d'homéostasie. Les Intégrines sont des récepteurs transmembranaires de protéines de la matrice extracellulaire qui jouent un rôle dans la régulation de l'efficacité synaptique à court et long terme (Chen & Grinnell 1995, Grotewiel et al. 1998, Kramar et al. 2002). Elles participent également à la régulation de l'accumulation des récepteurs au neurotransmetteur aux synapses inhibitrices et excitatrices (Charrier et al. 2010, Pozo et al. 2012). Elles ont un rôle important dans l'adaptation homéostasique à des déprivations chroniques d'activité (Cingolani et al. 2008). Le blocage chronique d'activité dans des neurones d'hippocampe en culture induit une augmentation de l'expression de surface de l'Intégrine β3. De plus, la perturbation de cette Intégrine par un peptide inhibiteur bloque l'augmentation homéostasique du nombre de récepteurs AMPA induite par le blocage d'activité. Les molécules d'adhérence synaptiques relient les compartiments pré- et postsynaptique et sont donc idéalement localisées pour réguler la taille de la jonction synaptique. Les N-Cadhérines sont des protéines d'adhérence présentes à la membrane de la jonction synaptique (Vitureira et al. 2012). Leur ablation en postsynaptique induit une diminution du nombre de VSs ancrées, de la Pl ainsi que du nombre de sous-unités GluA2 des récepteurs AMPA. La β-Caténine est une protéine intracellulaire qui forme un complexe avec la N-Cadhérine. Sa délétion dans des cultures de neurones dissociés prévient l'augmentation de Pl observée dans ce modèle après un blocage d'activité. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle des Intégrines et du complexe N-Cadhérines / β -Caténines dans la régulation de la taille de la jonction synaptique.

Il a également été montré qu'un blocage d'activité induit une diminution des niveaux de protéines d'échafaudage de la ZA Munc13, Bassoon, Piccolo, CAST, et Liprin-α (Lazarevic et al.

2011). Cette diminution apparaît dépendante d'une augmentation de l'activité du système Ubiquitine-Protéasome, lui-même régulé par l'activité. De plus, la délétion de Munc13 ou de Piccolo et Bassoon chez la souris induit une augmentation de taille de la ZA et de la DPS (Varoqueaux et al. 2002, Mukherjee et al. 2010). La diminution de la quantité de protéines d'échafaudage après un blocage d'activité pourrait donc réduire les contraintes physiques maintenant la taille de la ZA et provoquer un élargissement de la jonction synaptique.

On peut se demander par quel mécanisme l'augmentation de taille de la jonction synaptique entraîne une augmentation du nombre de VSs ancrées. Nos travaux ont mis en évidence que cette augmentation de taille ne s'accompagne pas d'une augmentation de la quantité de protéines RIM aux synapses. Ce résultat suggère que RIM n'est pas impliquée dans la croissance de la taille de la jonction synaptique, et, de plus, qu'elle ne régule pas le nombre de VSs ancrées à la ZA. Cependant, l'étude de la morphologie des synapses de souris RIM1/2 KO montre une diminution du nombre de VSs ancrées, sans effet sur la taille de la jonction synaptique (Han et al. 2011). La contradiction entre nos résultats et ceux de Han et collègues concernant le rôle de RIM dans l'ancrage pourrait s'expliquer par un effet indirect de la délétion de RIM, via ses interactions avec les molécules de la ZA (Kaeser 2011). En particulier, RIM régule la disponibilité de Munc13, protéine nécessaire à l'ancrage (Deng et al. 2011). L'augmentation de l'ancrage en condition de blocage d'activité pourrait simplement s'expliquer par l'augmentation de la taille de la ZA. La taille plus importante de la ZA pourrait favoriser le recrutement de VSs en augmentant la surface d'interaction avec des protéines telles que les dimères Syntaxine1 / SNAP25 présents à la membrane.

II. Régulation de la probabilité de libération du neurotransmetteur

Nous avons étudié les changements morphologiques des synapses excitatrices induits par un blocage chronique d'activité dans des tranches d'hippocampe. Dans notre modèle, une déprivation d'activité augmente la taille de la jonction synaptique. De nombreux travaux ont mis en évidence que cette augmentation de taille s'accompagne d'une augmentation de l'efficacité de la jonction, avec en particulier une augmentation de la fréquence des mEPSCs

(Turrigiano et al. 1998, O'Brien et al. 1998). Or, les enregistrements électrophysiologiques de neurones dans nos tranches montrent que la fréquence moyenne des mEPSCs ne varie pas. Cependant, la plupart des études sur l'homéostasie synaptique ont été réalisées sur des cultures de neurones dissociés. Un autre groupe a montré récemment qu'un blocage d'activité dans des tranches d'hippocampe n'induit pas d'augmentation de fréquence des mEPSCs (Arendt et al. 2013). La discordance entre les résultats obtenus sur des cultures de cellules et sur des tranches pourrait s'expliquer par une différence de maturation. Les terminaisons présynaptiques de tranches organotypiques en culture présentent en effet une maturation qui n'est pas atteinte par celles des neurones dissociés, avec notamment une augmentation de la vitesse de recyclage des VSs (Rose et al. 2013).

L'enregistrement de la fréquence des mEPSCs est fréquemment utilisé pour évaluer la Pl moyenne des synapses (Prange & Murphy 1999). Cette fréquence dépend en effet du nombre de synapses établies sur le neurone et de la Pl aux synapses individuelles. Dans nos tranches, étant donné que l'on n'observe pas de perte de synapses, l'absence de variation de fréquence des mEPSCs implique que le blocage d'activité n'induit pas d'augmentation de la Pl. De nombreux travaux sur la terminaison présynaptique ont mis en évidence une corrélation positive entre la Pl, la taille de la ZA, le nombre de VSs ancrées et les quantités de CaV et de protéines RIM aux synapses individuelles (Branco et al. 2010, Lazarevic et al. 2011, Holderith et al. 2012). Nos travaux montrent en revanche que dans des tranches d'hippocampe la Pl ne varie pas après un blocage chronique d'activité, malgré une augmentation de la taille de la ZA et du nombre de VSs ancrées. Nous avons également mis en évidence une absence de modification de la quantité de protéines RIM aux synapses. Ce résultat suggère que la quantité de protéine RIM plutôt que le nombre de VSs ancrées pourrait déterminer la Pl. Cette hypothèse est en accord avec la corrélation observée entre la quantité de RIM et la Pl (Holderith et al. 2012). De plus, un blocage d'activité dans des cultures de neurones dissociés induit une augmentation de la quantité de RIM (Lazarevic et al. 2011). Cette différence avec les cultures de tranches pourrait expliquer l'augmentation de fréquence des mEPSCs mise en évidence dans les neurones dissociés.

RIM pourrait contrôler l'efficacité de la fusion en interagissant avec les molécules du complexe SNARE telles que Munc13, Munc18 ou SNAP25 (Kaeser 2011). RIM interagit également avec Rab3 et la Synaptotagmine1, deux protéines vésiculaires régulant la sensibilité au calcium des évènements d'exocytose (Brose et al. 1992, Geppert et al. 1997). RIM pourrait aussi contrôler le recrutement des CaV à proximité des VSs ancrées à la ZA par la formation de complexes tripartites avec RIM-BP et les CaV (Hibino et al. 2002). Il a été montré que la délétion de RIM induit une diminution de la densité des CaV aux terminaisons présynaptiques du Calice de Held ainsi que dans des neurones d'hippocampe en culture (Han et al. 2011, Kaeser et al. 2012). De plus, les influx de calcium dans les terminaisons sont corrélés à la Pl (Zhao et al. 2011). L'interaction de RIM avec les CaV des terminaisons présynaptiques pourrait donc être un facteur crucial de régulation de la Pl.

III. Développements nécessaires pour l'observation du cycle des vésicules synaptiques après stimulation et congélation

Nous avons mis au point un outil pour étudier en ME les différentes étapes du cycle des VSs après une stimulation de la terminaison présynaptique. Nous avons travaillé sur des co-cultures d'astrocytes et de neurones exprimant une ChR2, ce qui nous permet d'activer les neurones par des flashs de lumière bleue. Nous avons cultivé et congelé ces co-cultures dans des CryoCapsules, un système conçu par Xavier Heiligenstein à l'Institut Curie pour faciliter et optimiser la CHP de cultures de cellules. En collaboration avec Leica Microsystems et à l'aide d'ingénieurs de l'IBENS, nous avons modifié l'HPM et conçu un système de commande externe afin de stimuler les neurones à l'intérieur de la machine et synchroniser à façon la stimulation et la congélation. Cet outil devrait permettre d'analyser différents aspects du recyclage des VSs, et en particulier de discriminer par visualisation directe l'endocytose dépendante de la Clathrine de l'endocytose de type « kiss and run ». La stimulation des synapses en présence de ferritine, un composé dense aux électrons qui s'attache aux membranes, pourrait permettre de suivre les VSs après l'endocytose (Paillart et al. 2003). Enfin, des études en tomographie électronique pourraient donner accès à une visualisation du remodelage du réseau de filaments

du bouton lors du cycle des VSs. Des données récentes publiées par une autre équipe font cependant apparaître certaines limites de l'approche optogénétique pour cette étude.

Une autre équipe a récemment publié des résultats obtenus grâce au développement d'un système similaire au nôtre. Ce système associe une stimulation lumineuse de neurones exprimant une ChR2 modifiée, la ChetaTC, et une congélation rapide par CHP (Watanabe et al. 2013). La ChetaTC a une cinétique de désactivation accélérée et permet donc de soutenir des stimulations de plus haute fréquence qu'avec la ChR2. Watanabe et collègues ont décrit en ME la morphologie des terminaisons présynaptiques à des temps compris entre 15 ms et 10 s après le déclenchement d'un potentiel d'action (PA). Leurs observations les ont amenés à proposer un nouveau mode d'endocytose. Cette endocytose se produit entre 50 et 100 ms après la libération de neurotransmetteur. Elle est caractérisée par un retrait en périphérie de la ZA de larges portions de membrane, équivalentes à la surface de 4 VSs (Fig. 41 A et B). Des endosomes apparaissent dans la terminaison environ 300 ms après la stimulation. Ce retrait de membrane est dépendant de l'Actine et de la Dynamine, mais ne nécessite pas la formation d'un manteau de Clathrine. Ce résultat très surprenant va à l'encontre des données de la littérature. Cependant, Les auteurs observent une libération de 40% des VSs ancrées à la ZA dès 15 ms après l'induction d'un PA (Fig. 41 C et D). Dans des neurones d'hippocampe en culture, on compte en moyenne 9 VSs ancrées à la ZA (Murthy et al. 2001). Ces données impliquent que la stimulation optique entraînant un unique PA induit la libération d'environ 3-4 VSs. Or des mesures effectuées sur ce même type de neurones mettent en évidence que le nombre de VSs libérées par un PA induit électriquement est compris entre 0 et 1, soit 10 fois moins (Hanse & Gustafsson 2001 Murthy et al. 2001, Branco et al. 2010). De plus il a été montré que les stimulations optiques de neurones exprimant une ChR2 induisent une augmentation de Pl comparativement à des stimulations électriques (Zhang & Oertner 2007). L'ensemble de ces observations nous font penser que la stimulation optogénétique de neurones exprimant une ChR2 pourrait induire des libérations massives et non physiologiques de VSs. Ce type de stimulation pourrait ainsi entraîner une endocytose de type « bulk », morphologiquement et moléculairement similaire à l'endocytose décrite par les auteurs.

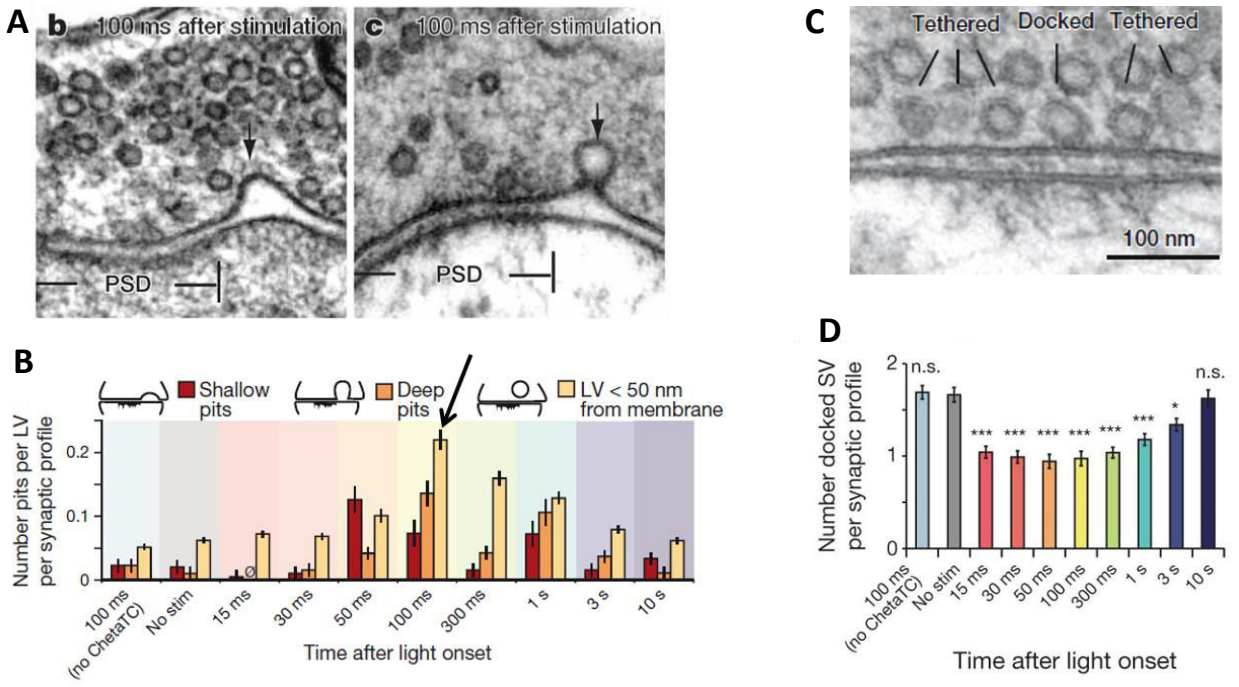


Figure 41 : Etude de l'endocytose et de l'exocytose après stimulation et congélation de neurones exprimant une ChannelRhodopsine2 (Watanabe et al. 2013).

A. Micrographies de boutons synaptiques présentant des figures d'endocytose. La flèche montre le pic des évènements d'endocytose.

B. Graphique décrivant le décours temporel de l'endocytose après une stimulation optique.

C. Micrographie de bouton synaptique présentant des VSs ancrées à la ZA.

D. Graphiques décrivant le décours temporel de l'exocytose de VSs ancrées après une stimulation optique.

On peut se demander ce qui pourrait expliquer l'augmentation de Pl lors d'une stimulation optogénétique. La ChR2 est exprimée à la membrane du soma, où son activation permet le déclenchement du PA, mais aussi à la membrane du bouton présynaptique. Watanabe et collègues ont stimulé la ChR2 pendant 10 ms pour induire un PA. Pendant ce temps, la stimulation a également du dépolariser la terminaison présynaptique. Cette dépolarisation pourrait activer les CaV et induire une entrée de calcium dans la terminaison avant l'arrivée du PA. Or il a été montré que le calcium résiduel dans les terminaisons après une première stimulation ou un train de potentiels d'action augmente la Pl à ces terminaisons (Regehr et al. 1994). Ainsi, l'accumulation de calcium en amont de l'arrivée du PA pourrait expliquer la

libération massive de VSs lors de ce PA. D'autre part, cette accumulation de calcium pourrait influer sur le mode d'endocytose. En effet, l'induction de mécanismes d'endocytose de type « bulk » implique l'activation de la Calcineurine, une phosphatase dépendante de la Calmoduline et du calcium (Clayton et al. 2007). Cette phosphatase est présente dans le cytosol du bouton et a une faible affinité pour le calcium ; elle n'est donc activée qu'en cas de forte concentration de calcium à la terminaison. Ainsi, la présence d'une ChR2 à la membrane du bouton pourrait induire une accumulation de calcium suffisante pour activer la Calcineurine et déclencher une endocytose de type « bulk ».

Ces observations mettent en évidence la nécessité de mettre au point une stimulation optogénétique permettant d'obtenir une Pl physiologique, comprise entre 0 et 1 VS libérée par PA. Une première solution pourrait être d'induire une diminution de la probabilité de libération en modifiant la composition de l'ACSF dans lequel les cellules sont congelées. Une diminution de la concentration de calcium extracellulaire entraîne une diminution de la Pl (Tokuoka & Goda 2008). Il serait alors intéressant de faire varier la Pl en modulant la concentration de calcium dans le milieu de stimulation et d'observer un éventuel changement du mode d'endocytose en fonction de la Pl. Cependant, en modifiant la concentration de calcium on pourrait également induire un changement du mode d'endocytose, comme évoqué ci-dessus. Une autre possibilité serait d'éviter l'accumulation de calcium à la terminaison en utilisant une ChR2 exprimée exclusivement à la membrane du compartiment somatodendritique. Différents travaux ont permis d'associer la ChR2 à des séquences permettant son adressage au soma et aux dendrites. L'ajout d'un motif de liaison à la myosine à la séquence de la ChR2 permet un transport unidirectionnel de la protéine, du soma vers les dendrites (Lewis, Mao et al. 2009). De la même façon, l'ajout de motifs provenant de canaux ioniques permet un adressage spécifique de la ChR2 à la membrane dendritique ou somatique (Greenberg et al. 2011, Wu et al. 2013). Ces séquences de ChR2 modifiées pourraient permettre que la stimulation optique dépolarise uniquement la membrane somatodendritique du neurone pour y induire un PA.

Bibliographie

Bibliographie

A

Alabi, A. A. and R. W. Tsien (2013). "Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission." Annu Rev Physiol **75**: 393-422.

Ales, E., L. Tabares, J. M. Poyato, V. Valero, M. Lindau and G. Alvarez de Toledo (1999). "High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism." Nat Cell Biol **1**(1): 40-44.

Aravamudan, B., T. Fergestad, W. S. Davis, C. K. Rodesch and K. Broadie (1999). "Drosophila UNC-13 is essential for synaptic transmission." Nat Neurosci **2**(11): 965-971.

Arendt, K. L., F. Sarti and L. Chen (2013). "Chronic inactivation of a neural circuit enhances LTP by inducing silent synapse formation." J Neurosci **33**(5): 2087-2096.

B

Bacci, A., S. Coco, E. Pravettoni, U. Schenk, S. Armano, C. Frassoni, C. Verderio, P. De Camilli and M. Matteoli (2001). "Chronic blockade of glutamate receptors enhances presynaptic release and downregulates the interaction between synaptophysin-synaptobrevin-vesicle-associated membrane protein 2." J Neurosci **21**(17): 6588-6596.

Baumeister, W., R. Grimm and J. Walz (1999). "Electron tomography of molecules and cells." Trends Cell Biol **9**(2): 81-85.

Bennett, M.K., N. Calakos and R.H. Scheller (1992). "Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones." Science **257**:255-259.

Betz, W. J. and G. S. Bewick (1992). "Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction." Science **255**(5041): 200-203.

Birks, R., H. E. Huxley and B. Katz (1960). "The fine structure of the neuromuscular junction of the frog." J Physiol **150**: 134-144.

Blasi, J., E. R. Chapman, E. Link, T. Binz, S. Yamasaki, P. De Camilli, T. C. Sudhof, H. Niemann and R. Jahn (1993). "Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25." Nature **365**(6442): 160-163.

Blasi, J., E. R. Chapman, S. Yamasaki, T. Binz, H. Niemann and R. Jahn (1993). "Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin." EMBO J **12**(12): 4821-4828.

Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-356.

Bloom, F. E. and G. K. Aghajanian (1966). "Cytochemistry of synapses: selective staining for electron microscopy." Science **154**(3756): 1575-1577.

Bolshakov, V. Y. and S. A. Siegelbaum (1994). "Postsynaptic induction and presynaptic expression of hippocampal long-term depression." Science **264**(5162): 1148-1152.

Bonifacino, J. S. and L. M. Traub (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." Annu Rev Biochem **72**: 395-447.

Boyden, E. S., F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel and K. Deisseroth (2005). "Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity." Nat Neurosci **8**(9): 1263-1268.

Branco, T., V. Marra and K. Staras (2010). "Examining size-strength relationships at hippocampal synapses using an ultrastructural measurement of synaptic release probability." J Struct Biol **172**(2): 203-210.

Branco, T., K. Staras, K. J. Darcy and Y. Goda (2008). "Local dendritic activity sets release probability at hippocampal synapses." Neuron **59**(3): 475-485.

Brenner, S. (1974). "The genetics of Caenorhabditis elegans." Genetics **77**(1): 71-94.

Bretou, M., C. Anne and F. Darchen (2008). "A fast mode of membrane fusion dependent on tight SNARE zippering." J Neurosci **28**(34): 8470-8476.

Brose, N., K. Hofmann, Y. Hata and T. C. Sudhof (1995). "Mammalian homologues of Caenorhabditis elegans unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins." J Biol Chem **270**(42): 25273-25280.

Brose, N., A. G. Petrenko, T. C. Sudhof and R. Jahn (1992). "Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface." Science **256**(5059): 1021-1025.

Buchs, P. A., L. Stoppini and D. Muller (1993). "Structural modifications associated with synaptic development in area CA1 of rat hippocampal organotypic cultures." Brain Res Dev Brain Res **71**(1): 81-91.

C

Cajal S.R. (1899) *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*, N. Moya ed, Madrid.

Calakos, N., S. Schoch, T. C. Sudhof and R. C. Malenka (2004). "Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release." Neuron **42**(6): 889-896.

Castillo, P.E., S. Schoch, F. Schmitz, T.C. Sudhof and R.C. Malenka (2002). "RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation." Nature **415**:327-330.

Ceccarelli, B., W. P. Hurlbut and A. Mauro (1973). "Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction." J Cell Biol **57**(2): 499-524.

Charrier, C., P. Machado, R. Y. Tweedie-Cullen, D. Rutishauser, I. M. Mansuy and A. Triller (2010). "A crosstalk between beta1 and beta3 integrins controls glycine receptor and gephyrin trafficking at synapses." Nat Neurosci **13**(11): 1388-1395.

Chen, B. M. and A. D. Grinnell (1995). "Integrins and modulation of transmitter release from motor nerve terminals by stretch." Science **269**(5230): 1578-1580.

Chernomordik, L. V. and M. M. Kozlov (2008). "Mechanics of membrane fusion." Nat Struct Mol Biol **15**(7): 675-683.

Chi, P., P. Greengard and T. A. Ryan (2001). "Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity." Nat Neurosci **4**(12): 1187-1193.

Cingolani, L. A., A. Thalhammer, L. M. Yu, M. Catalano, T. Ramos, M. A. Colicos and Y. Goda (2008). "Activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor composition and abundance by beta3 integrins." Neuron **58**(5): 749-762.

Clayton, E. L., V. Anggono, K. J. Smillie, N. Chau, P. J. Robinson and M. A. Cousin (2009). "The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles." J Neurosci **29**(24): 7706-7717.

Clayton, E. L. and M. A. Cousin (2009). "The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles." J Neurochem **111**(4): 901-914.

Clayton, E. L., G. J. Evans and M. A. Cousin (2007). "Activity-dependent control of bulk endocytosis by protein dephosphorylation in central nerve terminals." J Physiol **585**(Pt 3): 687-691.

Clayton, E. L., G. J. Evans and M. A. Cousin (2008). "Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation." J Neurosci **28**(26): 6627-6632.

Coppola, T., S. Magnin-Luthi, V. Perret-Menoud, S. Gattesco, G. Schiavo and R. Regazzi (2001). "Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca2+ channels, SNAP-25, and synaptotagmin." J Biol Chem **276**(35): 32756-32762.

Couteaux R. (1944). "Nouvelles observations sur la structure de la plaque motrice et interprétation des rapports myo-neuraux." C.R. Soc. Biol **138** : 976–979.

Couteaux, R. and M. Pecot-Dechavassine (1970). "Synaptic vesicles and pouches at the level of "active zones" of the neuromuscular junction." C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **271**(25): 2346-2349.

D

De Camilli, P., S. M. Harris, Jr., W. B. Huttner and P. Greengard (1983). "Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes." J Cell Biol **96**(5): 1355-1373.

De Robertis, E. D. and H. S. Bennett (1955). "Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm." J Biophys Biochem Cytol **1**(1): 47-58.

Del Castillo, J. and B. Katz (1954). "Changes in end-plate activity produced by presynaptic polarization." J Physiol **124**(3): 586-604.

Del Castillo, J. and B. Katz (1954). "Quantal components of the end-plate potential." J Physiol **124**(3): 560-573.

Deng, L., P. S. Kaeser, W. Xu and T. C. Sudhof (2011). "RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13." Neuron **69**(2): 317-331.

Denker, A. and S. O. Rizzoli (2010). "Synaptic vesicle pools: an update." Front Synaptic Neurosci **2**: 135.

Dittman, J. and T. A. Ryan (2009). "Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals." Annu Rev Cell Dev Biol **25**: 133-160.

Dulubova, I., X. Lou, J. Lu, I. Huryeva, A. Alam, R. Schneggenburger, T. C. Sudhof and J. Rizo (2005). "A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity?" EMBO J **24**(16): 2839-2850.

E

Echegoyen, J., A. Neu, K. D. Graber and I. Soltesz (2007). "Homeostatic plasticity studied using in vivo hippocampal activity-blockade: synaptic scaling, intrinsic plasticity and age-dependence." PLoS One **2**(8): e700.

Emptage, N., T. V. Bliss and A. Fine (1999). "Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines." Neuron **22**(1): 115-124.

Emptage, N. J., C. A. Reid, A. Fine and T. V. Bliss (2003). "Optical quantal analysis reveals a presynaptic component of LTP at hippocampal Schaffer-associational synapses." Neuron **38**(5): 797-804.

Enoki, R., Y. L. Hu, D. Hamilton and A. Fine (2009). "Expression of long-term plasticity at individual synapses in hippocampus is graded, bidirectional, and mainly presynaptic: optical quantal analysis." Neuron **62**(2): 242-253.

F

Ferguson, S. M., G. Brasnjo, M. Hayashi, M. Wolfel, C. Collesi, S. Giovedi, A. Raimondi, L. W. Gong, P. Ariel, S. Paradise, E. O'Toole, R. Flavell, O. Cremona, G. Miesenbock, T. A. Ryan and P. De Camilli (2007). "A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis." Science **316**(5824): 570-574.

Fernandez-Busnadiego, R., B. Zuber, U. E. Maurer, M. Cyrklaff, W. Baumeister and V. Lucic (2010). "Quantitative analysis of the native presynaptic cytomatrix by cryoelectron tomography." J Cell Biol **188**(1): 145-156.

Fernandez-Chacon, R., A. Konigstorfer, S. H. Gerber, J. Garcia, M. F. Matos, C. F. Stevens, N. Brose, J. Rizo, C. Rosenmund and T. C. Sudhof (2001). "Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability." Nature **410**(6824): 41-49.

Fernandez-Moran, H. (1953). "A diamond knife for ultrathin sectioning." Exp Cell Res **5**(1): 255-256.

Fesce, R., F. Grohovaz, F. Valtorta and J. Meldolesi (1994). "Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'?" Trends Cell Biol **4**(1): 1-4.

Fischer von Mollard, G., G. A. Mignery, M. Baumert, M. S. Perin, T. J. Hanson, P. M. Burger, R. Jahn and T. C. Sudhof (1990). "rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(5): 1988-1992.

Finger S. (1994) *Origins of Neuroscience*, Oxford University Press, New York.

Fletcher, A. I., R. Shuang, D. R. Giovannucci, L. Zhang, M. A. Bittner and E. L. Stuenkel (1999). "Regulation of exocytosis by cyclin-dependent kinase 5 via phosphorylation of Munc18." J Biol Chem **274**(7): 4027-4035.

G

Gaffield, M. A. and W. J. Betz (2007). "Synaptic vesicle mobility in mouse motor nerve terminals with and without synapsin." J Neurosci **27**(50): 13691-13700.

Gaffield, M. A., S. O. Rizzoli and W. J. Betz (2006). "Mobility of synaptic vesicles in different pools in resting and stimulated frog motor nerve terminals." Neuron **51**(3): 317-325.

Gandhi, S. P. and C. F. Stevens (2003). "Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging." Nature **423**(6940): 607-613.

Garthwaite, J., S. L. Charles and R. Chess-Williams (1988). "Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain." Nature **336**(6197): 385-388.

Gay, H. and T. F. Anderson (1954). "Serial sections for electron microscopy." Science **120**(3130): 1071-1073.

Geppert, M., Y. Goda, C. F. Stevens and T. C. Sudhof (1997). "The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion." Nature **387**(6635): 810-814.

Giraudo, C. G., W. S. Eng, T. J. Melia and J. E. Rothman (2006). "A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis." Science **313**(5787): 676-680.

Gitler, D., Y. Takagishi, J. Feng, Y. Ren, R. M. Rodriguiz, W. C. Wetsel, P. Greengard and G. J. Augustine (2004). "Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses." J Neurosci **24**(50): 11368-11380.

Goda, Y. and C. F. Stevens (1998). "Readily releasable pool size changes associated with long term depression." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(3): 1283-1288.

Gradinaru, V., K. R. Thompson and K. Deisseroth (2008). "eNpHR: a Natronomonas halorhodopsin enhanced for optogenetic applications." Brain Cell Biol **36**(1-4): 129-139.

Granseth, B., B. Odermatt, S. J. Royle and L. Lagnado (2006). "Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses." Neuron **51**(6): 773-786.

Gray, E. G. (1963). "Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord." J Anat **97**: 101-106.

Gray, E. G. (1964). "The Fine Structure of Normal and Degenerating Synapses of the Central Nervous System." Arch Biol (Liege) **75**:285-99.

Greenberg, K. P., A. Pham and F. S. Werblin (2011). "Differential targeting of optical neuromodulators to ganglion cell soma and dendrites allows dynamic control of center-surround antagonism." Neuron **69**(4): 713-720.

Grimm, R., M. Barmann, W. Hackl, D. Typke, E. Sackmann and W. Baumeister (1997). "Energy filtered electron tomography of ice-embedded actin and vesicles." Biophys J **72**(1): 482-489.

Grotewiel, M. S., C. D. Beck, K. H. Wu, X. R. Zhu and R. L. Davis (1998). "Integrin-mediated short-term memory in Drosophila." Nature **391**(6666): 455-460.

Gunaydin, L. A., O. Yizhar, A. Berndt, V. S. Sohal, K. Deisseroth and P. Hegemann (2010). "Ultrafast optogenetic control." Nat Neurosci **13**(3): 387-392.

H

Han, Y., P. S. Kaeser, T. C. Sudhof and R. Schneggenburger (2011). "RIM determines Ca(2)+ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone." Neuron **69**(2): 304-316.

Hanse, E. and B. Gustafsson (2001). "Vesicle release probability and pre-primed pool at glutamatergic synapses in area CA1 of the rat neonatal hippocampus." J Physiol **531**(Pt 2): 481-493.

Hardingham, N., J. Dachtler and K. Fox (2013). "The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis." Front Cell Neurosci **7**: 190.

Harris, K. M. and J. K. Stevens (1988). "Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics." J Neurosci **8**(12): 4455-4469.

Harris, K. M. and J. K. Stevens (1989). "Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics." J Neurosci **9**(8): 2982-2997.

Harris, K. M. and T. J. Teyler (1984). "Developmental onset of long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampus." J Physiol **346**: 27-48.

Hata, Y., C. A. Slaughter and T. C. Sudhof (1993). "Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin." Nature **366**(6453): 347-351.

Haucke, V. and P. De Camilli (1999). "AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs." Science **285**(5431): 1268-1271.

Hayat M. A. (1989) *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. The MacMillan Press Ltd, London.

Heeroma, J. H., M. Roelandse, K. Wierda, K. I. van Aerde, R. F. Toonen, R. A. Hensbroek, A. Brussaard, A. Matus and M. Verhage (2004). "Trophic support delays but does not prevent cell-intrinsic degeneration of neurons deficient for munc18-1." Eur J Neurosci **20**(3): 623-634.

Heerssen, H., R. D. Fetter and G. W. Davis (2008). "Clathrin dependence of synaptic-vesicle formation at the Drosophila neuromuscular junction." Curr Biol **18**(6): 401-409.

Heiligenstein, X., J. Heiligenstein, C. Delevoye, I. Hurbain, S. Bardin, P. Paul-Gilloteaux, L. Sengmanivong, G. Regnier, J. Salamero, C. Antony and G. Raposo (2014). "The CryoCapsule: simplifying correlative light to electron microscopy." Traffic **15**(6): 700-716.

Hengen, K. B., M. E. Lambo, S. D. Van Hooser, D. B. Katz and G. G. Turrigiano (2013). "Firing rate homeostasis in visual cortex of freely behaving rodents." Neuron **80**(2): 335-342.

Henne, W. M., E. Boucrot, M. Meinecke, E. Evergren, Y. Vallis, R. Mittal and H. T. McMahon (2010). "FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis." Science **328**(5983): 1281-1284.

Heuser, J. E. and T. S. Reese (1973). "Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction." J Cell Biol **57**(2): 315-344.

Heuser, J. E. and T. S. Reese (1981). "Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction." J Cell Biol **88**(3): 564-580.

Heuser, J. E., T. S. Reese, M. J. Dennis, Y. Jan, L. Jan and L. Evans (1979). "Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release." J Cell Biol **81**(2): 275-300.

Hibino, H., R. Pironkova, O. Onwumere, M. Vologodskaia, A. J. Hudspeth and F. Lesage (2002). "RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca(2+) channels." Neuron **34**(3): 411-423.

Hirokawa, N., K. Sobue, K. Kanda, A. Harada and H. Yorifuji (1989). "The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1." J Cell Biol **108**(1): 111-126.

Hogins, J., D. C. Crawford, X. Jiang and S. Mennerick (2011). "Presynaptic silencing is an endogenous neuroprotectant during excitotoxic insults." Neurobiol Dis **43**(2): 516-525.

Holderith, N., A. Lorincz, G. Katona, B. Rozsa, A. Kulik, M. Watanabe and Z. Nusser (2012). "Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone." Nat Neurosci **15**(7): 988-997.

Holt, M., A. Cooke, A. Neef and L. Lagnado (2004). "High mobility of vesicles supports continuous exocytosis at a ribbon synapse." Curr Biol **14**(3): 173-183.

Holt, M., A. Cooke, M. M. Wu and L. Lagnado (2003). "Bulk membrane retrieval in the synaptic terminal of retinal bipolar cells." J Neurosci **23**(4): 1329-1339.

Huang, Y. Y., E. R. Kandel, L. Varshavsky, E. P. Brandon, M. Qi, R. L. Idzerda, G. S. McKnight and R. Bourtchouladze (1995). "A genetic test of the effects of mutations in PKA on mossy fiber LTP and its relation to spatial and contextual learning." Cell **83**(7): 1211-1222.

J

Jahn, R. and D. Fasshauer (2012). "Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles." Nature **490**(7419): 201-207.

Jakawich, S. K., H. B. Nasser, M. J. Strong, A. J. McCartney, A. S. Perez, N. Rakesh, C. J. Carruthers and M. A. Sutton (2010). "Local presynaptic activity gates homeostatic changes in presynaptic function driven by dendritic BDNF synthesis." Neuron **68**(6): 1143-1158.

Jockusch, W. J., G. J. Praefcke, H. T. McMahon and L. Lagnado (2005). "Clathrin-dependent and clathrin-independent retrieval of synaptic vesicles in retinal bipolar cells." Neuron **46**(6): 869-878.

Johannes, L., F. Doussau, A. Clabecq, J. P. Henry, F. Darchen and B. Poulain (1996). "Evidence for a functional link between Rab3 and the SNARE complex." J Cell Sci **109 (Pt 12)**: 2875-2884.

Jorgensen, E. M., E. Hartwieg, K. Schuske, M. L. Nonet, Y. Jin and H. R. Horvitz (1995). "Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of Caenorhabditis elegans." Nature **378**(6553): 196-199.

K

Kaeser, P. S. (2011). "Pushing synaptic vesicles over the RIM." Cell Logist **1**(3): 106-110.

Kaeser, P. S., L. Deng, M. Fan and T. C. Sudhof (2012). "RIM genes differentially contribute to organizing presynaptic release sites." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(29): 11830-11835.

Keck, T., G. B. Keller, R. I. Jacobsen, U. T. Eysel, T. Bonhoeffer and M. Hubener (2013). "Synaptic scaling and homeostatic plasticity in the mouse visual cortex in vivo." Neuron **80**(2): 327-334.

Kesavan, J., M. Borisovska and D. Bruns (2007). "v-SNARE actions during Ca(2+)-triggered exocytosis." Cell **131**(2): 351-363.

Kim, S. H. and T. A. Ryan (2010). "CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release." Neuron **67**(5): 797-809.

Kleinlogel, S., K. Feldbauer, R. E. Dempski, H. Fotis, P. G. Wood, C. Bamann and E. Bamberg (2011). "Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca(2)+-permeable channelrhodopsin CatCh." Nat Neurosci **14**(4): 513-518.

Klingauf, J., E. T. Kavalali and R. W. Tsien (1998). "Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses." Nature **394**(6693): 581-585.

Kramar, E. A., J. A. Bernard, C. M. Gall and G. Lynch (2002). "Alpha3 integrin receptors contribute to the consolidation of long-term potentiation." Neuroscience **110**(1): 29-39.

L

Landis, D. M., A. K. Hall, L. A. Weinstein and T. S. Reese (1988). "The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse." Neuron **1**(3): 201-209.

Lazarevic, V., S. Pothula, M. Andres-Alonso and A. Fejtova (2013). "Molecular mechanisms driving homeostatic plasticity of neurotransmitter release." Front Cell Neurosci **7**: 244.

Lazarevic, V., C. Schone, M. Heine, E. D. Gundelfinger and A. Fejtova (2011). "Extensive remodeling of the presynaptic cytomatrix upon homeostatic adaptation to network activity silencing." J Neurosci **31**(28): 10189-10200.

Lewis, T. L., Jr., T. Mao, K. Svoboda and D. B. Arnold (2009). "Myosin-dependent targeting of transmembrane proteins to neuronal dendrites." Nat Neurosci **12**(5): 568-576.

Lindskog, M., L. Li, R. D. Groth, D. Poburko, T. C. Thiagarajan, X. Han and R. W. Tsien (2010). "Postsynaptic GluA1 enables acute retrograde enhancement of presynaptic function to coordinate adaptation to synaptic inactivity." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21806-21811.

Link, E., L. Edelmann, J. H. Chou, T. Binz, S. Yamasaki, U. Eisel, M. Baumert, T. C. Sudhof, H. Niemann and R. Jahn (1992). "Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis." Biochem Biophys Res Commun **189**(2): 1017-1023.

Lissin, D. V., S. N. Gomperts, R. C. Carroll, C. W. Christine, D. Kalman, M. Kitamura, S. Hardy, R. A. Nicoll, R. C. Malenka and M. von Zastrow (1998). "Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 7097-7102.

Lisman JE, Raghavachari S, Tsien RW (2007) The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. Nat Rev Neurosci **8**:597-609.

Lu, J., M. Machius, I. Dulubova, H. Dai, T. C. Sudhof, D. R. Tomchick and J. Rizo (2006). "Structural basis for a Munc13-1 homodimer to Munc13-1/RIM heterodimer switch." PLoS Biol **4**(7): e192.

M

Macia, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner and T. Kirchhausen (2006). "Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin." Dev Cell **10**(6): 839-850.

Matsubara, M., M. Kusubata, K. Ishiguro, T. Uchida, K. Titani and H. Taniguchi (1996). "Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions." J Biol Chem **271**(35): 21108-21113.

Matthew, W. D., L. Tsavaler and L. F. Reichardt (1981). "Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue." J Cell Biol **91**(1): 257-269.

Mattis, J., K. M. Tye, E. A. Ferenczi, C. Ramakrishnan, D. J. O'Shea, R. Prakash, L. A. Gunaydin, M. Hyun, L. E. Fenno, V. Gradinaru, O. Yizhar and K. Deisseroth (2012). "Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins." Nat Methods **9**(2): 159-172.

McMahon, H. T. and E. Boucrot (2011). "Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 517-533.

McMahon, H. T., M. Missler, C. Li and T. C. Sudhof (1995). "Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function." Cell **83**(1): 111-119.

McNaughton, B. L. (1982). "Long-term synaptic enhancement and short-term potentiation in rat fascia dentata act through different mechanisms." J Physiol **324**: 249-262.

Mellentin, C., M. Moller and H. Jahnsen (2006). "Properties of long-term synaptic plasticity and metaplasticity in organotypic slice cultures of rat hippocampus." Exp Brain Res **170**(4): 522-531.

Miller, T. M. and J. E. Heuser (1984). "Endocytosis of synaptic vesicle membrane at the frog neuromuscular junction." J Cell Biol **98**(2): 685-698.

Morgan, J. R., K. Prasad, S. Jin, G. J. Augustine and E. M. Lafer (2001). "Uncoating of clathrin-coated vesicles in presynaptic terminals: roles for Hsc70 and auxilin." Neuron **32**(2): 289-300.

Moser, E. I. (2011). "The multi-laned hippocampus." Nat Neurosci **14**(4): 407-408.

Moulder, K. L., J. P. Meeks, A. A. Shute, C. K. Hamilton, G. de Erausquin and S. Mennerick (2004). "Plastic elimination of functional glutamate release sites by depolarization." Neuron **42**(3): 423-435.

Muller, D., P. A. Buchs and L. Stoppini (1993). "Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures." Brain Res Dev Brain Res **71**(1): 93-100.

Mukherjee K., X. Yang, S.H. Gerber, H.B. Kwon, A.Ho, P.E. Castillo, X. Liu, T.C. Südhof (2010). "Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**:6504–6509.

Murthy, V. N., T. Schikorski, C. F. Stevens and Y. Zhu (2001). "Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size." Neuron **32**(4): 673-682.

Murthy, V. N., T. J. Sejnowski and C. F. Stevens (1997). "Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses." Neuron **18**(4): 599-612.

N, O

Nagel, G., D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg and P. Hegemann (2002). "Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae." Science **296**(5577): 2395-2398.

Nakajima, Y. and T. S. Reese (1983). "Inhibitory and excitatory synapses in crayfish stretch receptor organs studied with direct rapid-freezing and freeze-substitution." J Comp Neurol **213**(1): 66-73.

Neher, E. and A. Marty (1982). "Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(21): 6712-6716.

Nonet, M. L., A. M. Holgado, F. Brewer, C. J. Serpe, B. A. Norbeck, J. Holleran, L. Wei, E. Hartwieg, E. M. Jorgensen and A. Alfonso (1999). "UNC-11, a Caenorhabditis elegans AP180 homologue, regulates the size and protein composition of synaptic vesicles." Mol Biol Cell **10**(7): 2343-2360.

O'Brien, R. J., S. Kamboj, M. D. Ehlers, K. R. Rosen, G. D. Fischbach and R. L. Huganir (1998). "Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation." Neuron **21**(5): 1067-1078.

P

Paillart, C., J. Li, G. Matthews and P. Sterling (2003). "Endocytosis and vesicle recycling at a ribbon synapse." J Neurosci **23**(10): 4092-4099.

Palay, S. L. (1956). "Synapses in the central nervous system." J Biophys Biochem Cytol **2**(4 Suppl): 193-202.

Palay, S.L. and Palade, G.E. (1955). " The fine structure of neurons." J Biophys Biochem Cytol **1**:69-88

Pearse, B. M. (1976). "Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(4): 1255-1259.

Peters A., Palay S. L. and Webster H. (1991) *The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and their supporting cells*, 3rd ed., Oxford University Press, New York.

Pfenninger, K., C. Sandri, K. Akert and C. H. Eugster (1969). "Contribution to the problem of structural organization of the presynaptic area." Brain Res **12**(1): 10-18.

Pierce, J. P. and G. R. Lewin (1994). "An ultrastructural size principle." Neuroscience **58**(3): 441-446.

Porter, K. R. and J. Blum (1953). "A study in microtomy for electron microscopy." Anat Rec **117**(4): 685-710.

Poudel, K. R. and J. Bai (2014). "Synaptic vesicle morphology: a case of protein sorting?" Curr Opin Cell Biol **26**: 28-33.

Powell, C. M., S. Schoch, L. Monteggia, M. Barrot, M. F. Matos, N. Feldmann, T. C. Sudhof and E. J. Nestler (2004). "The presynaptic active zone protein RIM1alpha is critical for normal learning and memory." Neuron **42**(1): 143-153.

Pozo, K., L. A. Cingolani, S. Bassani, F. Laurent, M. Passafaro and Y. Goda (2012). "beta3 integrin interacts directly with GluA2 AMPA receptor subunit and regulates AMPA receptor expression in hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(4): 1323-1328.

Pozo, K. and Y. Goda (2010). "Unraveling mechanisms of homeostatic synaptic plasticity." Neuron **66**(3): 337-351.

Prange, O. and T. H. Murphy (1999). "Correlation of miniature synaptic activity and evoked release probability in cultures of cortical neurons." J Neurosci **19**(15): 6427-6438.

Purves D, G.J. Augustine, D. Fitzpatrick, L.C. Katz, A.-S. LaMantia, J. O. McNamara and S. M. Williams. (2001) *Neuroscience*, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland (MA).

R

Raimondi, A., S. M. Ferguson, X. Lou, M. Armbruster, S. Paradise, S. Giovedi, M. Messa, N. Kono, J. Takasaki, V. Cappello, E. O'Toole, T. A. Ryan and P. De Camilli (2011). "Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis." Neuron **70**(6): 1100-1114.

Regehr, W. G., K. R. Delaney and D. W. Tank (1994). "The role of presynaptic calcium in short-term enhancement at the hippocampal mossy fiber synapse." J Neurosci **14**(2): 523-537.

Reim, K., M. Mansour, F. Varoqueaux, H. T. McMahon, T. C. Sudhof, N. Brose and C. Rosenmund (2001). "Complexins regulate a late step in Ca2+-dependent neurotransmitter release." Cell **104**(1): 71-81.

Richmond, J. E., W. S. Davis and E. M. Jorgensen (1999). "UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in C. elegans." Nat Neurosci **2**(11): 959-964.

Richmond, J. E., R. M. Weimer and E. M. Jorgensen (2001). "An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming." Nature **412**(6844): 338-341.

Rizo, J., X. Chen and D. Arac (2006). "Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release." Trends Cell Biol **16**(7): 339-350.

Rizo, J. and C. Rosenmund (2008). "Synaptic vesicle fusion." Nat Struct Mol Biol **15**(7): 665-674.

Rizzoli, S.O. and W.J. Betz (2005). "Synaptic vesicle pools." Nat Rev Neurosci **6**:57-69.

Robertson, J. D. (1956). "The ultrastructure of a reptilian myoneural junction." J Biophys Biochem Cytol **2**(4): 381-394.

Rose, T., P. Schoenenberger, K. Jezek and T. G. Oertner (2013). "Developmental refinement of vesicle cycling at Schaffer collateral synapses." Neuron **77**(6): 1109-1121.

Rosenbluth, J. and S. L. Wissig (1964). "The Distribution of Exogenous Ferritin in Toad Spinal Ganglia and the Mechanism of Its Uptake by Neurons." J Cell Biol **23**: 307-325.

Rostaing, P., E. Real, L. Siksou, J. P. Lechaire, T. Boudier, T. M. Boeckers, F. Gertler, E. D. Gundelfinger, A. Triller and S. Marty (2006). "Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography." Eur J Neurosci **24**(12): 3463-3474.

Rothman, J. E. (1994). "Mechanisms of intracellular protein transport." Nature **372**(6501): 55-63.

Roux, A., K. Uyhazi, A. Frost and P. De Camilli (2006). "GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission." Nature **441**(7092): 528-531.

Royle, S. J. and L. Lagnado (2003). "Endocytosis at the synaptic terminal." J Physiol **553**(Pt 2): 345-355.

Ryan, T. A. (1999). "Inhibitors of myosin light chain kinase block synaptic vesicle pool mobilization during action potential firing." J Neurosci **19**(4): 1317-1323.

S

Sabatini, B. L. and W. G. Regehr (1996). "Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain." Nature **384**(6605): 170-172.

Saheki, Y. and P. De Camilli (2012). "Synaptic vesicle endocytosis." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(9): a005645.

Schluter, O. M., F. Schmitz, R. Jahn, C. Rosenmund and T. C. Sudhof (2004). "A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function." J Neurosci **24**(29): 6629-6637.

Schoch, S., P. E. Castillo, T. Jo, K. Mukherjee, M. Geppert, Y. Wang, F. Schmitz, R. C. Malenka and T. C. Sudhof (2002). "RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone." Nature **415**(6869): 321-326.

Shupliakov, O., P. Low, D. Grabs, H. Gad, H. Chen, C. David, K. Takei, P. De Camilli and L. Brodin (1997). "Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions." Science **276**(5310): 259-263.

Siksou, L., P. Rostaing, J. P. Lechaire, T. Boudier, T. Ohtsuka, A. Fejtova, H. T. Kao, P. Greengard, E. D. Gundelfinger, A. Triller and S. Marty (2007). "Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix." J Neurosci **27**(26): 6868-6877.

Siksou, L., K. Silm, C. Biesemann, R. B. Nehring, S. M. Wojcik, A. Triller, S. El Mestikawy, S. Marty and E. Herzog (2013). "A role for vesicular glutamate transporter 1 in synaptic vesicle clustering and mobility." Eur J Neurosci **37**(10): 1631-1642.

Siksou, L., A. Triller and S. Marty (2009). "An emerging view of presynaptic structure from electron microscopic studies." J Neurochem **108**(6): 1336-1342.

Siksou, L., F. Varoqueaux, O. Pascual, A. Triller, N. Brose and S. Marty (2009). "A common molecular basis for membrane docking and functional priming of synaptic vesicles." Eur J Neurosci **30**(1): 49-56.

Sjostrand, F. S. (1958). "Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections." J Ultrastruct Res **2**(1): 122-170.

Smith, J. E. and T. S. Reese (1980). "Use of aldehyde fixatives to determine the rate of synaptic transmitter release." J Exp Biol **89**: 19-29.

Smith, S. M., R. Renden and H. von Gersdorff (2008). "Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval." Trends Neurosci **31**(11): 559-568.

Sollner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst and J. E. Rothman (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." Nature **362**(6418): 318-324.

Stanton, P. K. and T. J. Sejnowski (1989). "Associative long-term depression in the hippocampus induced by hebbian covariance." Nature **339**(6221): 215-218.

Stigloher, C., H. Zhan, M. Zhen, J. Richmond and J. L. Bessereau (2011). "The presynaptic dense projection of the Caenorhabditis elegans cholinergic neuromuscular junction localizes synaptic vesicles at the active zone through SYD-2/liprin and UNC-10/RIM-dependent interactions." J Neurosci **31**(12): 4388-4396.

Stoppini, L., P. A. Buchs and D. Muller (1991). "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue." J Neurosci Methods **37**(2): 173-182.

Su, S. C., J. Seo, J. Q. Pan, B. A. Samuels, A. Rudenko, M. Ericsson, R. L. Neve, D. T. Yue and L. H. Tsai (2012). "Regulation of N-type voltage-gated calcium channels and presynaptic function by cyclin-dependent kinase 5." Neuron **75**(4): 675-687.

Sudhof, T. C. (2012). "The presynaptic active zone." Neuron **75**(1): 11-25.

Sudhof, T. C. (2013). "Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle." Neuron **80**(3): 675-690.

T

Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S. A. Muller, B. Rammner, F. Grater, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmuller, J. Heuser, F. Wieland and R. Jahn (2006). "Molecular anatomy of a trafficking organelle." Cell **127**(4): 831-846.

Takei, K., O. Mundigl, L. Daniell and P. De Camilli (1996). "The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin." J Cell Biol **133**(6): 1237-1250.

Takei, Y., A. Harada, S. Takeda, K. Kobayashi, S. Terada, T. Noda, T. Takahashi and N. Hirokawa (1995). "Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system." J Cell Biol **131**(6 Pt 2): 1789-1800.

Takumi, Y., A. Matsubara, E. Rinvik and O. P. Ottersen (1999). "The arrangement of glutamate receptors in excitatory synapses." Ann N Y Acad Sci **868**: 474-482.

Tang, J., A. Maximov, O. H. Shin, H. Dai, J. Rizo and T. C. Sudhof (2006). "A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis." Cell **126**(6): 1175-1187.

Tatsuoka, H. and T. S. Reese (1989). "New structural features of synapses in the anteroventral cochlear nucleus prepared by direct freezing and freeze-substitution." J Comp Neurol **290**(3): 343-357.

Thiagarajan, T. C., M. Lindskog and R. W. Tsien (2005). "Adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons." Neuron **47**(5): 725-737.

Tokuoka, H. and Y. Goda (2008). "Activity-dependent coordination of presynaptic release probability and postsynaptic GluR2 abundance at single synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14656-14661.

Torri-Tarelli, F., C. Haimann and B. Ceccarelli (1987). "Coated vesicles and pits during enhanced quantal release of acetylcholine at the neuromuscular junction." J Neurocytol **16**(2): 205-214.

Triller, A. and H. Korn (1985). "Activity-dependent deformations of presynaptic grids at central synapses." J Neurocytol **14**(2): 177-192.

Turrigiano, G. G., K. R. Leslie, N. S. Desai, L. C. Rutherford and S. B. Nelson (1998). "Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons." Nature **391**(6670): 892-896.

Tyler, W. J. and L. Pozzo-Miller (2003). "Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones." J Physiol **553**(Pt 2): 497-509.

V

Valdivia, O. (1971). "Methods of fixation and the morphology of synaptic vesicles." J Comp Neurol **142**(3): 257-273.

van der Bliek, A. M. and E. M. Meyerowitz (1991). "Dynamin-like protein encoded by the Drosophila shibire gene associated with vesicular traffic." Nature **351**(6325): 411-414.

Varoqueaux, F., A. Sigler, J. S. Rhee, N. Brose, C. Enk, K. Reim and C. Rosenmund (2002). "Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 9037-9042.

Verhage, M., A. S. Maia, J. J. Plomp, A. B. Brussaard, J. H. Heeroma, H. Vermeer, R. F. Toonen, R. E. Hammer, T. K. van den Berg, M. Missler, H. J. Geuze and T. C. Sudhof (2000). "Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion." Science **287**(5454): 864-869.

Verstreken, P., C. V. Ly, K. J. Venken, T. W. Koh, Y. Zhou and H. J. Bellen (2005). "Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at Drosophila neuromuscular junctions." Neuron **47**(3): 365-378.

Vitureira, N. and Y. Goda (2013). "Cell biology in neuroscience: the interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity." J Cell Biol **203**(2): 175-186.

Vitureira, N., M. Letellier and Y. Goda (2012). "Homeostatic synaptic plasticity: from single synapses to neural circuits." Curr Opin Neurobiol **22**(3): 516-521.

Vitureira, N., M. Letellier, I. J. White and Y. Goda (2012). "Differential control of presynaptic efficacy by postsynaptic N-cadherin and beta-catenin." Nat Neurosci **15**(1): 81-89.

W

Wang, Y., M. Okamoto, F. Schmitz, K. Hofmann and T. C. Sudhof (1997). "Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion." Nature **388**(6642): 593-598.

Wang, Y. and T. C. Sudhof (2003). "Genomic definition of RIM proteins: evolutionary amplification of a family of synaptic regulatory proteins." Genomics **81**(2): 126-137.

Watanabe, S., B. R. Rost, M. Camacho-Perez, M. W. Davis, B. Sohl-Kielczynski, C. Rosenmund and E. M. Jorgensen (2013). "Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses." Nature **504**(7479): 242-247.

Weimer, R. M., E. O. Gracheva, O. Meyrignac, K. G. Miller, J. E. Richmond and J. L. Bessereau (2006). "UNC-13 and UNC-10/rim localize synaptic vesicles to specific membrane domains." J Neurosci **26**(31): 8040-8047.

Whittaker, V. P. (1971). "Subcellular localization of neurotransmitters." Adv Cytopharmacol **1**: 319-330.

Wilson, N. R., J. Kang, E. V. Hueske, T. Leung, H. Varoqui, J. G. Murnick, J. D. Erickson and G. Liu (2005). "Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1." J Neurosci **25**(26): 6221-6234.

Wu, C., E. Ivanova, Y. Zhang and Z. H. Pan (2013). "rAAV-mediated subcellular targeting of optogenetic tools in retinal ganglion cells in vivo." PLoS One **8**(6): e66332.

Y, Z

Yamaguchi, K., M. Tanaka, A. Mizoguchi, Y. Hirata, H. Ishizaki, K. Kaneko, J. Miyoshi and Y. Takai (2002). "A GDP/GTP exchange protein for the Rab3 small G protein family up-regulates a postdocking step of synaptic exocytosis in central synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14536-14541.

Yang, Y. and N. Calakos (2013). "Presynaptic long-term plasticity." Front Synaptic Neurosci **5**: 8.

Zalutsky, R. A. and R. A. Nicoll (1990). "Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons." Science **248**(4963): 1619-1624.

Zampighi, G. A., L. M. Zampighi, N. Fain, S. Lanzavecchia, S. A. Simon and E. M. Wright (2006). "Conical electron tomography of a chemical synapse: vesicles docked to the active zone are hemi-fused." Biophys J **91**(8): 2910-2918.

Zhang, F., M. Prigge, F. Beyriere, S. P. Tsunoda, J. Mattis, O. Yizhar, P. Hegemann and K. Deisseroth (2008). "Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from Volvox carteri." Nat Neurosci **11**(6): 631-633.

Zhang, Y. P. and T. G. Oertner (2007). "Optical induction of synaptic plasticity using a light-sensitive channel." Nat Methods **4**(2): 139-141.

Zhao, C., E. Dreosti and L. Lagnado (2011). "Homeostatic synaptic plasticity through changes in presynaptic calcium influx." J Neurosci **31**(20): 7492-7496.

Zhu, Y., J. Xu and S. F. Heinemann (2009). "Two pathways of synaptic vesicle retrieval revealed by single-vesicle imaging." Neuron **61**(3): 397-411.