

# *Machinerie d'exocytose*

Master de Biologie - Neurobiologie  
Module Neurobiologie N2  
Ecole Normale Supérieure  
29 Septembre 2014

*Lydia Danglot*

**INSTITUT JACQUES MONOD**



université  
**PARIS  
DIDEROT**  
PARIS 7

**Inserm**

*Download slides on: <http://lydia.danglot.free.fr/cours>*

Institut Jacques Monod

Université Paris Diderot-CNRS UMR7592- Inserm ERL950 - Building Buffon - 15 rue Hélène Brion - 75013 Paris - France

Tel.: +33 (0)1 57 27 80 37 - [lydia.danglot@inserm.fr](mailto:lydia.danglot@inserm.fr)

*Website <http://lydia.danglot.free.fr>*



# Machinerie d'exocytose

## 1. Exocytose et complexe SNARE

Les voies d'exocytose régulée  
Définition du complexe SNARE  
Nomenclature v/t-SNARE et R/Q-SNARE

## 2. Historique de la découverte de NSF et des SNARE

Découverte de NSF et SNAP  
Isolement des SNARE  
Rôle de NSF & SNAP dans la fusion

## 3. Le cycle des vésicules synaptiques

Voie lente: endocytose médiée par la clathrine  
Voie courte: kiss and run  
Les différents « pool » vésiculaires

## 4. Comment mesurer l'exocytose ?

Capacitance  
Ampérométrie  
GFP pH sensible: la Phluorin

## 5. Comment mesurer le recyclage ?

Utilisation des anti-synaptotagmine  
Sondes fluorescentes de type FM

## 6. Régulation de l'exocytose

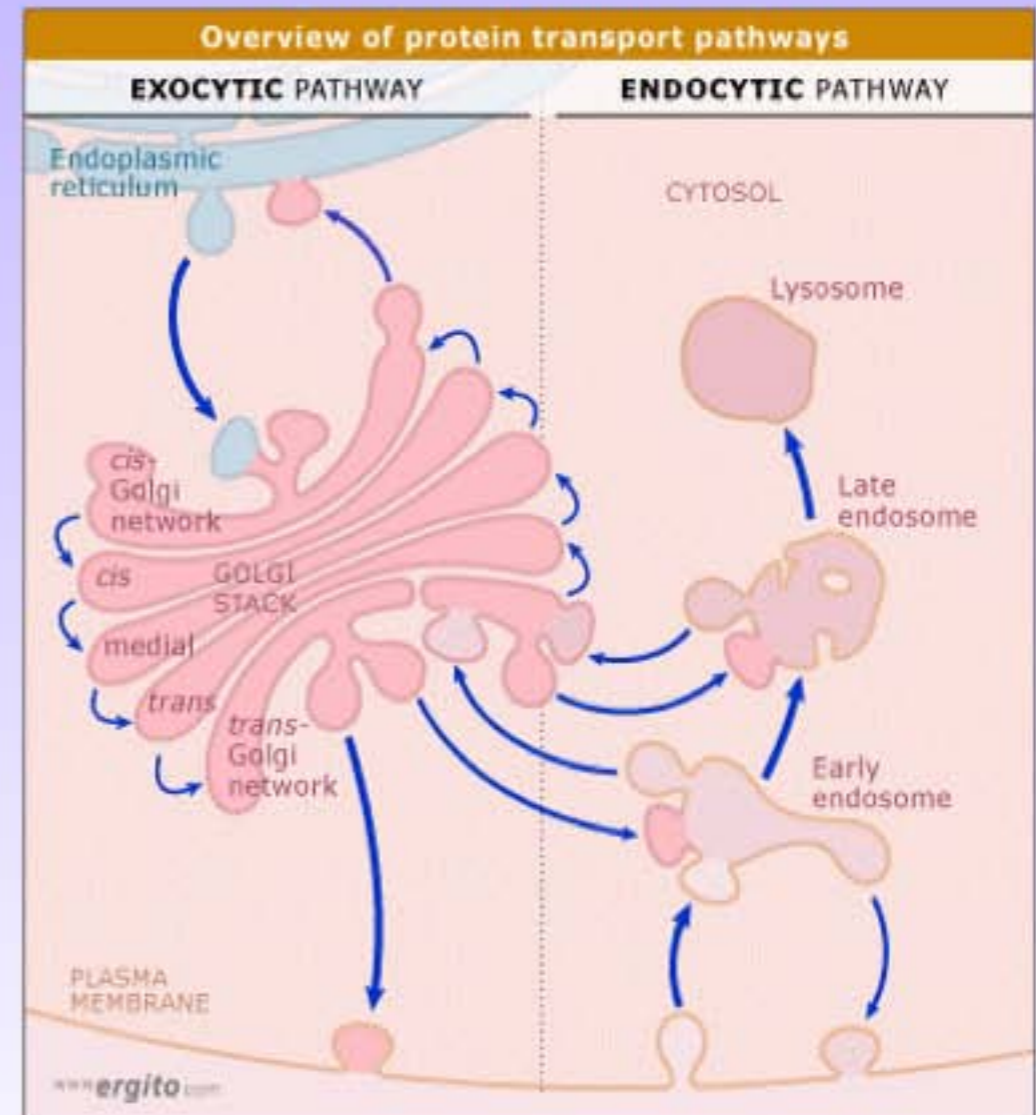
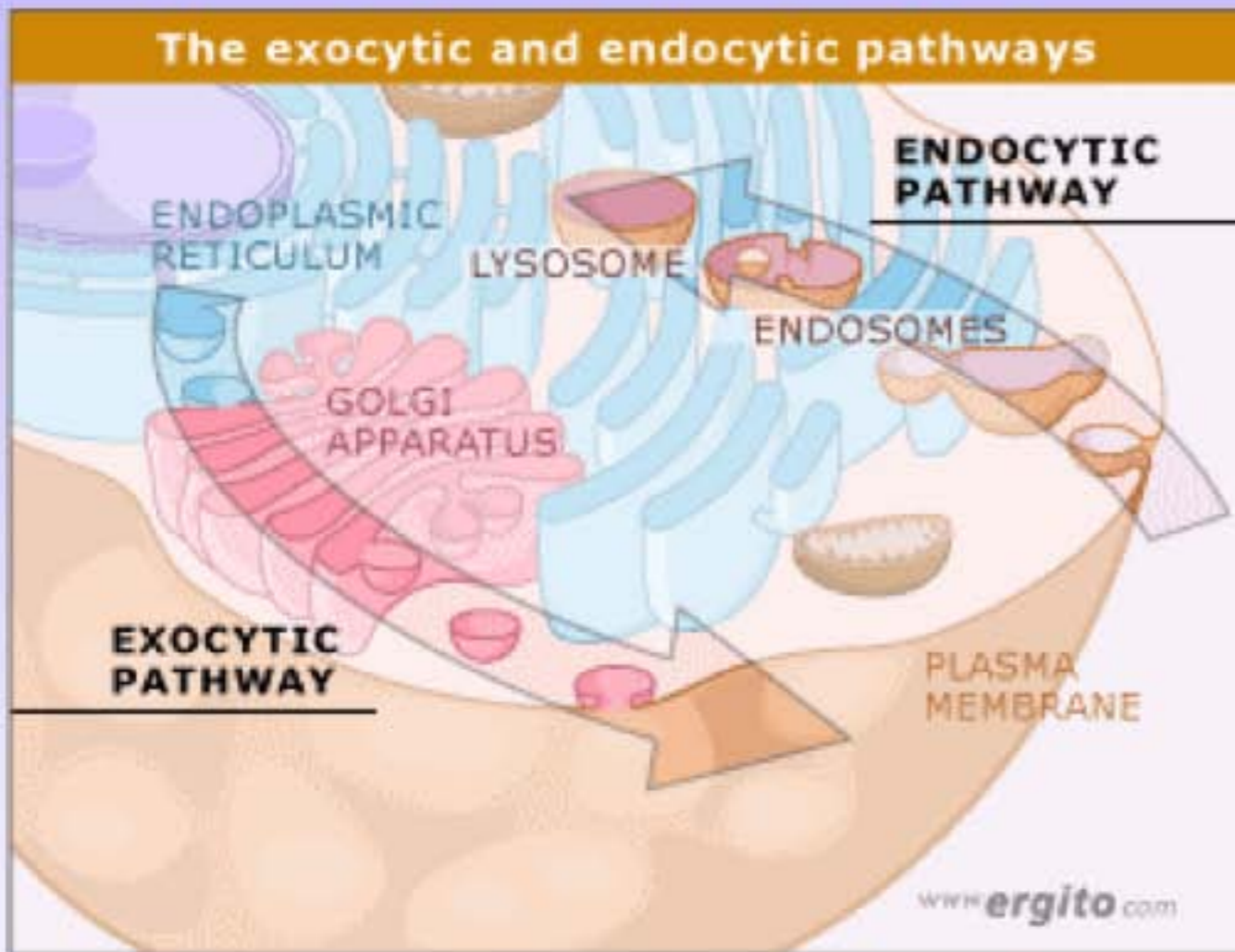
Munc-18 et les protéines SM  
Munc 13, RIM et Rab3  
Rôle de la synaptotagmine et du calcium

## 7. Fonctions des SNARES selon le type cellulaire

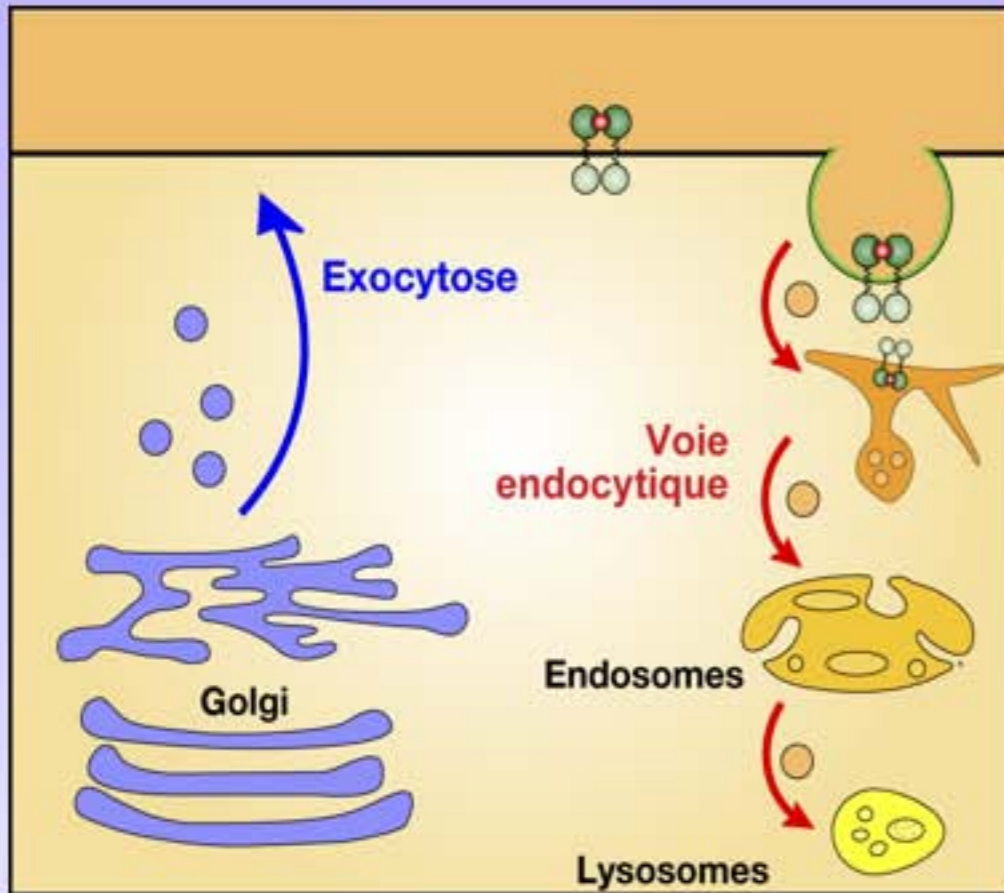
Rôle de la Cellubrevine dans la migration  
Rôle de la synaptobrevine dans la libération des NT  
Rôles de TI-VAMP dans la croissance neuritique  
Rôles de Stx3 et SytVII dans la croissance



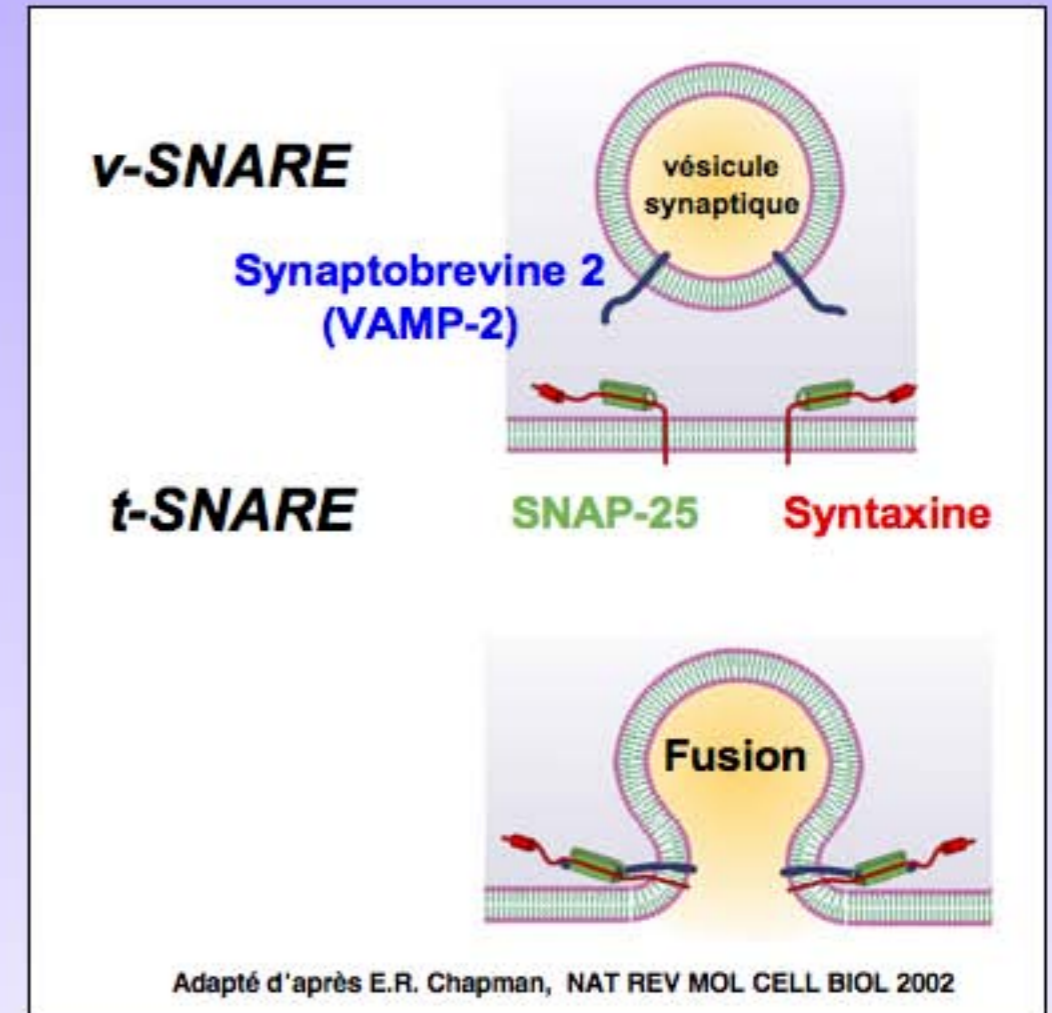
# Exo-endocytose



## Rôle central des protéines SNARE dans la fusion membranaire



Transport intracellulaire:  
Processus d'Exocytose et  
endocytose



Machinerie de fusion:  
Les protéines SNARE



# Role centrale de l'exocytose dans la croissance membranaire et le remodelage

- **Exocytose au pôle apical pole des cellules épithéliales**

( Galli et al., 1998, Lafont et al., 1999, Pocard et al. 2007)

- **Sécrétion des lysosomes (réparation, migration)**

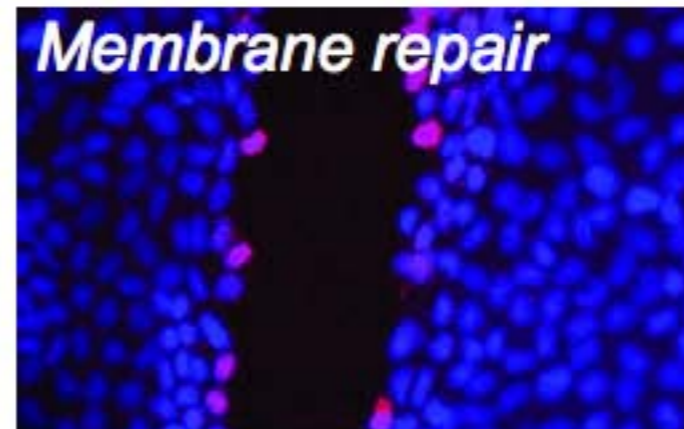
( Pryor et al., 2004; Proux-Gillardeaux 2007)

- **Croissance neuritique**

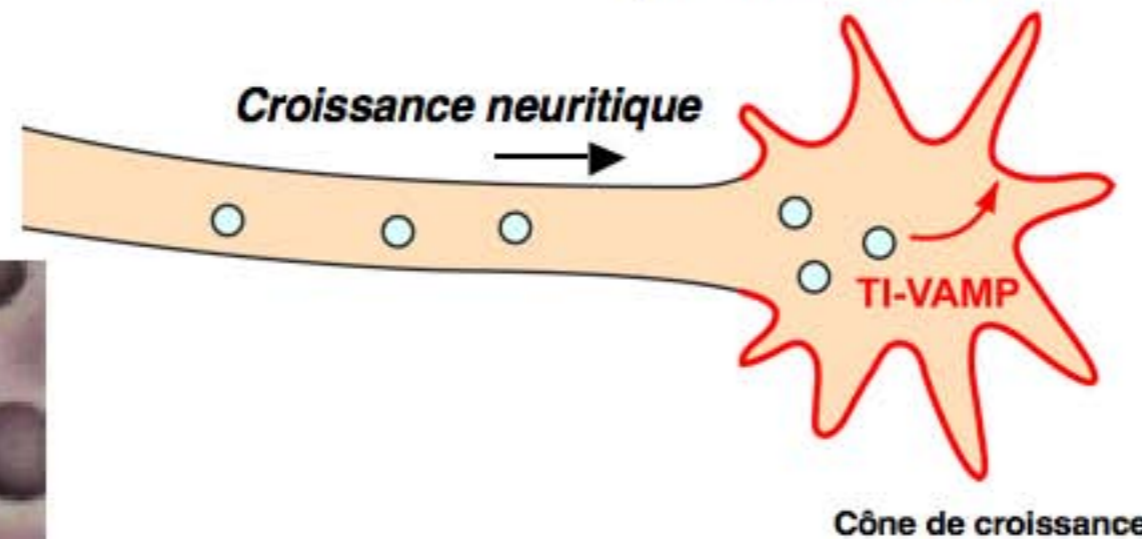
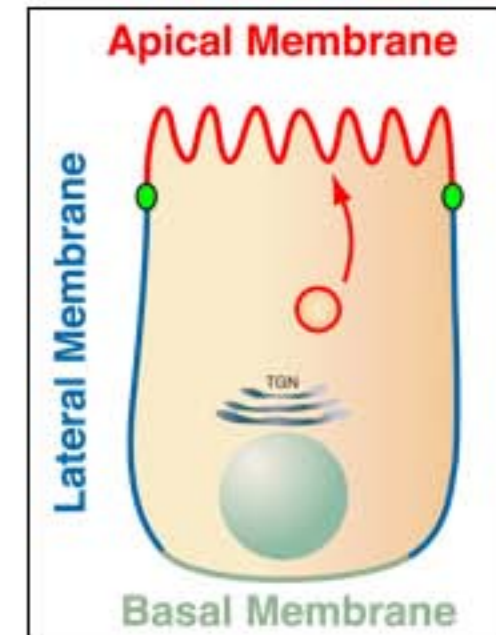
(Martinez-Arca et al.,2003)

- **Exocytose synaptique : libération de NT**

(Danglot et al. PNAS 2006)

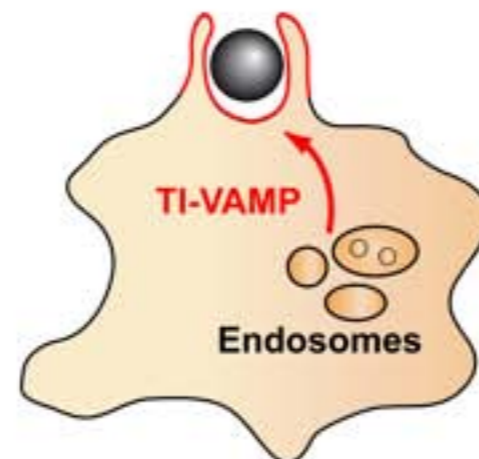


(Proux-Gillardeaux, 2007)



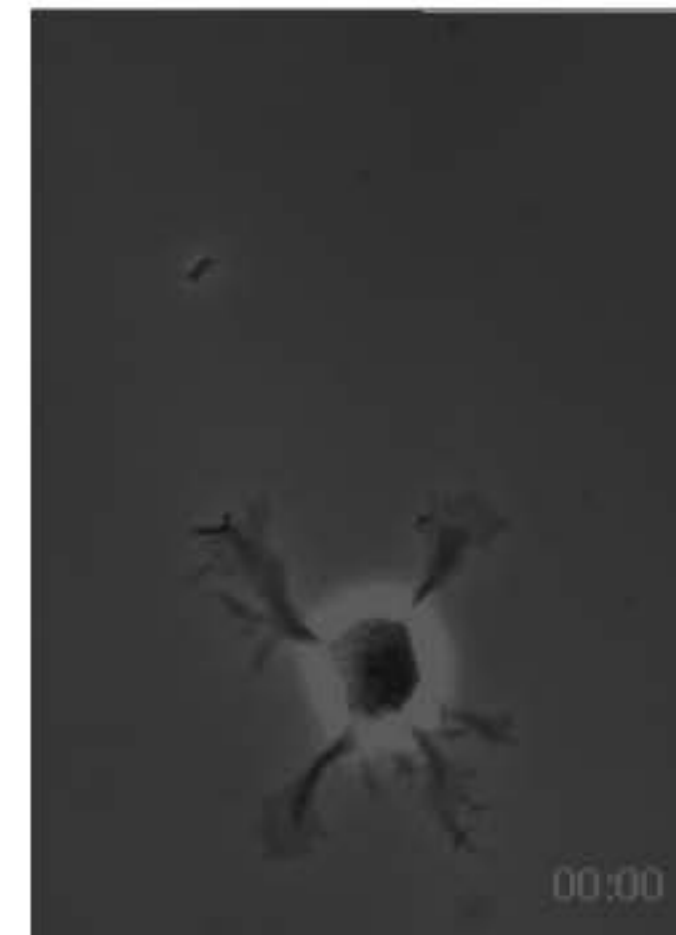
- **Phagocytose**

(Braun and Niedergang., EMBO J, 2004)



- **Degradation de la matrice dans les metastases (invadopodia)**

(Steffen and Chavrier, Curr Biol, 2008)

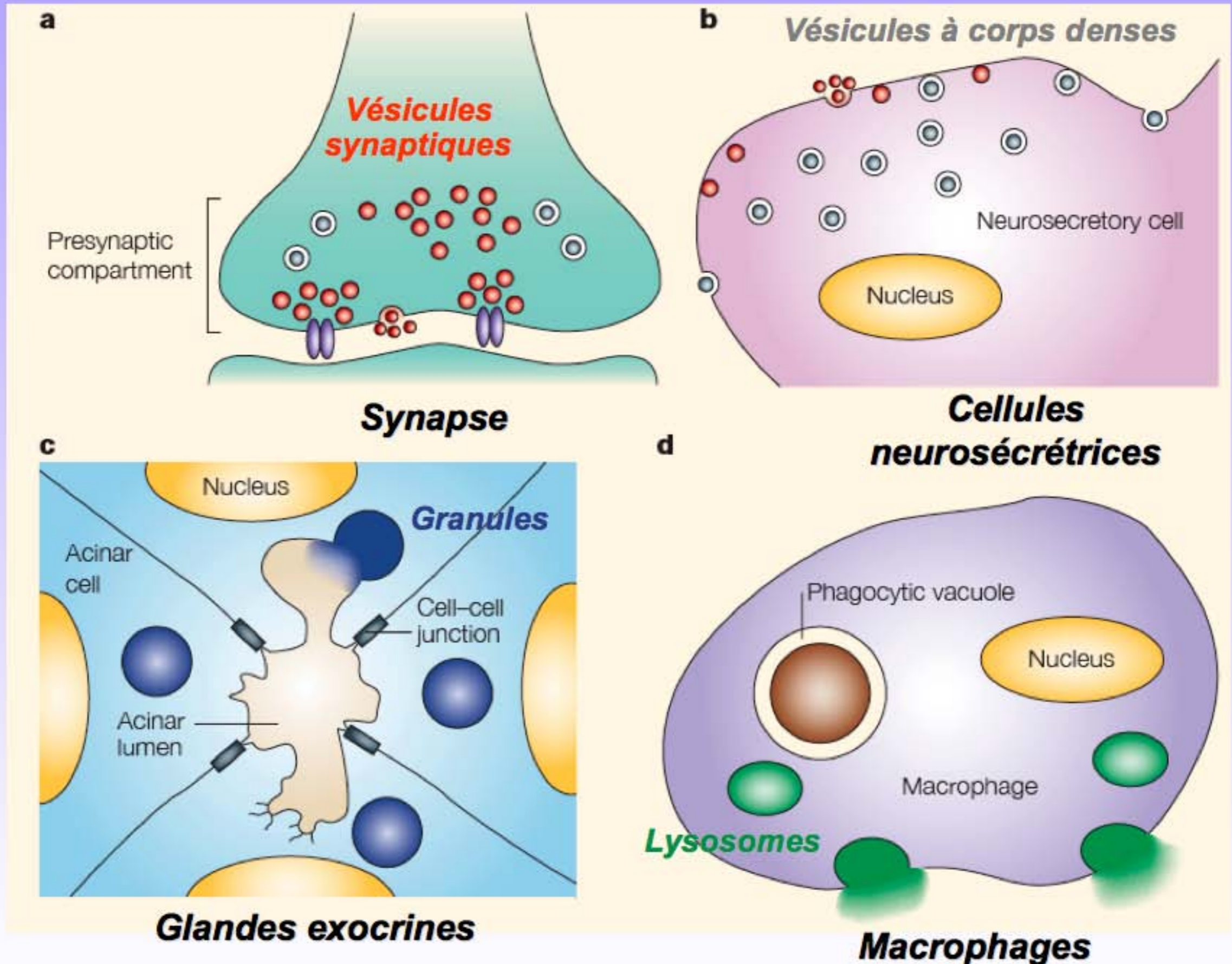


**Croissance neuritique**

<http://www.silvermanlab.org/>

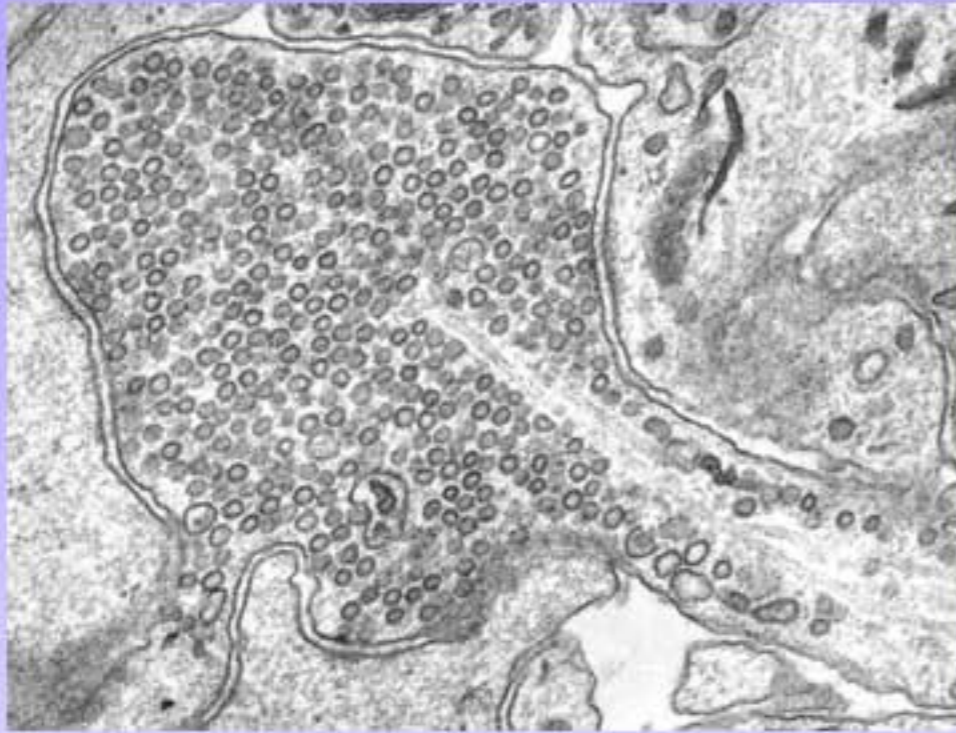


# Exocytose régulée

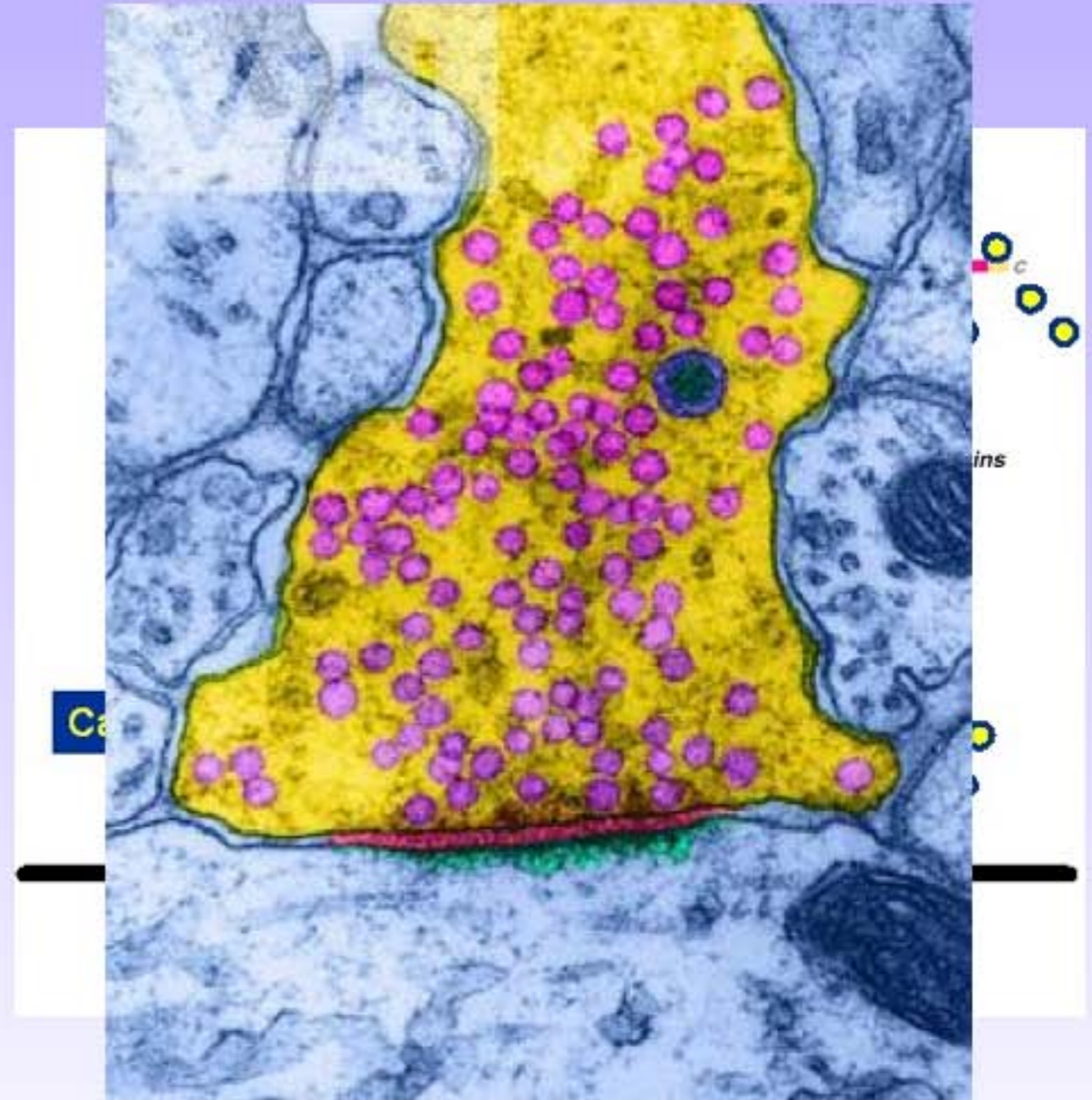




# Les vésicules synaptiques

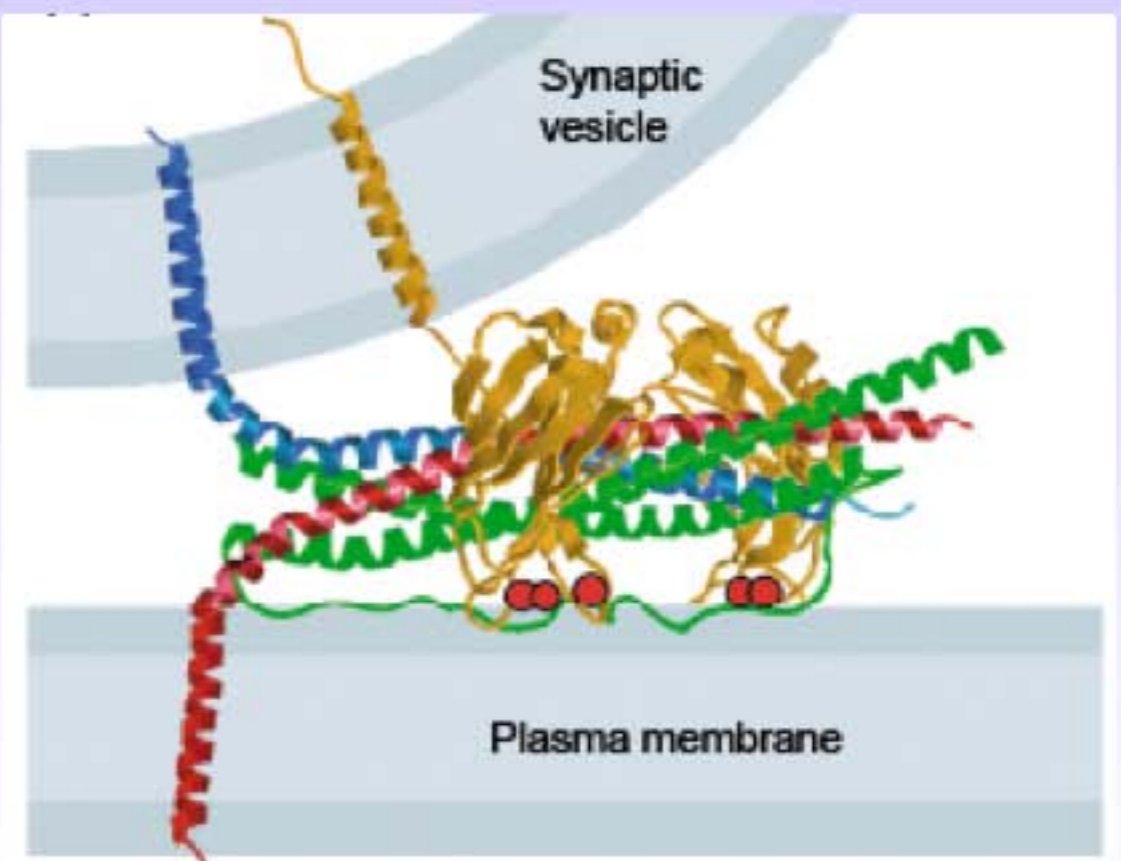
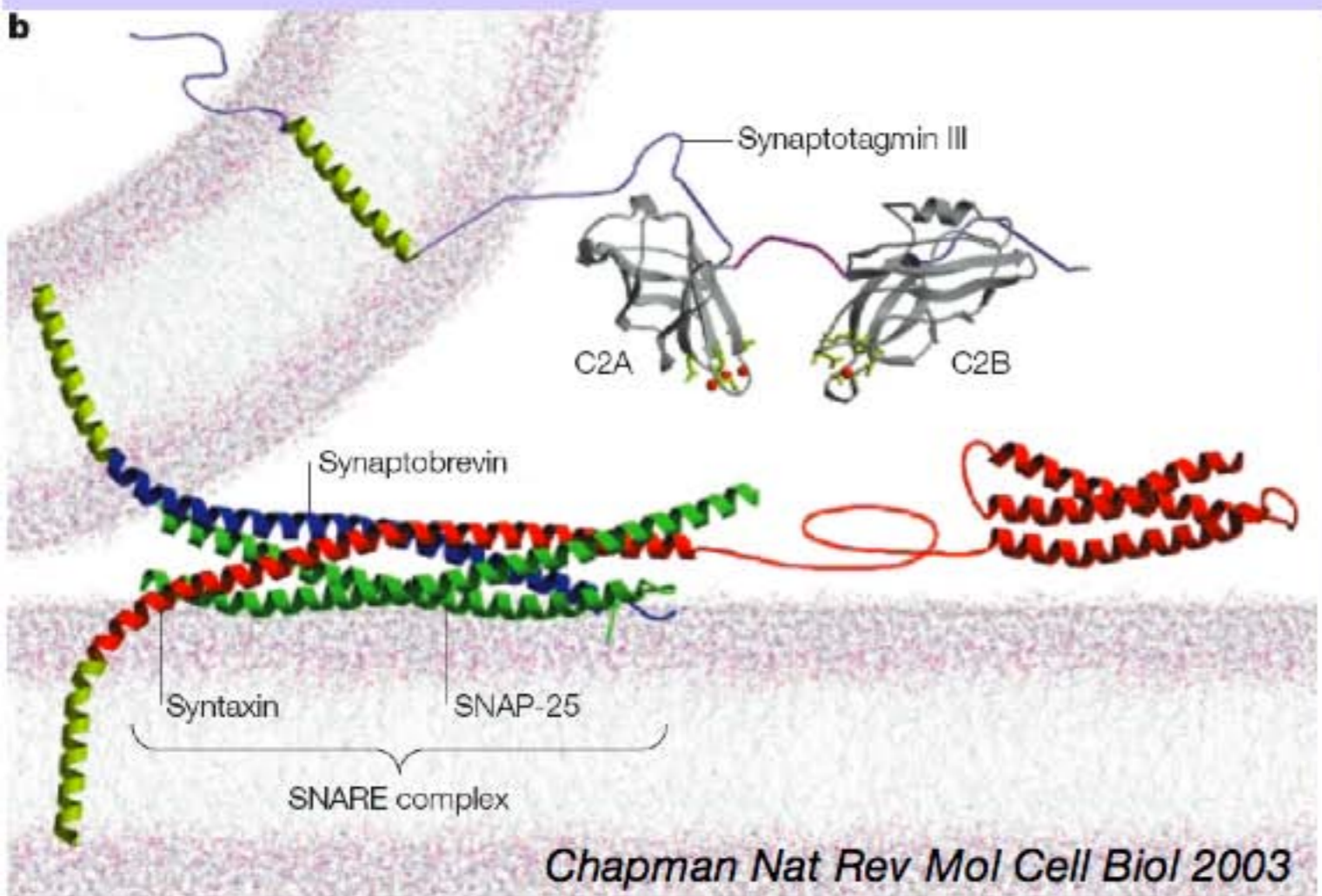
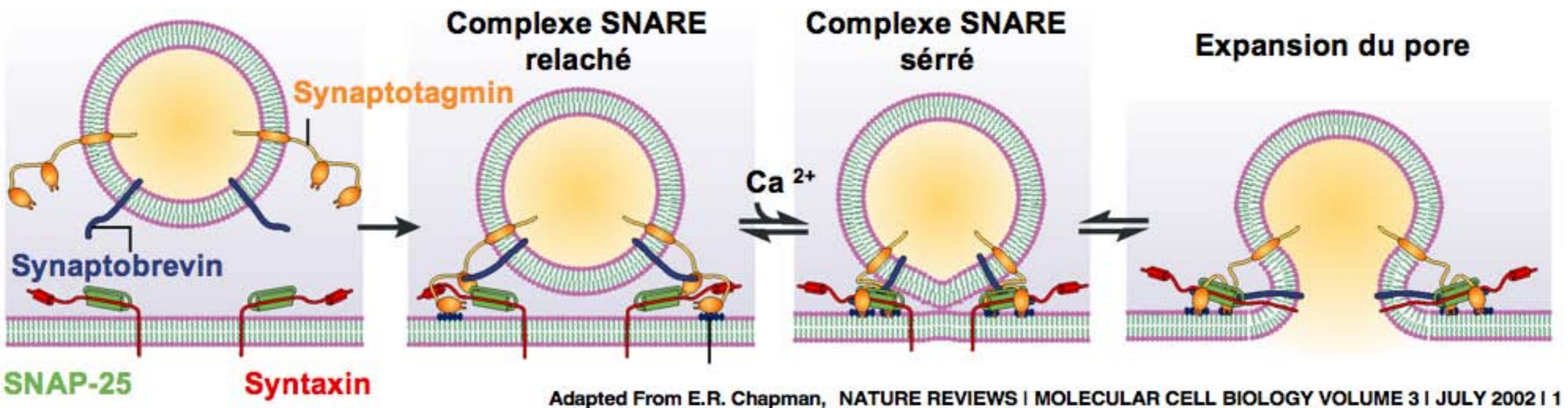


- 50 nm de diamètre
- 500 VS/terminaison
  - $\times 10\ 000$  contacts =  $10^6$  à  $10^7$  VS/neurone
  - $\times 10^{11}$  neurones =  $10^{17}$  VS/SNC
- cholestérol:phospholipides = 1:2
- 12000 molécules de phospholipides / VS
- phospholipides:protéines = 1:1
- 20 à 40 protéines différentes / VS
- synaptophysine= 7% protéine VS = 0,3% protéines totales



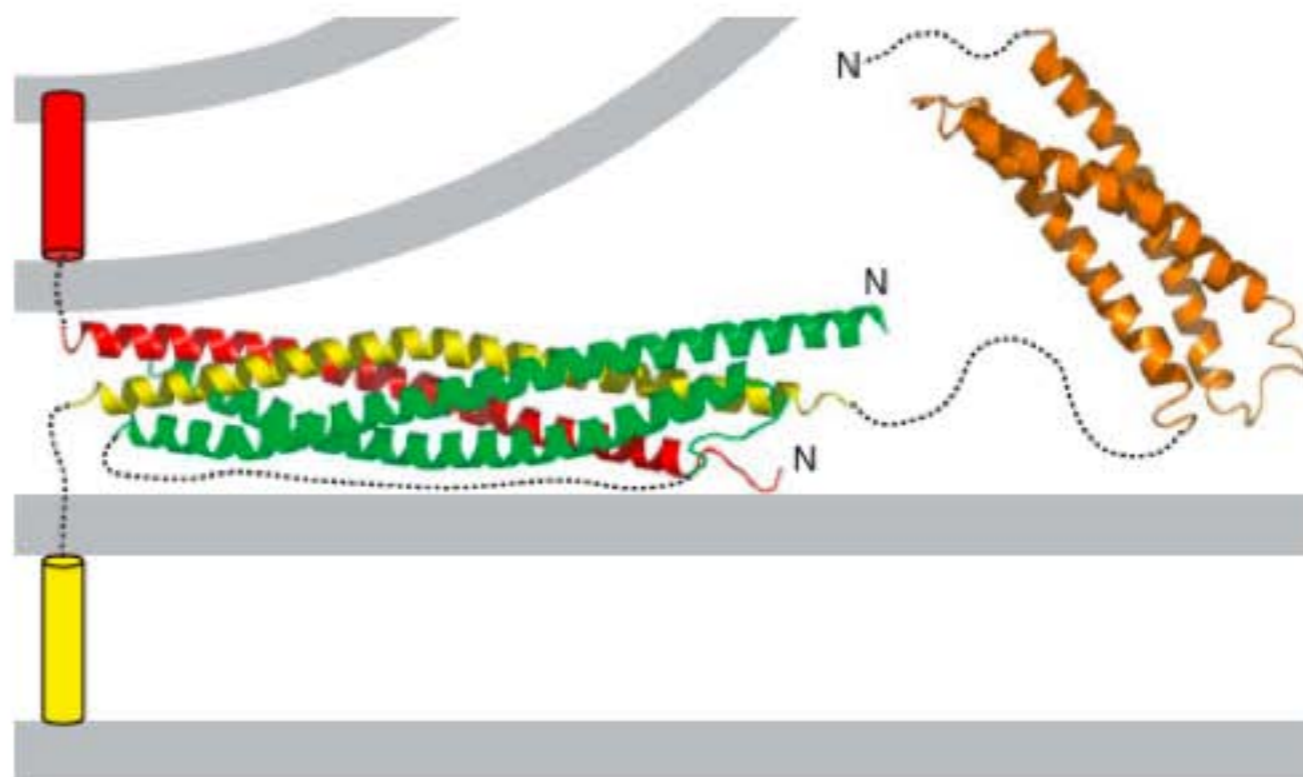
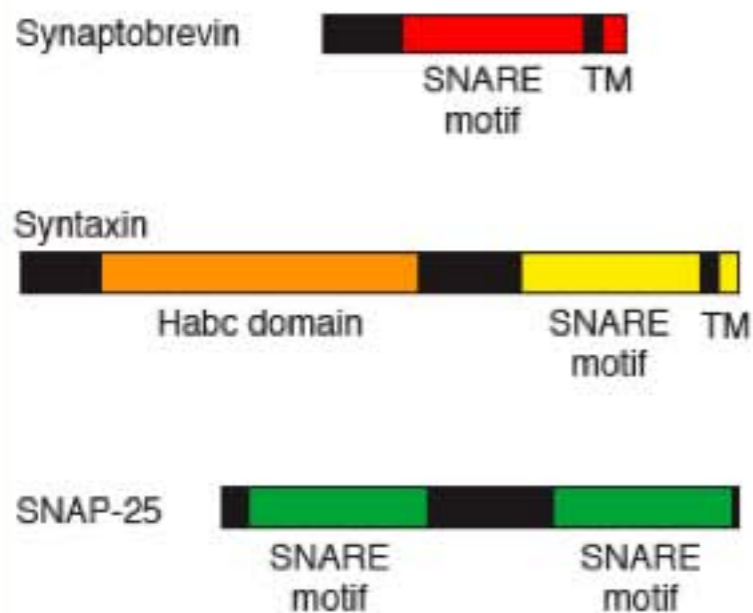


# Les protéines SNARE et l'exocytose



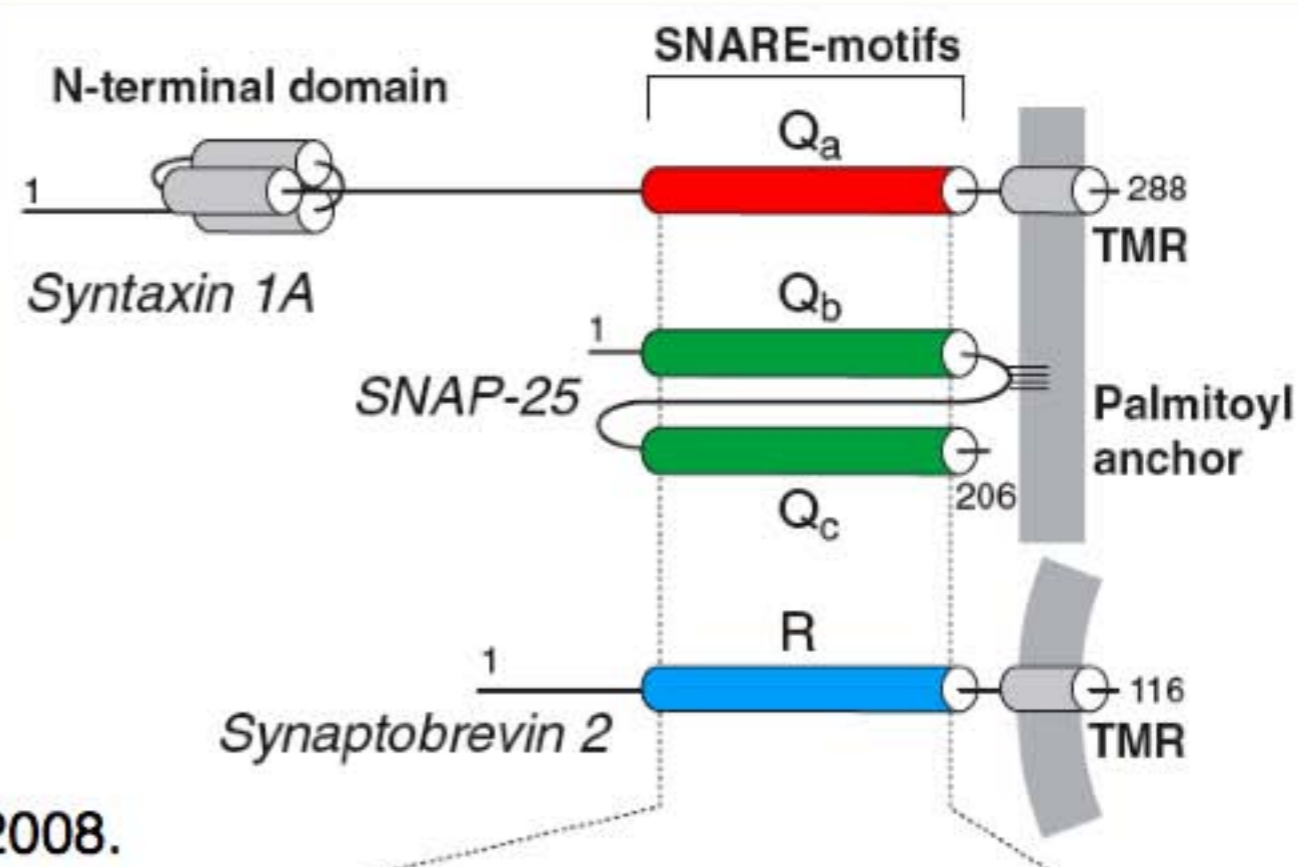


# Le complexe SNARE



TRENDS in Cell Biology

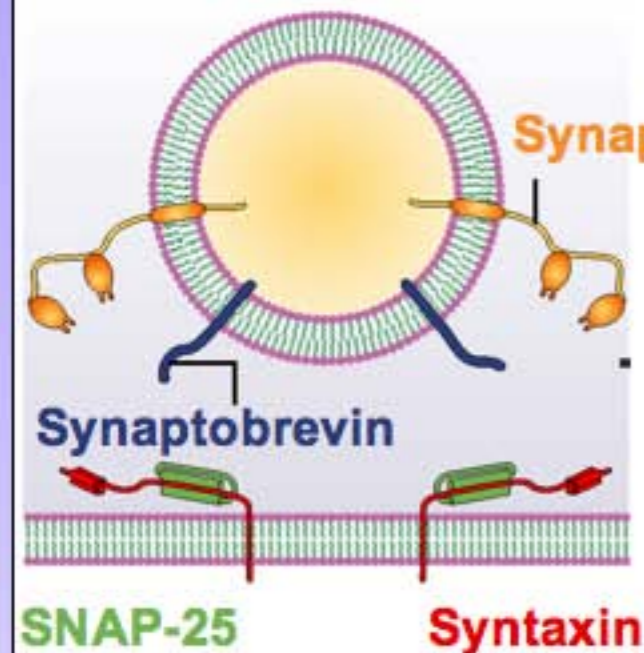
Rizo, Chen et d'Areç, Tins 2006.



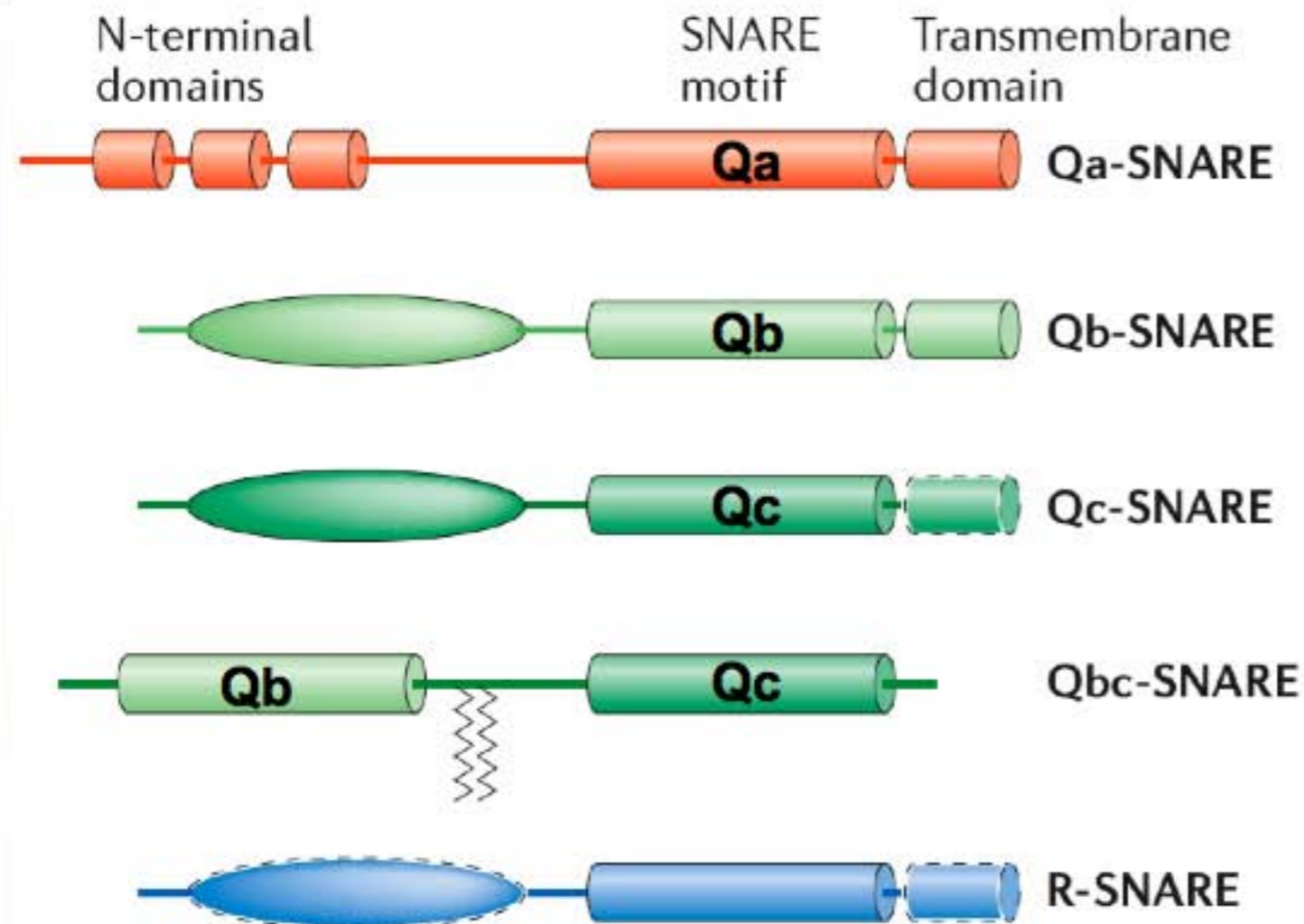
Core Proteins of the Secretory  
 Lang and Jahn, Pharmacology of NT release, 2008.



# Les protéines SNARE et l'exocytose



- **v-SNARE**: sur la vesicule (vesicule)
- **t-SNARE**: sur la membrane cible (target)
- **1 complexe SNARE = 1 motif SNARE sur la vesicule (R) + 3 motifs SNAREs sur la membrane cible (Q)**
- **Les 3 motifs t-SNARE peuvent venir de :**
  - **2 t-SNAREs** : 1 SNARE avec 1 motif (Qa), 1 SNARE avec 2 motifs (Qbc)
  - **3 t-SNAREs** : 3 SNAREs différents avec 1 motif chacun (Qa, Qb, Qc).



**ex: Syntaxin 1 à 5, 11, 13, 16, 17, 18.**

**ex: Vti1a, Vti1b, GS27, GS28**

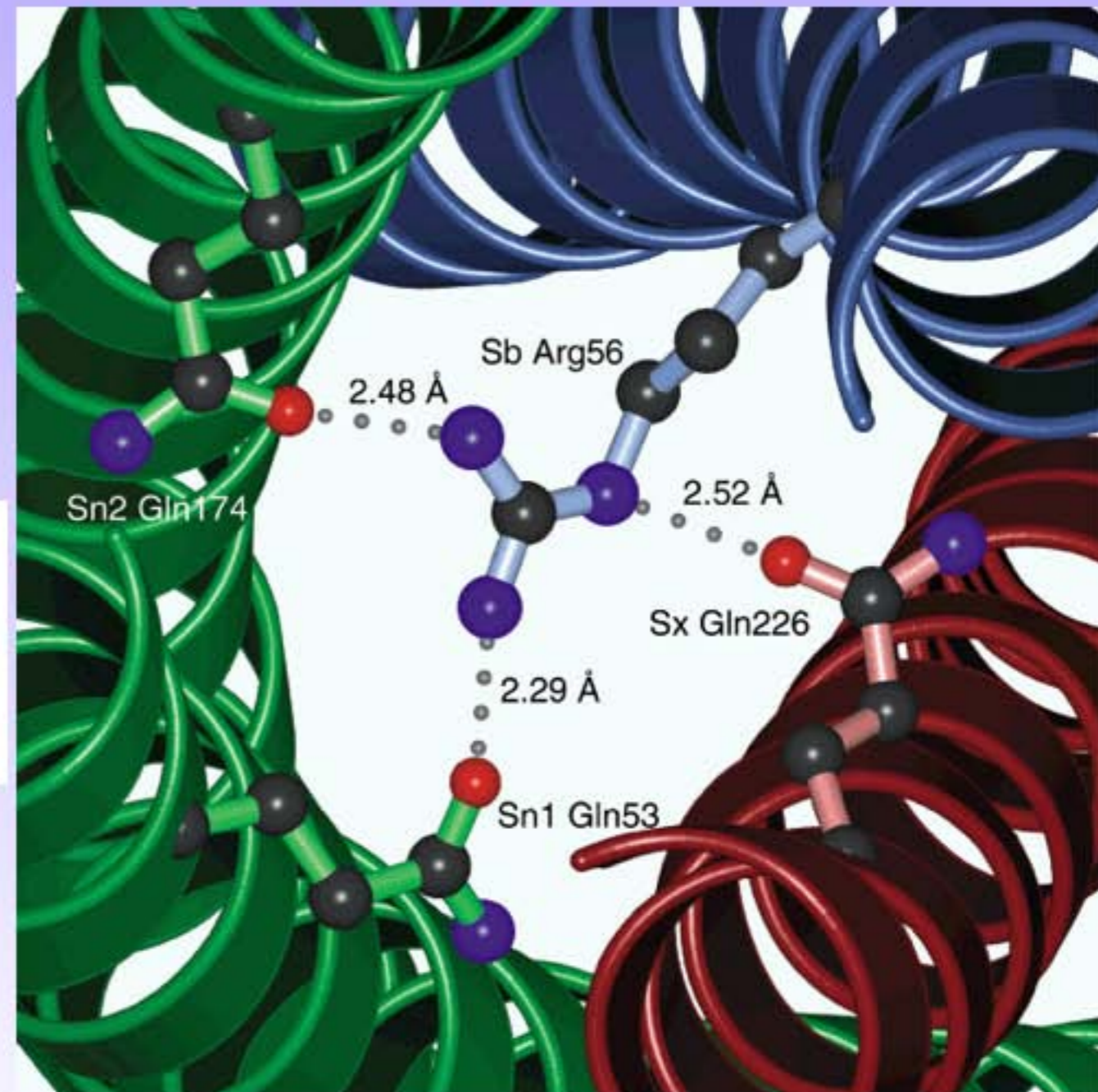
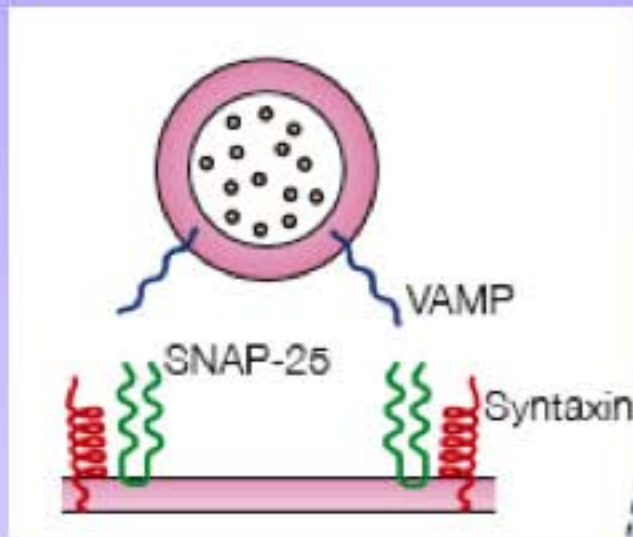
**ex: Bet21, GS15, stx6, stx8, stx10**

**ex: SNAP-25, SNAP-23, SNAP-29**

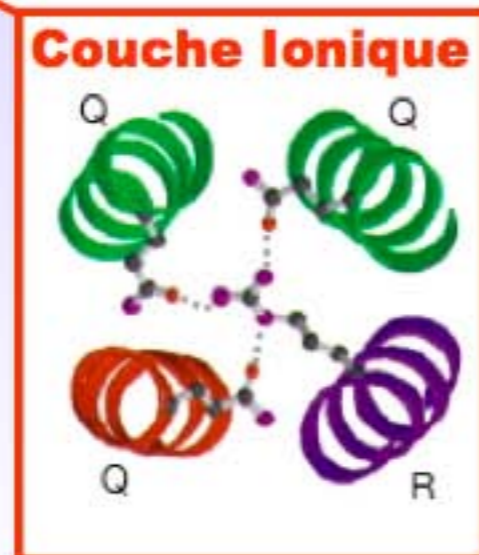
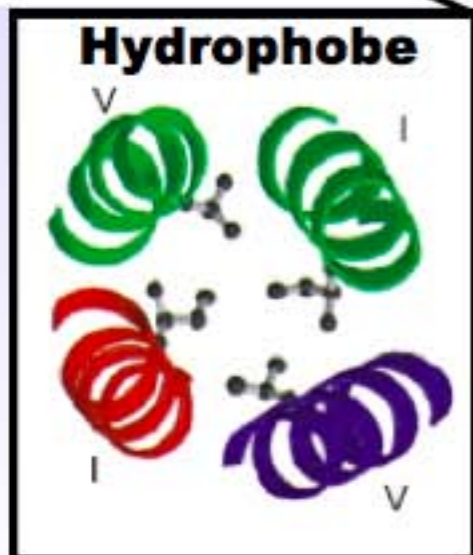
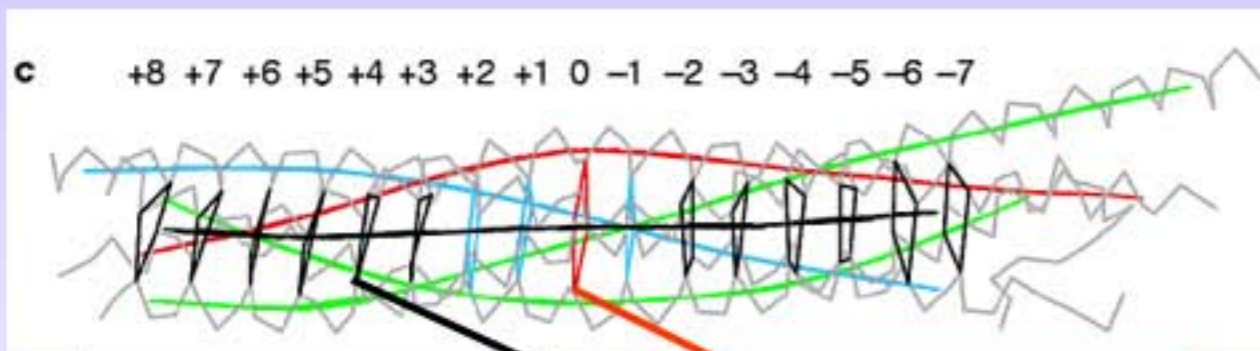
**ex: Syb2, TI-VAMP, Sec22, YKT6  
VAMP1 à VAMP8**



# Le complexe SNARE : Q-SNARE & R-SNARE



(Sutton et al., Nature 1998)



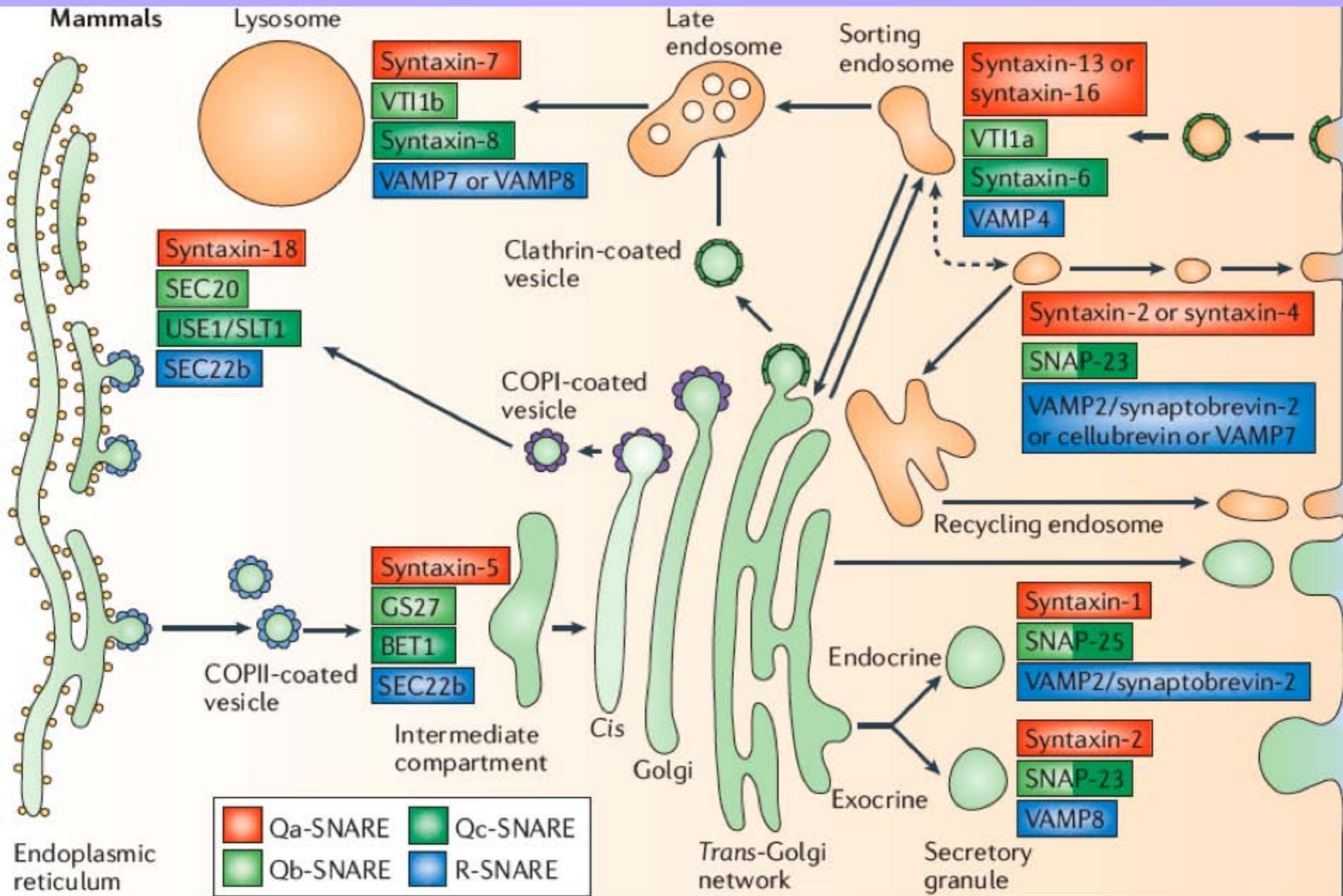


# SNARE & compartiments

Chaîne	Levure	Nématode	Drosophile	Mammifères
<b>SNAREs</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>20</b>	<b>35</b>
<b>Qa</b> Syntaxines	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>12</b>
<b>Qb</b> Nter SNAP25	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>9</b>
<b>Qc</b> Cter SNAP25	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>8</b>
<b>R</b> V-SNARE	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>9</b>
<b>Sec1</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
<b>Rab</b>	<b>11</b>	<b>29</b>	<b>26</b>	<b>60</b>

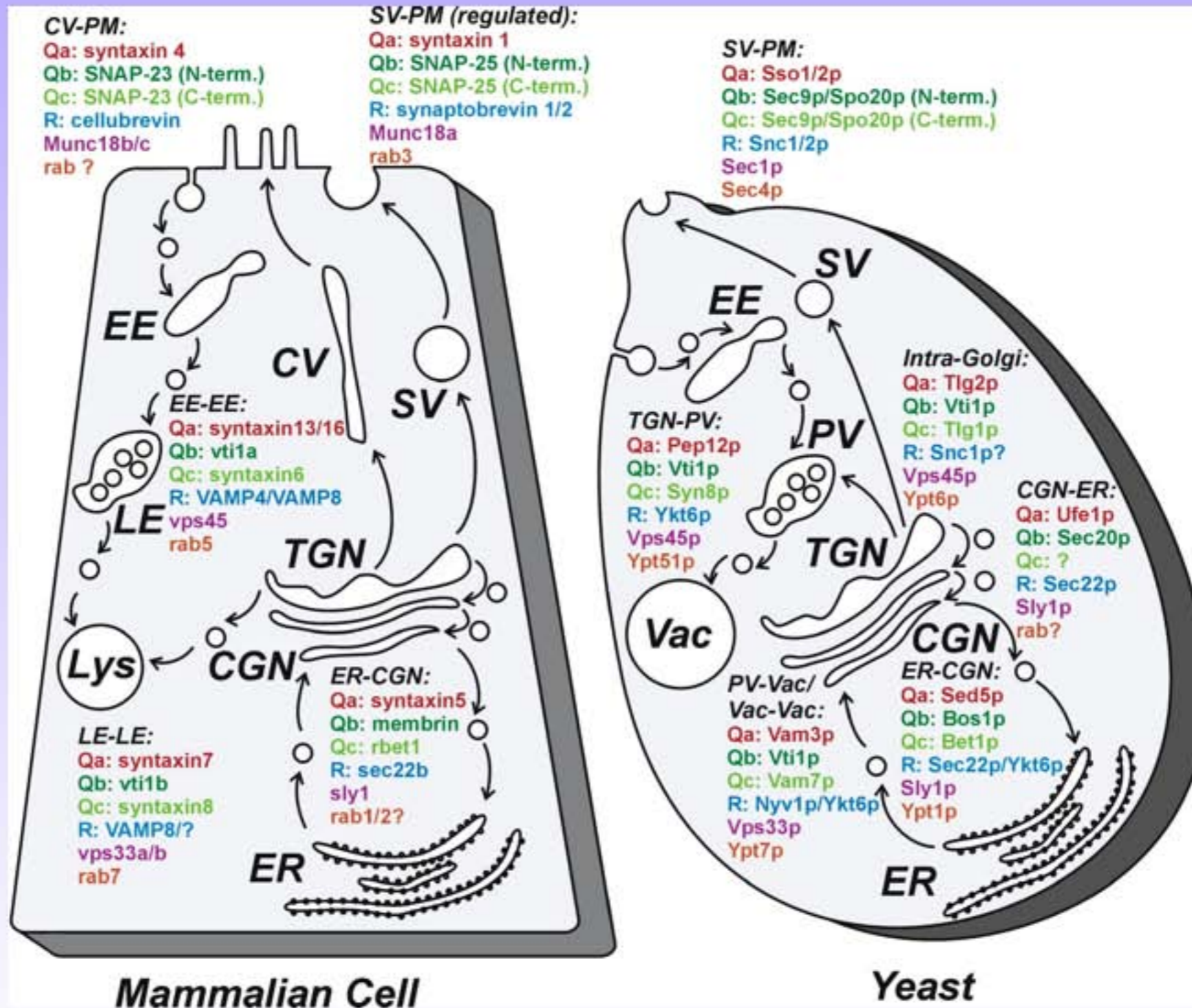


# Les protéines SNARE et le trafic membranaire dans la cellule





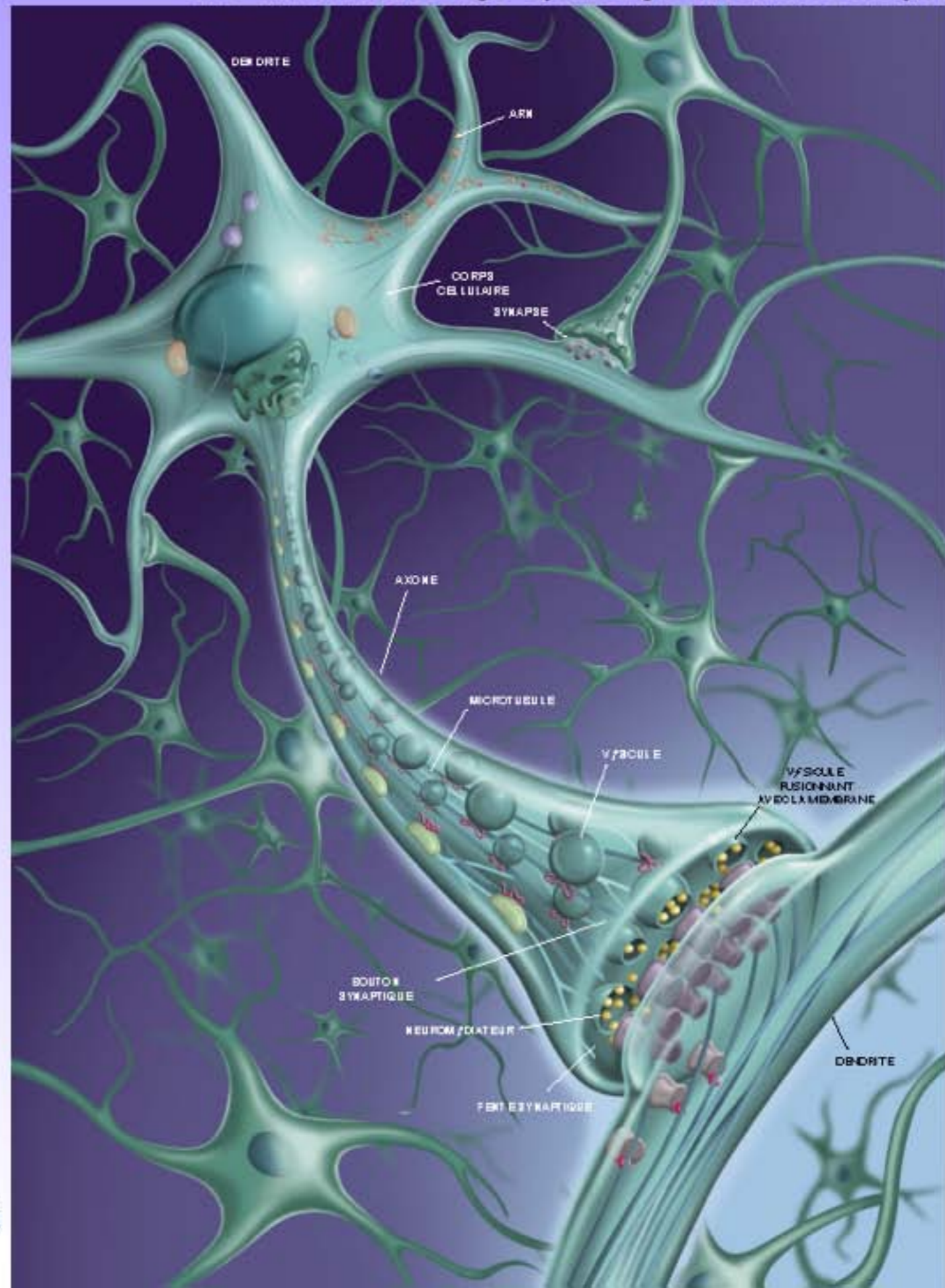
# SNARE & compartments





# ***Machinerie d'exocytose: le modele neuronal : l'exocytose synaptique***

*La fusion vésiculaire entre les vésicules synaptiques et la membrane présynaptique permet la libération des neurotransmetteur.*

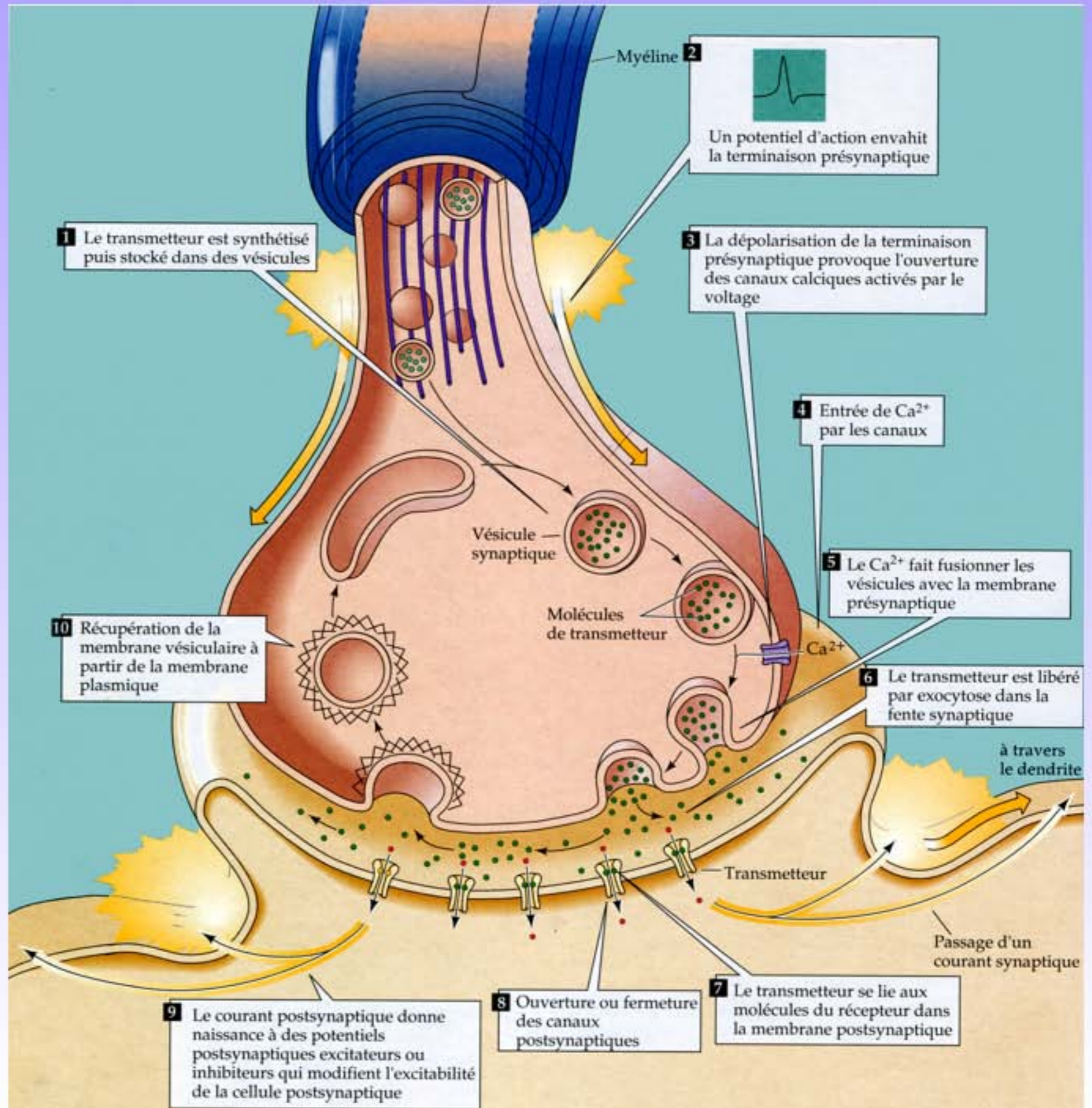


Thierry Galli & fabienne Paumet

© POUR LA SCIENCE - N° 302 DÉCEMBRE 2002



# L'exocytose synaptique

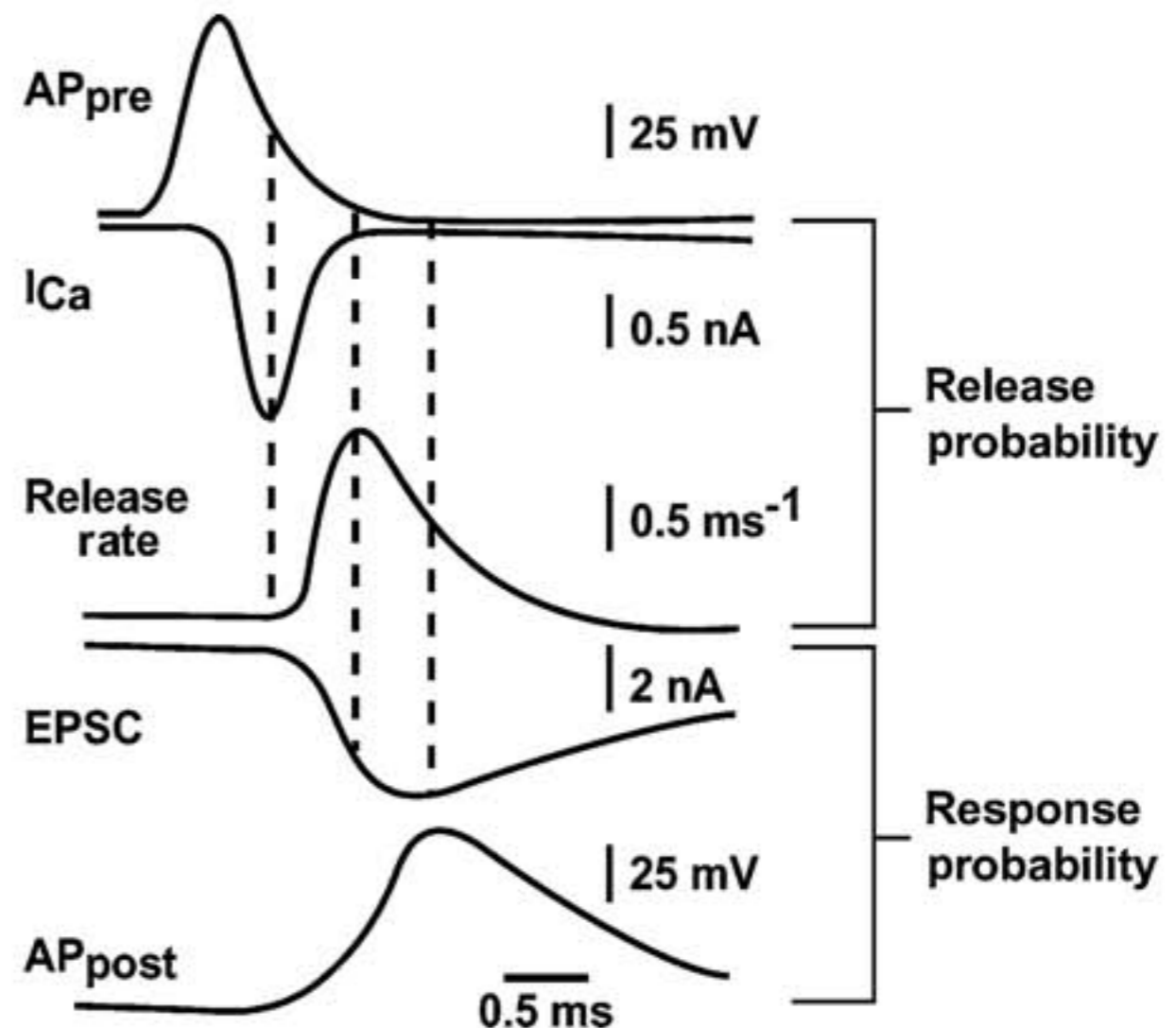
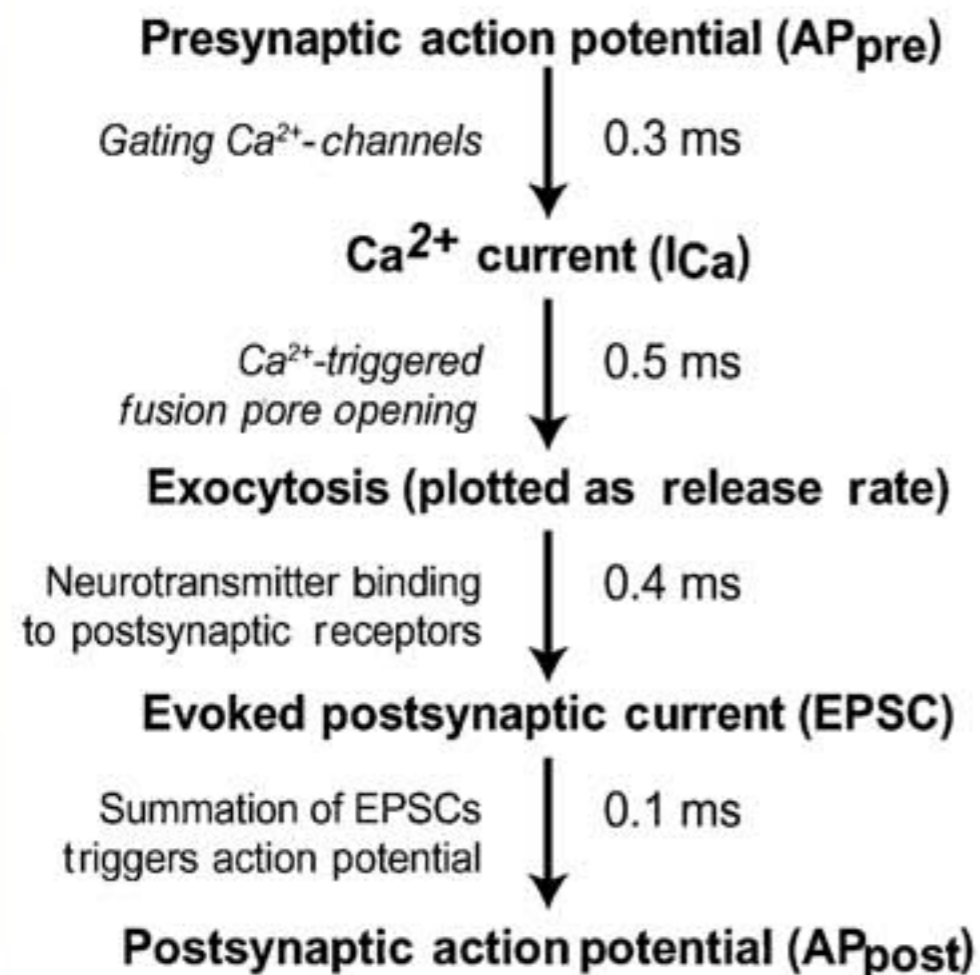


D'après Neurosciences,  
à la découverte du cerveau  
M. F. Bear



# Chronologie: rapidité! Et rôle du calcium

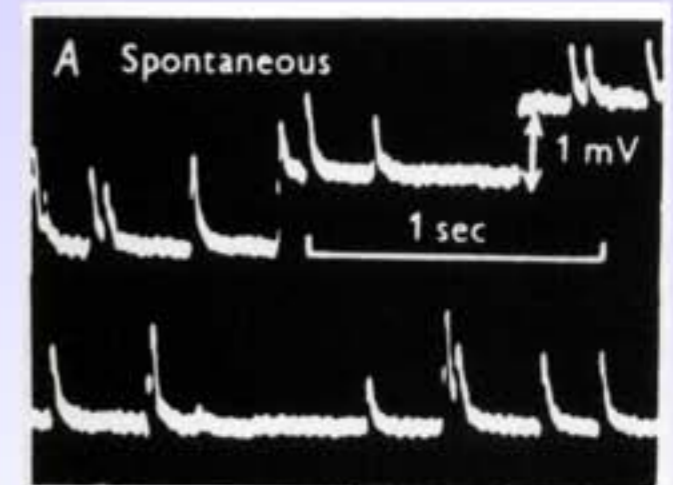
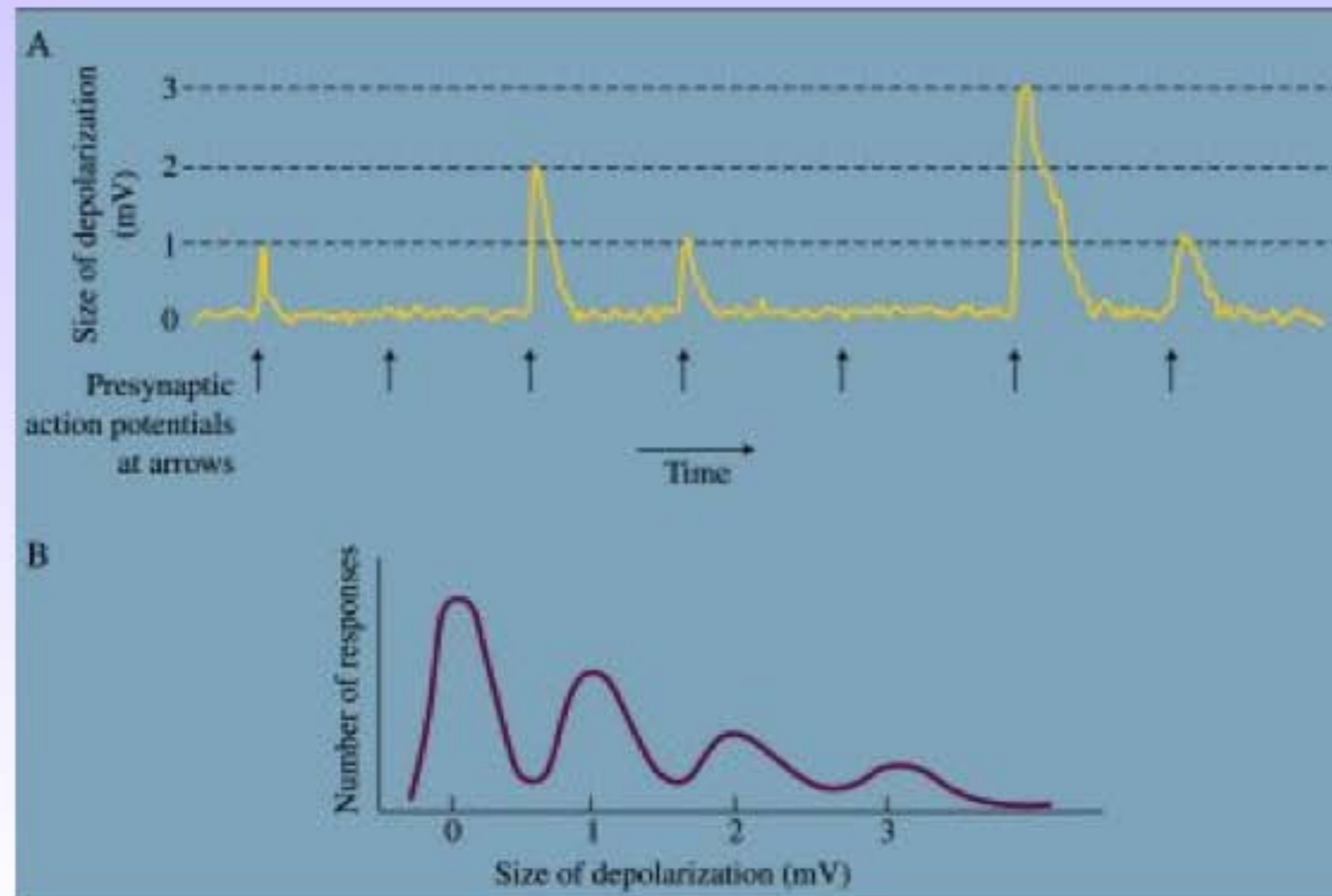
## THE SYNAPTIC VESICLE CYCLE





# Libération de l'acétylcholine

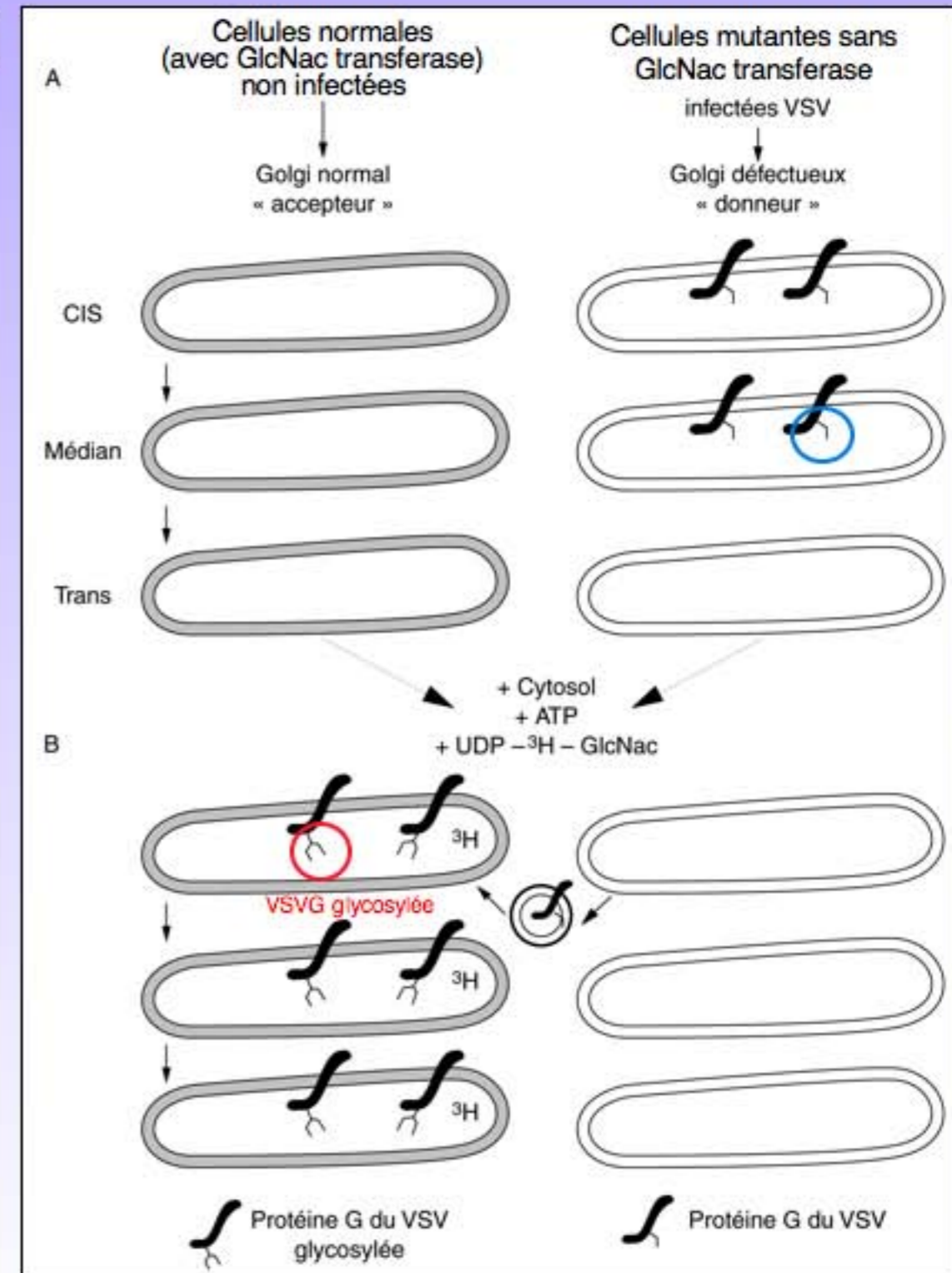
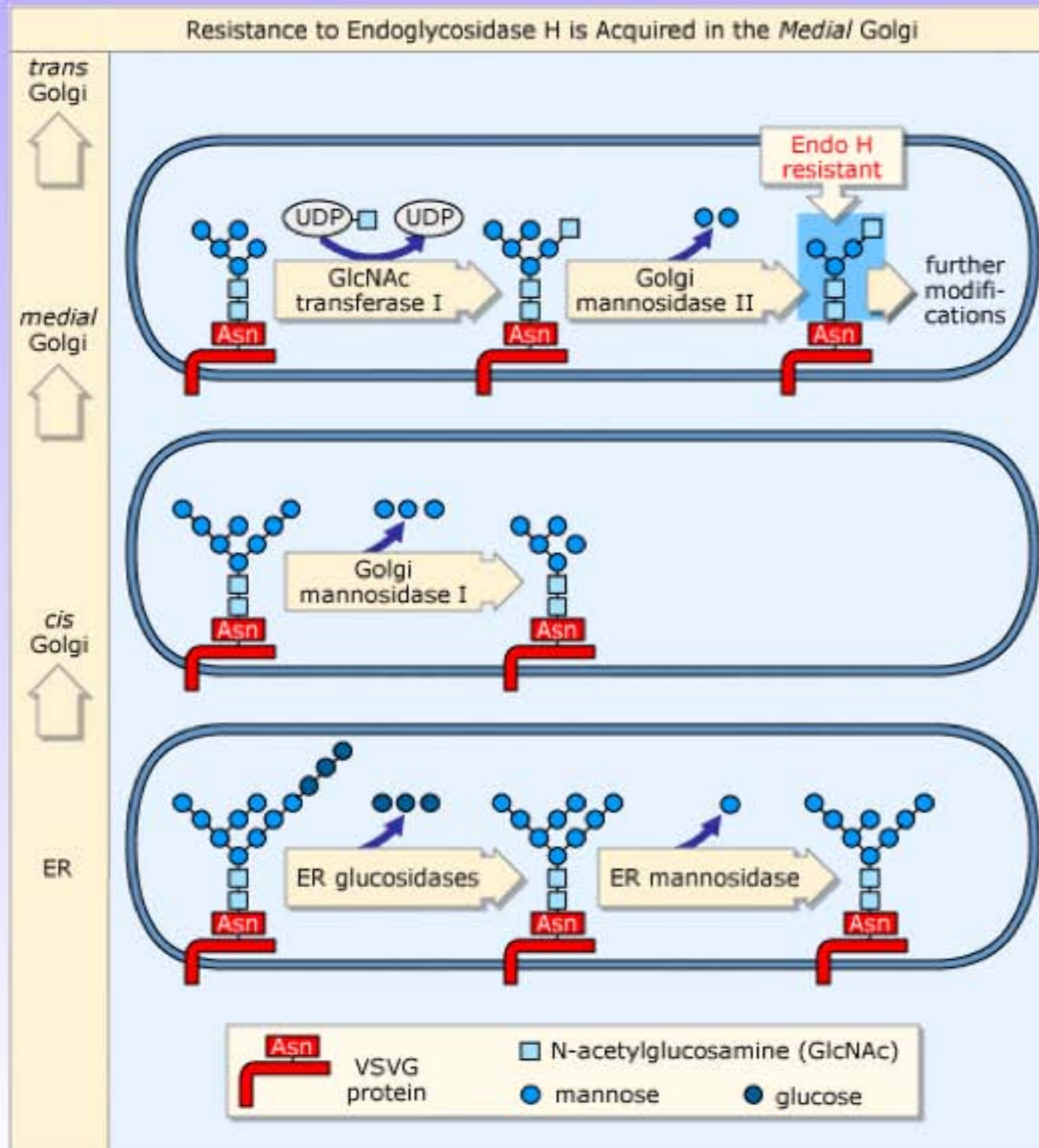
- Théorie quantique: Prix Nobel pour Katz
  - Nt libéré par paquet de taille définie
  - 10,000 molécules d'ACh
- Libération en "tout ou rien"
  - Calcium extracellulaire réduit, seuls quelques quanta sont libérés





# Test in vitro de transport membranaire

(Balch et Rothman, Cell (1984))

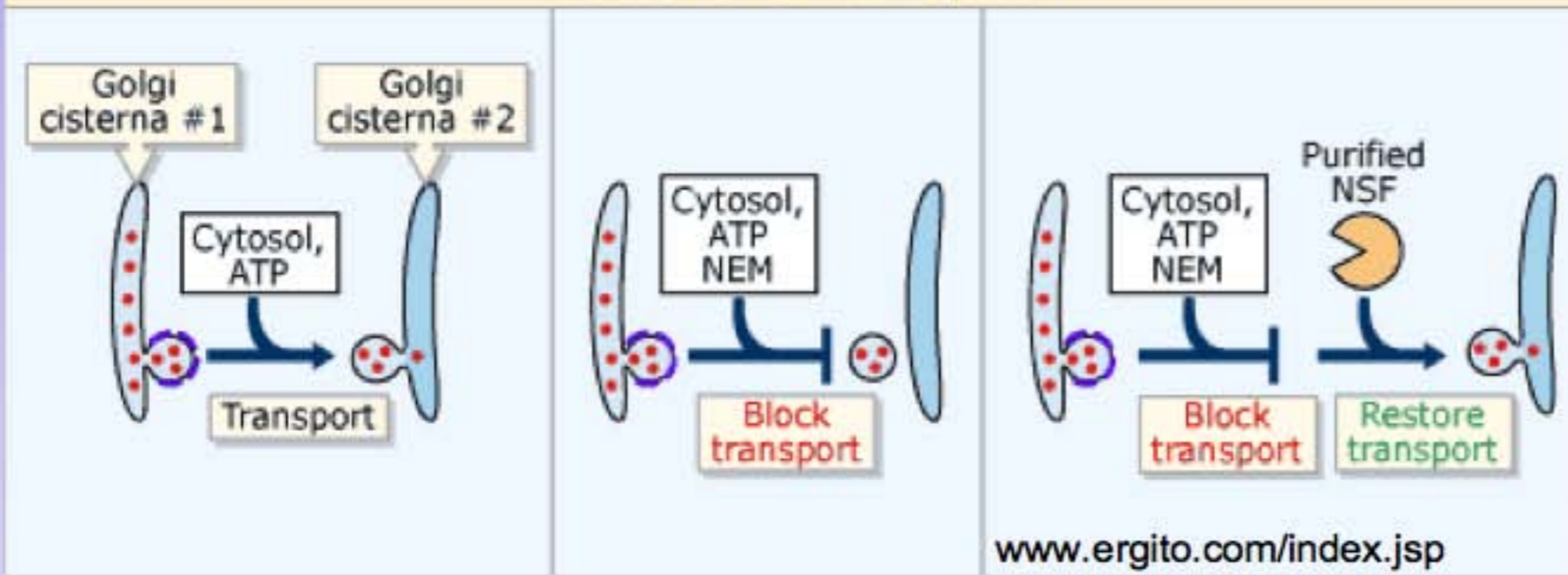


Les citernes restent distinctes, VSVG a été transportée : les auteurs formulent l'hypothèse du **transport vésiculaire**.



# Découverte historique de NSF & SNAPs

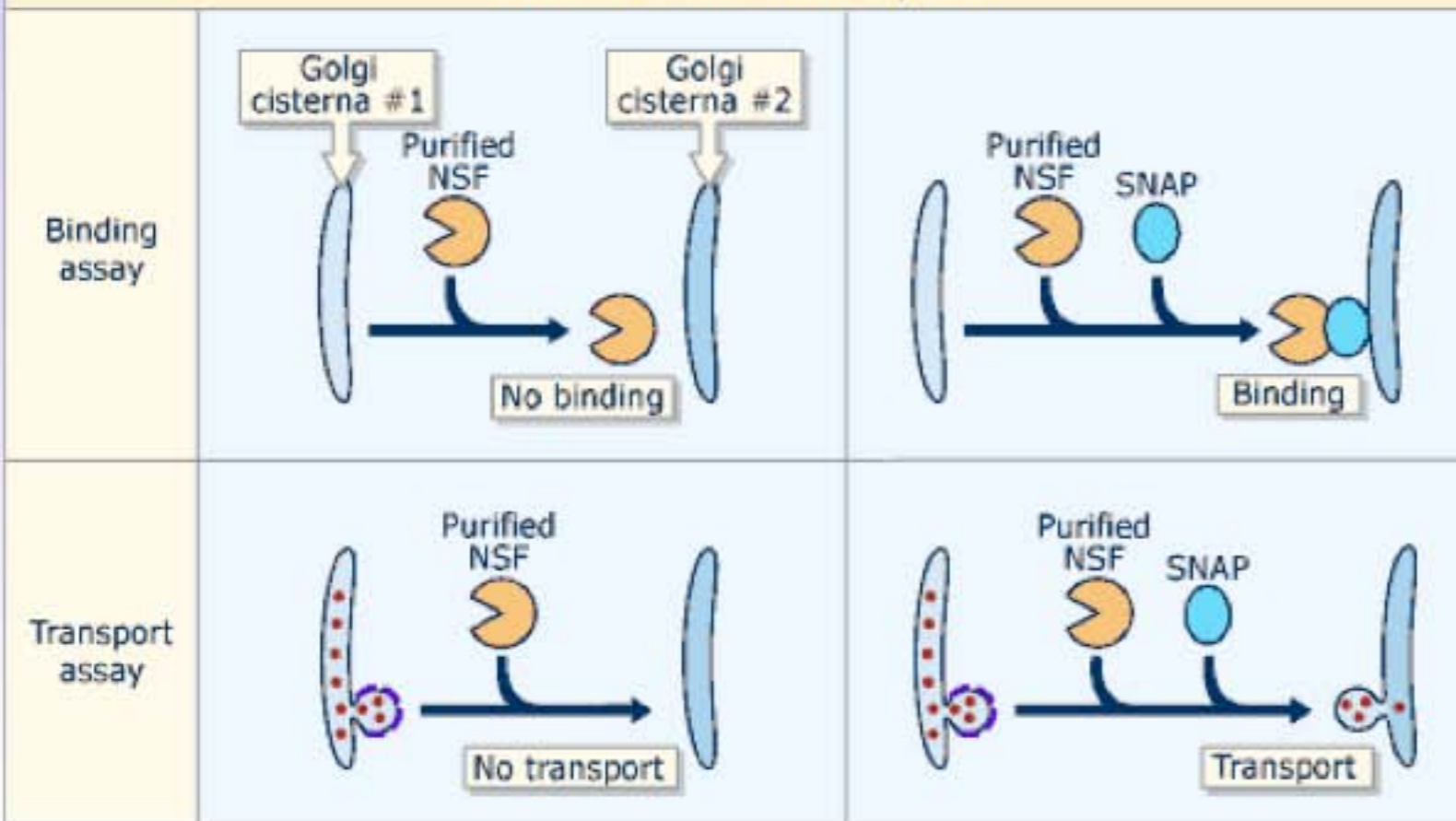
Isolation of NSF from Cytosol



**NEM: N-Ethyl-Maleimide**  
**NSF: NEM sensitive factor**

**NSF est nécessaire à la fusion.**  
**NSF est inhibée par le NEM.**

Isolation of SNAPs from Cytosol

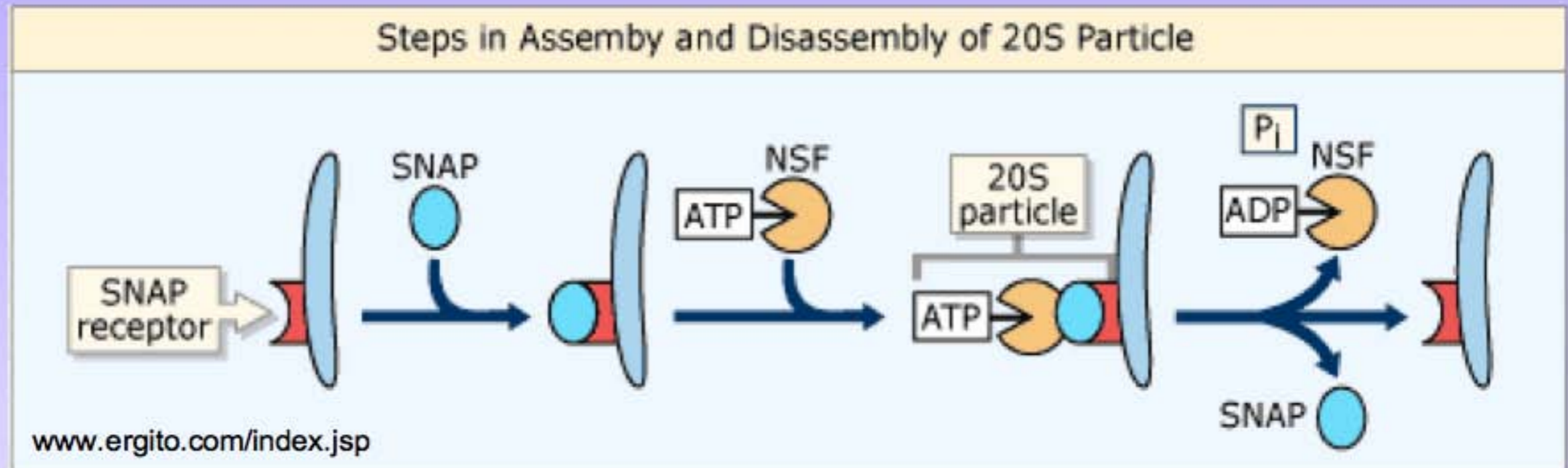


**SNAP:**  
**Soluble NSF Attachment Factor**

**NSF est une protéine soluble qui ne peut se lier aux membranes que grâce aux SNAPs (3 isoformes  $\alpha, \beta, \gamma$ ).**



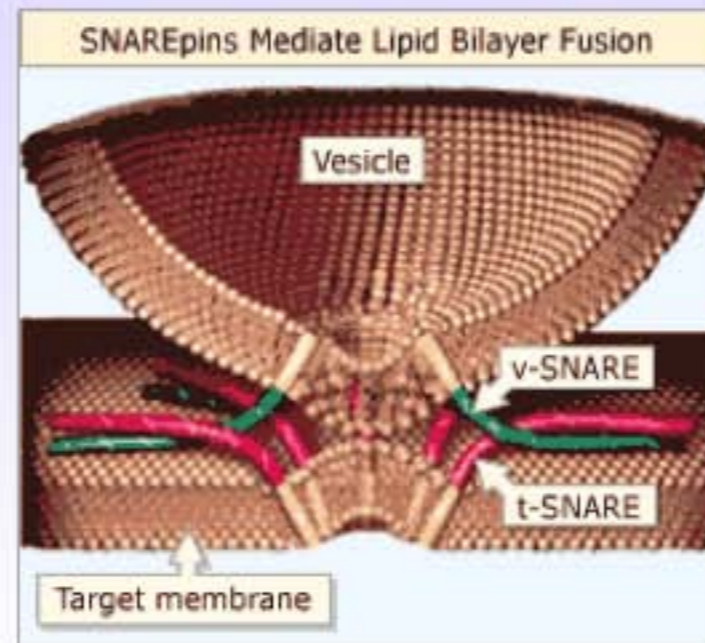
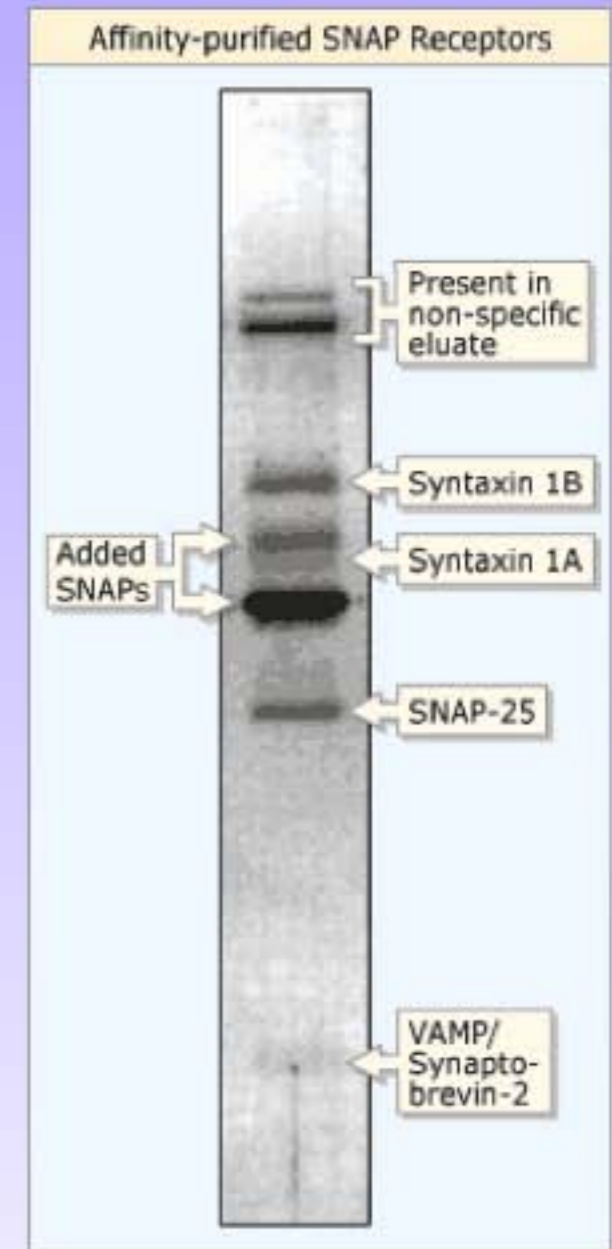
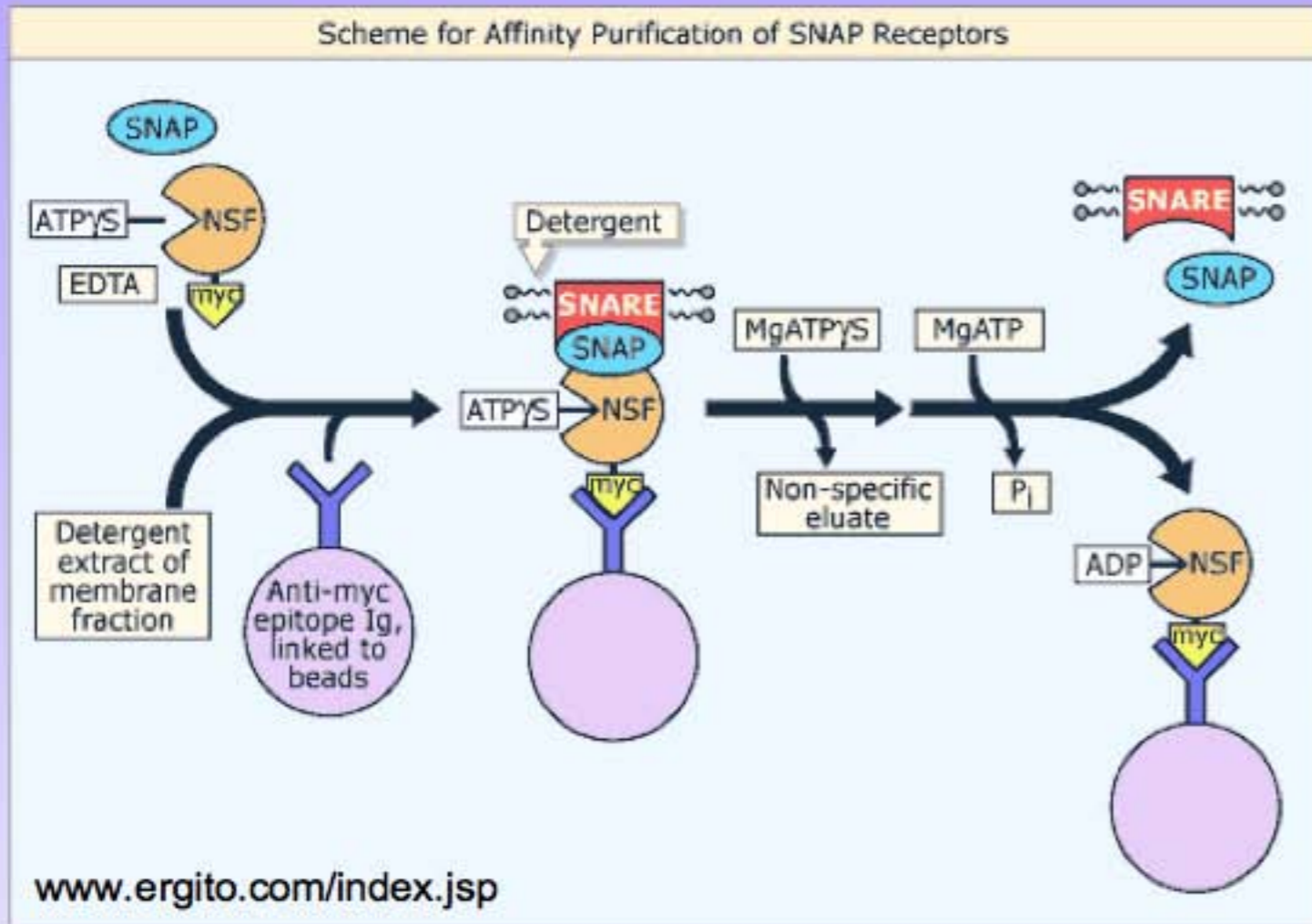
## Découverte historique des récepteurs de SNAP: les SNARE



**Comment isoler les récepteurs de SNAPs: les SNARE?**

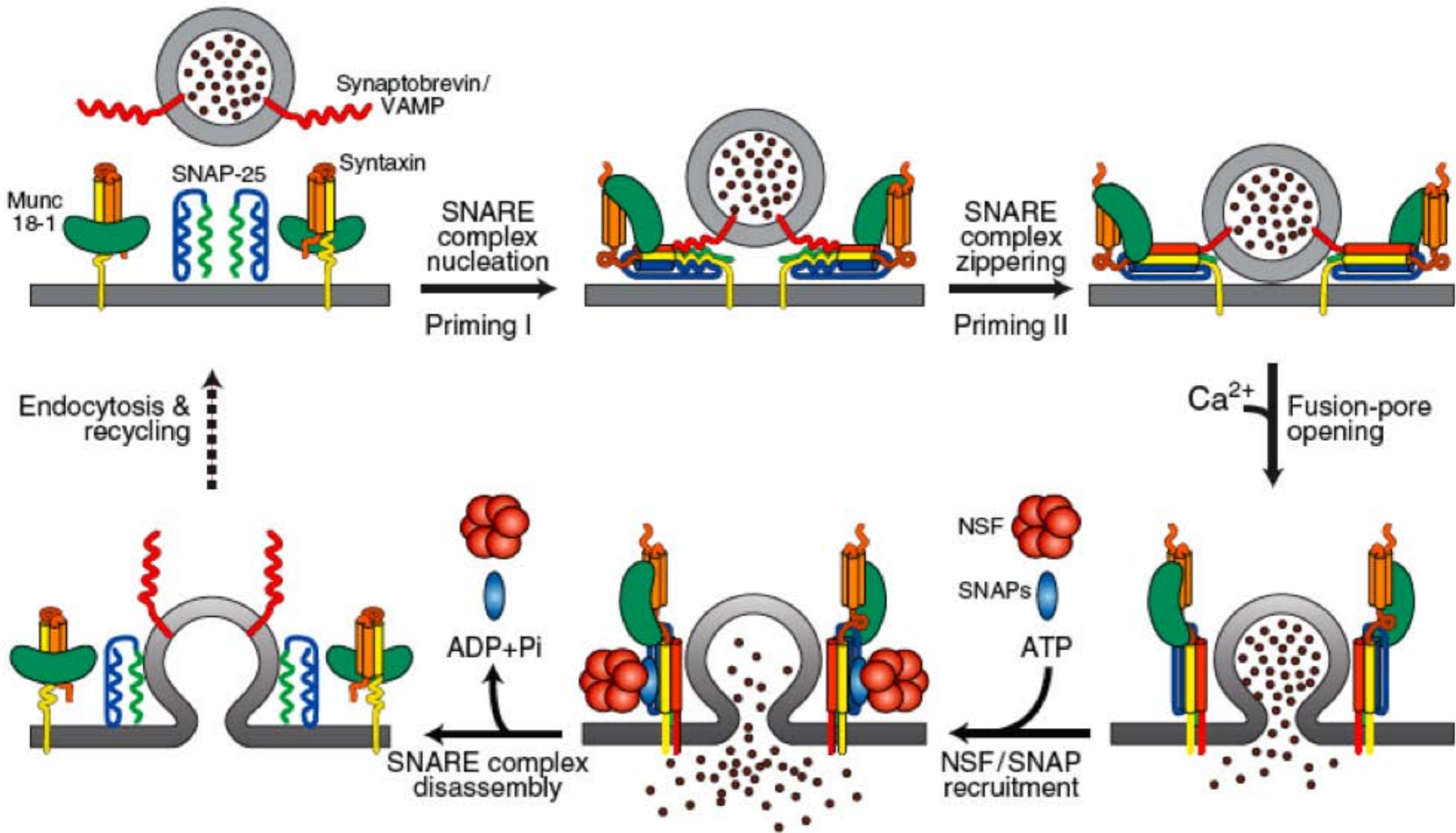


# Isolement des SNAREs





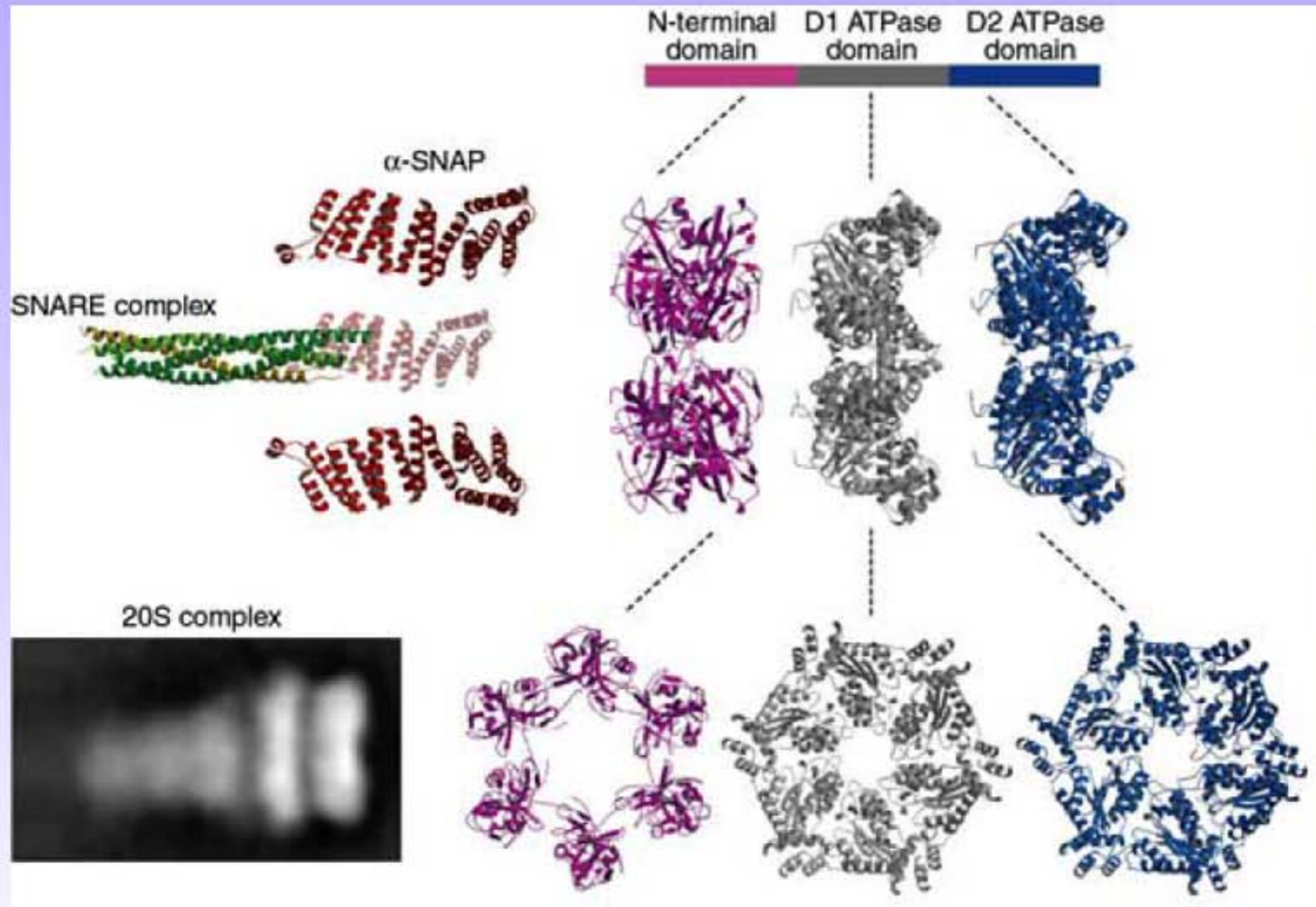
# Dissociation des SNARE par NSF



T.C. Südhof, K. Starke (eds.), *Pharmacology of Neurotransmitter Release. Handbook of Experimental Pharmacology 184.*

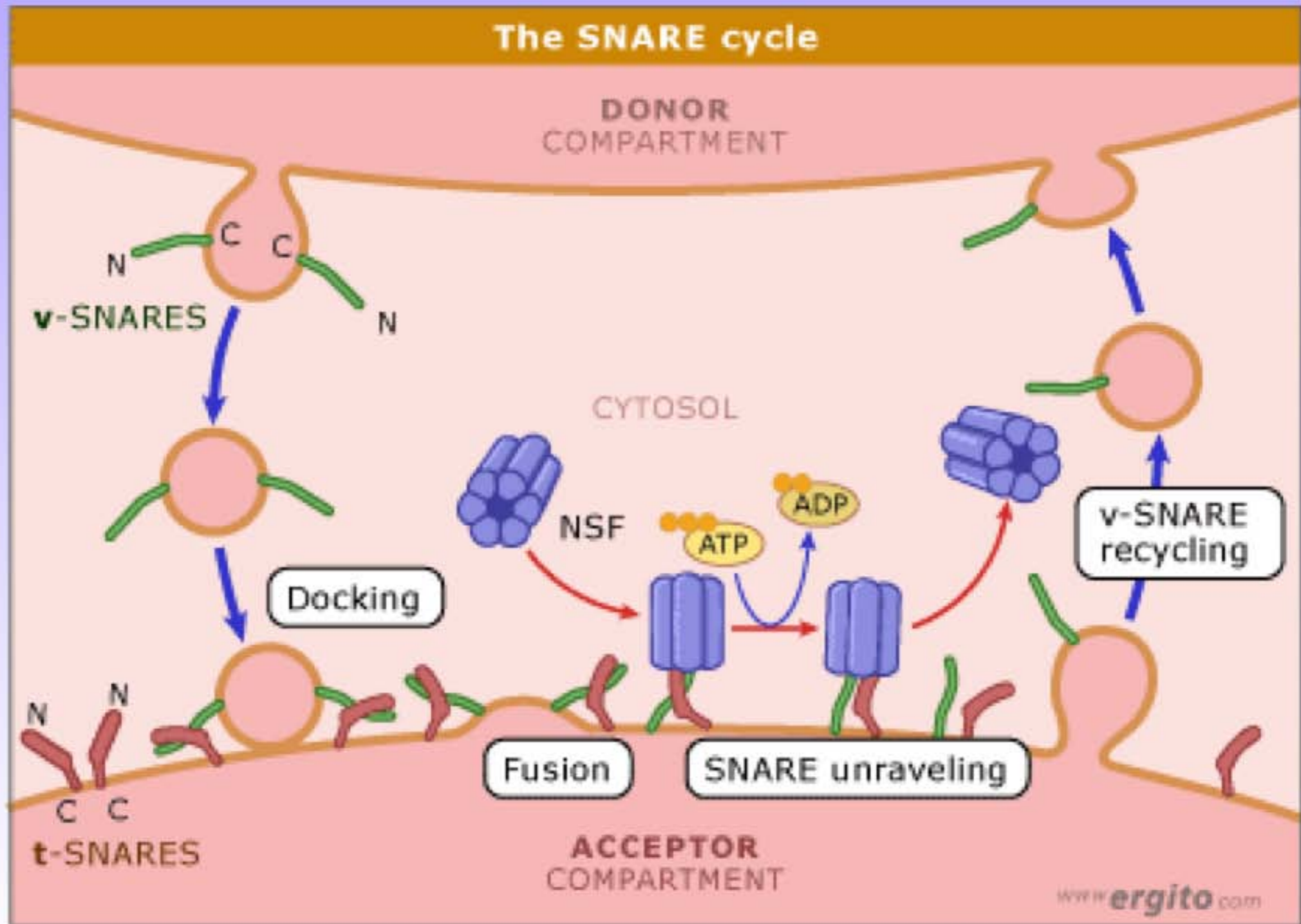


# Structure de l'ATPase NSF



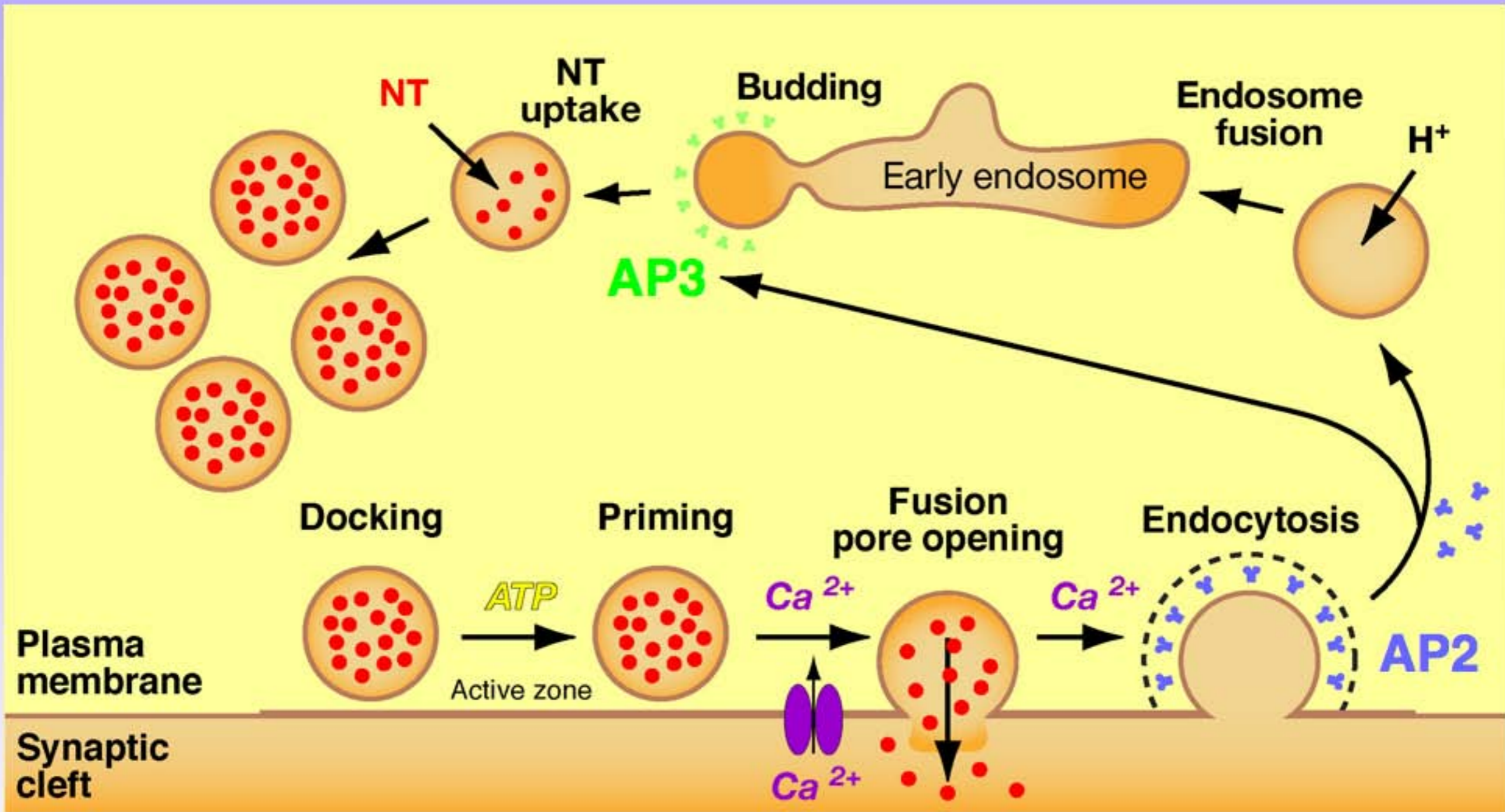


# Dissociation des SNARE par NSF





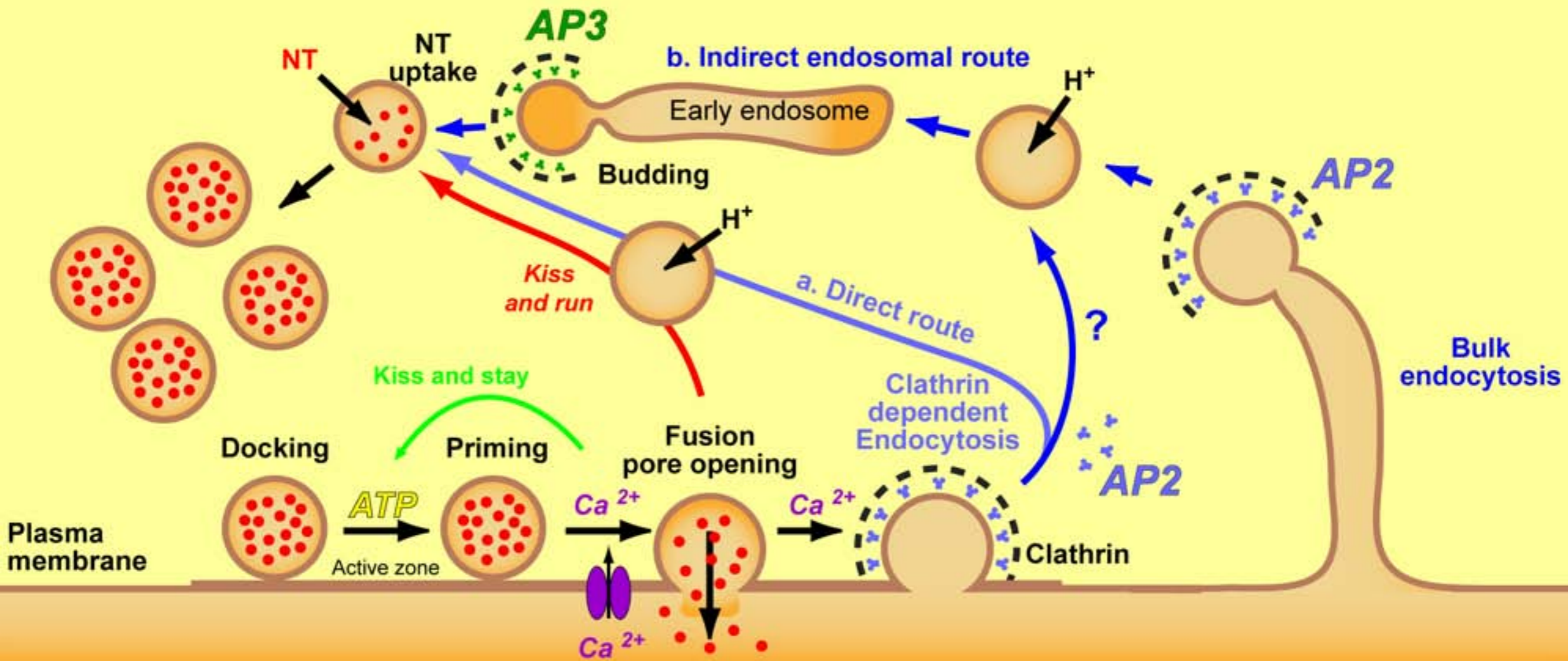
# Recyclage des vésicules synaptiques



Danglot & Galli, *Biology of the cell*, 2003.



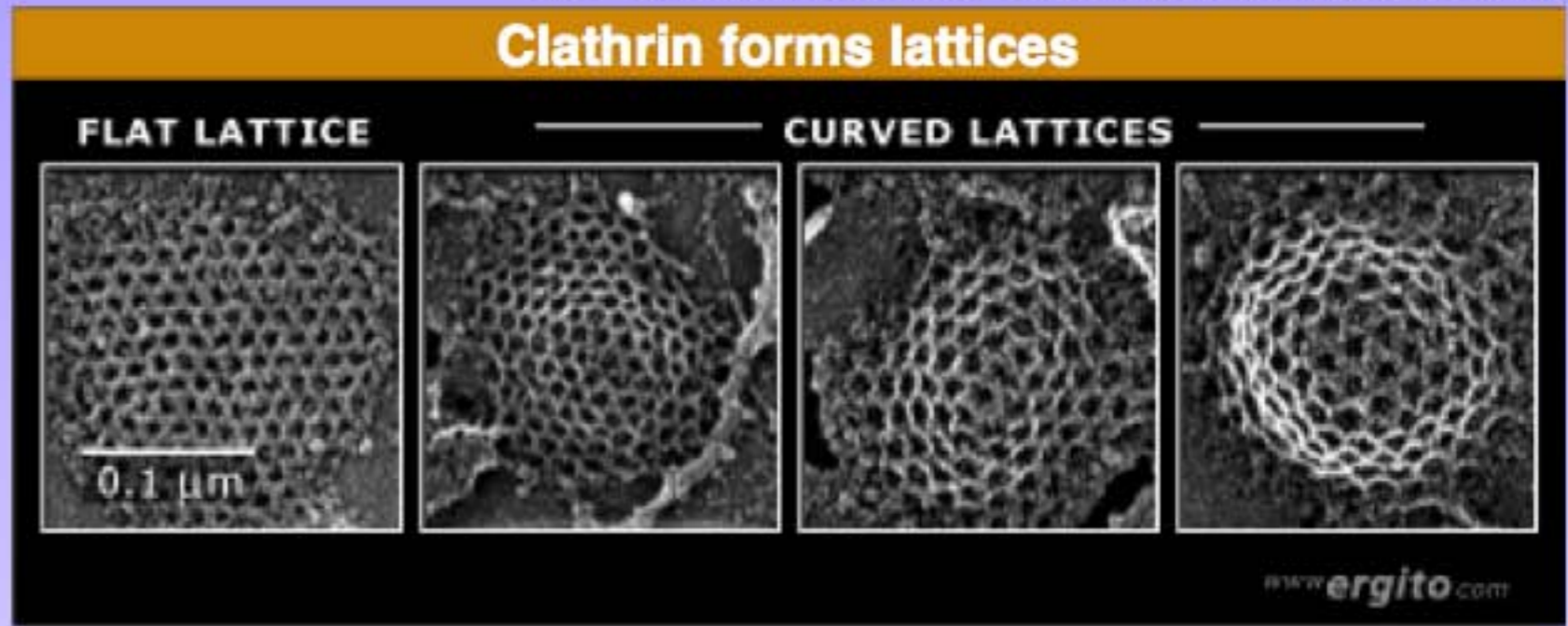
# Recyclage des vésicules synaptiques



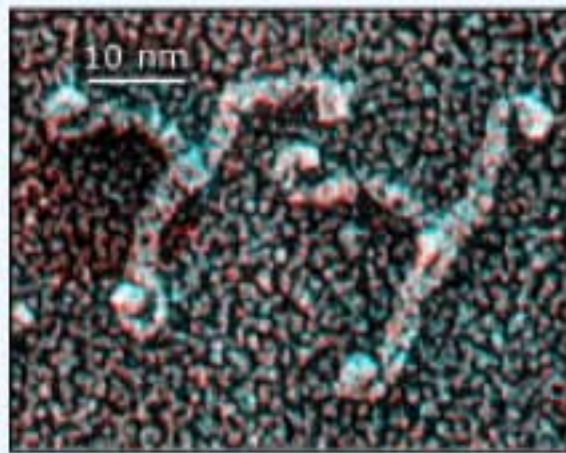


# Clathrine

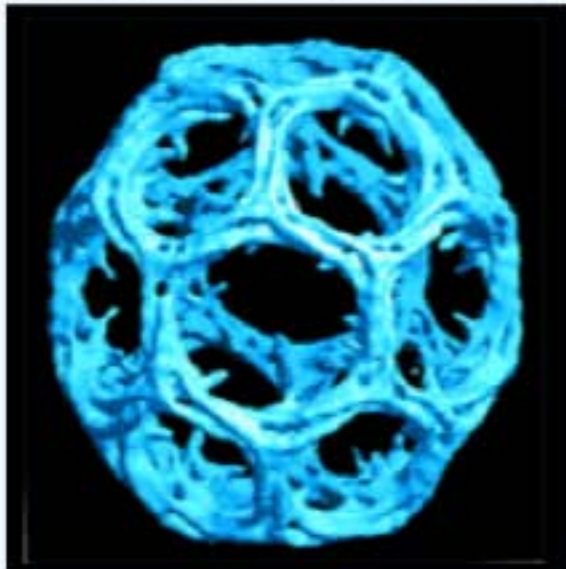
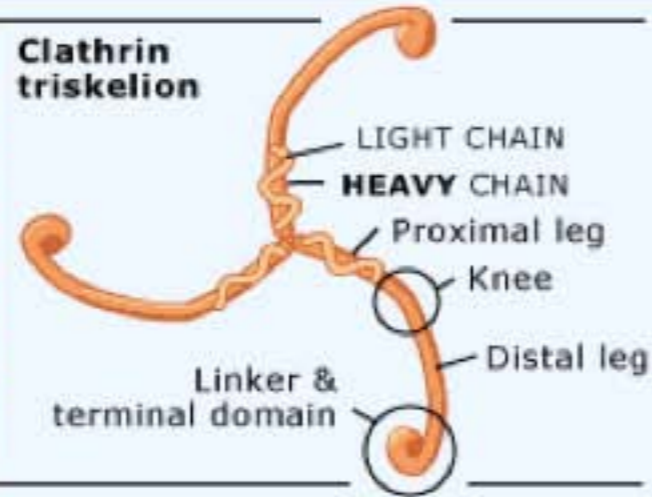
## Clathrin forms lattices



## Structure of clathrin



**Clathrin triskelion**

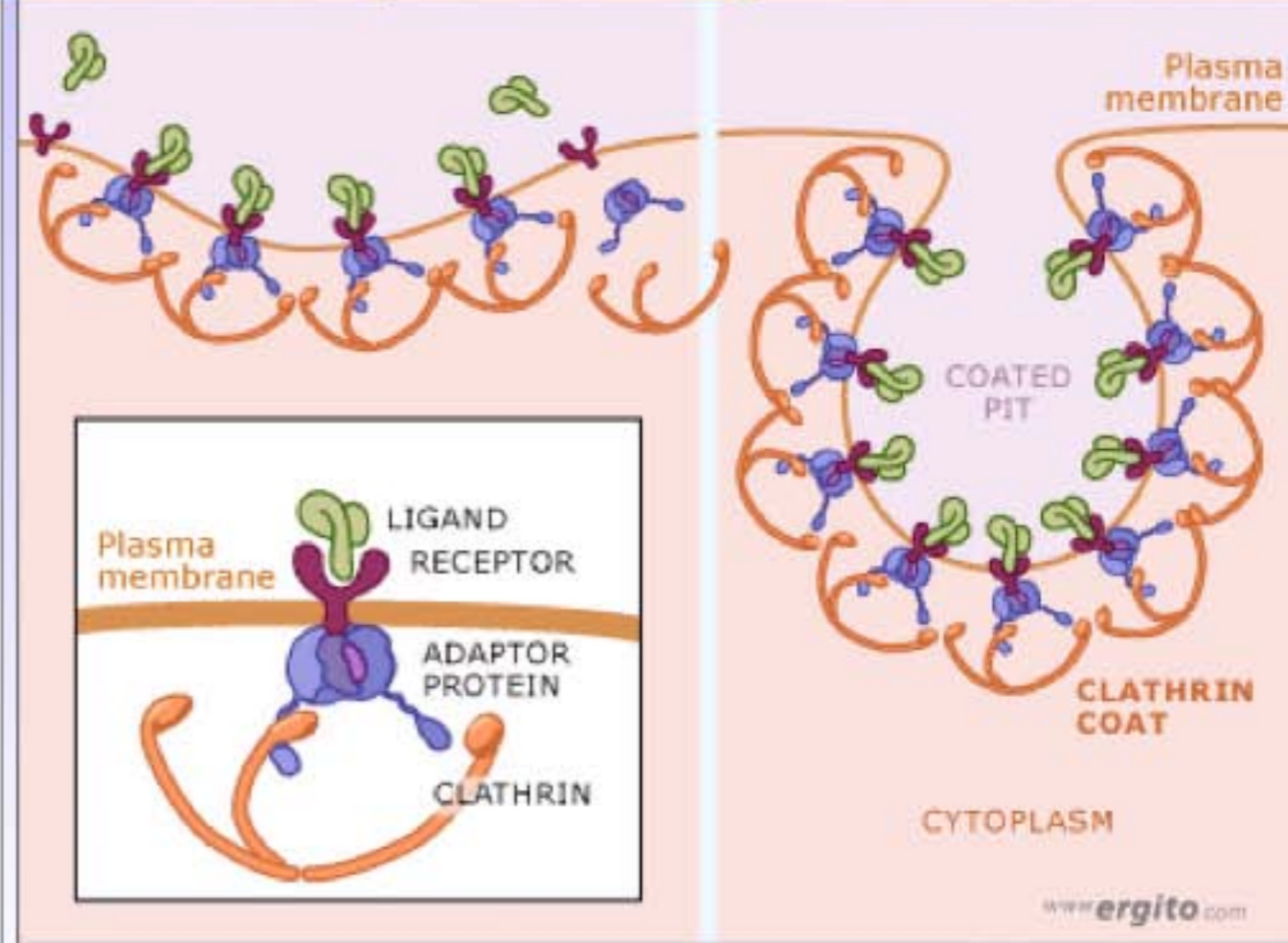


**Clathrin lattice**



www.ergito.com

## Adapters links cargo & clathrin



www.ergito.com/index.jsp

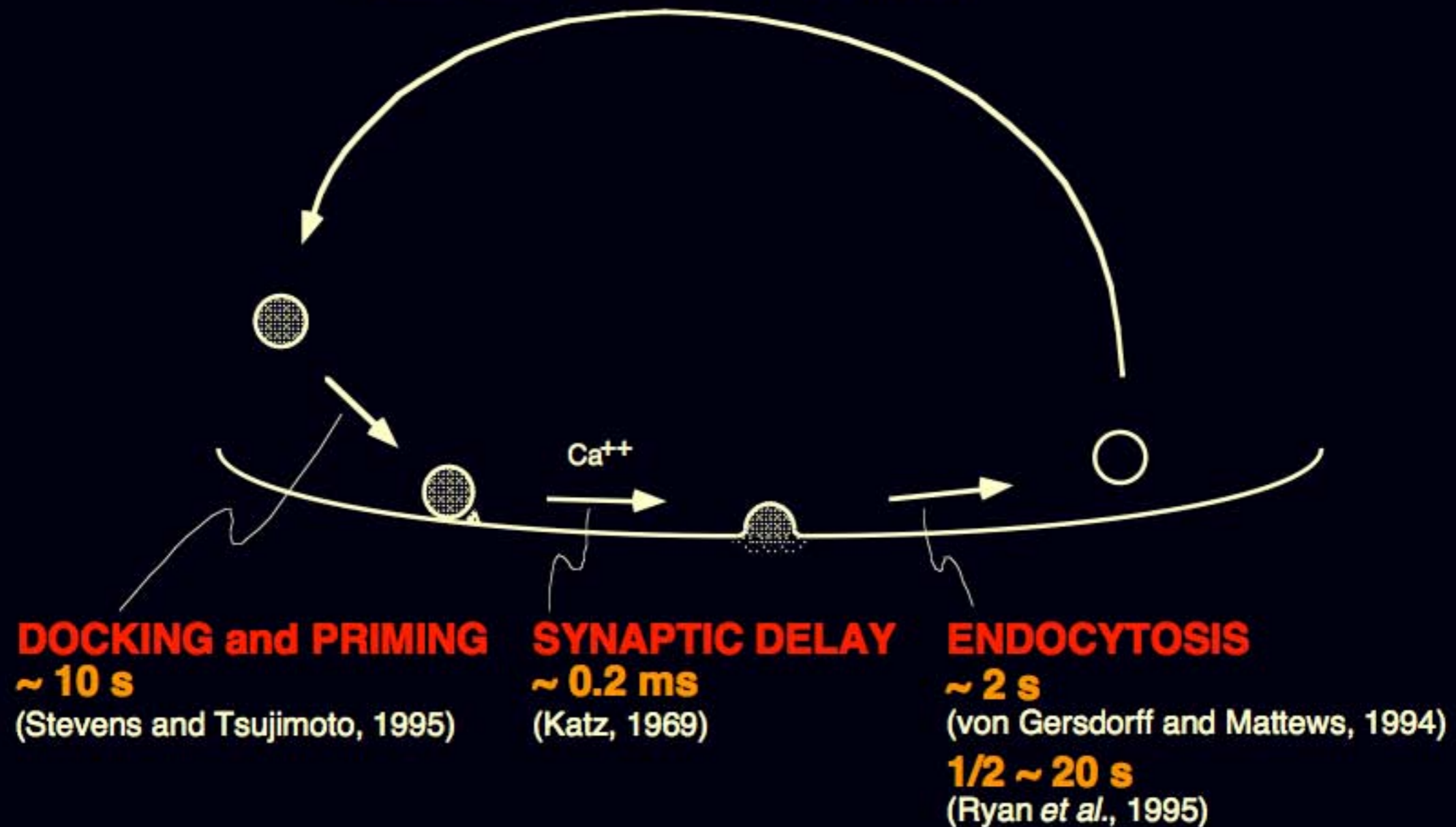


# Recyclage des vésicules synaptiques

## RECYCLING TIME

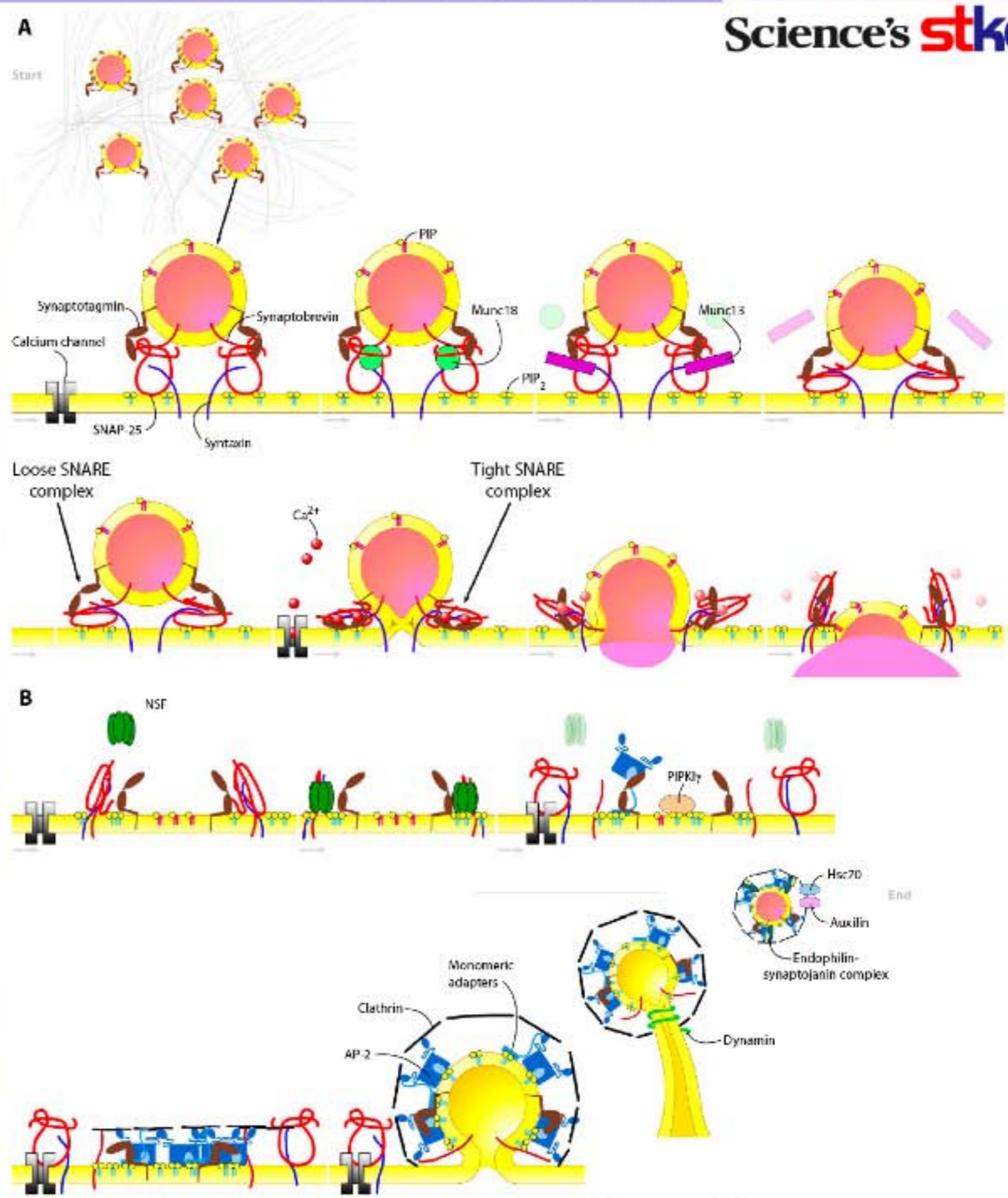
**less than 60 s**

(Betz and Bewick, 1993; Ryan *et al.*, 1995)





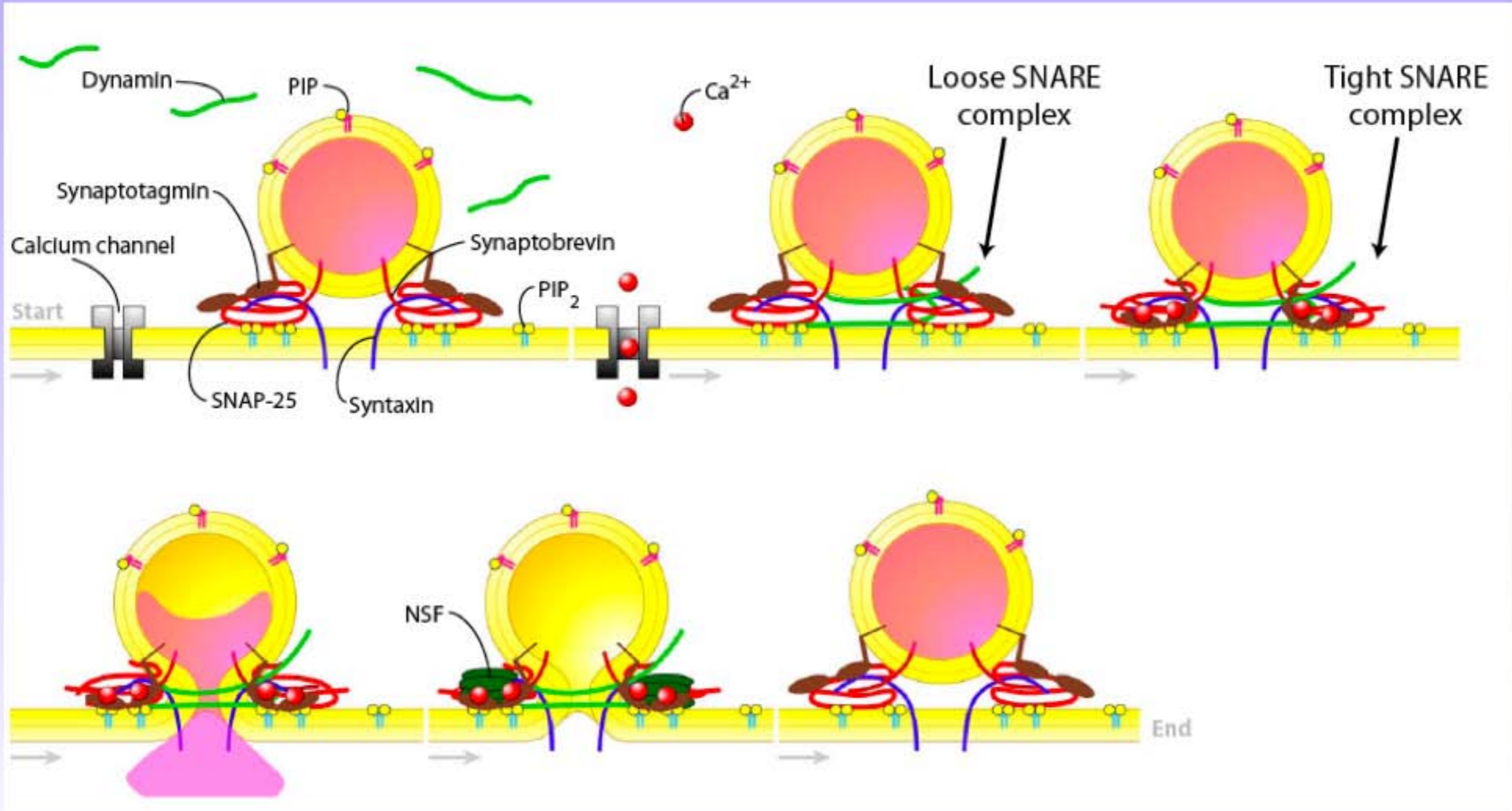
**Recyclage des Vésicules synaptiques:  
endocytose médiée par la clathrine  
(la voie lente)**



Thierry Galli<sup>1</sup> and Volker Haucke



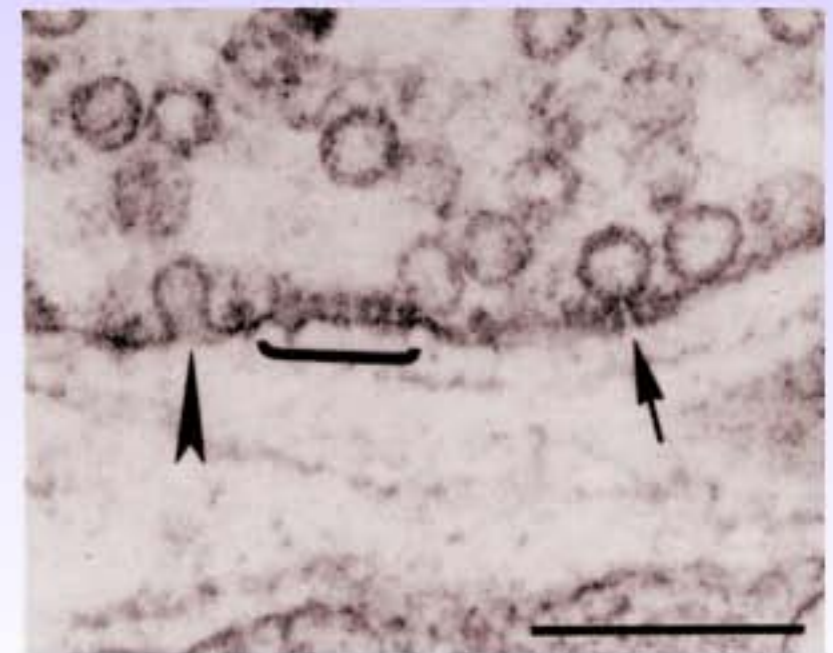
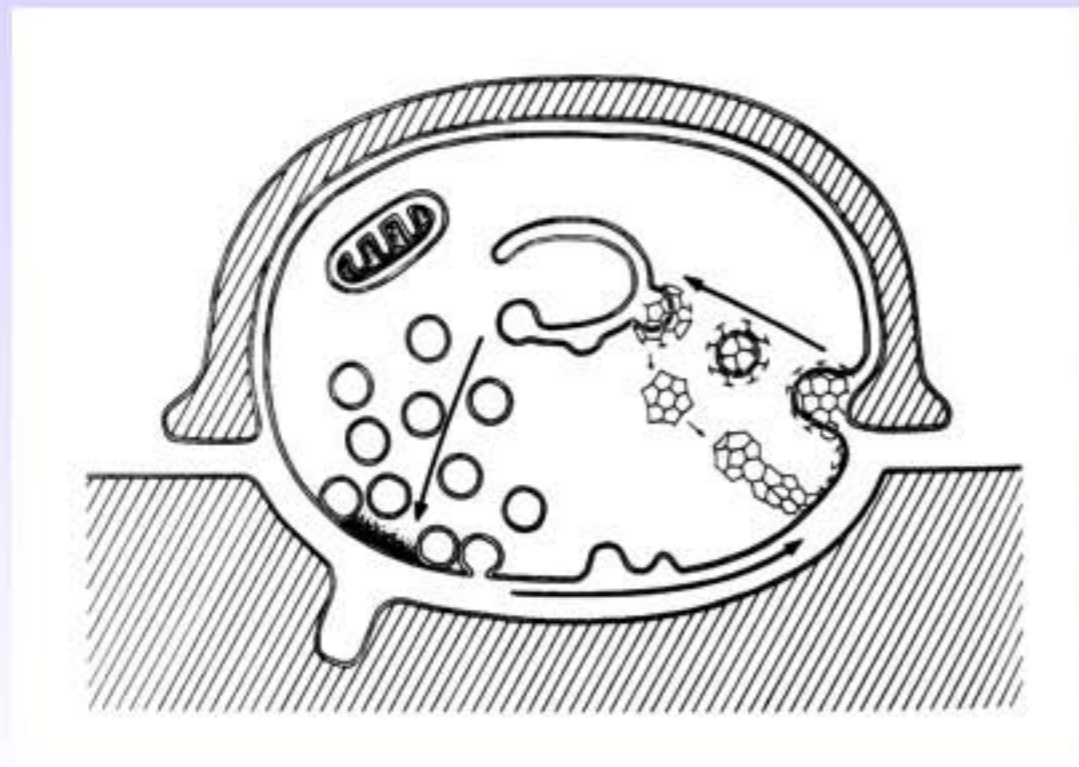
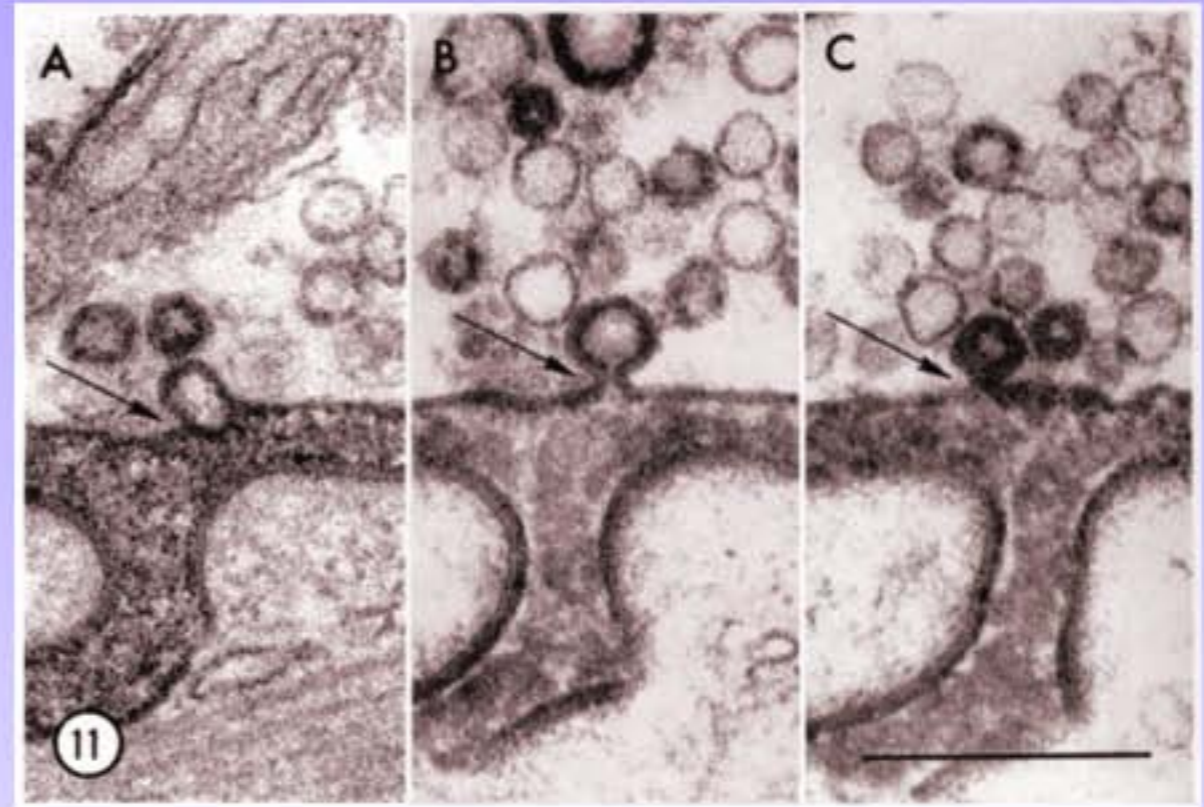
# Kiss and Run ?



Thierry Galli1 and Volker Haucke

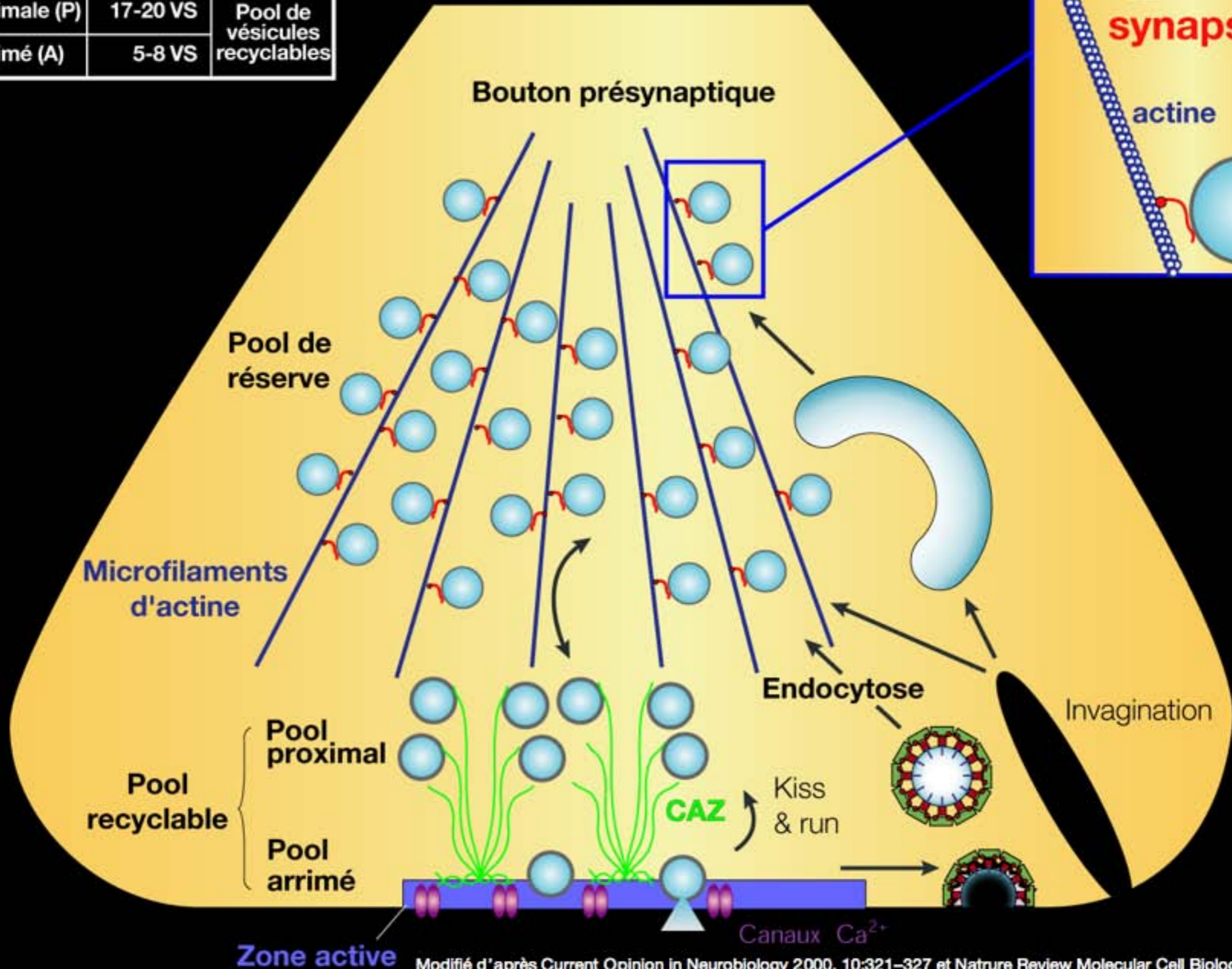
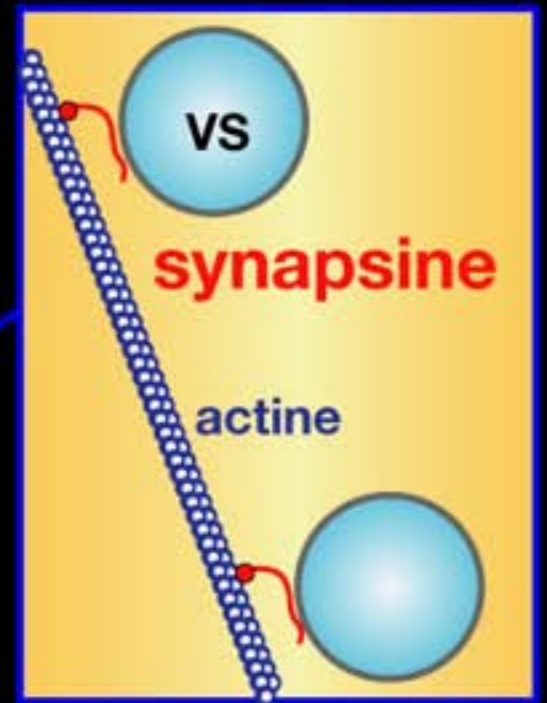


**Et en microscopie  
électronique ?**



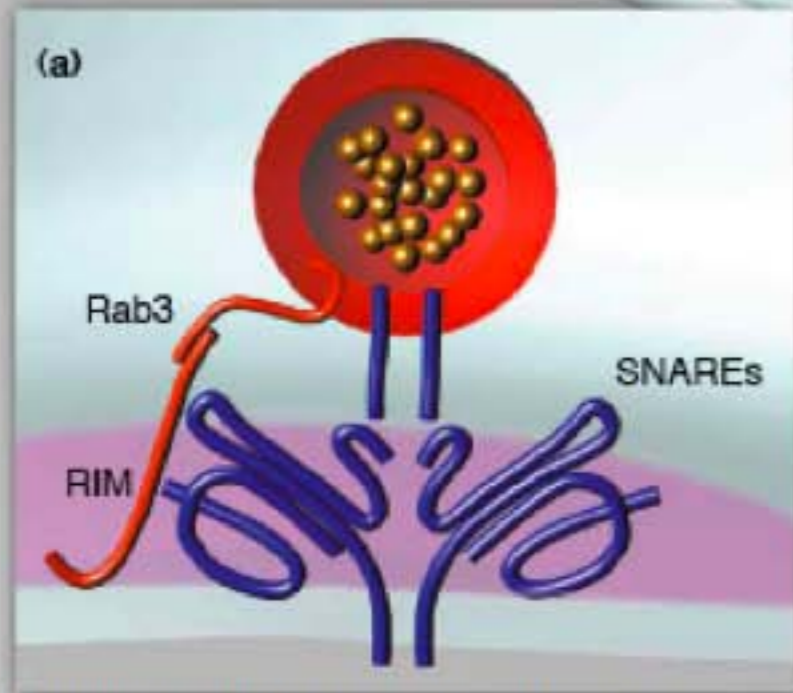


Type de pool	Nombre de vésicules	
de réserve (R)	180 VS	
proximale (P)	17-20 VS	Pool de vésicules recyclables
arrimé (A)	5-8 VS	

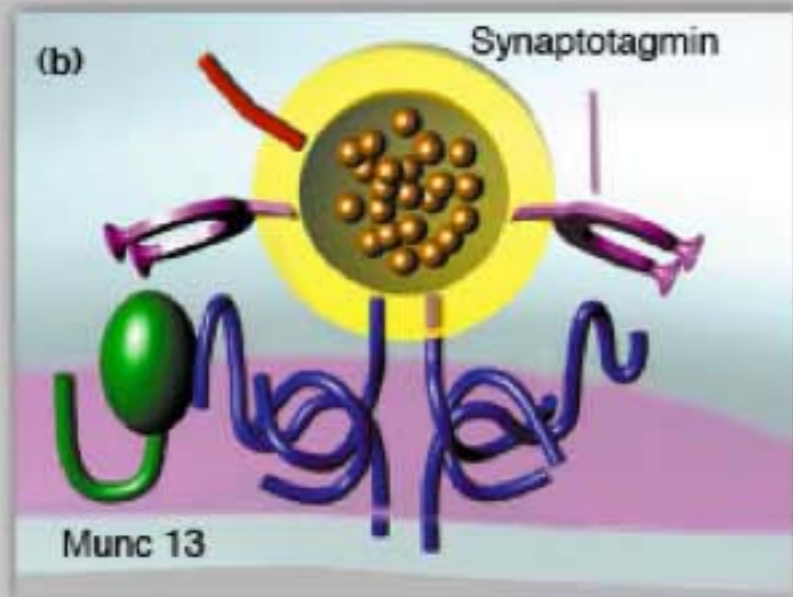




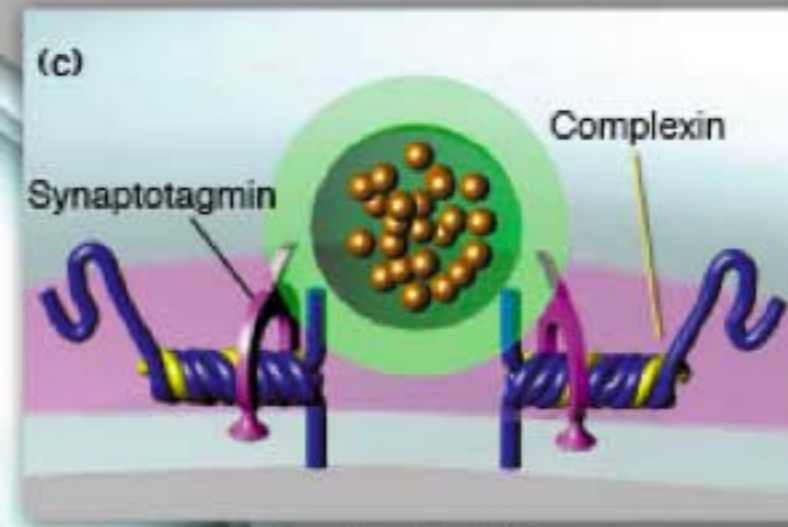
# Régulation de l'exocytose



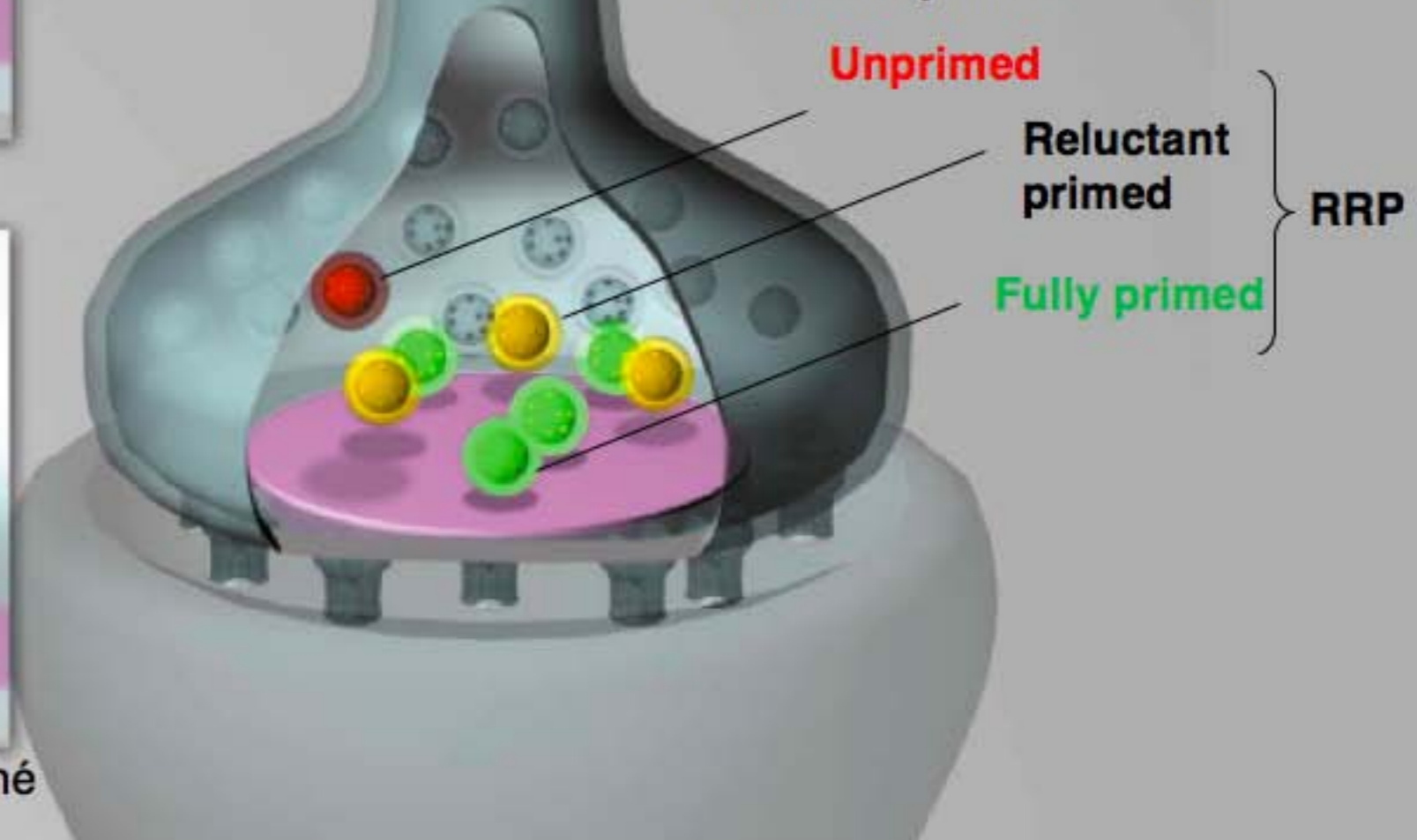
Docking-Initiation du priming



Priming- complexe SNARE relaché  
 Proba de libération: 1-2%  
 Libération asynchrone : 20 ms



Prete à fusionner- attente du  $Ca^{2+}$   
 Proba de libération: 12-14%  
 Libération synchrone : 2 ms





# Comment mesurer l'exocytose ?

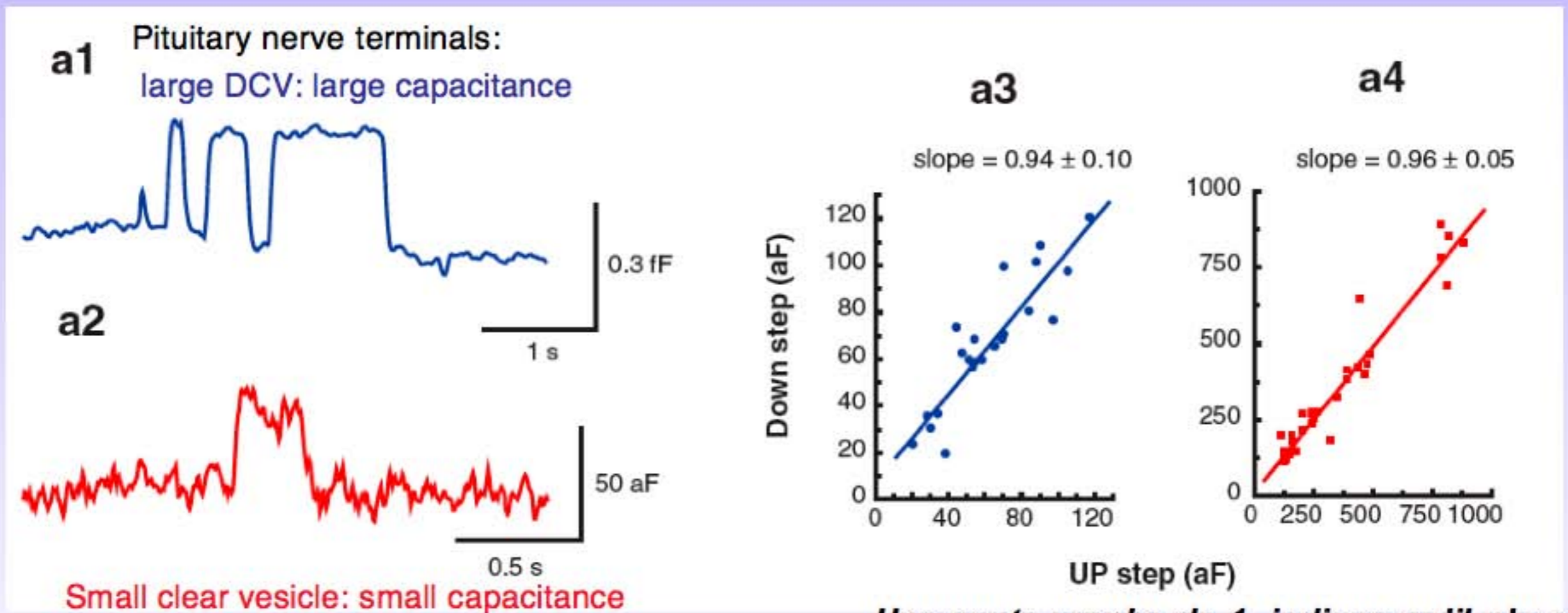
## 1) Capacitance:

La mesure de la capacitance de la cellule est proportionnelle à la surface de la membrane.

L'enregistrement de la capacitance permet de mesurer l'addition de membrane provoquée lors d'un évènement de fusion membranaire.

Cellules chromaffines (medullosurrénales): la fusion d'une vésicules produit une augmentation de la capacitance de 1fF (Neher, PNAS 1982).

Mastocytes : ont des vésicules + larges: augmentation de 16fF



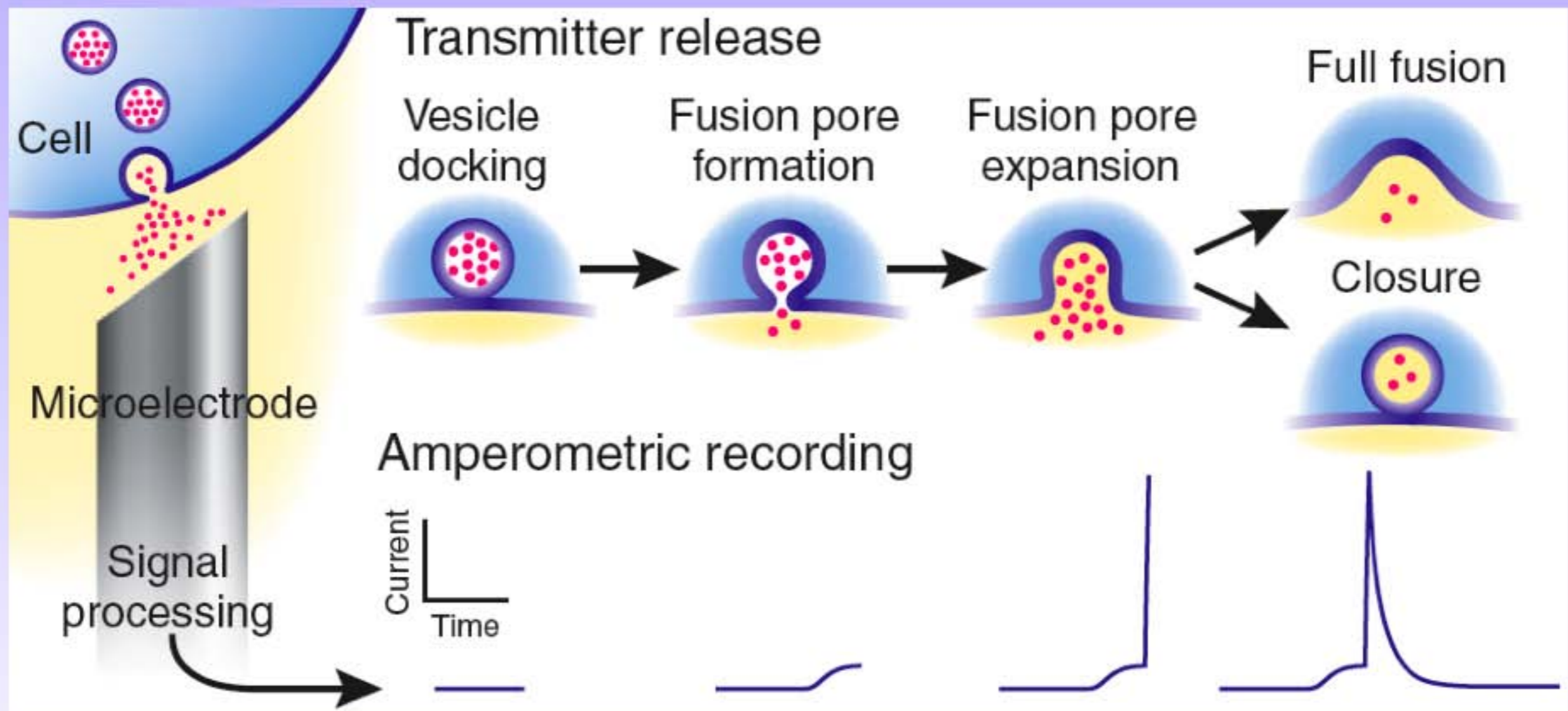
**Une pente proche de 1, indique qu'il n'y a pas de transfert de membrane et indique plutôt un événement de type kiss-and-run.**



# Comment mesurer l'exocytose ?

## 2) L'ampérométrie à fibre de carbone (5-10 microns de diamètre):

On stimule les cellules par une dépolarisation. La cellule sécrète alors des molécules. En présence d'un potentiel approprié, les molécules (catécholamines, indolamines) sécrétées s'oxydent et libèrent des électrons. La mesure du courant d'oxydation donne accès à la quantité de molécules sécrétées par événement unitaire d'exocytose.



**Cellules mesurées:** cellules chromaffines (noradrénaline, adrénaline), mastocytes (histamines, serotoninines), et cellules  $\beta$  du pancreas (insuline).

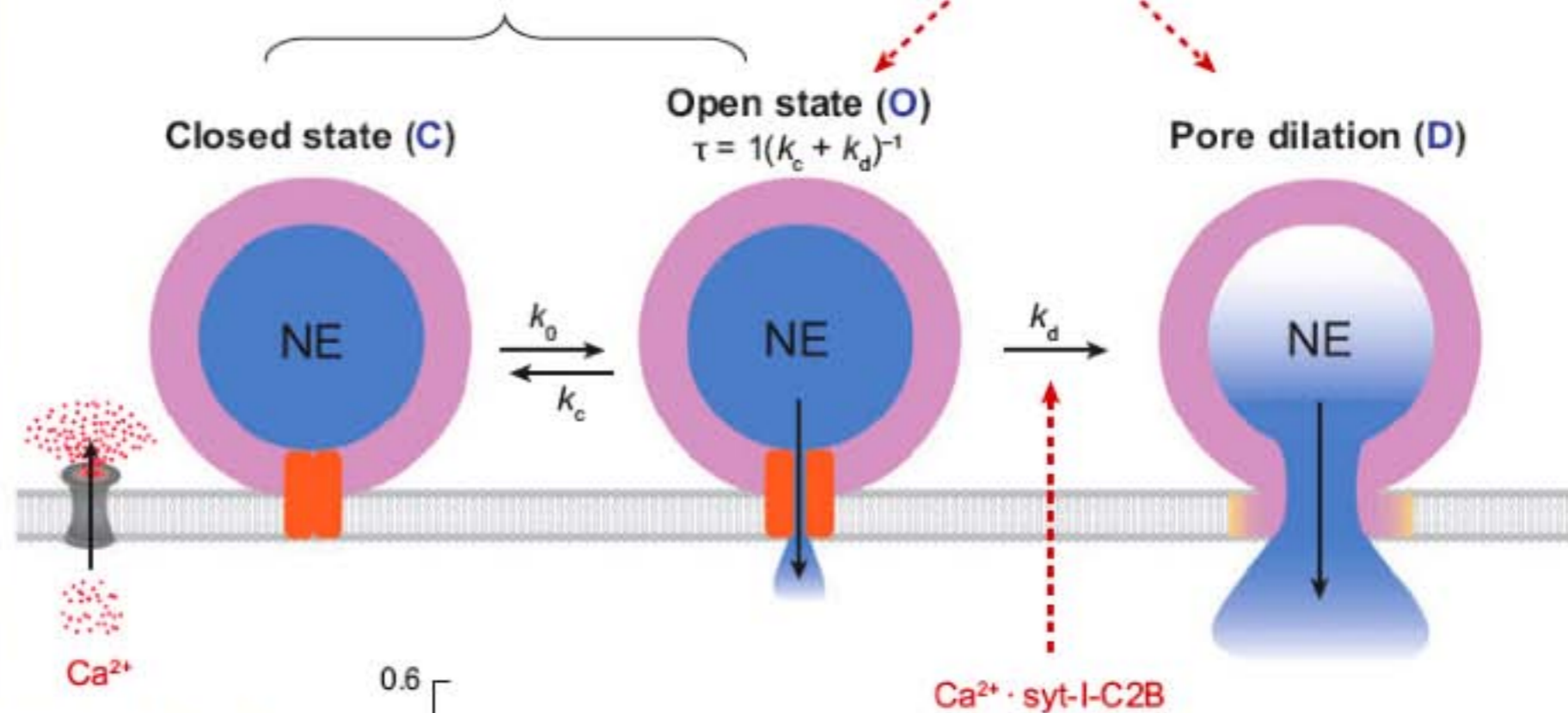
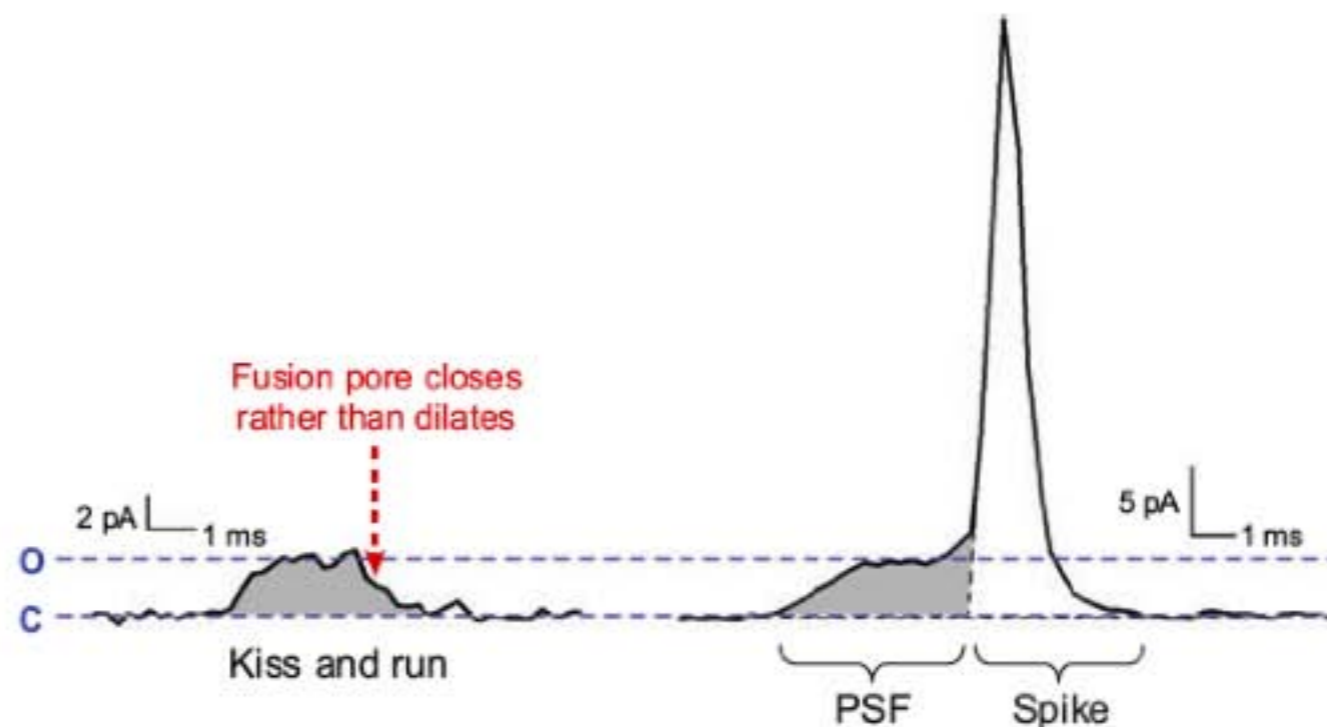
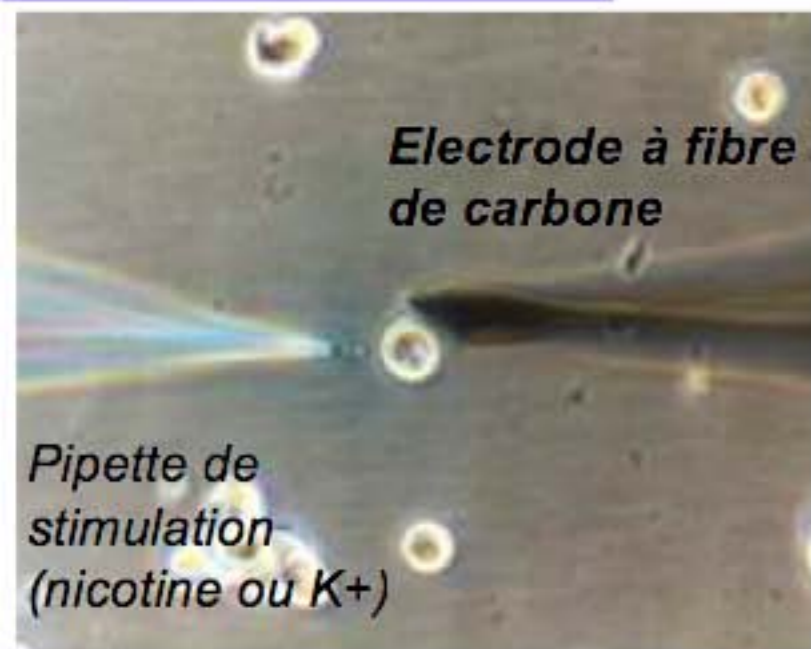
**Résolution temporelle:**  $<1\text{ms}$

**Sensibilité de détection:** quelques milliers de molécules (Chen et al., 1994)



# Comment mesurer l'exocytose ?

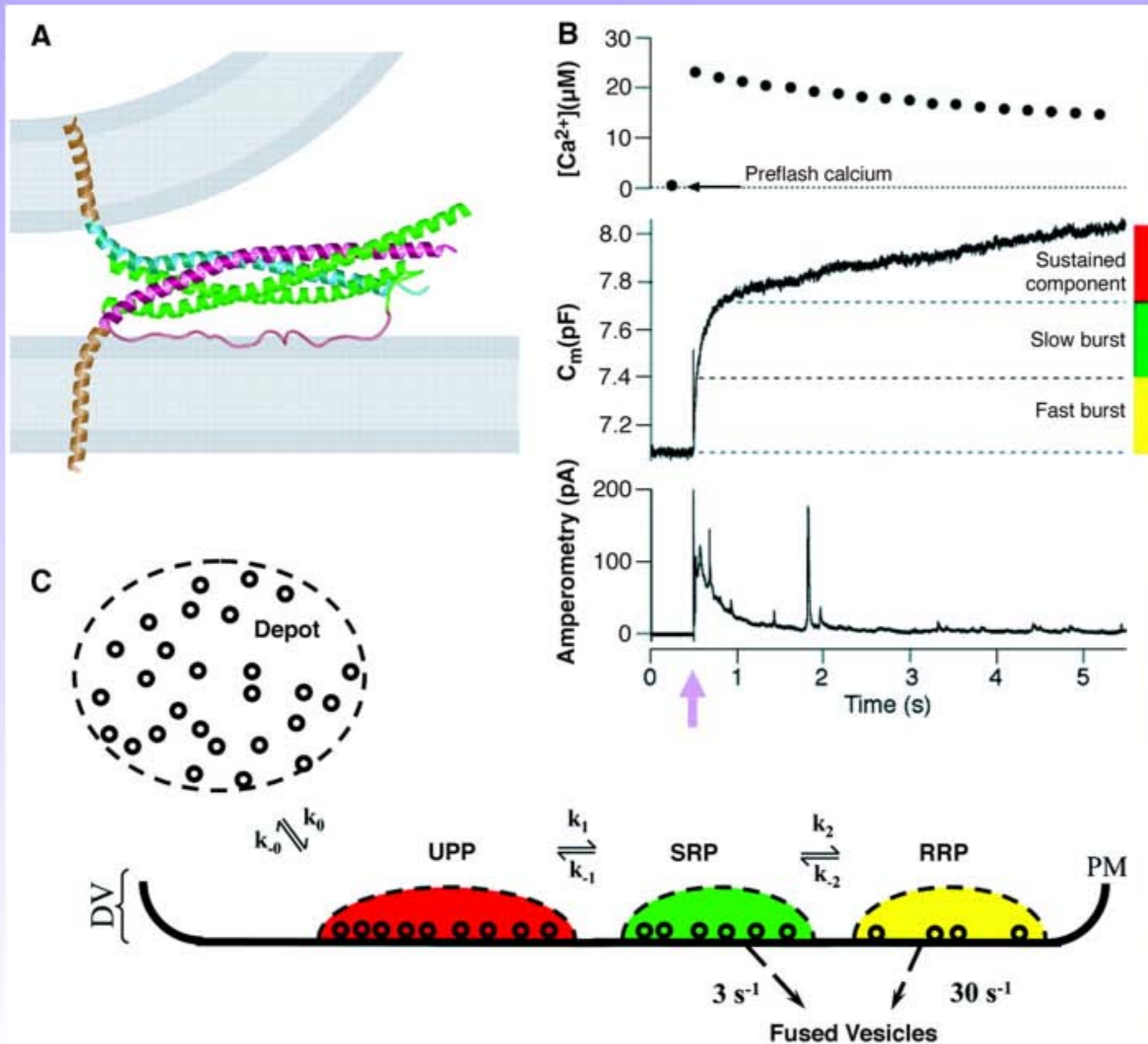
## 2) L'ampérométrie à fibre de carbone:



Ex: Syt1 prolonge le PSF, Syt4 le diminue.



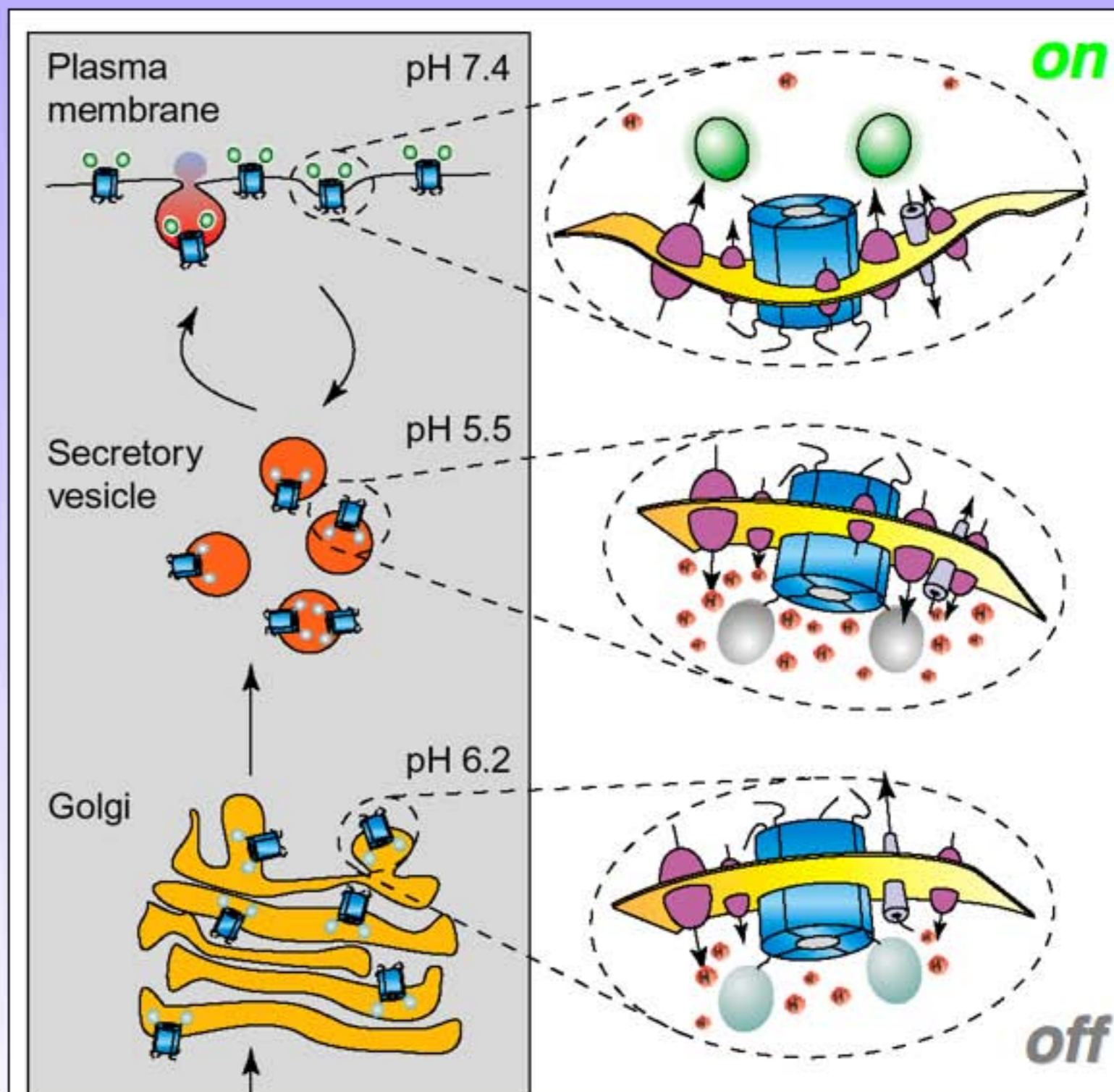
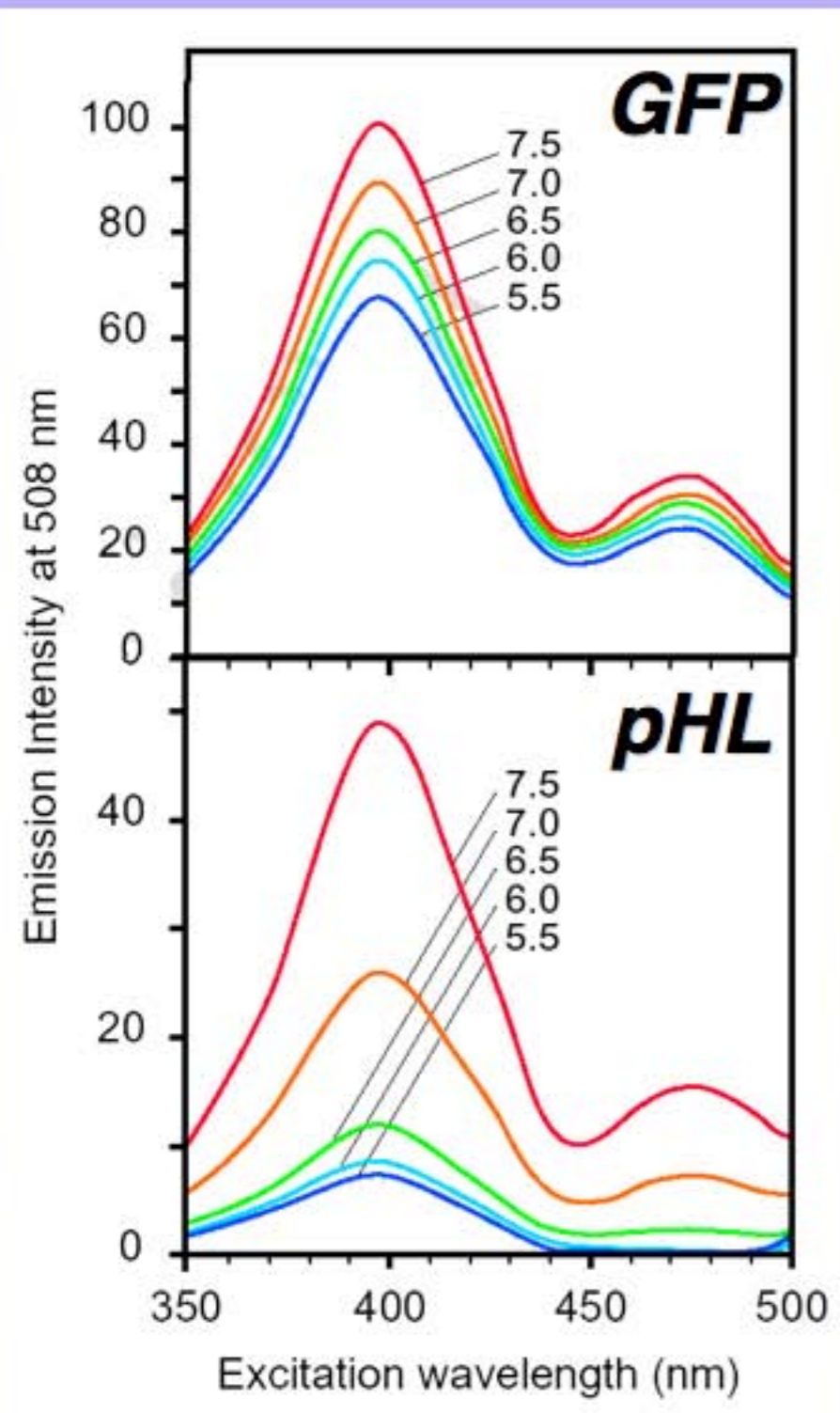
# Réserve, Amorçage, Fusion





# Comment mesurer l'exocytose ?

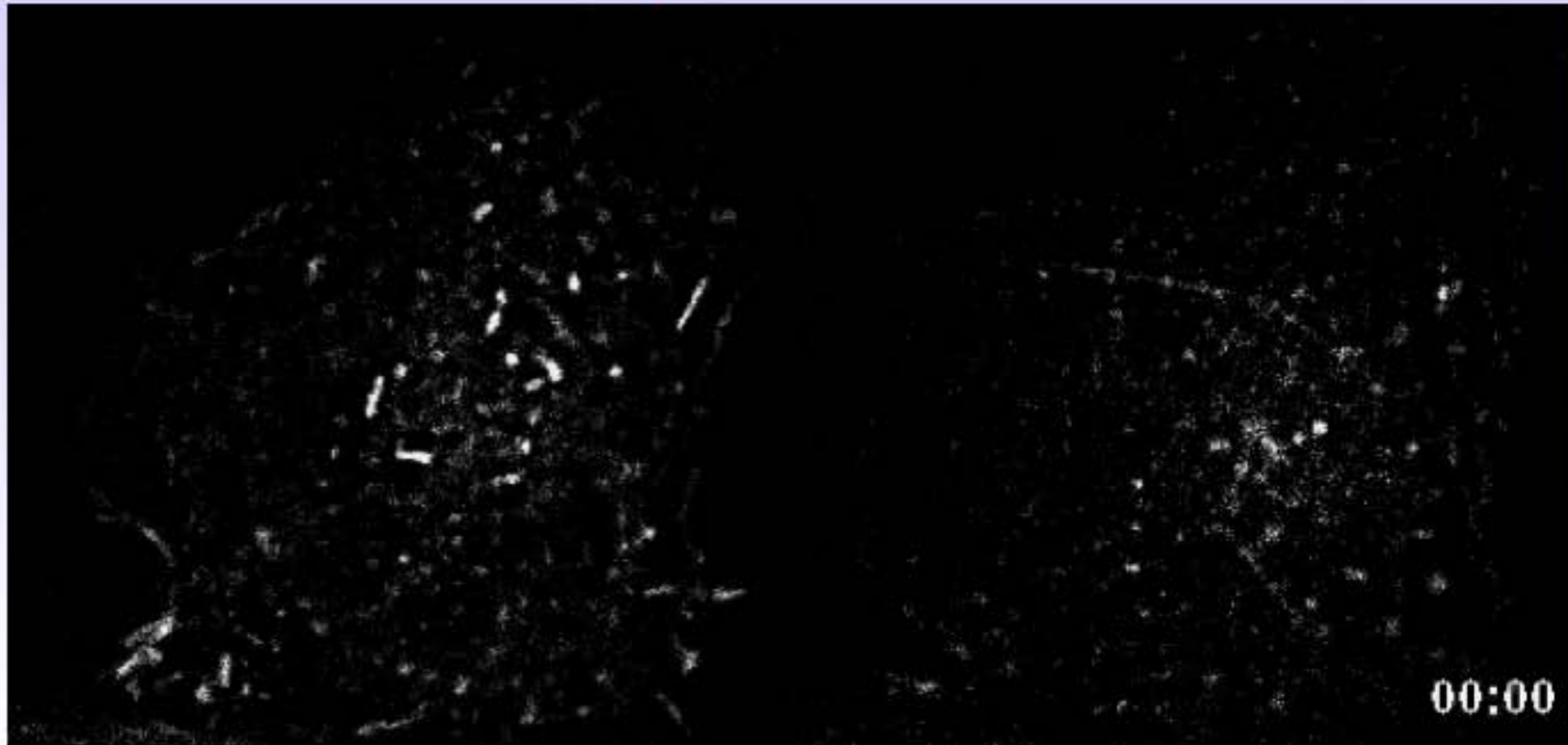
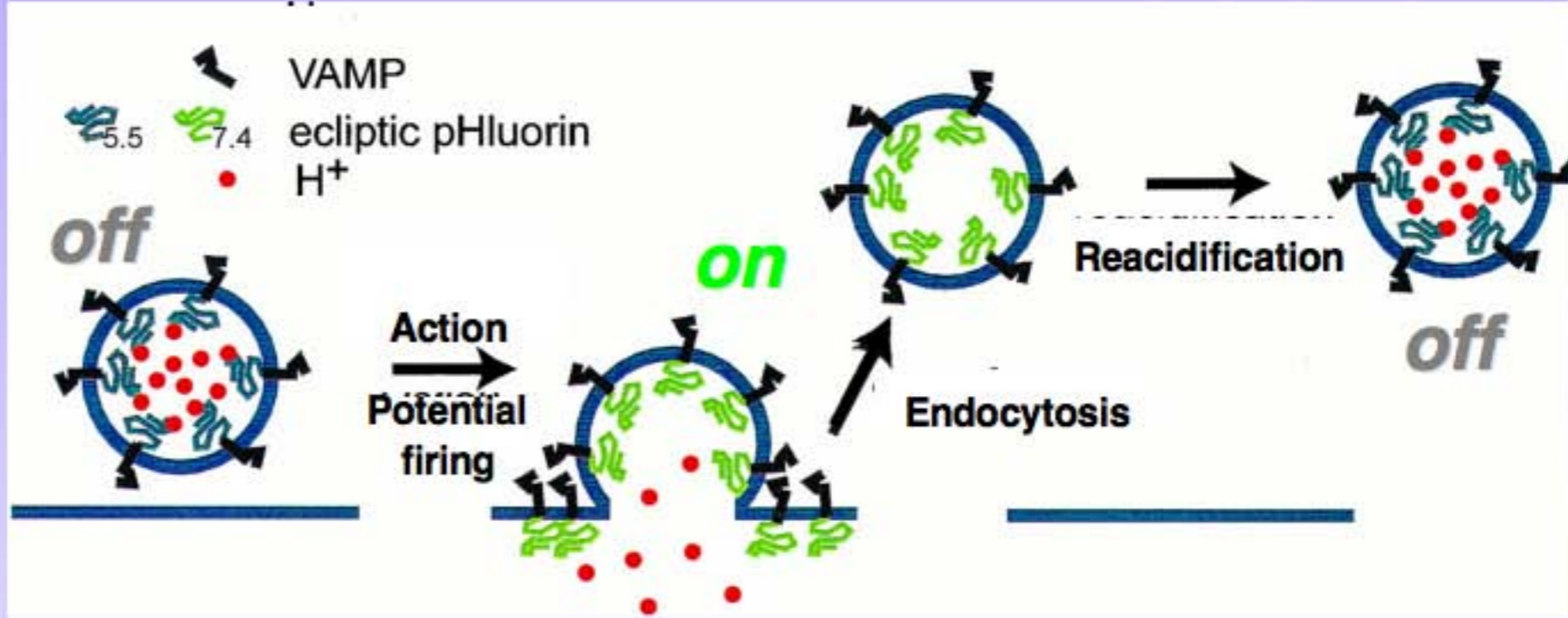
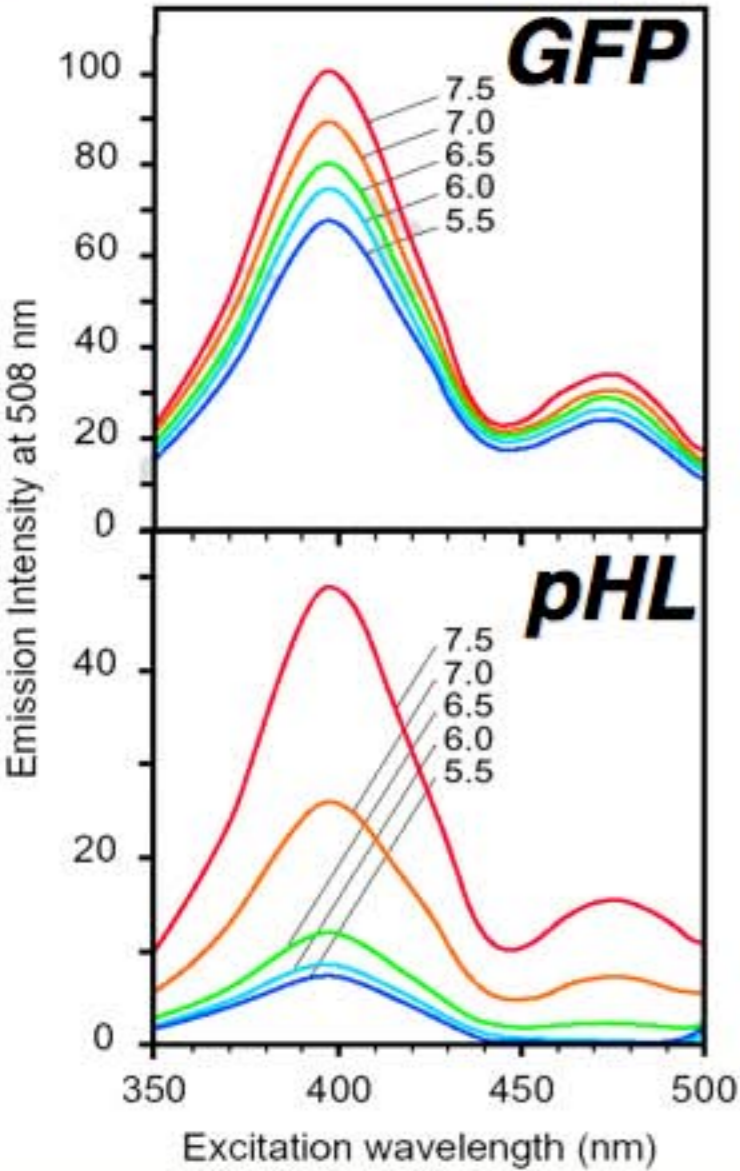
## 3) Mesure de fluorescence avec la GFP sensible au pH : la pHLuorin





# Comment mesurer l'exocytose ?

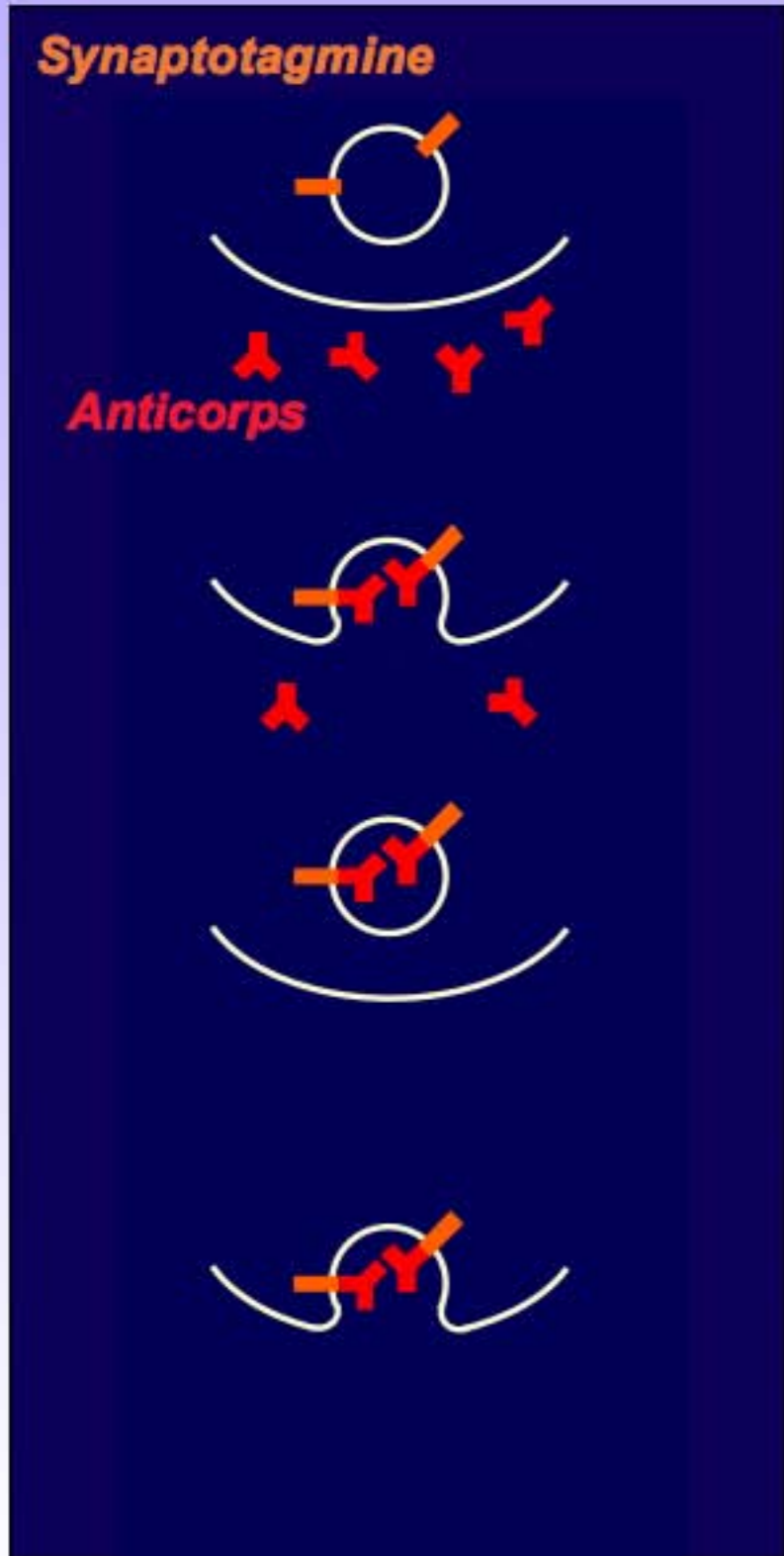
## 3) Mesure de fluorescence avec la GFP sensible au pH : la pHluorin





# Comment mesurer le recyclage ?

## 1) L'utilisation d'anticorps anti-synaptotagmine



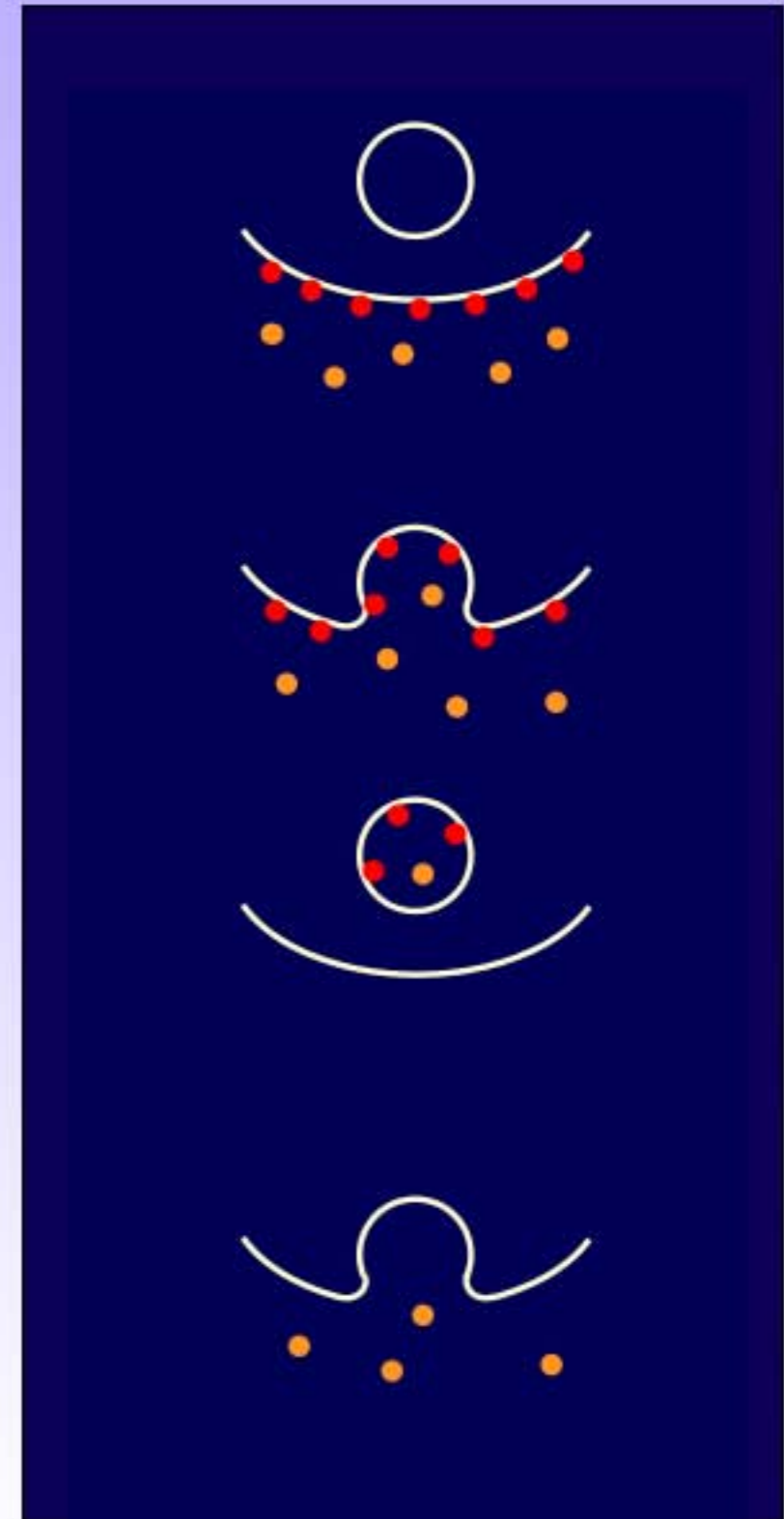
**Incubation  
avec anticorps  
ou sonde**

**Endocytose**

**Vésicules  
chargées**

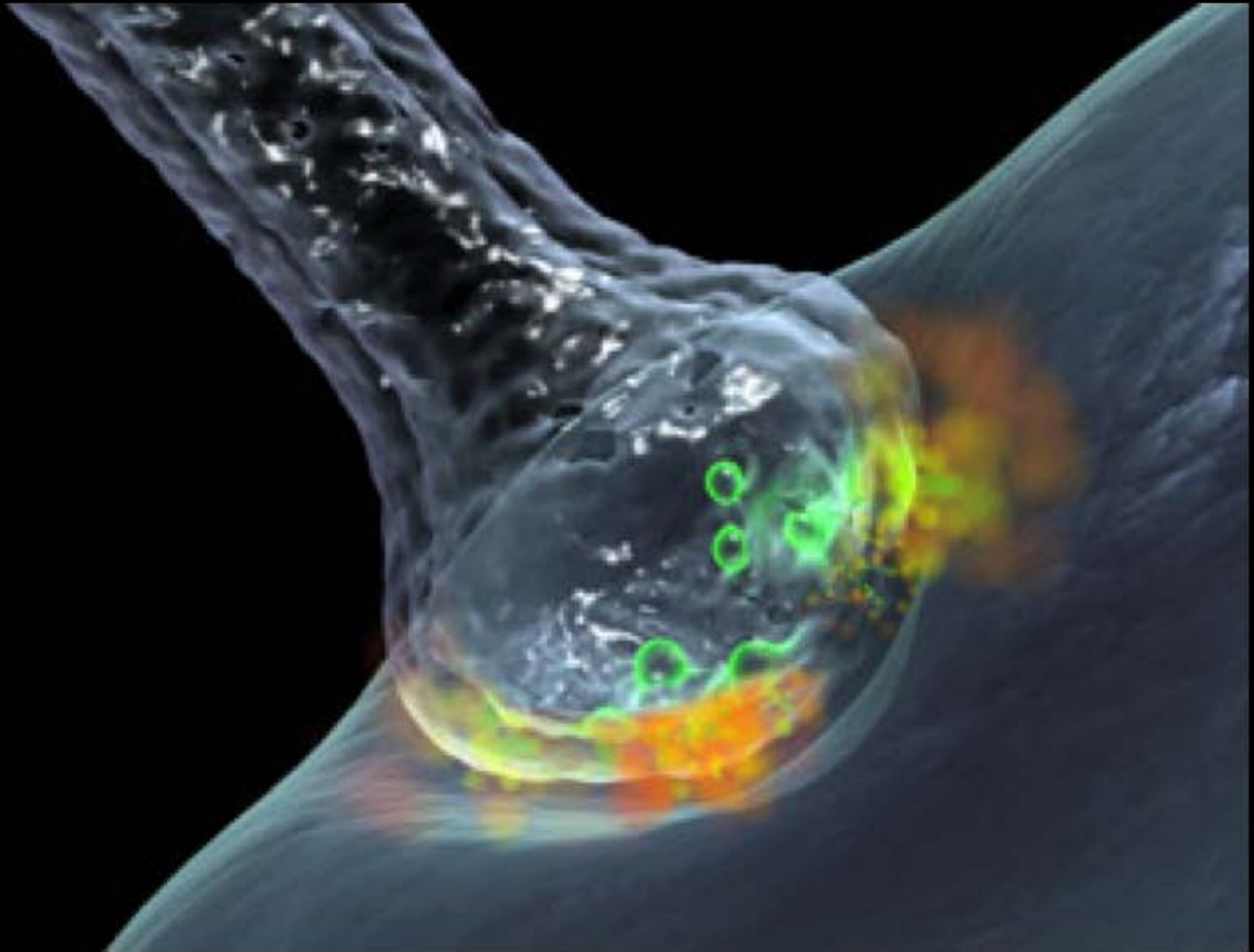
**Exocytose**

## 2) L'utilisation de sondes fluorescentes (FM Dyes)





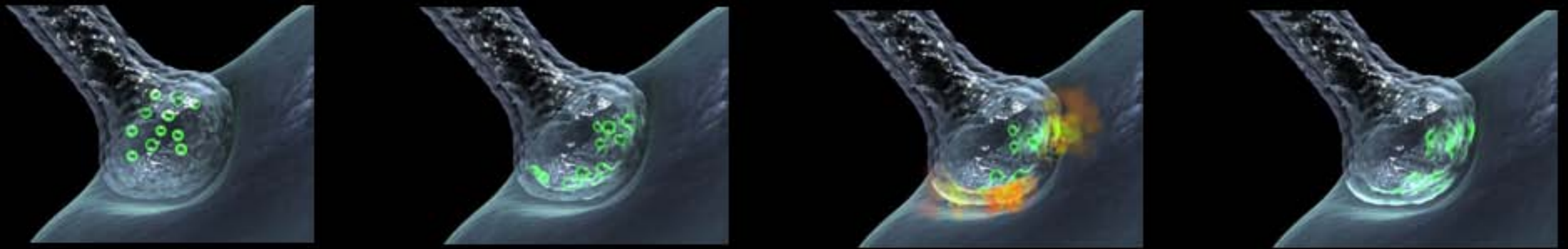
# *Neuronal transmission: exocytosis*





# Neuronal transmission: exocytosis

ENS - Master1 Neurobiologie  
Lydia Danglot - Machinerie d'exocytose



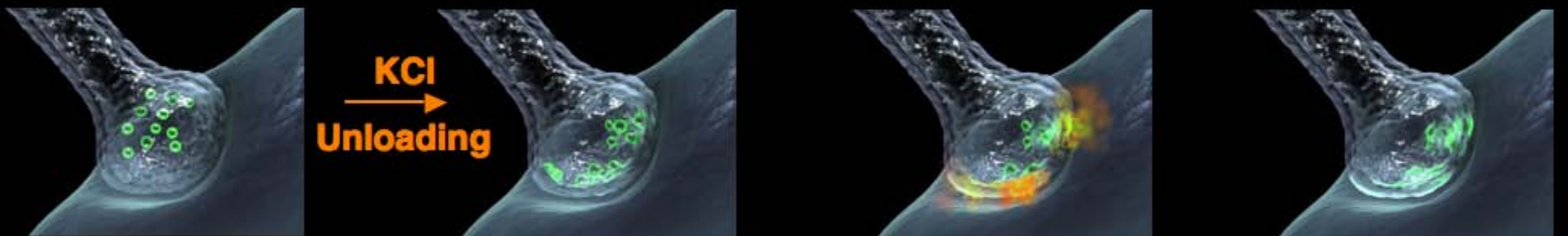
## FM experiments

### 1. Loading of fluorescent dyes



Zero  $\text{Ca}^{2+}$ : block ExoC

### 2. Measurement of the unloading of FM dyes





## Basic properties of the FM dyes

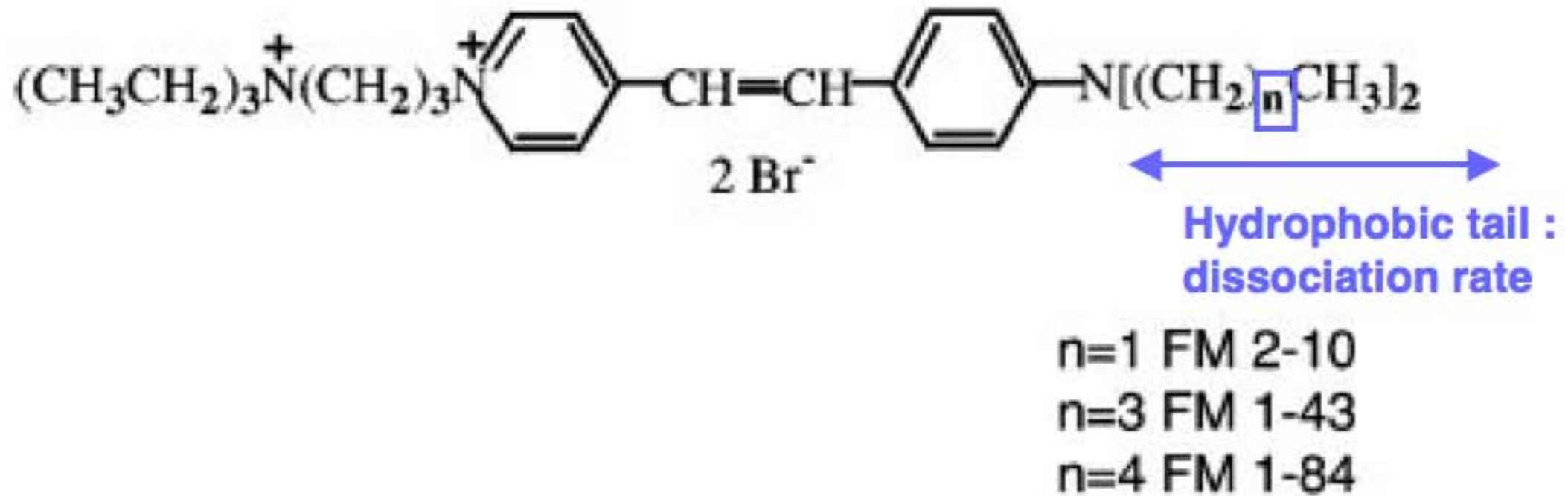
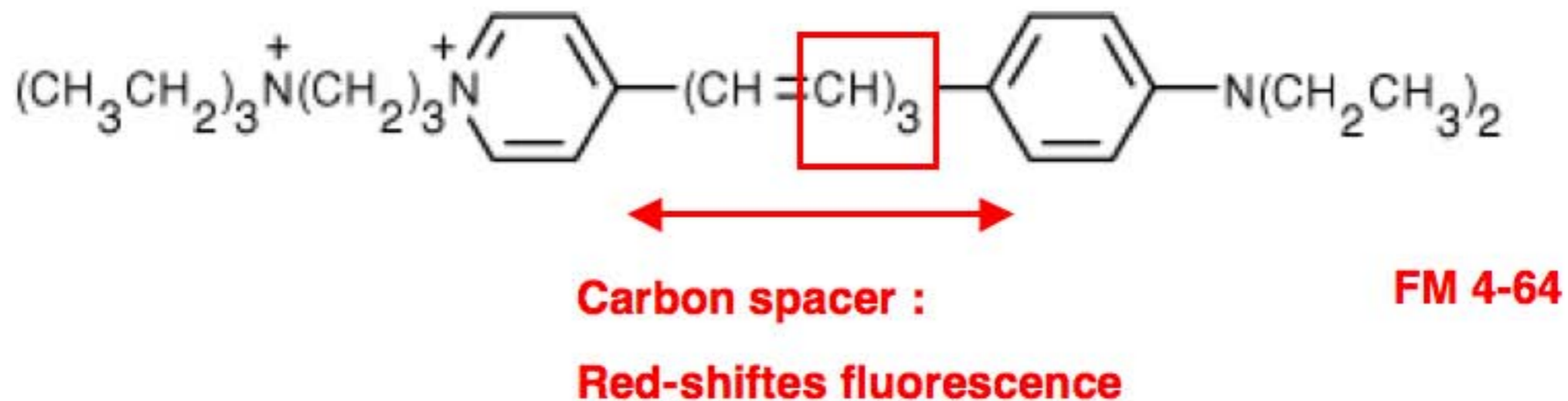


FIG. 1. Chemical structures of FM 2-10, FM 1-43, and FM 1-84.





# Basic properties of the FM dyes

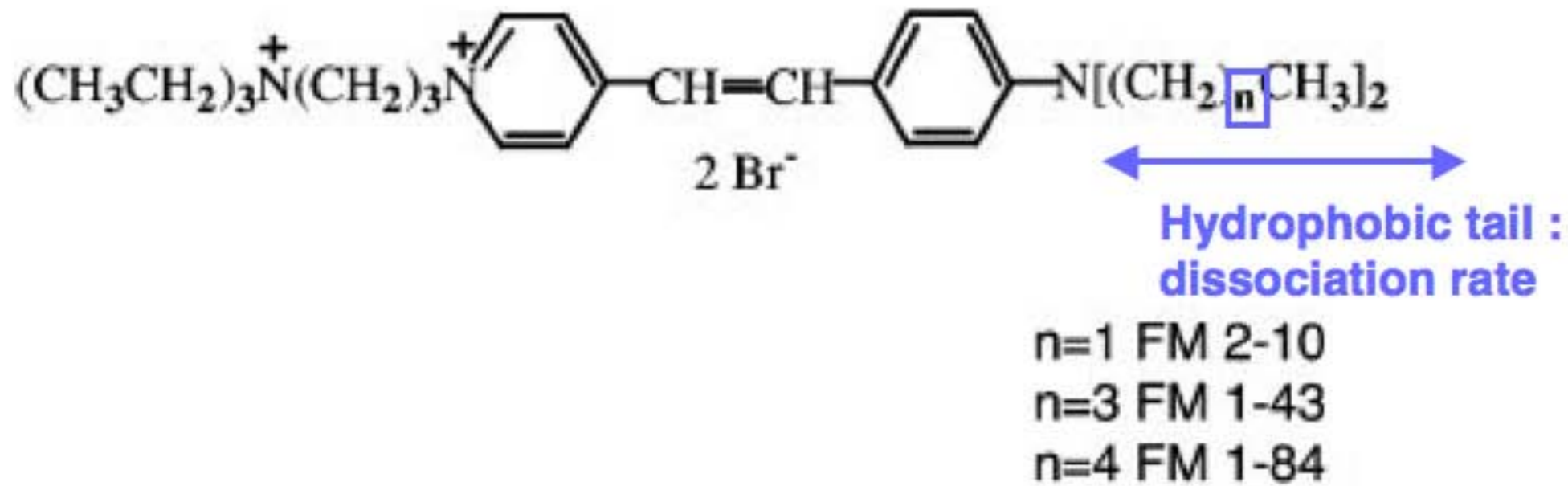
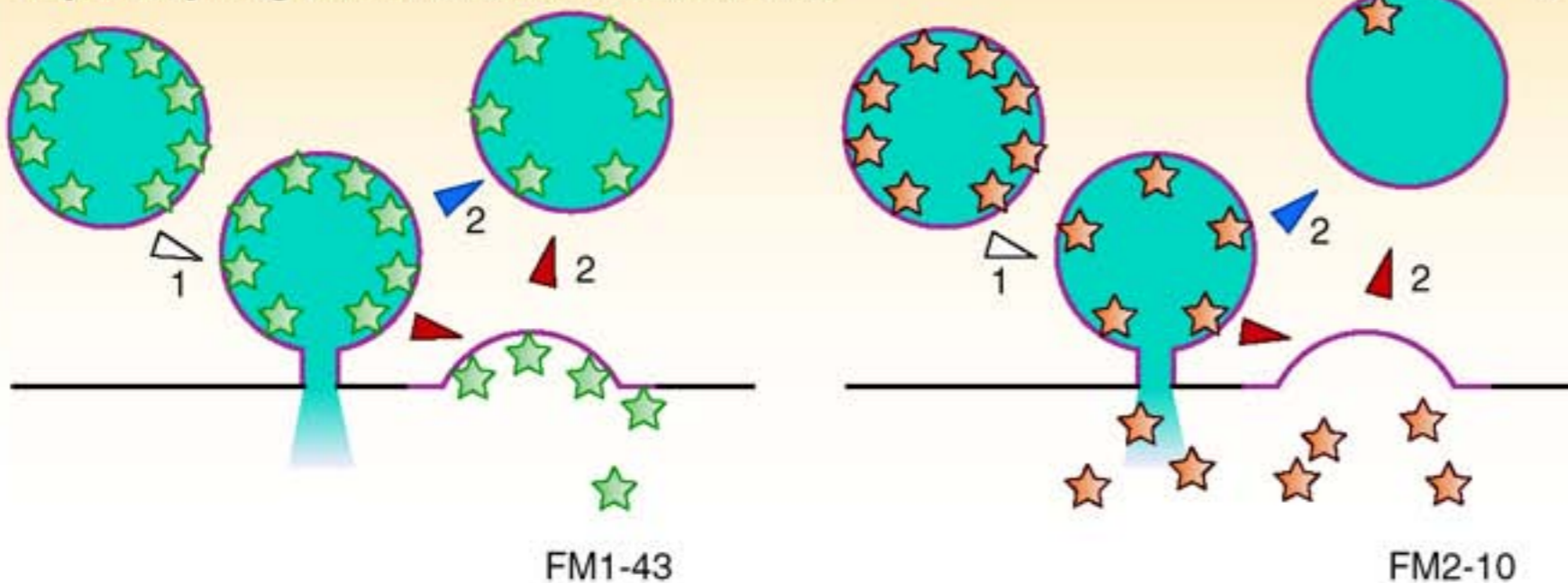


FIG. 1. Chemical structures of FM 2-10, FM 1-43, and FM 1-84.

NATURE CELL BIOLOGY | VOL 4 | NOVEMBER 2002 |

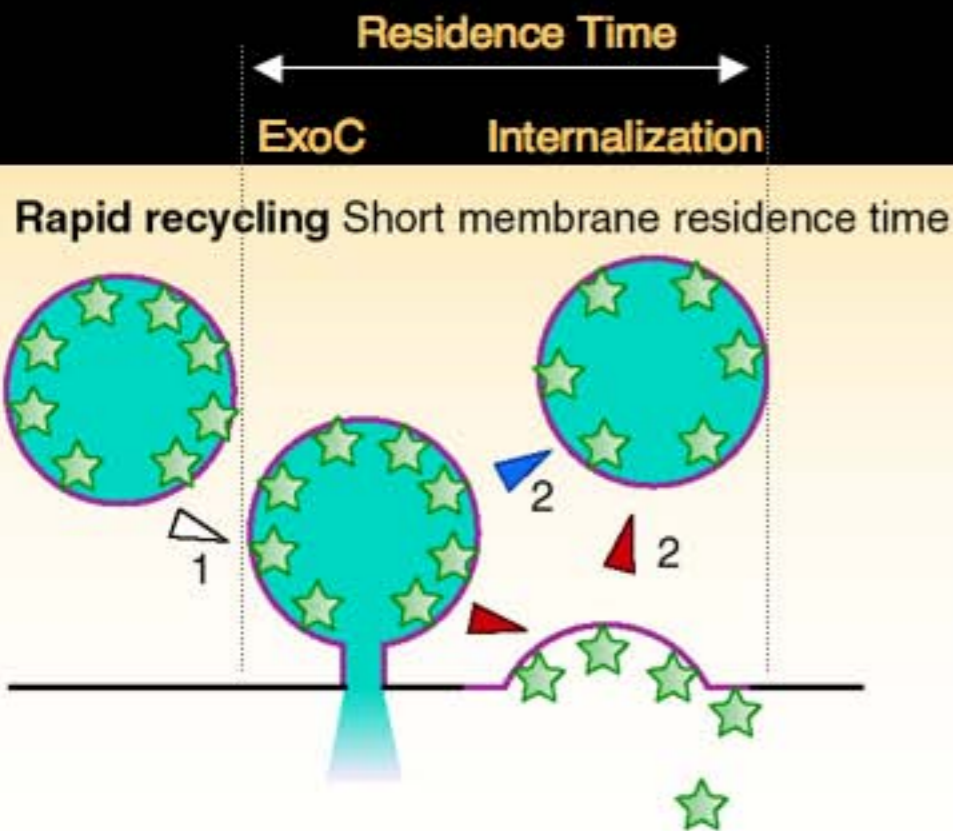
Rapid recycling Short membrane residence time



**FM2-10 is faster  
than FM1-43**

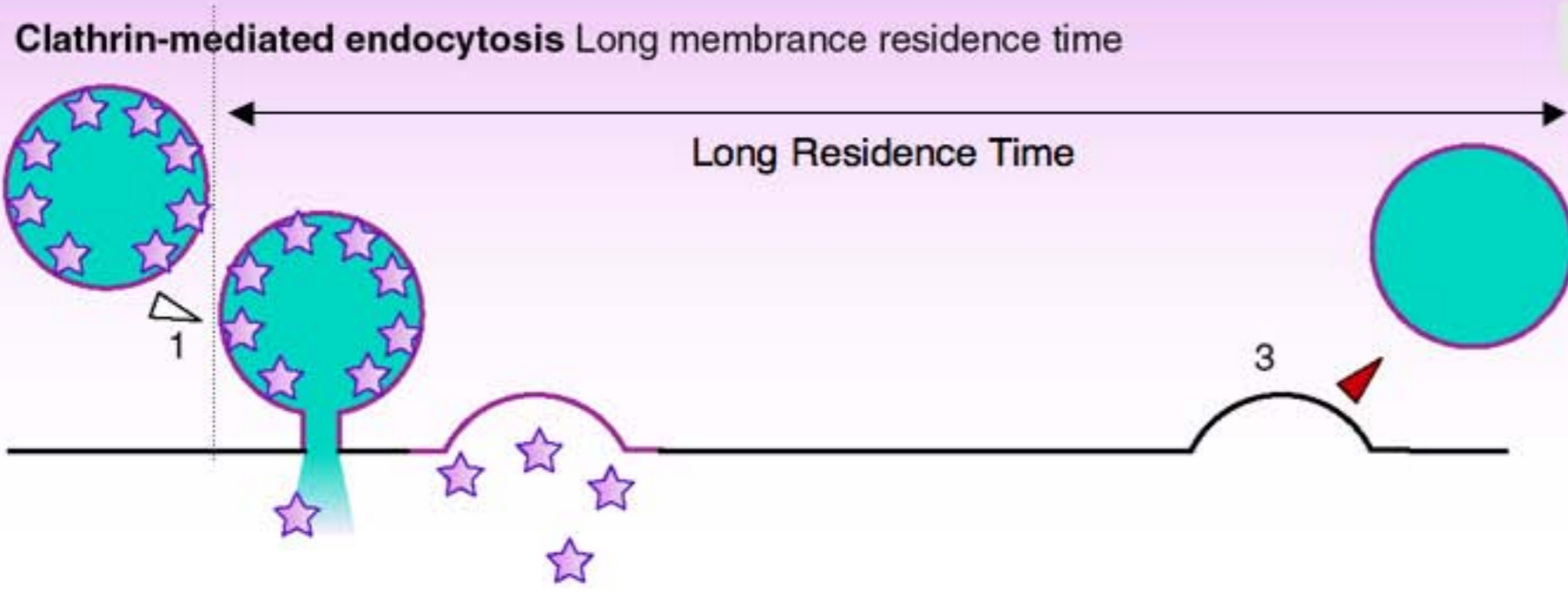
- Dye with slow 'off time'
- Dye with fast 'off time'
- Vesicle membrane
- Pre-synaptic membrane
- Neurotransmitter





# How to discriminate between Kiss & run and Endocytosis

**Kiss and run :**  
Short Residence time (Res.T)



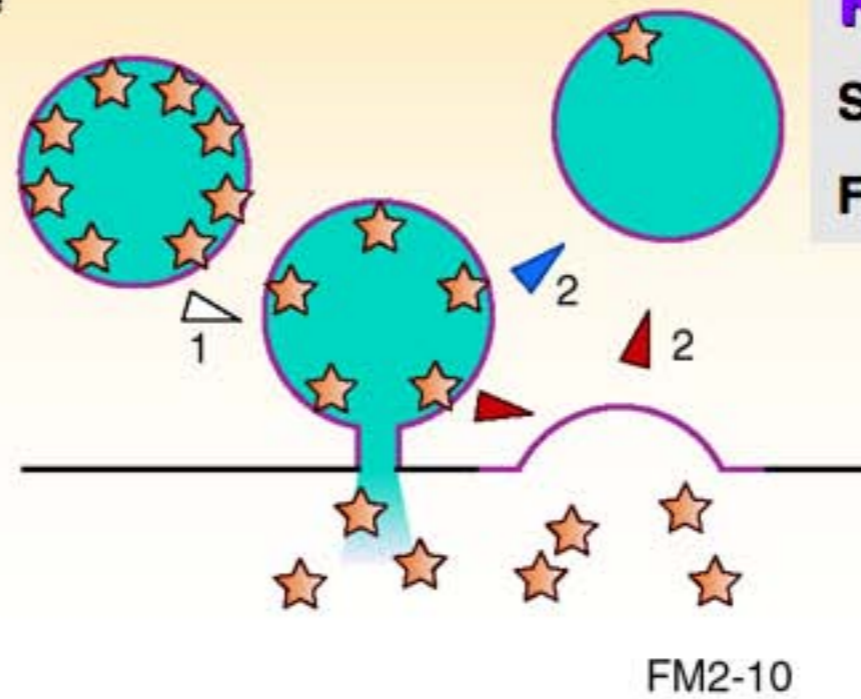
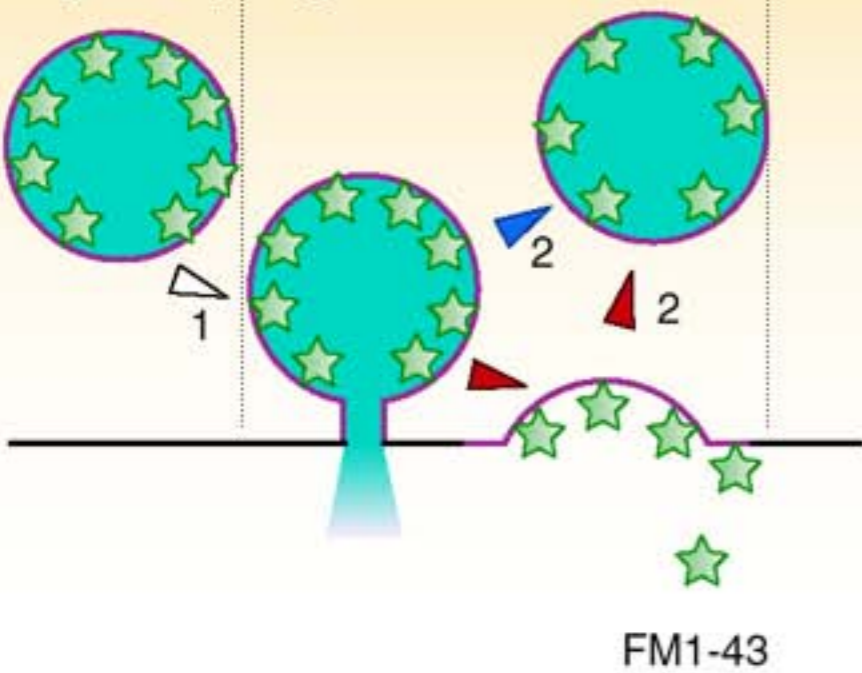
**Clathrin mediated endocytosis:**  
Long Residence time

- ★ Dye with slow 'off time'
- ★ Dye with fast 'off time'
- Vesicle membrane
- Pre-synaptic membrane
- Neurotransmitter



Residence Time  
ExoC Internalization

Rapid recycling Short membrane residence time



**Kiss and run :**

Short Residence time (Res.T)

$FM2-10 < Res. T < FM 1-43$

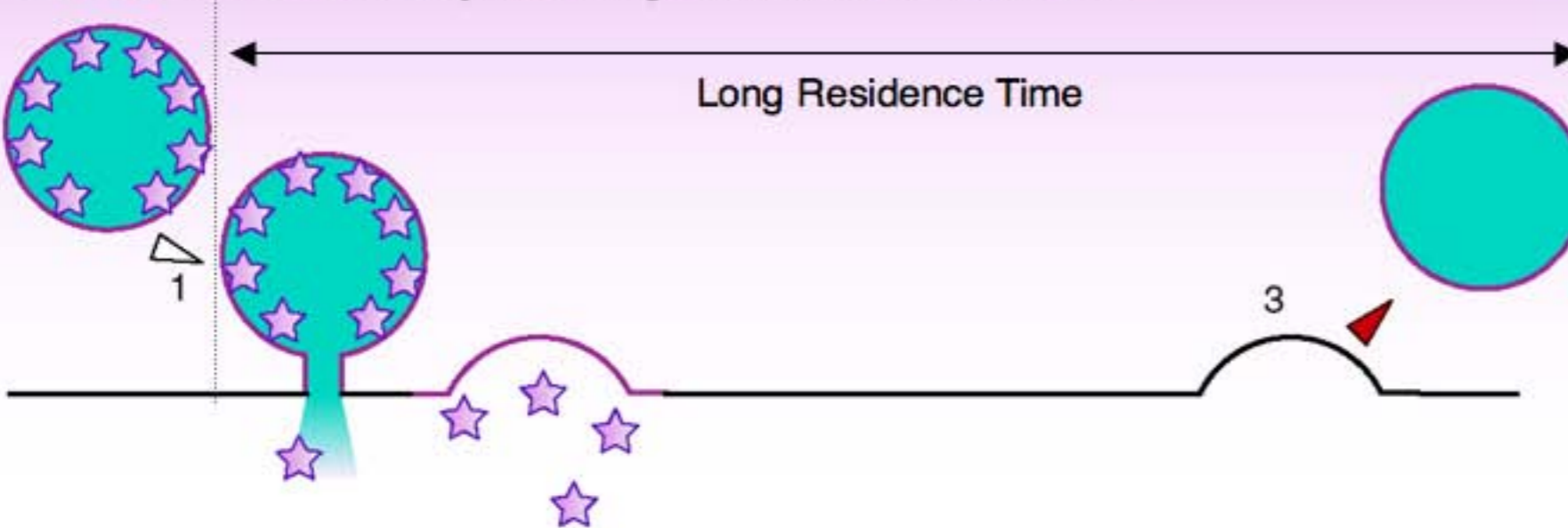
**FM2-10 is faster**

**than FM1-43 :**

« Off time »

$FM2-10 < FM 1-43$

Clathrin-mediated endocytosis Long membrane residence time



**Clathrin mediated endocytosis:**

Long Residence time

Residence time  $\gg$  FM off time

$Res. T \gg FM 1-43 > FM2-10$

**There is no difference  
between FM2-10 and  
FM1-43**

**Both can dissociate  
before internalization**

☆ Dye with slow 'off time'

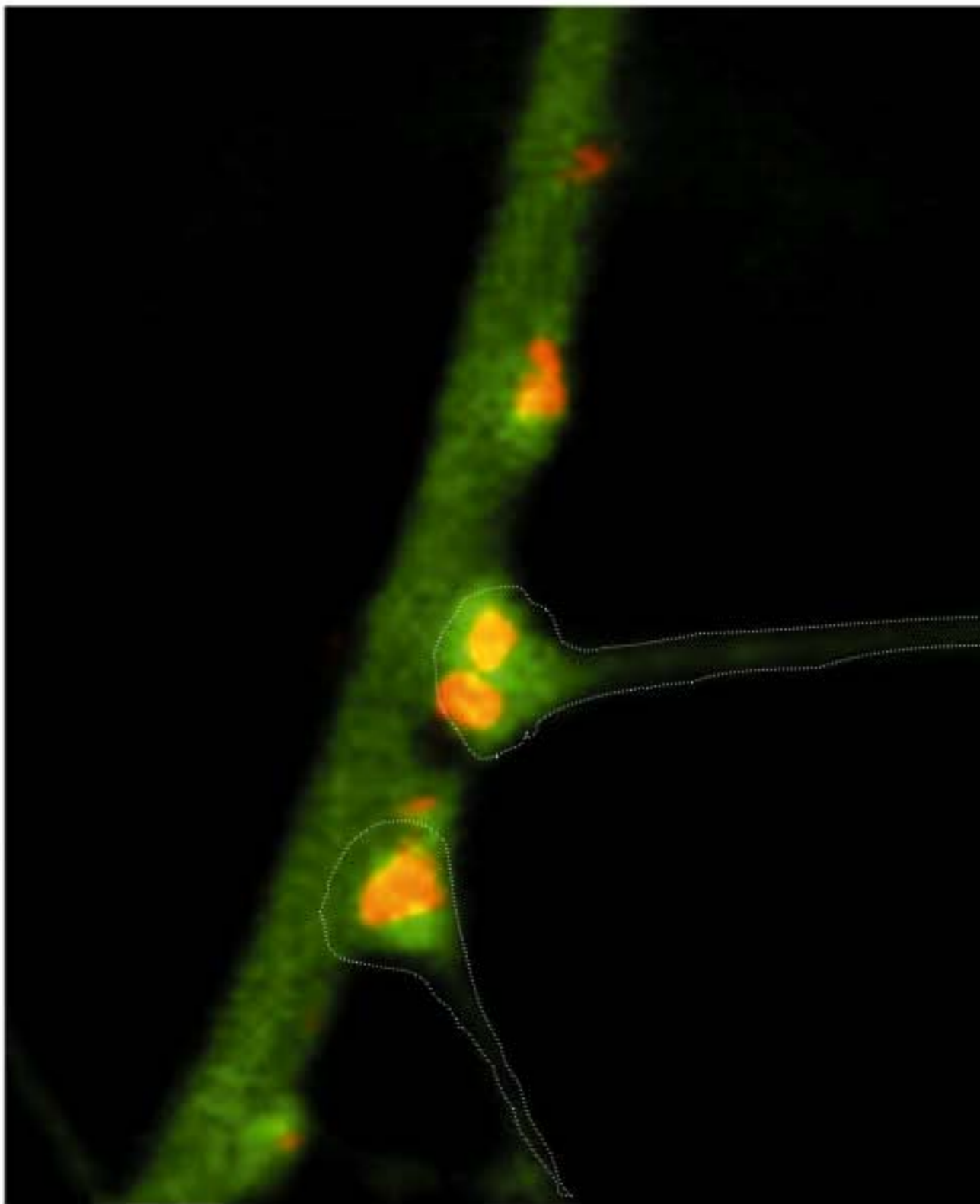
— Vesicle membrane

■ Neurotransmitter

☆ Dye with fast 'off time'

— Pre-synaptic membrane





Current Opinion in Neurobiology

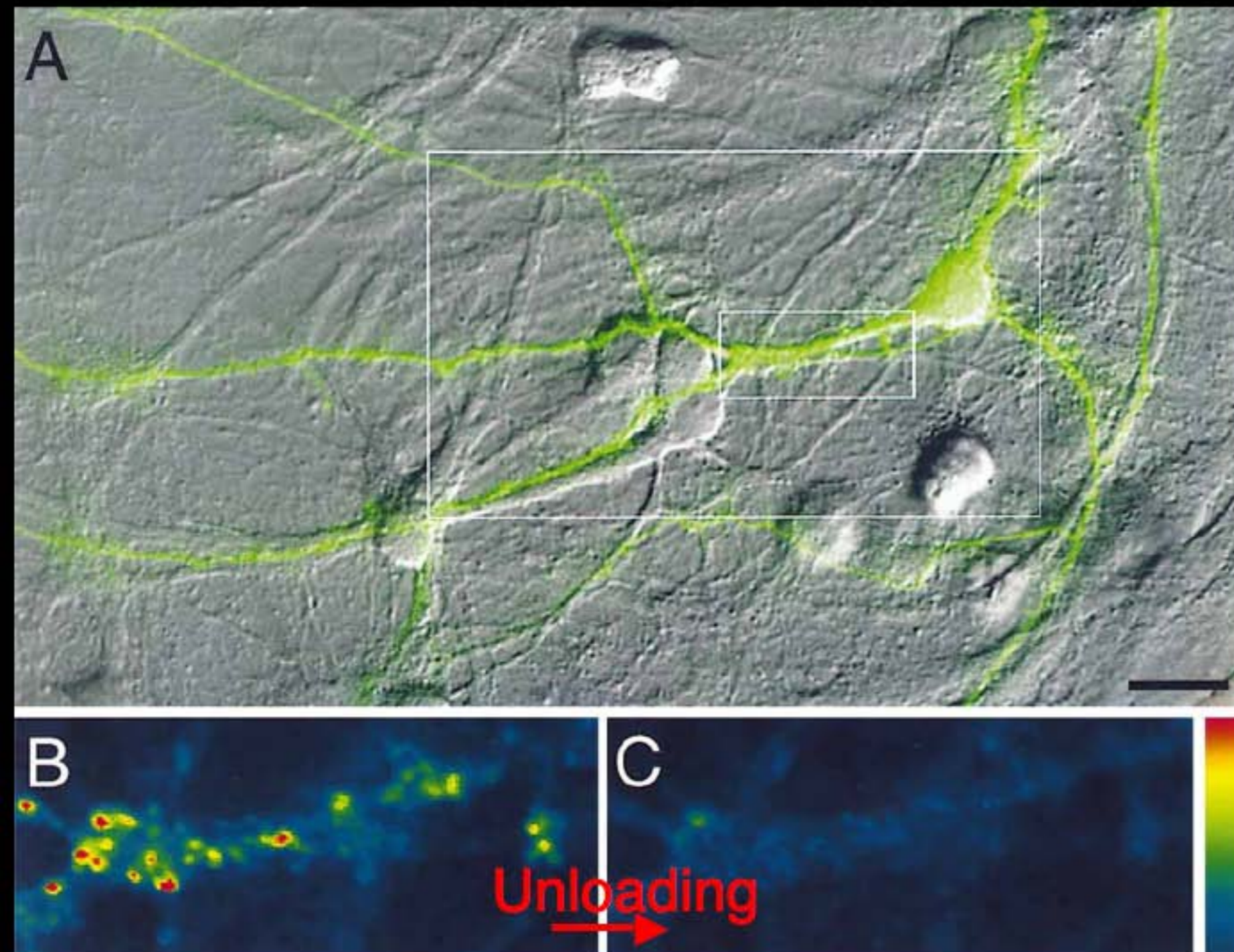
FM 4-64 labeling of synaptic vesicle clusters in hippocampal neurons. FM 4-64, which is a red-shifted variant of FM 1-43, was applied during AP firing to hippocampal neurons in cell culture. Two GFP-expressing cells that form an axo-dendritic contact containing two clusters of recycling vesicles labeled by FM 4-64 are shown.



# Evidence for a Role of Dendritic Filopodia in Synaptogenesis and Spine Formation

Noam E. Ziv and Stephen J Smith

Neuron, Vol. 17, 91–102, July, 1996.



**Figure 1. Imaging of Dendritic Structure and Presynaptic Boutons in Live Cultured Hippocampal Neurons**

(A) A fluorescence image of a single pyramidal neuron labeled with FAST DiO, digitally overlaid on a DIC image of the same field. The neurons shown in this figure were grown for 13 DIV prior to the experiment.

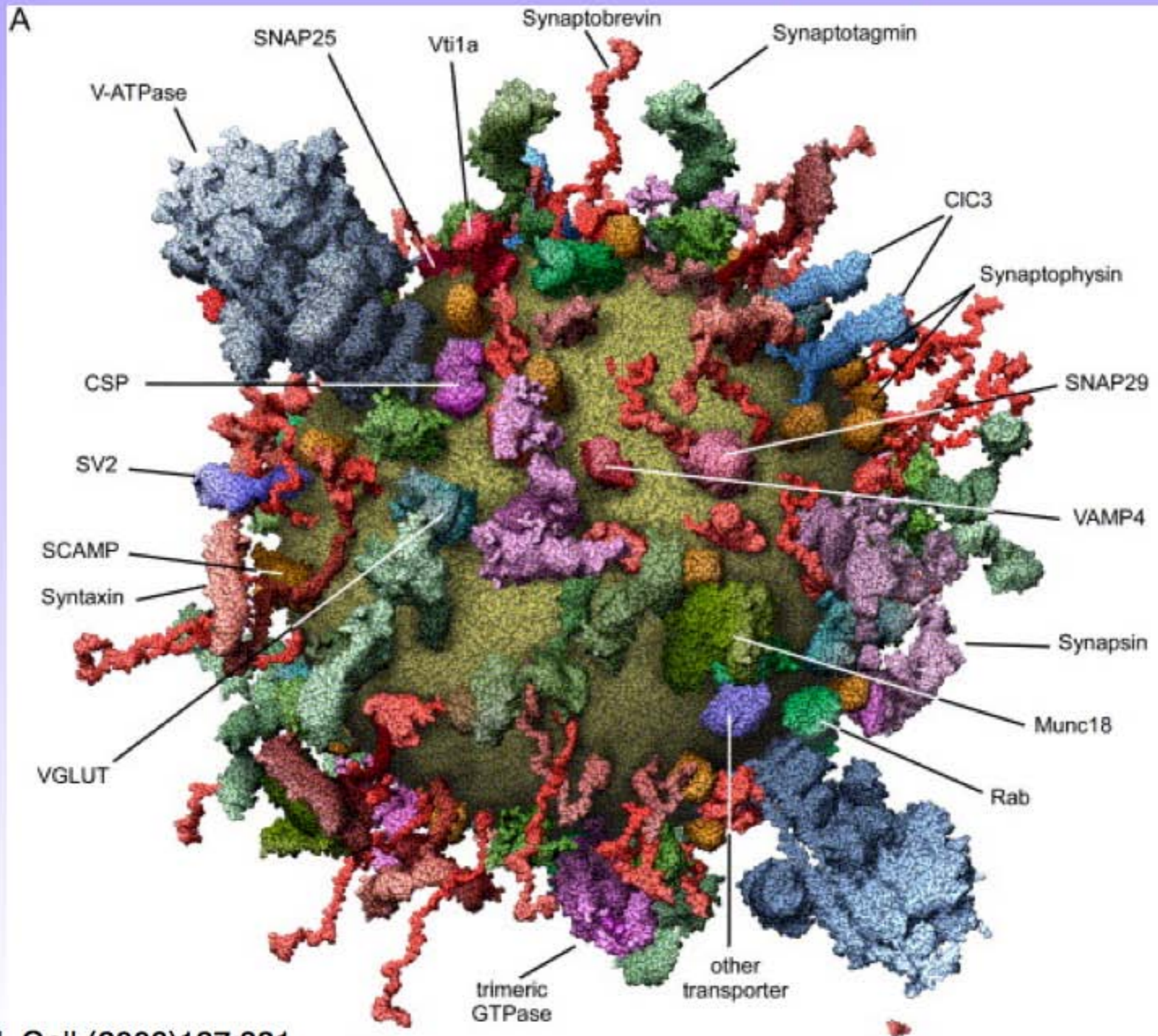
(B) A pseudocolor fluorescence image of presynaptic boutons loaded with FM 4–64. The area shown corresponds to the inner rectangle in (A). Fluorescence intensity is coded according to color bar on far right.

(C) The same field shown in (B) after the dye was unloaded by stimulating the neurons to fire action potentials for 60 s at 10 Hz.

(D) Digital superposition of the FM 4–64 difference image (red), created by subtracting the image in (C) from that in (B), onto the fluorescence image of the FAST DiO-labeled neuron (green). Area shown corresponds to outer rectangle in (A). Scale bars, 20  $\mu\text{m}$  (A) and 10  $\mu\text{m}$  (D).



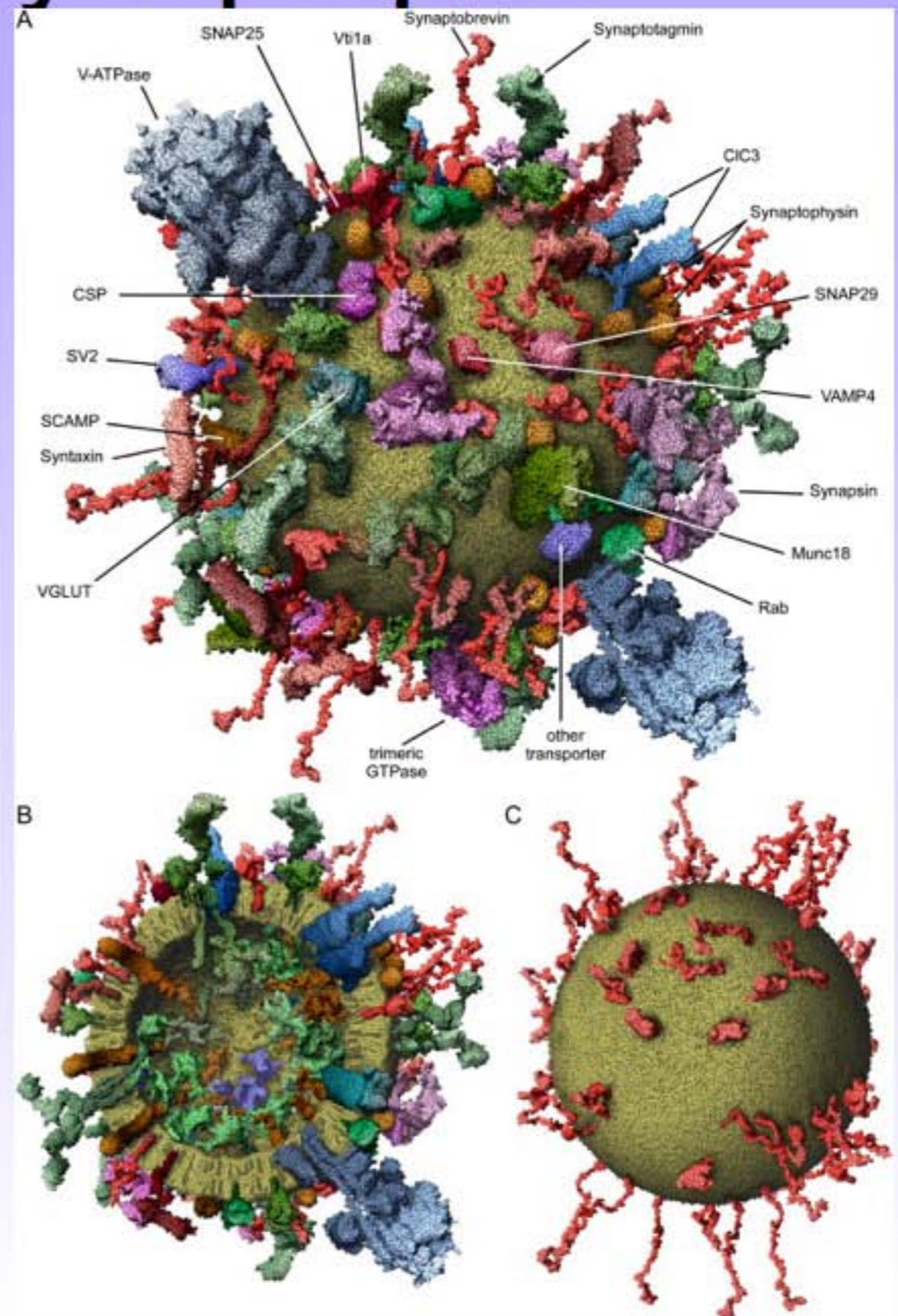
# Vésicules Synaptiques





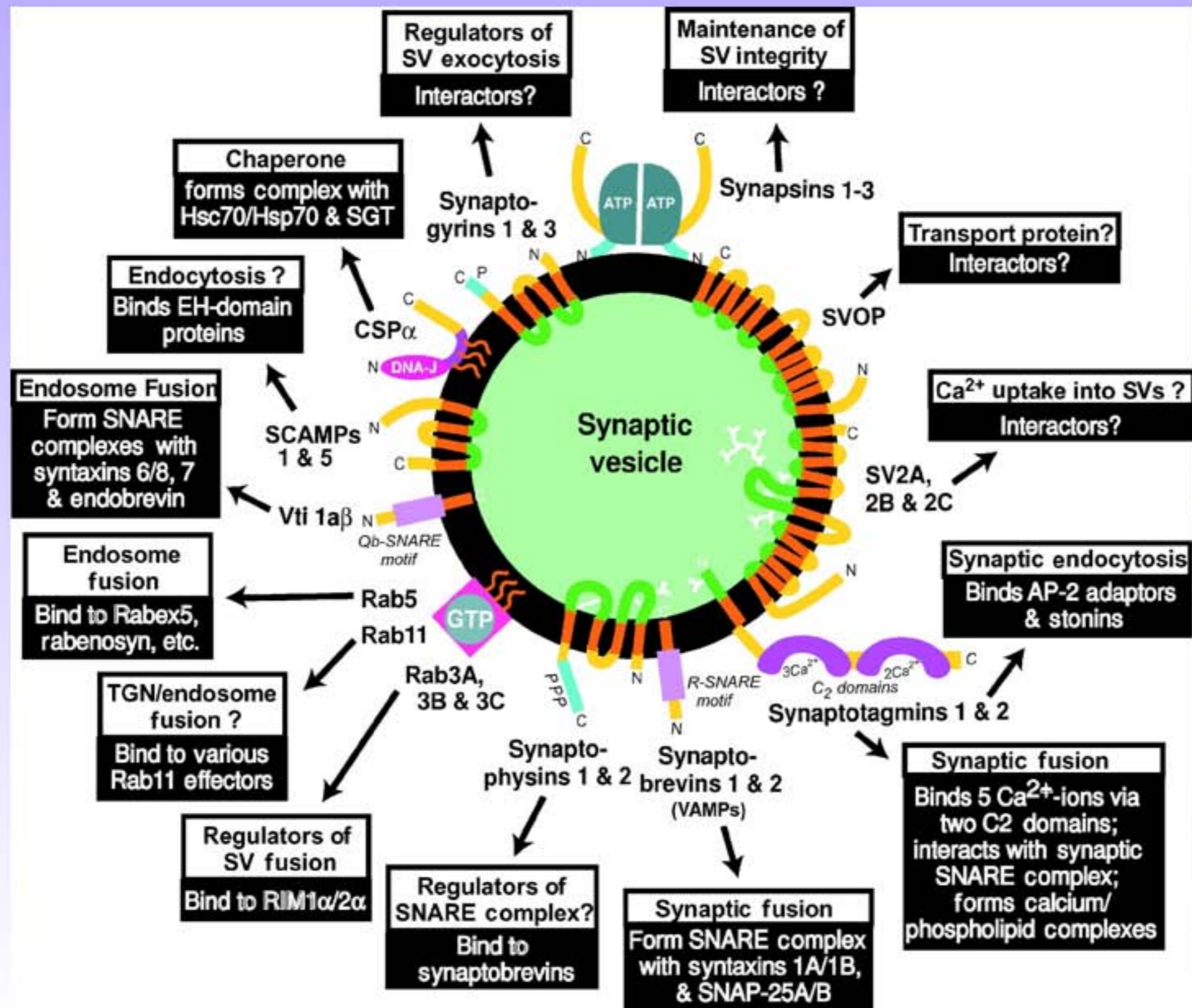
# Vésicules Synaptiques

Protein	% of total SV proteins
Synaptophysin	10.20 ± 1.54 <sup>(1,4)</sup>
Synaptobrevin 2	8.60 ± 1.55 <sup>(1)</sup>
Syntaxin 1	2.00 ± 0.27 <sup>(1,5)</sup>
SNAP25	0.40 ± 0.06 <sup>(1,6)</sup>
Synapsins	6 <sup>(2,3)</sup>
Rab3A	2.5 <sup>(2)</sup>
Synaptotagmin 1	7 <sup>(3)</sup>
Synaptogyrin 1	0.5 <sup>(2)</sup>
SV2	1.4 <sup>(2)</sup>
SCAMP	0.3 <sup>(2)</sup>
CSP	0.6 <sup>(2)</sup>
VGLUT1	5.36 ± 1.11 <sup>(1,7)</sup>
VGLUT2	9.01 ± 2.31 <sup>(1,7)</sup>
V-ATPase V1-B subunit	1.15 ± 0.21 <sup>(1)</sup>



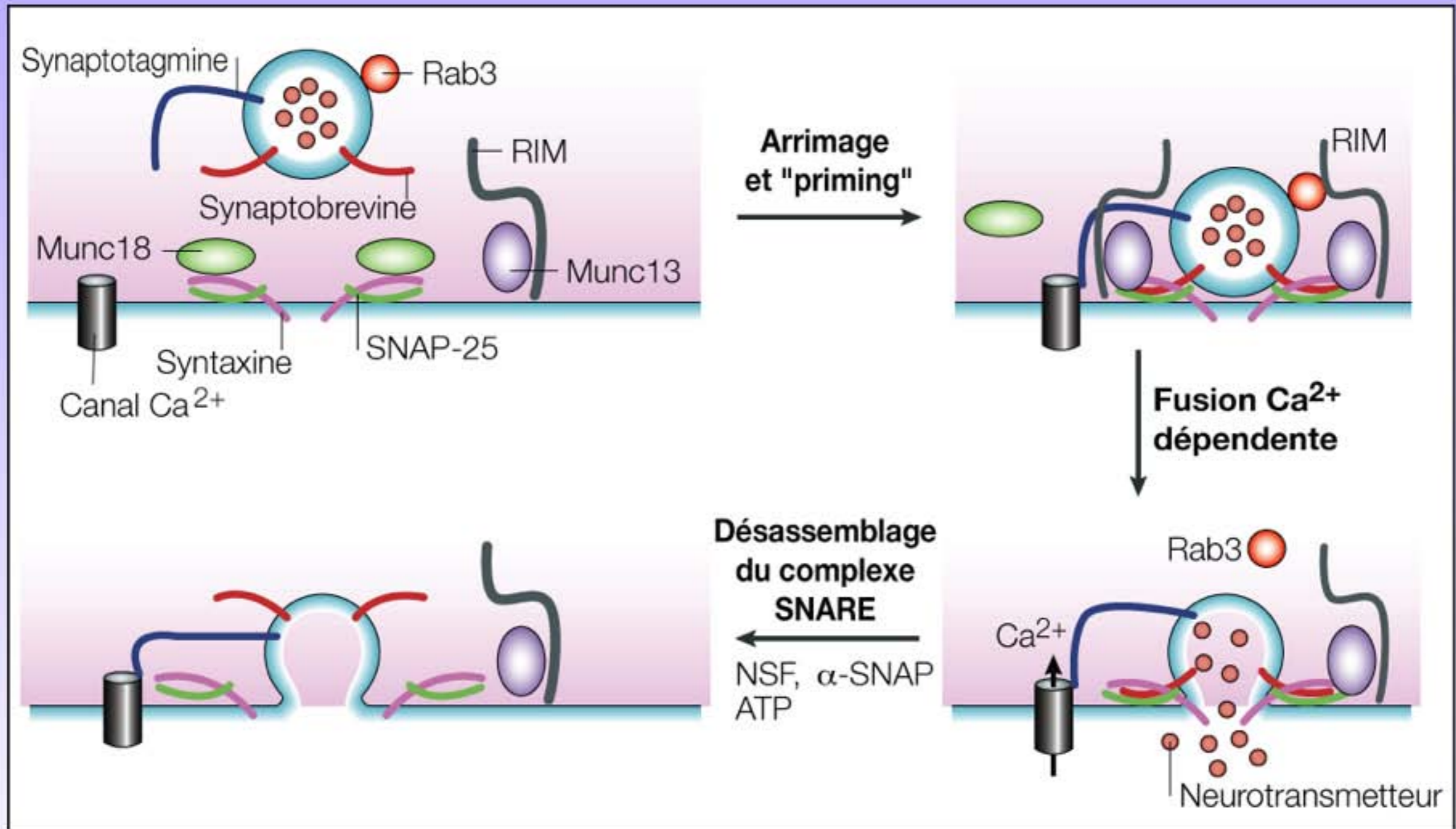


# Fonction des protéines des VS





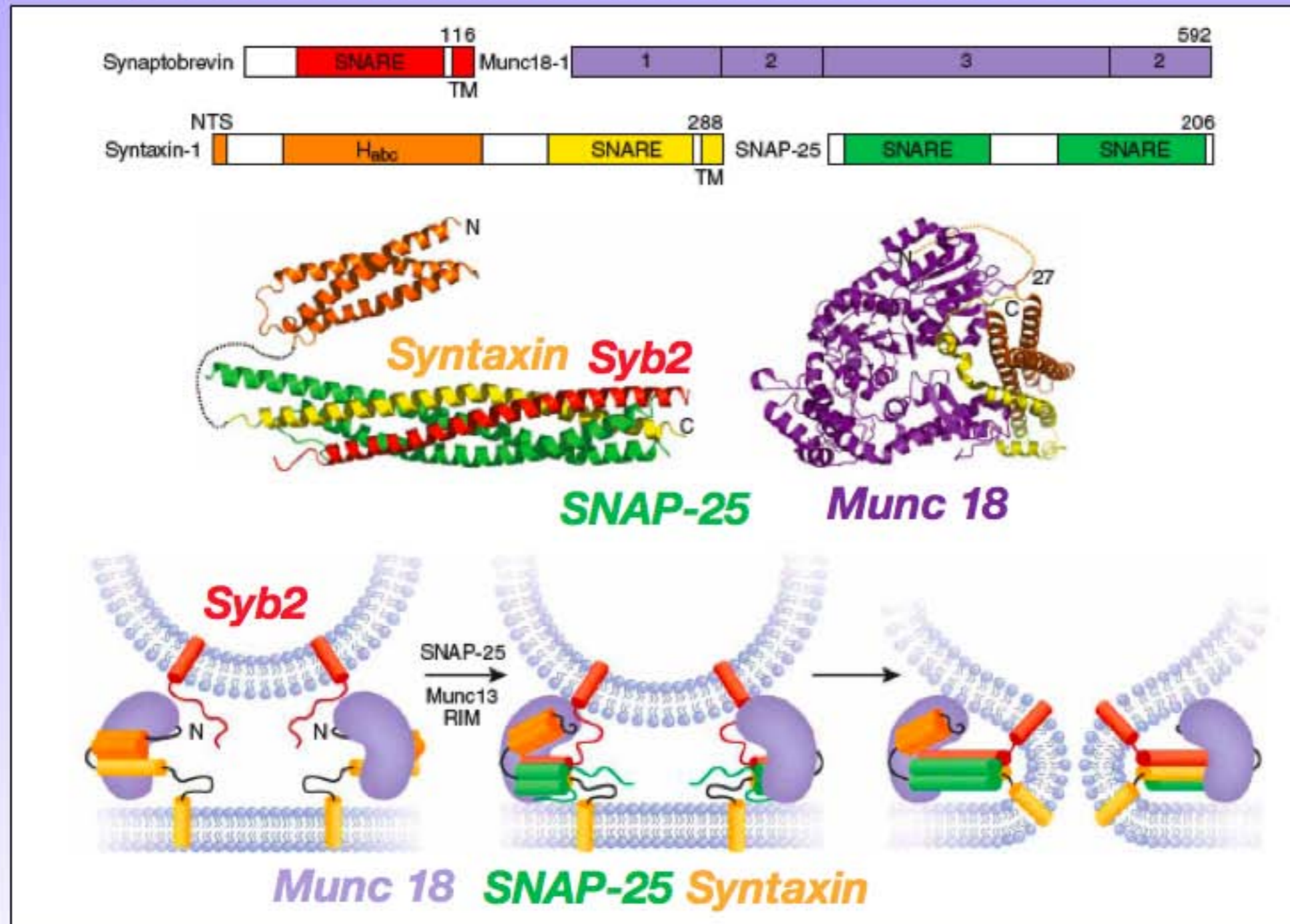
# Régulation de l'exocytose par différentes protéines





# Regulation par Munc18

SM proteins = Sec1 /Munc 18: découverte sur un sreen génétique (levure, c.elegans) pour des défauts dans le trafic mbR et la sécrétion. Ont un rôle essentiel dans la fusion.

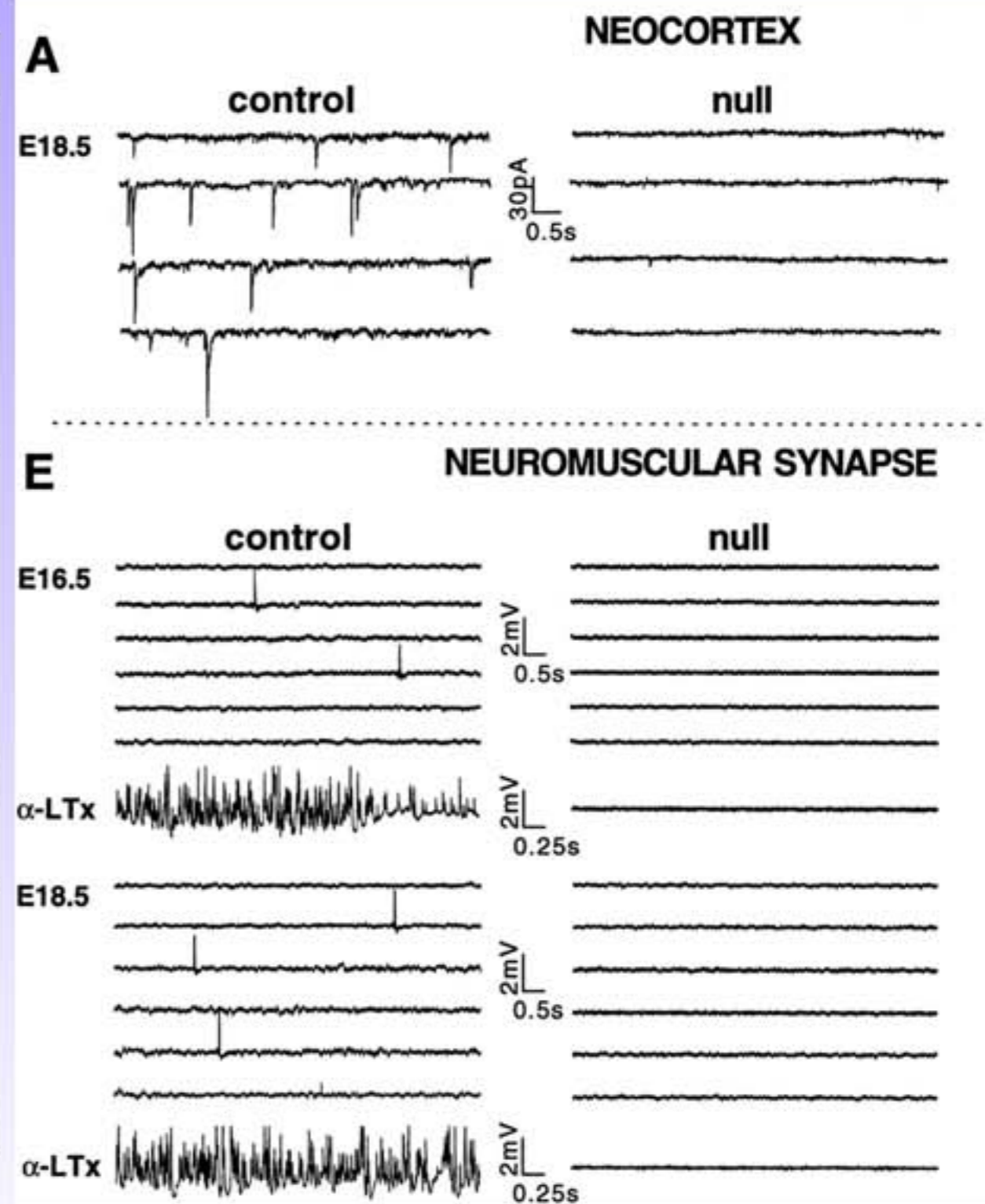
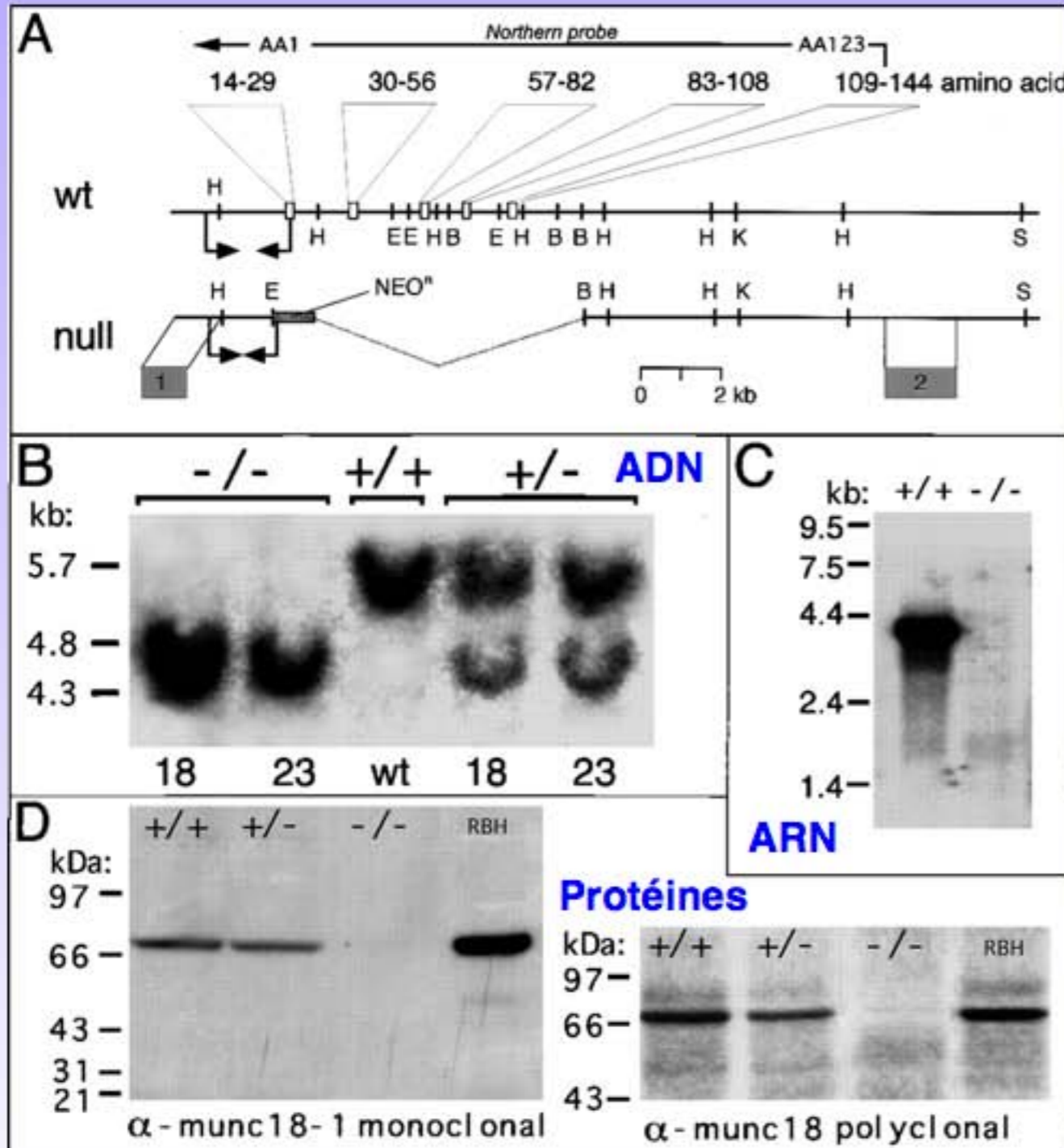


VOLUME 15 NUMBER 7 JULY 2008 NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY

Munc 18 lie la syntaxine 1 ainsi que le complexe SNARE et promeut son assemblage en introduisant une vérification des couples de SNAREs (Peng & Gallwitz 2002).



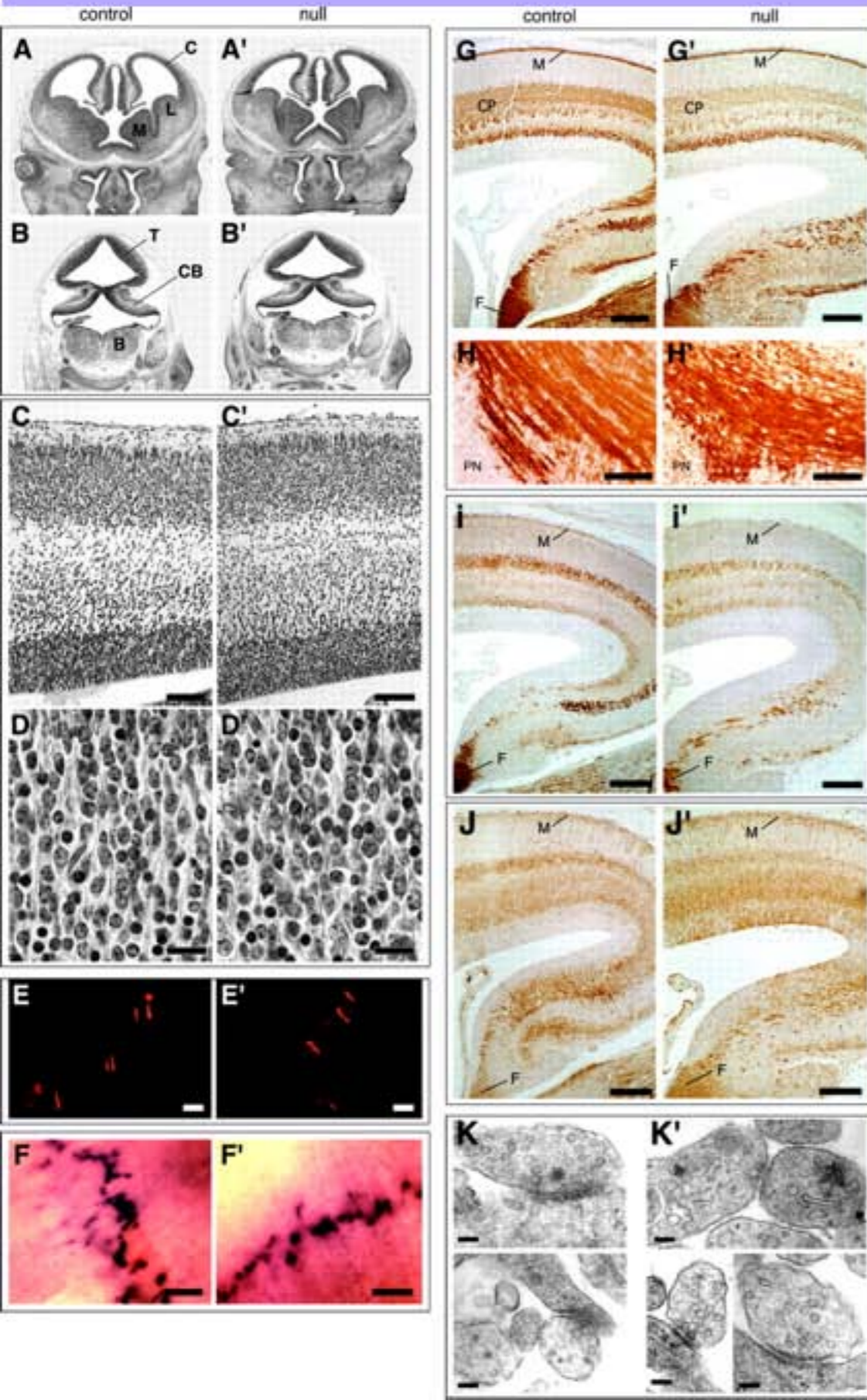
# Munc18 KO



Les synapses sont totalement silencieuses:  
pas de libération de neurotransmetteur.



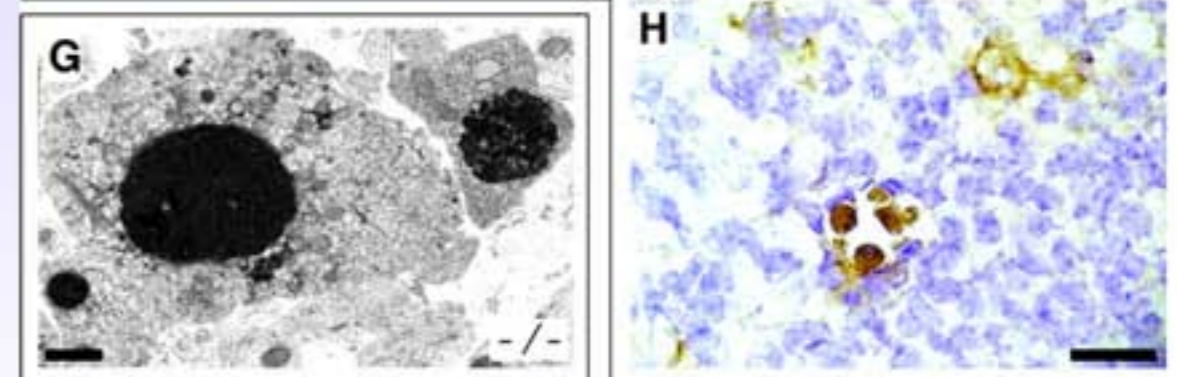
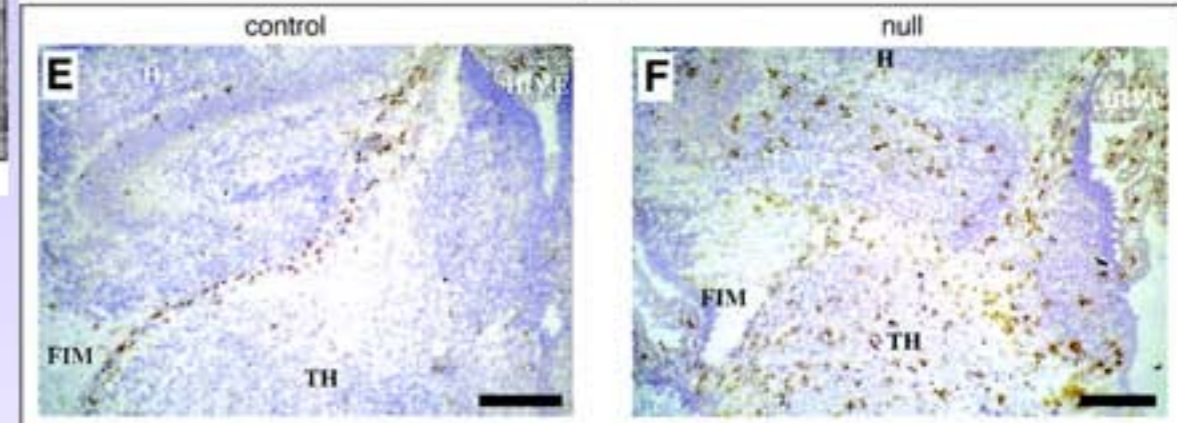
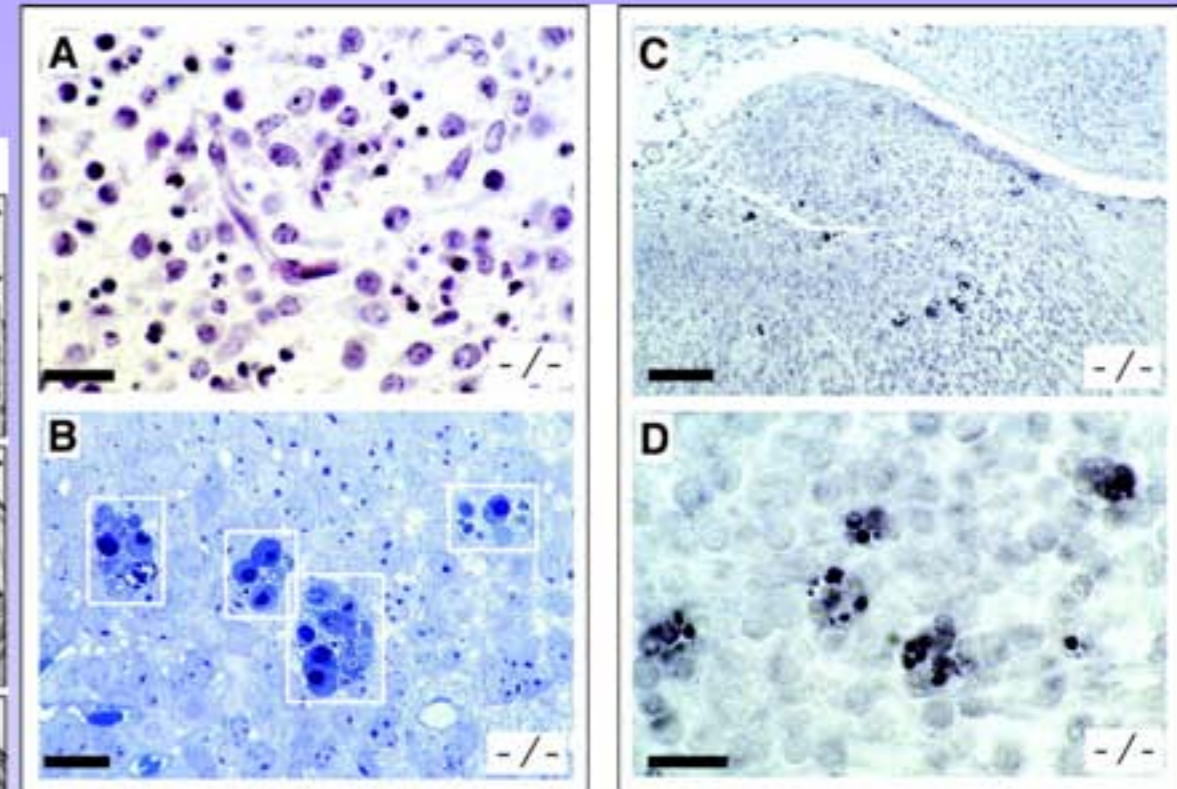
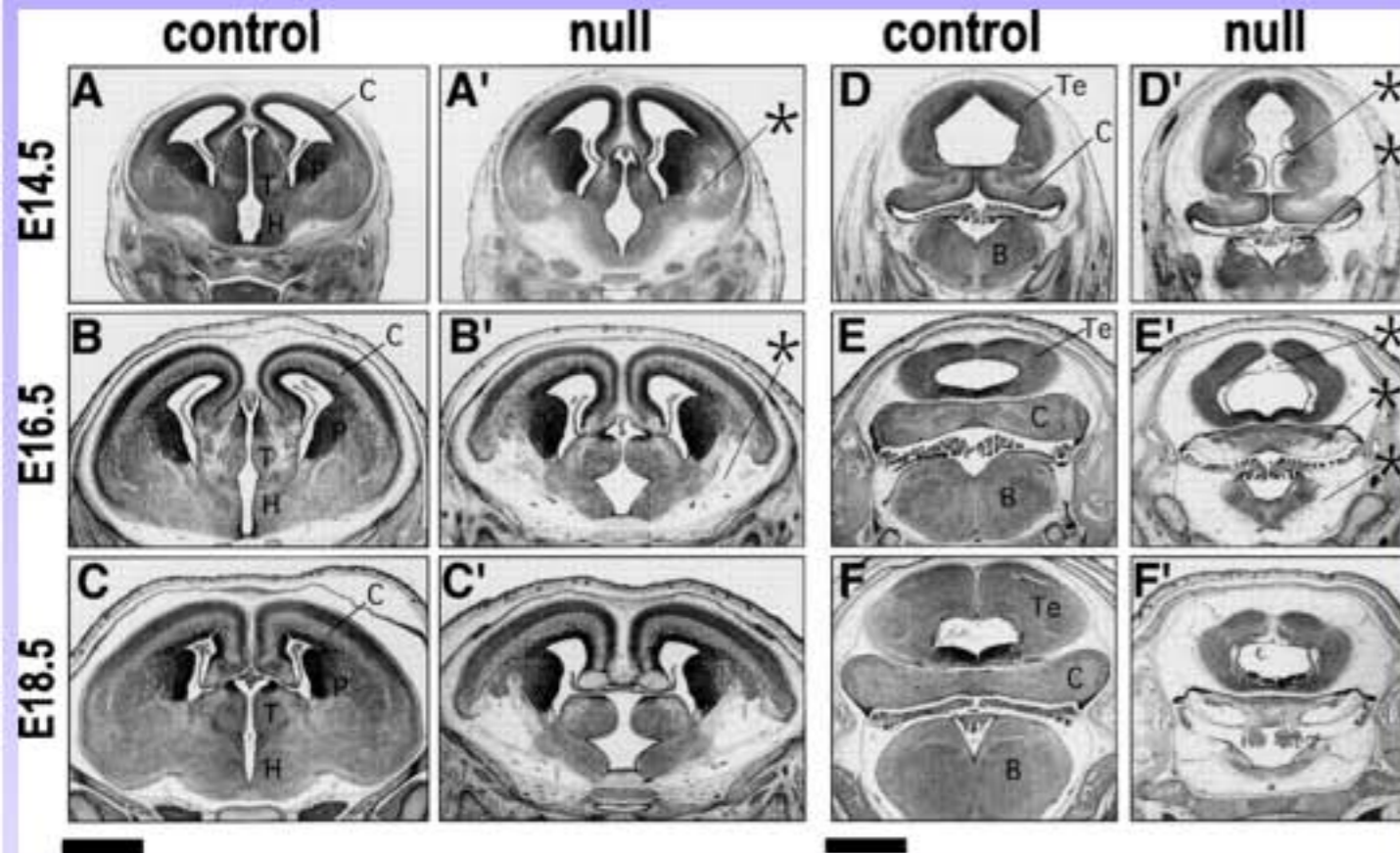
# Munc18 KO



Le développement cérébral est normal même en absence de sécrétion de neurotransmetteur. On constate qu'on a bien: la formation de structures en couches, les tractus de fibres sont présents, les synapses sont morphologiquement définies.



# Munc18 KO



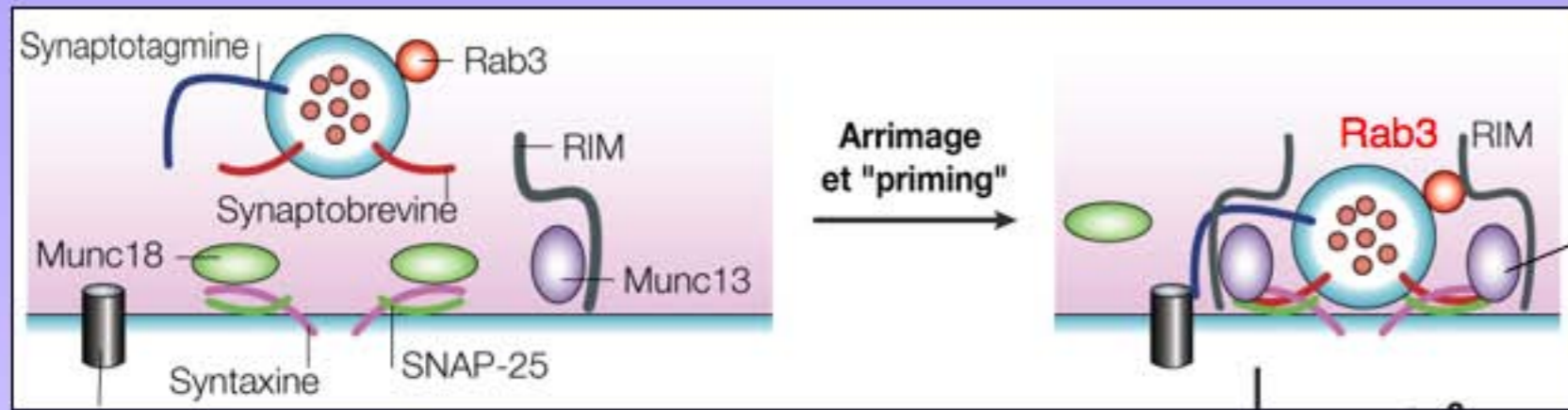
Apoptose massive après la synptogenese.

Par contre, après formation du système, les neurones subissent une apoptose massive suivi d'une dégénérescence massive (marquée d'une \*).

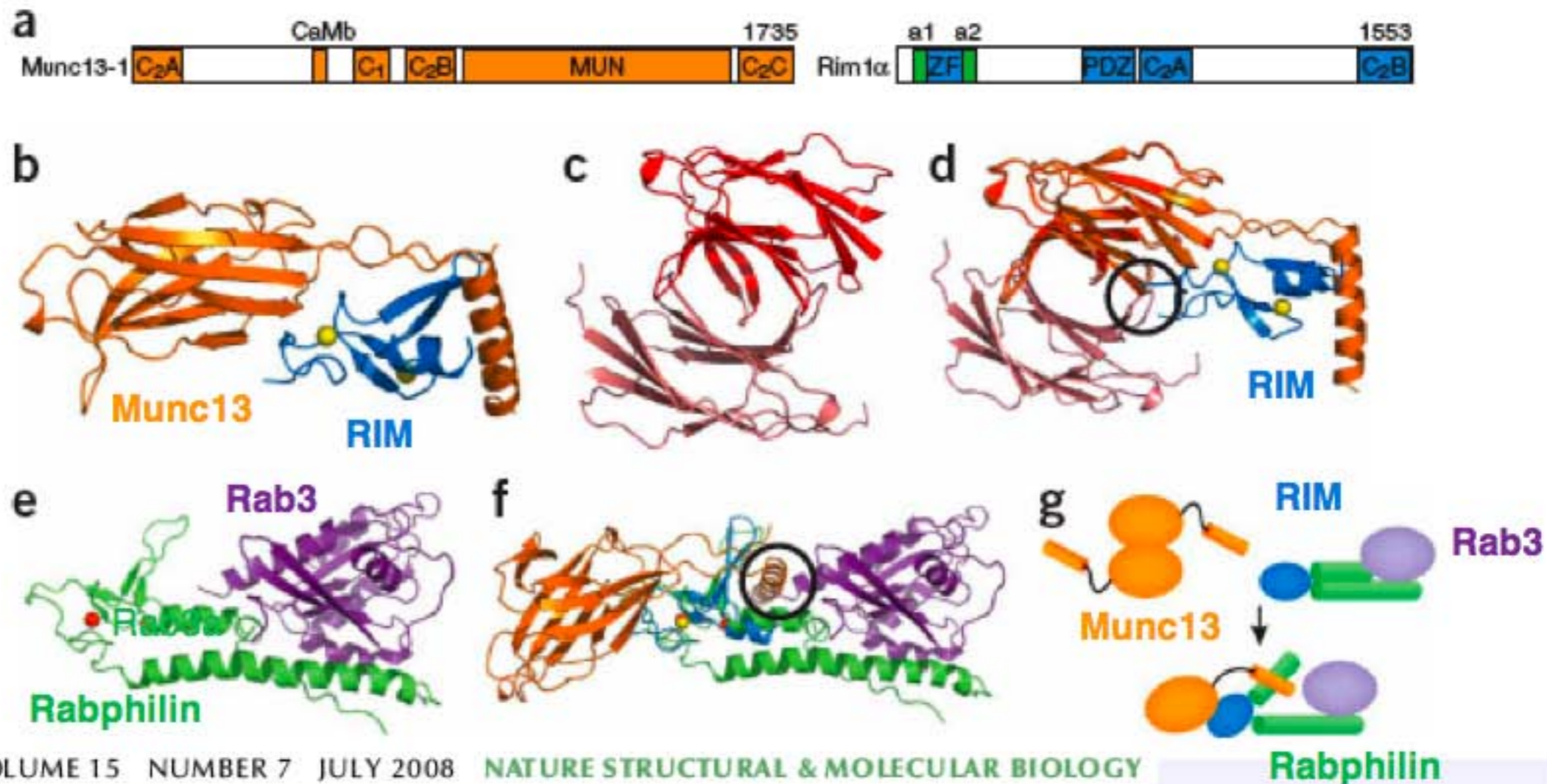
Conclusion: La connectivité synaptique ne dépend pas de la sécrétion de NT, mais la maintenance du système nécessite la sécrétion de neurotransmetteurs.



# Régulation par Munc13



**Munc13**



Munc 13 est essentiel pour le priming. Le double KO Munc 13 et Syntaxine est « sauvé » par la présence de syntaxine ouverte: d'où l'hypothèse que munc13 permettrait l'ouverture de la syntaxine '(Brunger 2005). Formation d'un complexe tripartite avec Munc13, Rab3a et Rim.

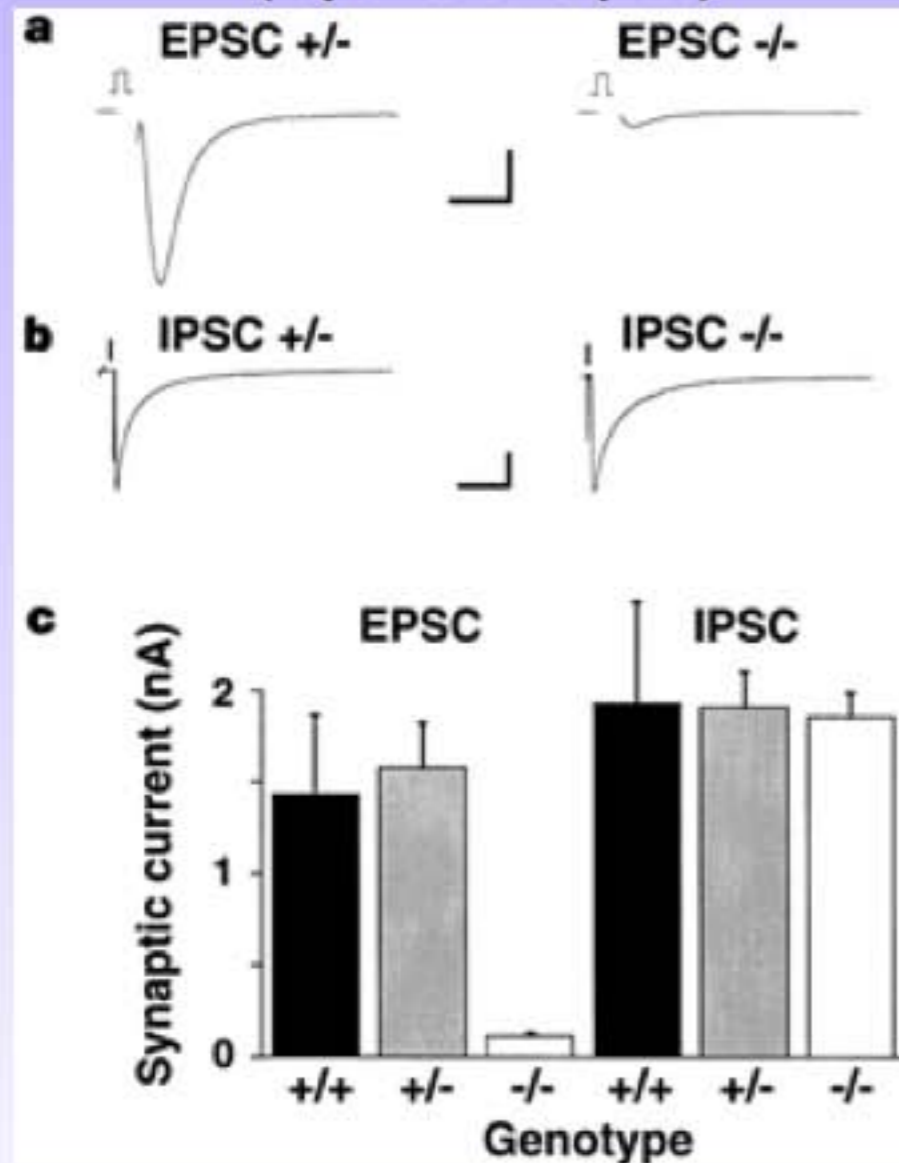


# Munc13 KO

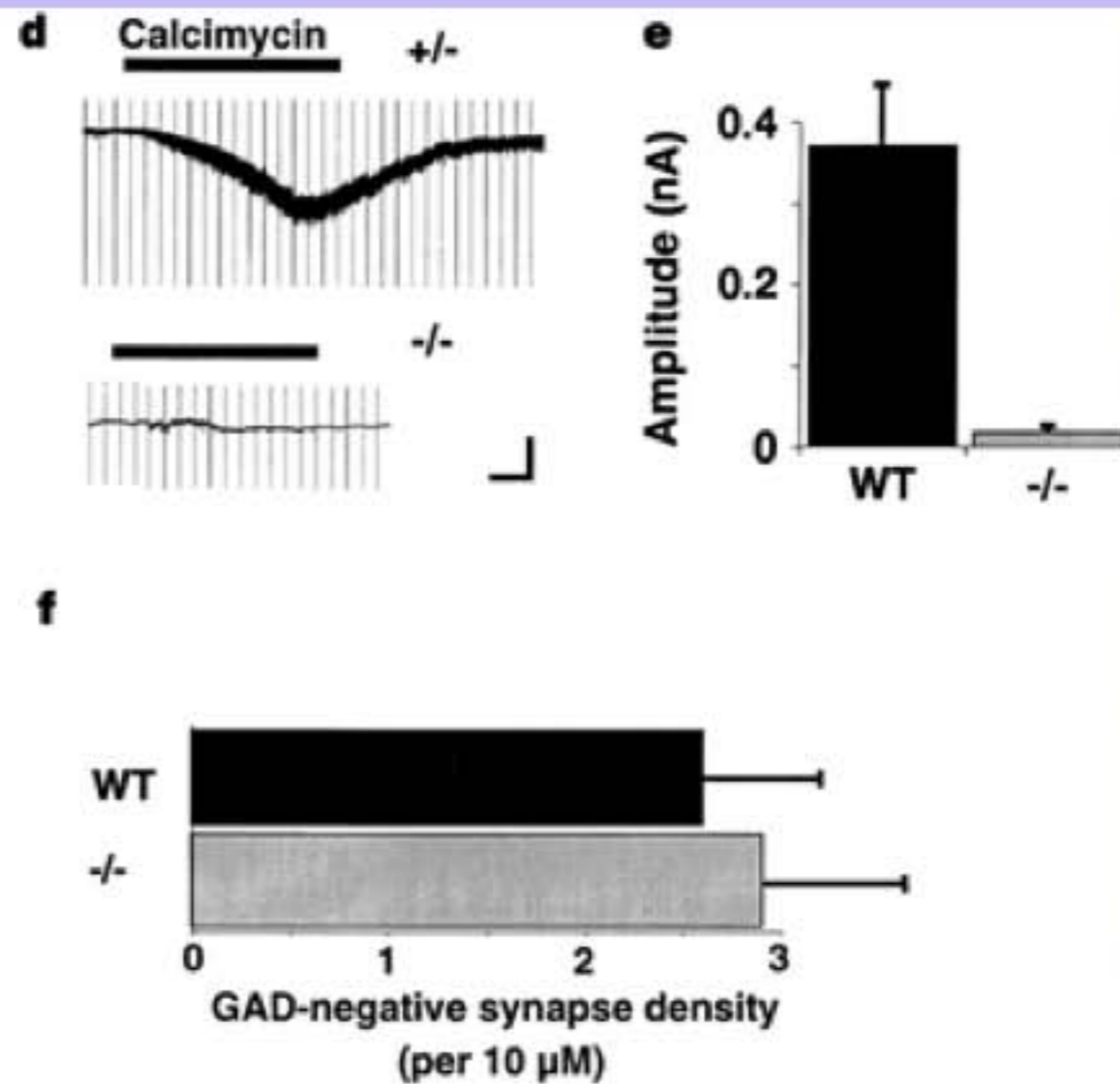
**Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles.**

Augustin I, Rosenmund C, Südhof TC, Brose N. Nature. 1999; 400(6743):457-61.

**Stimulation par potentiel d'action  
(réponse évoquée)**



**Stimulation par ionophore calcique**



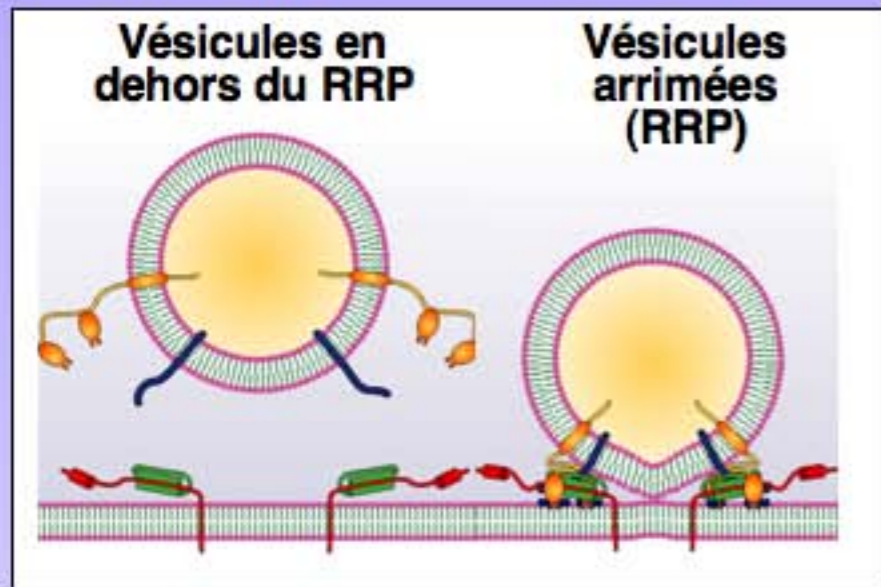
Calcimycin:  
Ionophore calcique  
qui déclenche la  
libération des NT.

La libération des NT est bloquée dans les synapses glutamatergiques: on ne peut ni la déclencher par des potentiels d'action, ni par des ionosphères calciques. Les synapses inhibitrices ne sont pas atteintes.

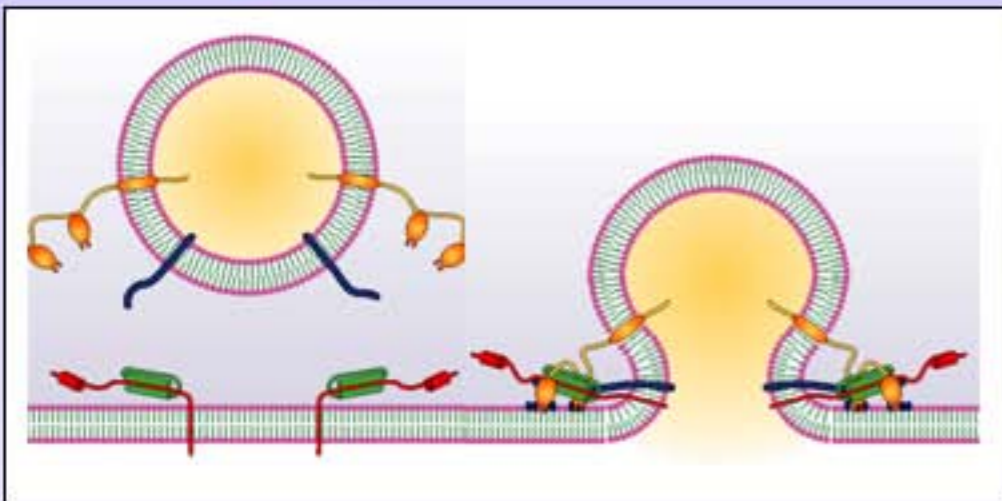


# Munc13 KO

Nature. 1999: 400(6743):457-61.

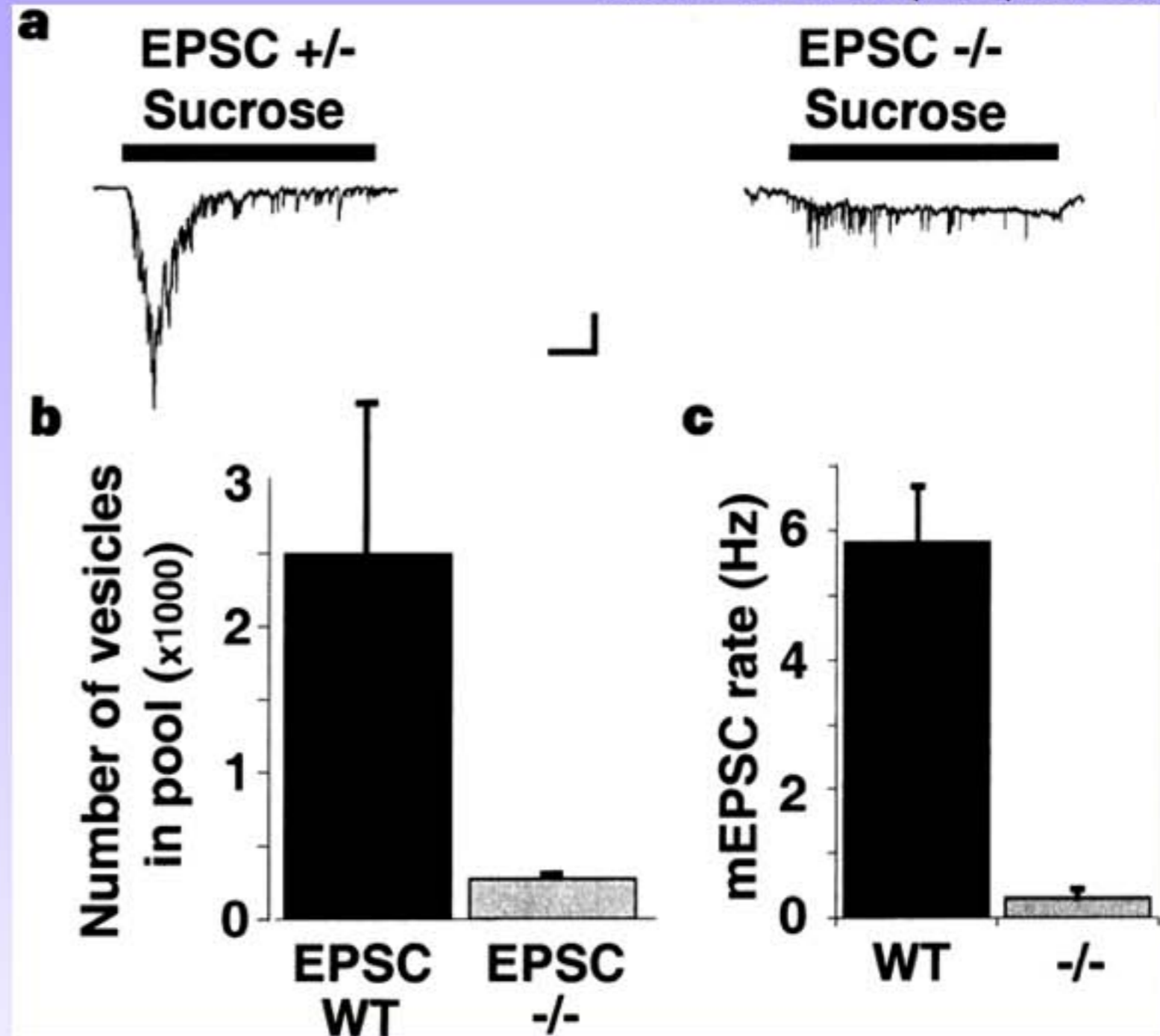


+ sucrose



Seules les vésicules déjà arrimées (appartenant au RRP) fusionnent de manière  $Ca^{2+}$  indépendante. Permet d'évaluer le nombre de vésicules dans le RRP.

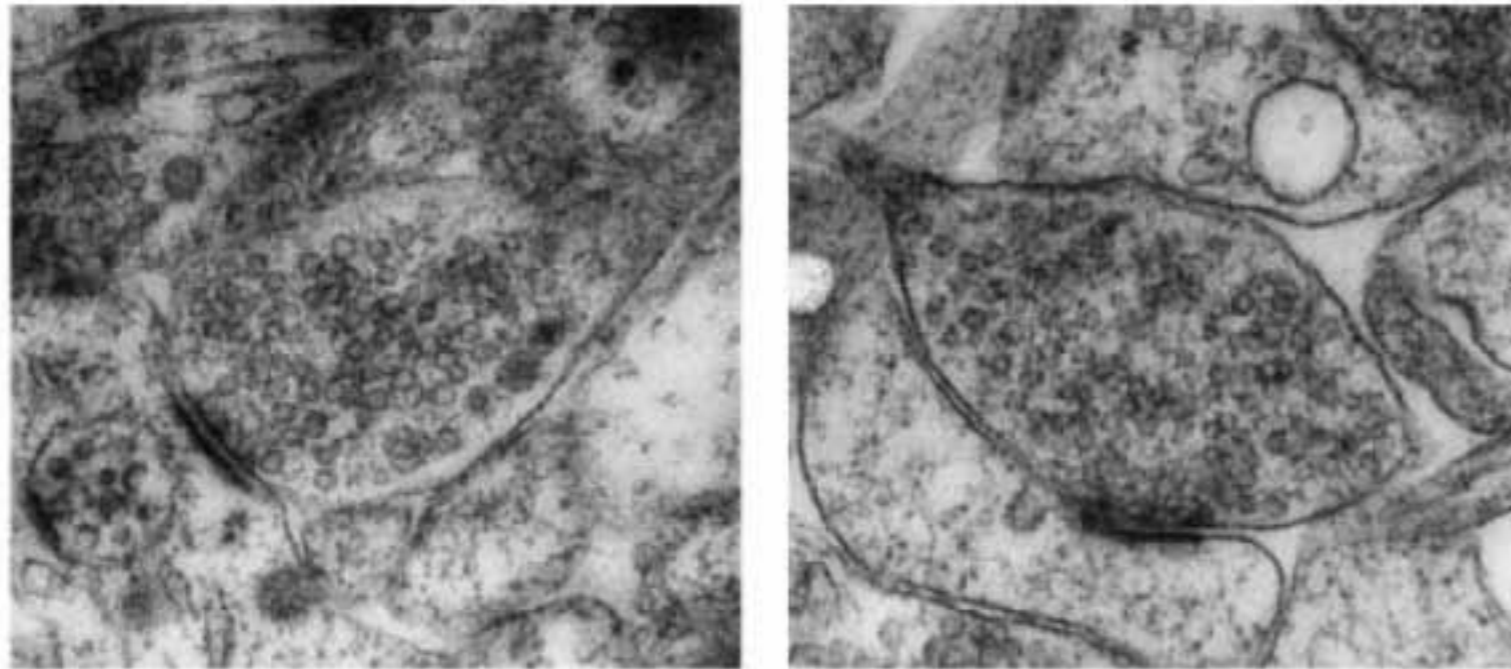
Cf. Rosenmund, C., and Stevens, C. F. (1996) *Neuron* 16, 1197-1207 & Lonart and Sudhof (2000) *JBC* 275 : 27703-27707.



La libération ne peut pas être déclenchée par le sucrose: le RRP est donc très limité. En l'absence de munc13, le priming est donc altéré dans les synapses excitatrices.

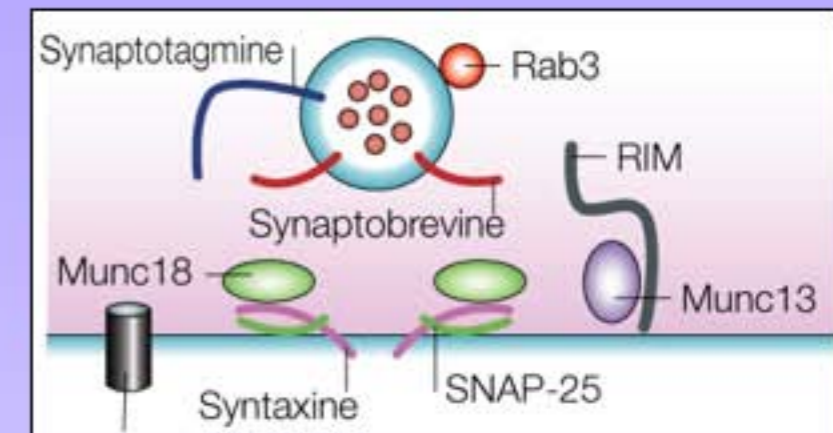
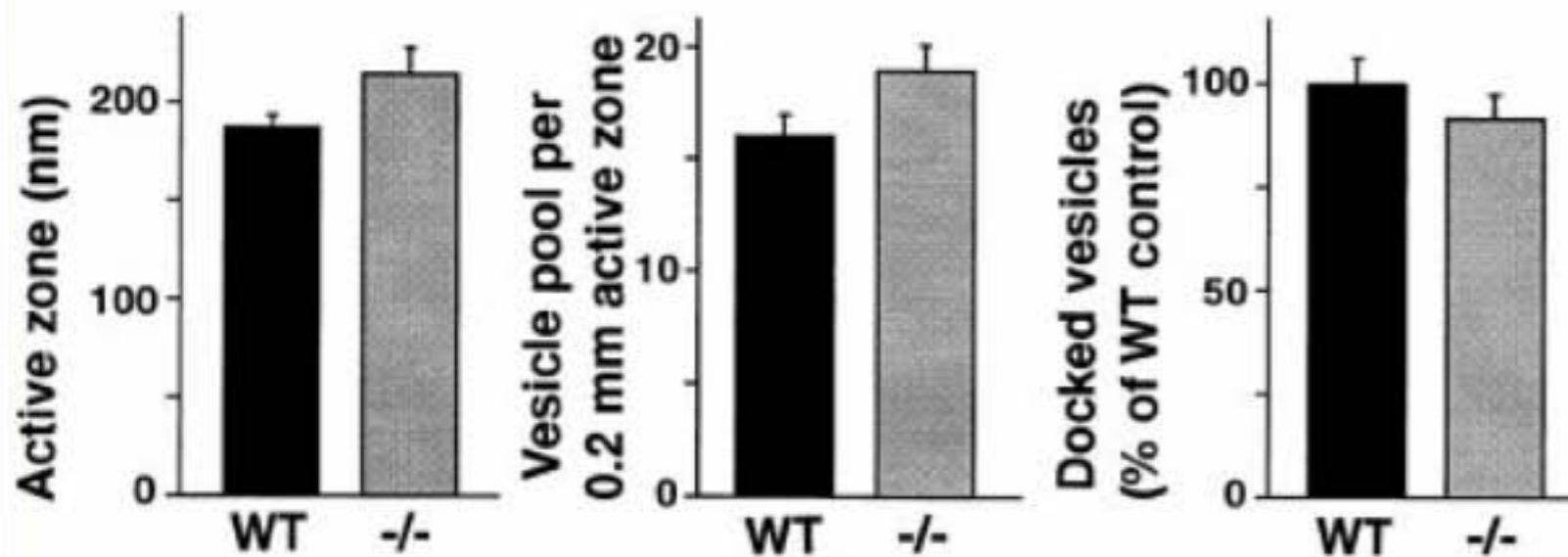


# Munc13 KO

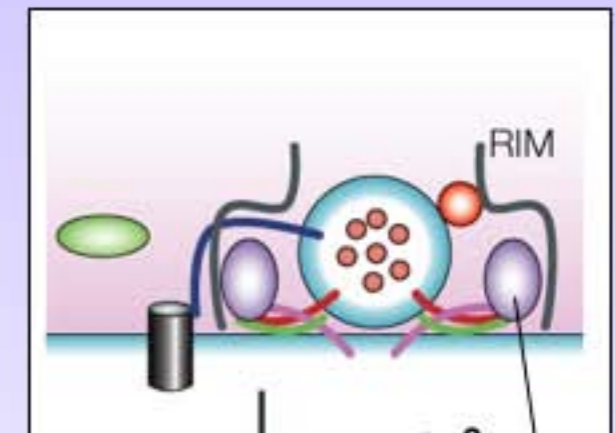


+/+

-/-



**Docking  
& priming**

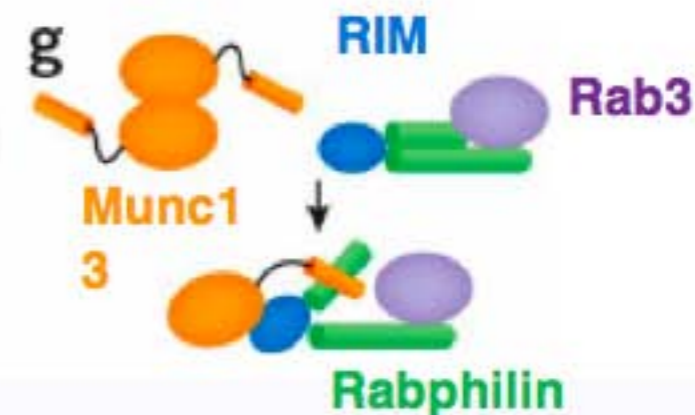
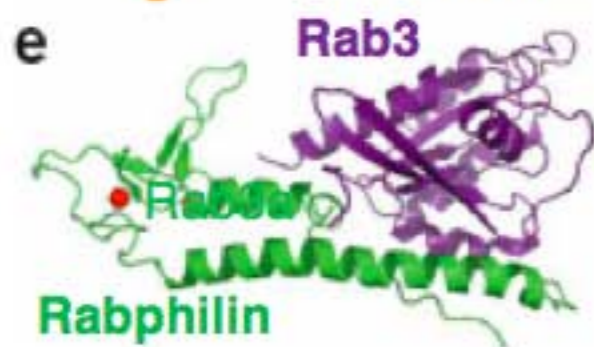
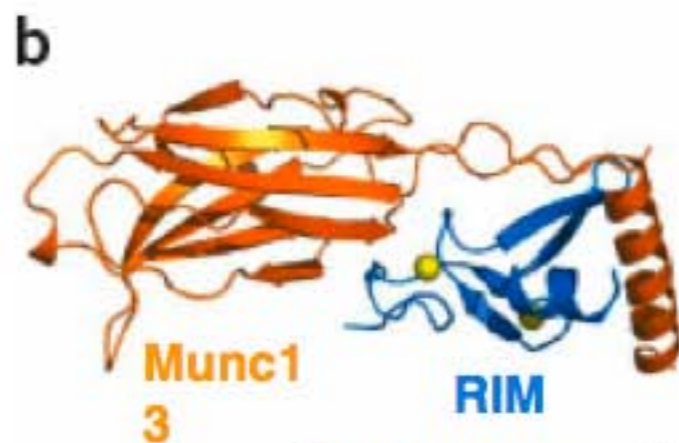
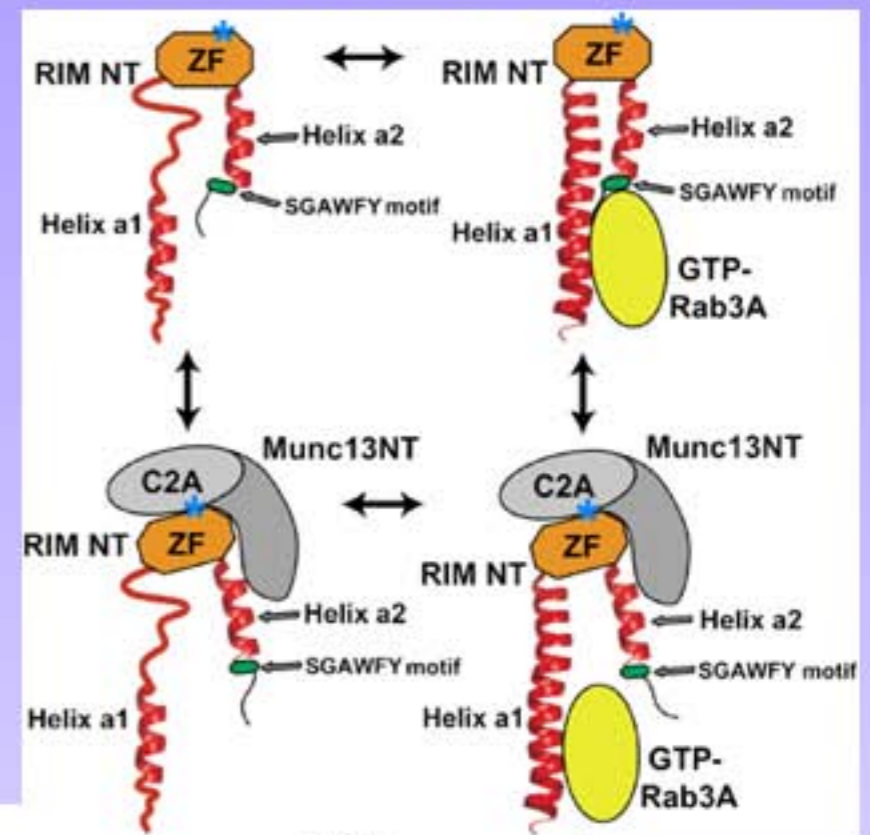
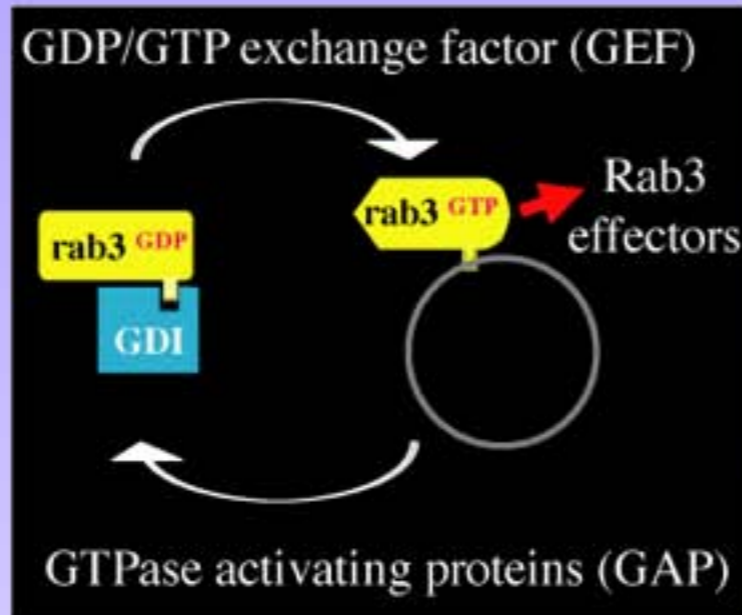
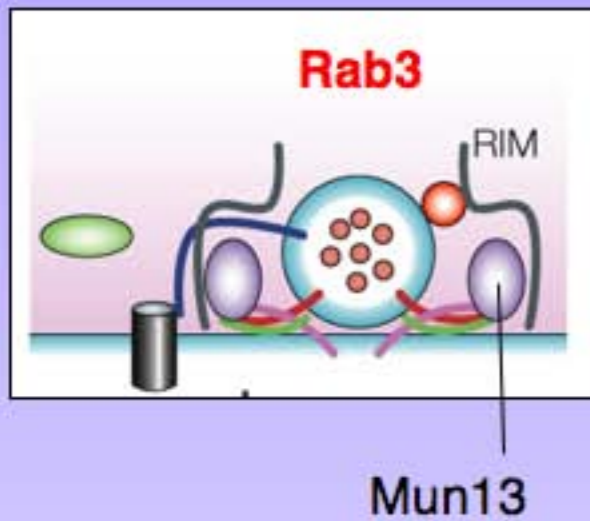


**Munc13**

Les neurones d'hippocampe de souris KO Munc13-1 forment des synapses normales au niveau ultra structurales. En l'absence de munc13, la formation du RRP est compromise, le priming est donc altéré dans les synapses excitatrices. Les synapses inhibitrices ne sont pas atteintes.



# Régulation par la GTPase Rab3



Rizo & Rosenmund, Nat Struct & Mol Biol (2008)

Formation d'un complexe tripartite avec Munc13, Rab3a et Rim.



# Régulation de l'exocytose

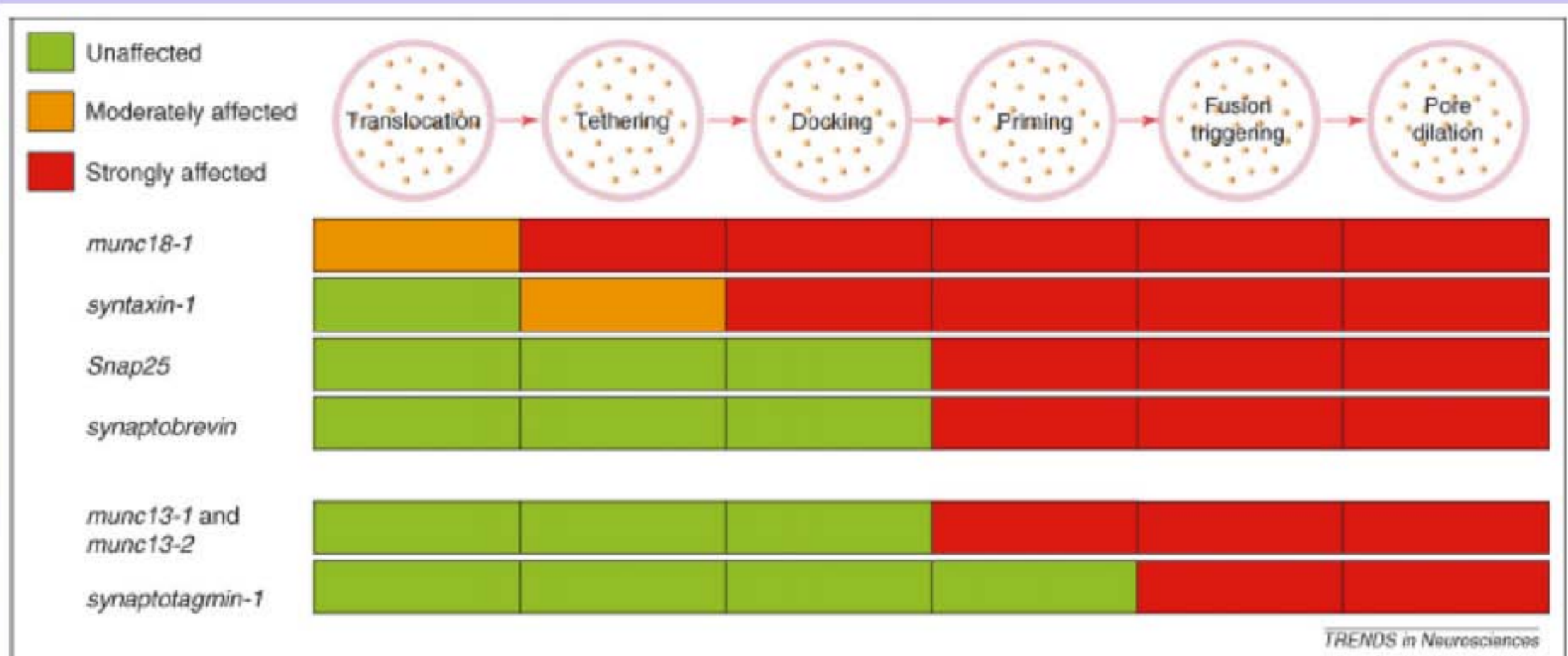
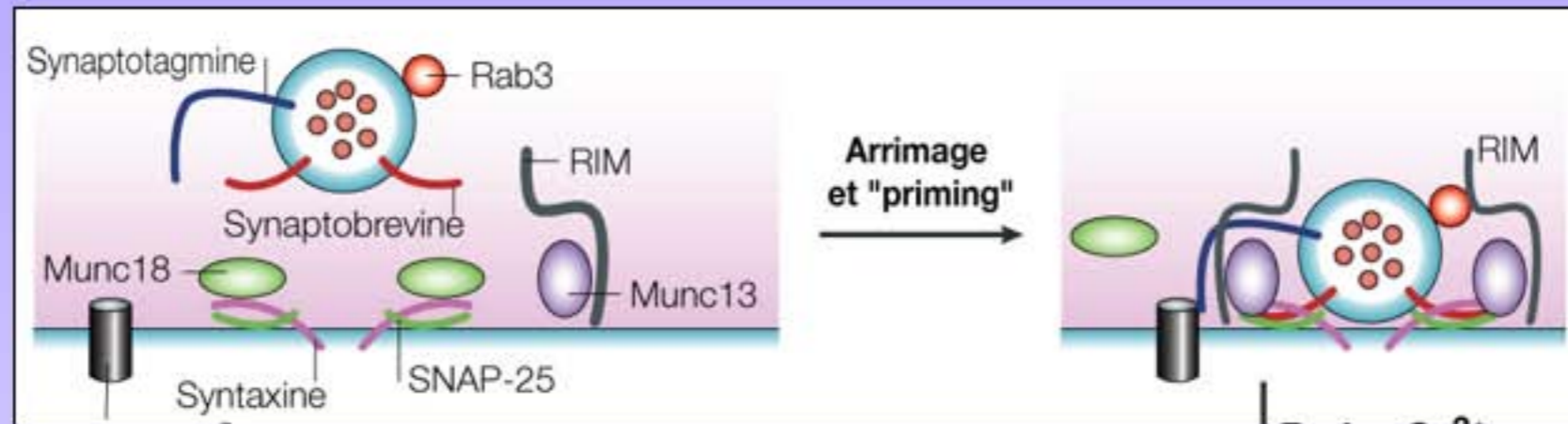
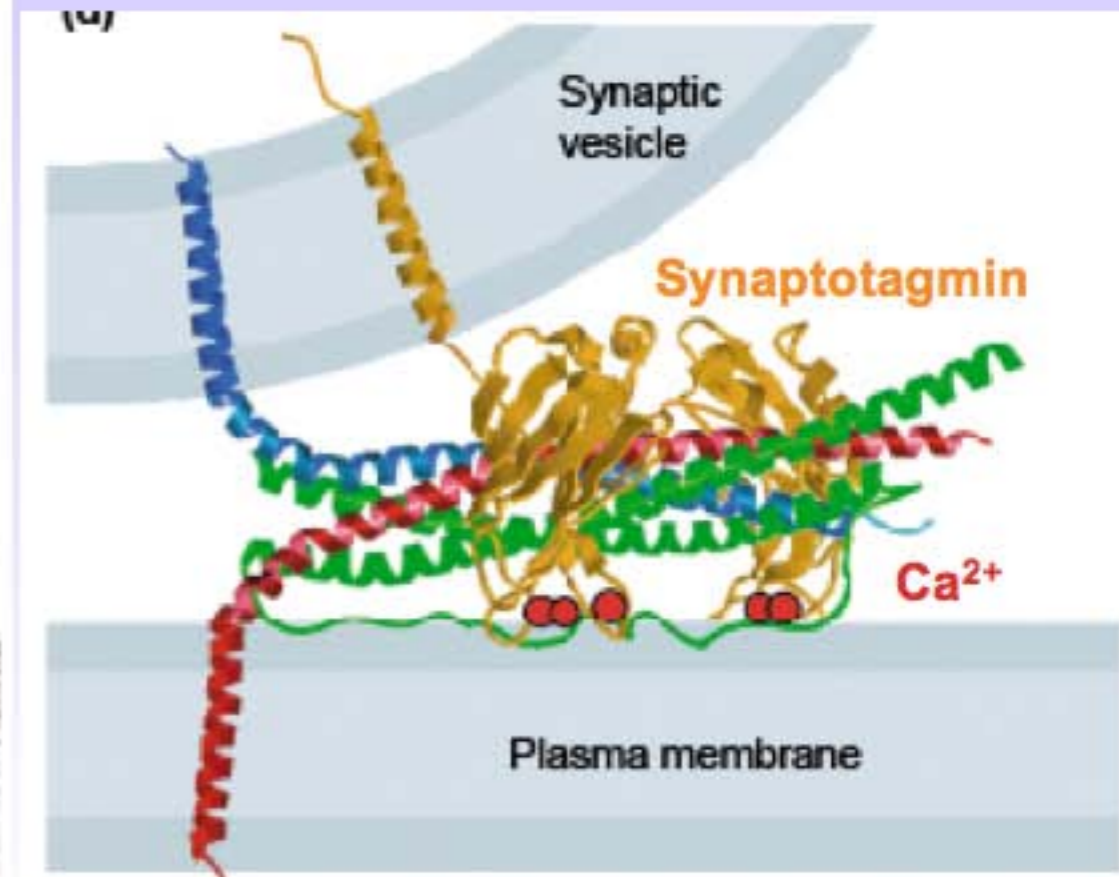
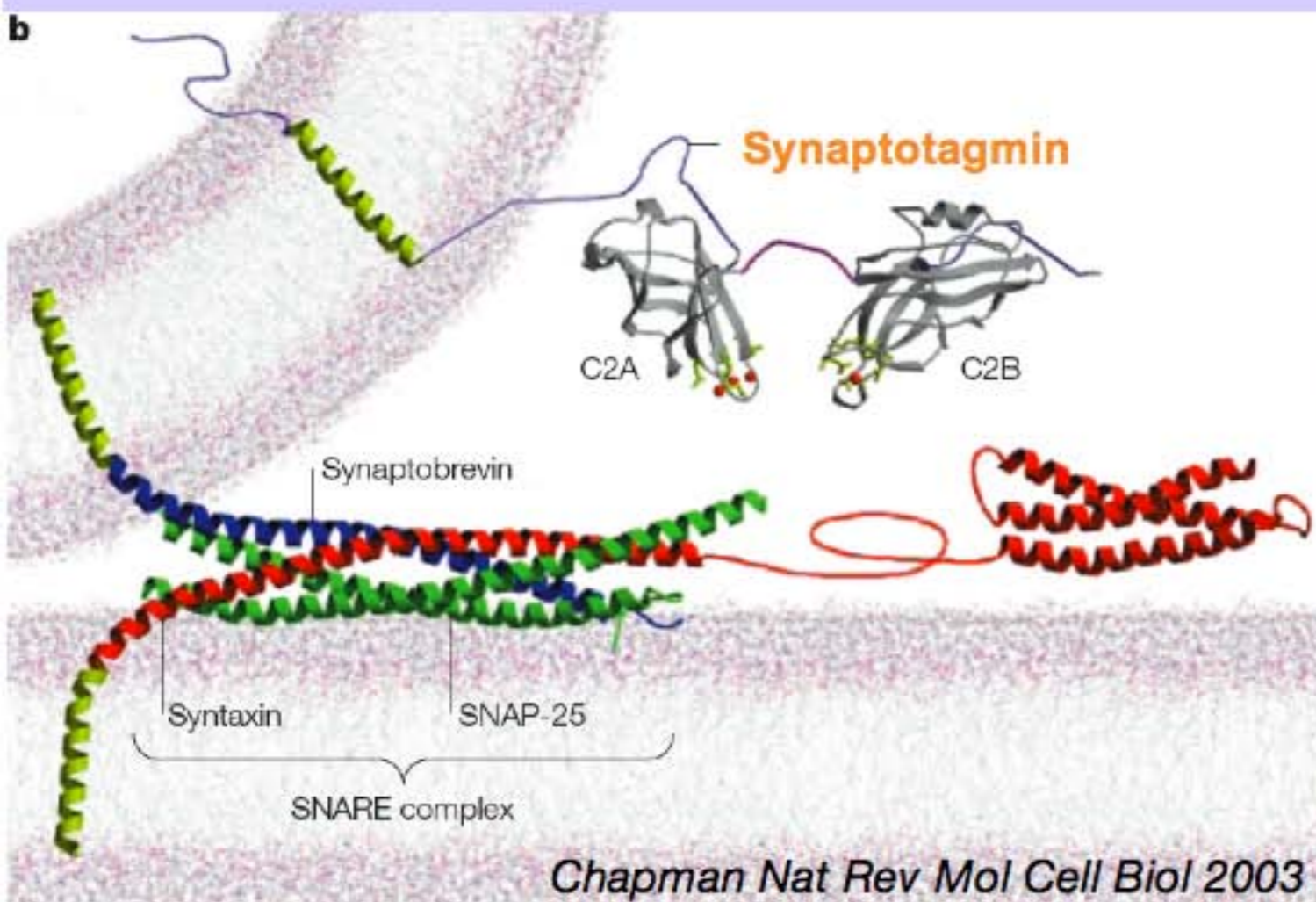
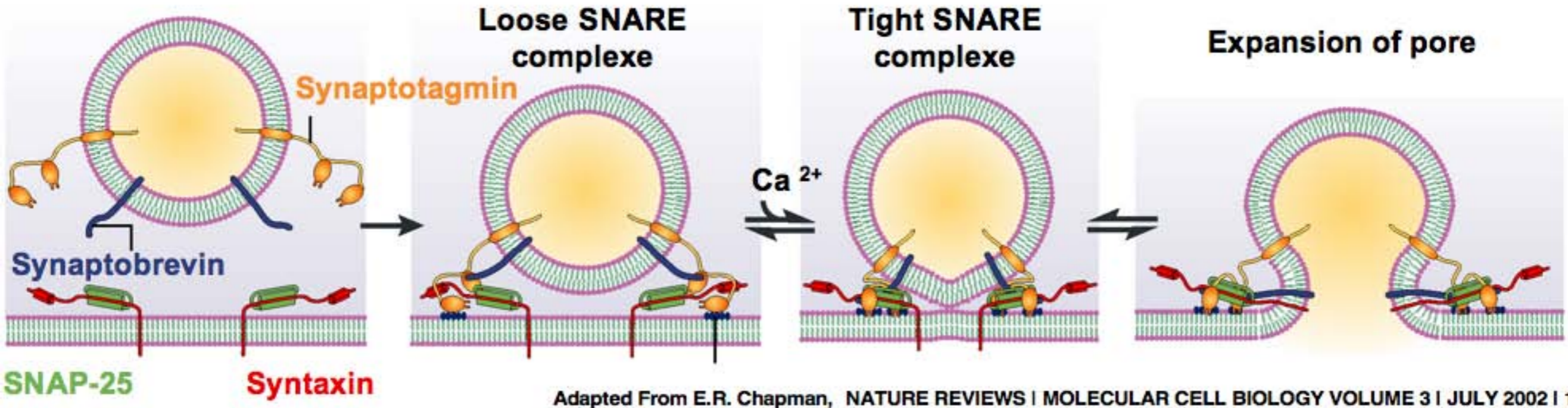


Figure 2. Overview of the steps in the secretory vesicle cycle that are affected by deletion of the respective genes. Deletion of *munc18-1* affects all steps in the cascade. Deletion of the SNARE genes (reviewed in [1]) results in priming defects with syntaxin-1 sharing a more upstream (docking) phenotype with Munc18-1 [25]. Deletion of *munc13-1* and *munc13-2* [68] and *synaptotagmin-1* [72] does not affect vesicle harboring at the membrane, but results in priming and fusion triggering defects, respectively.

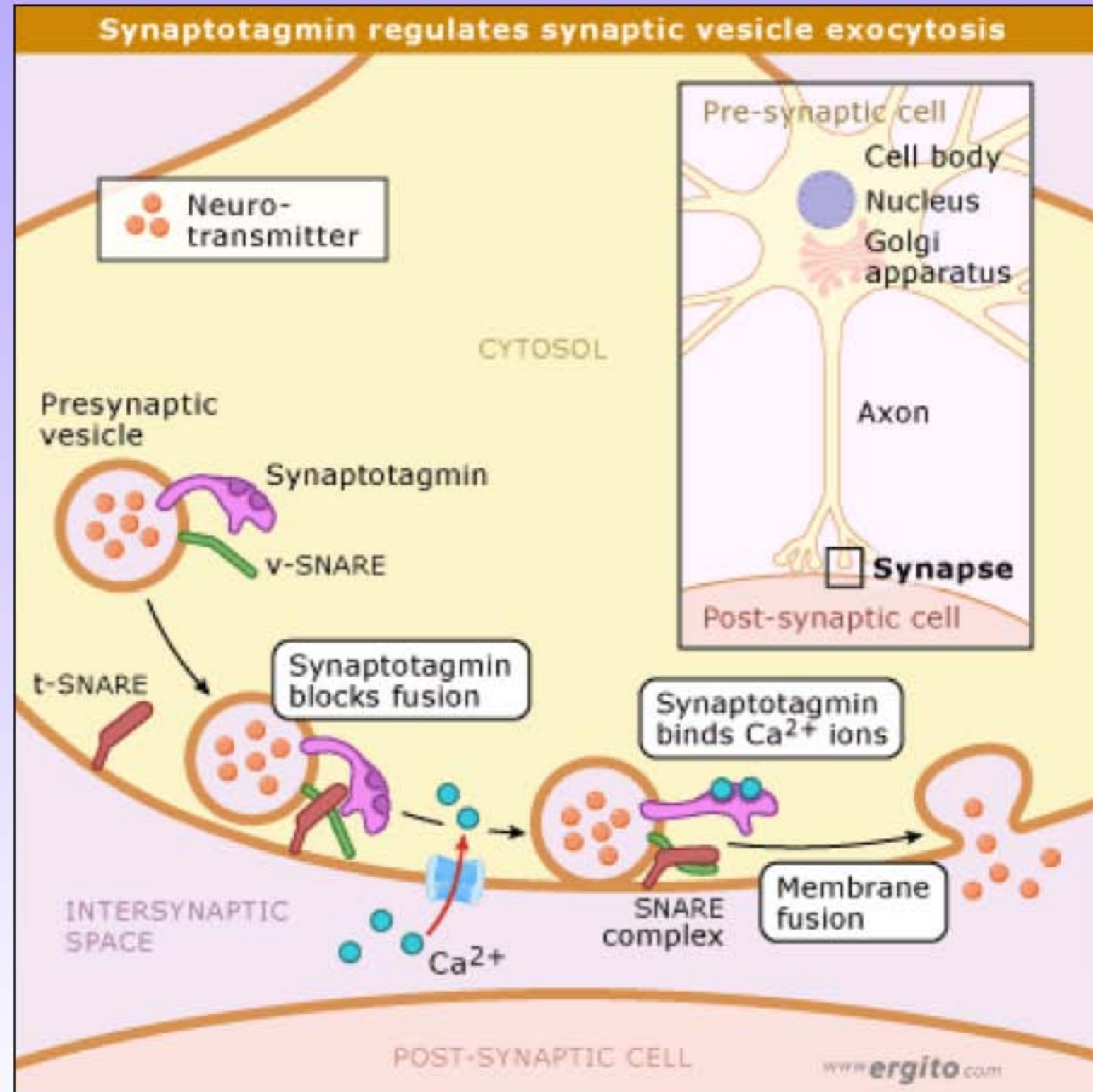
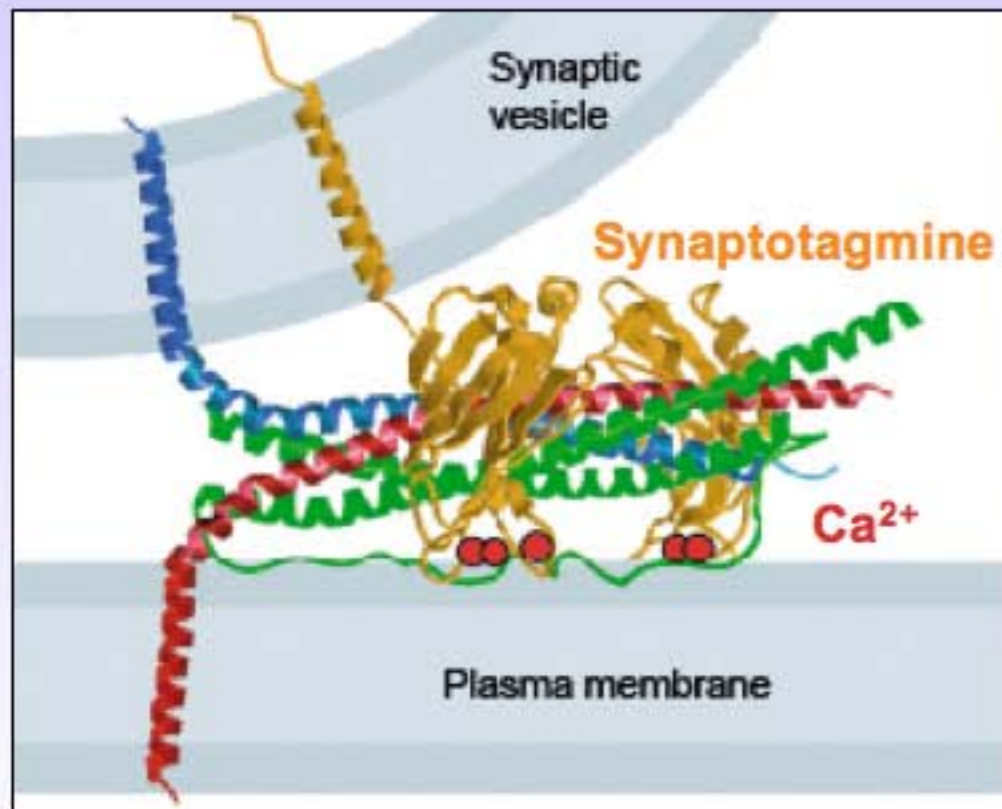
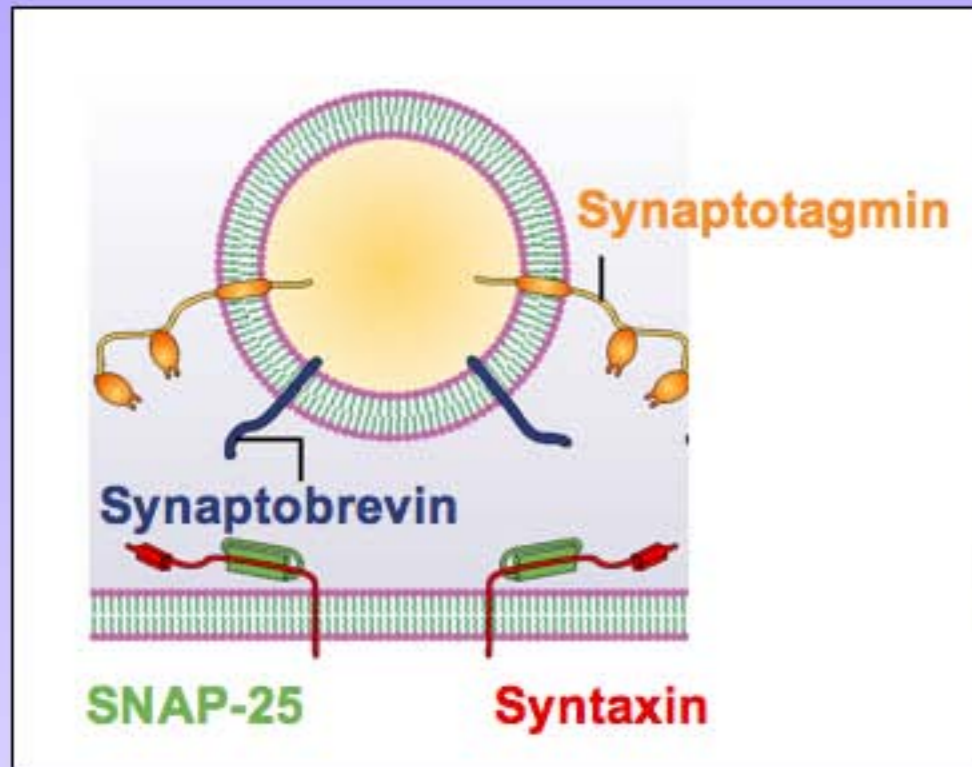


# Régulation de l'exocytose par la synaptotagmine



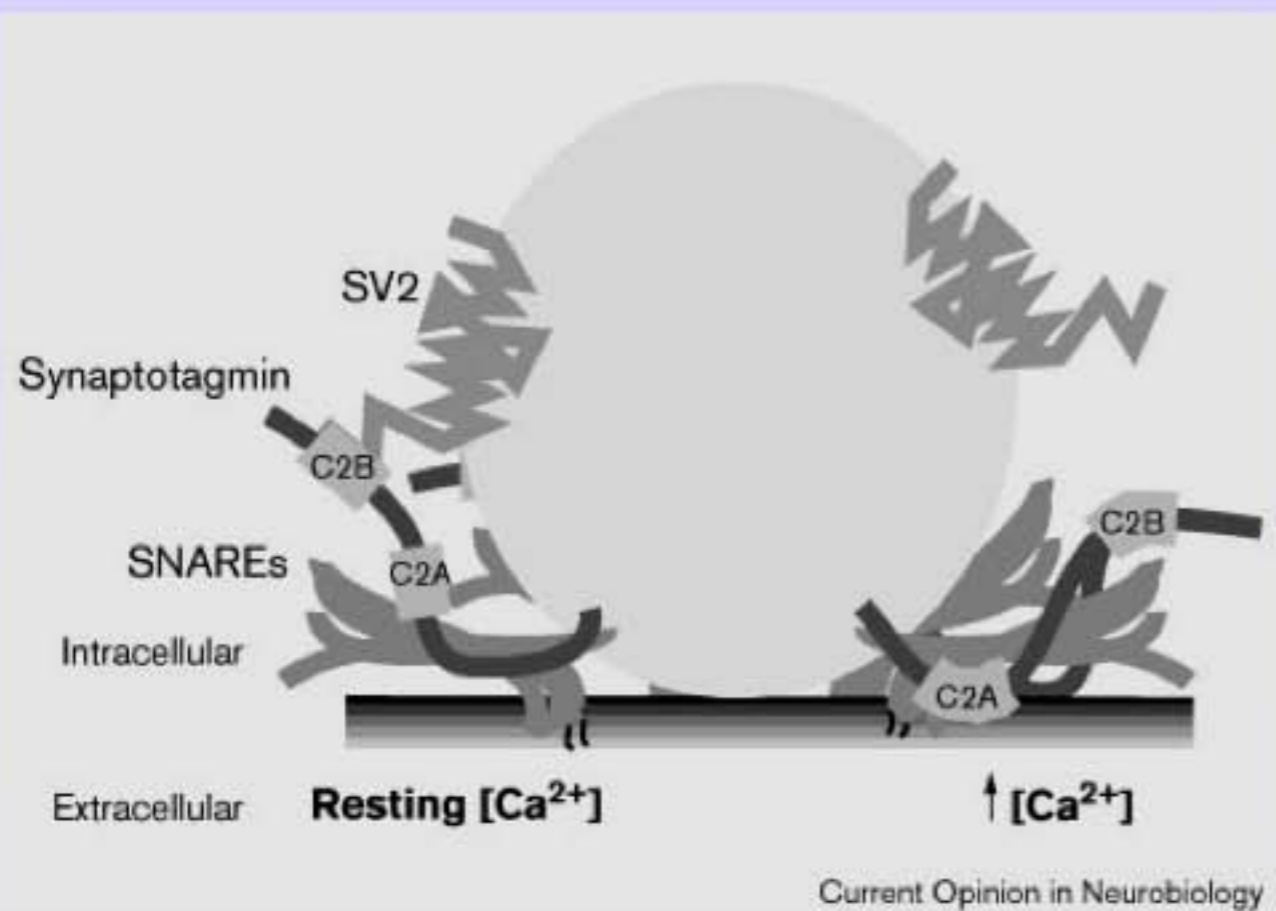
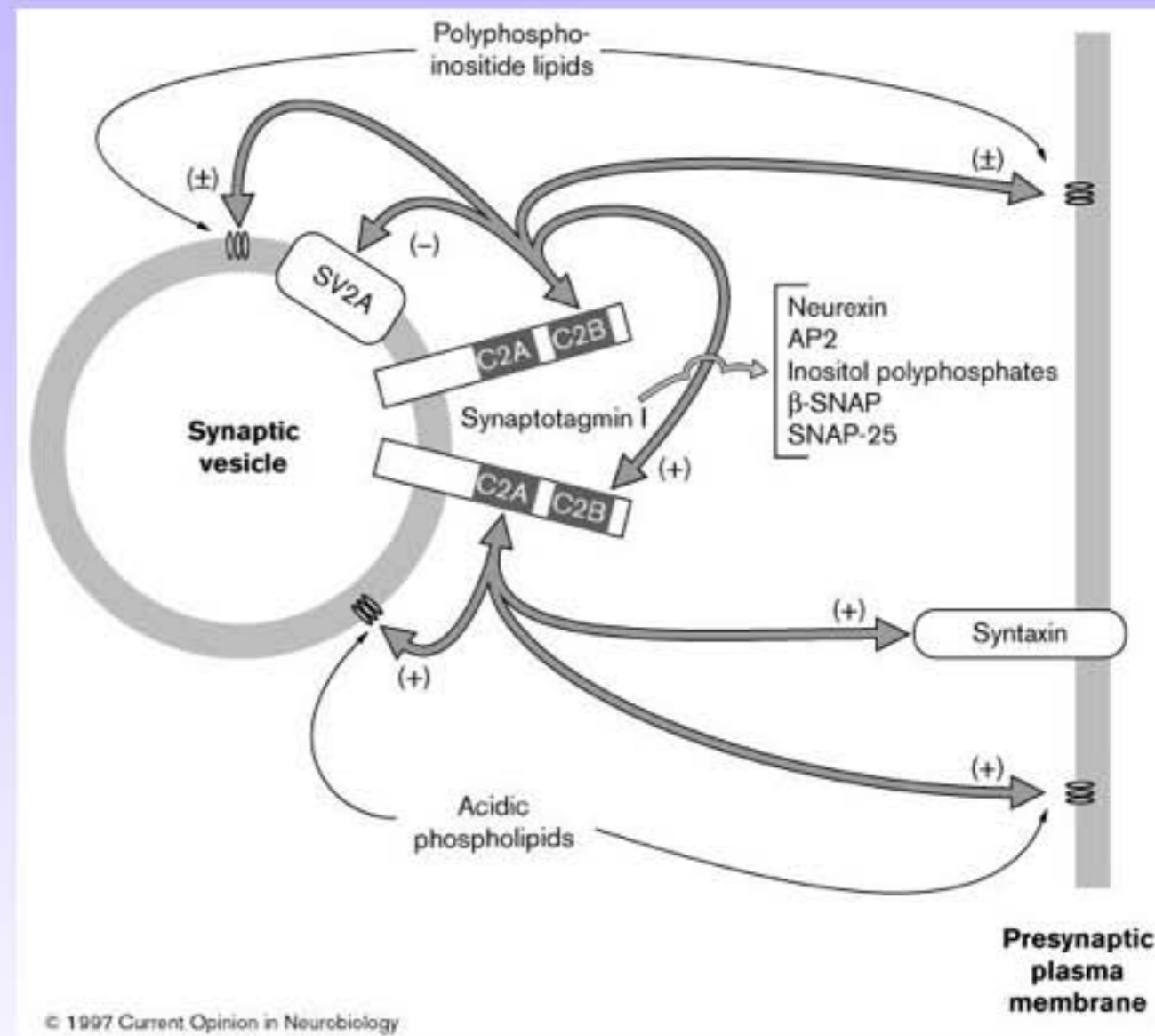
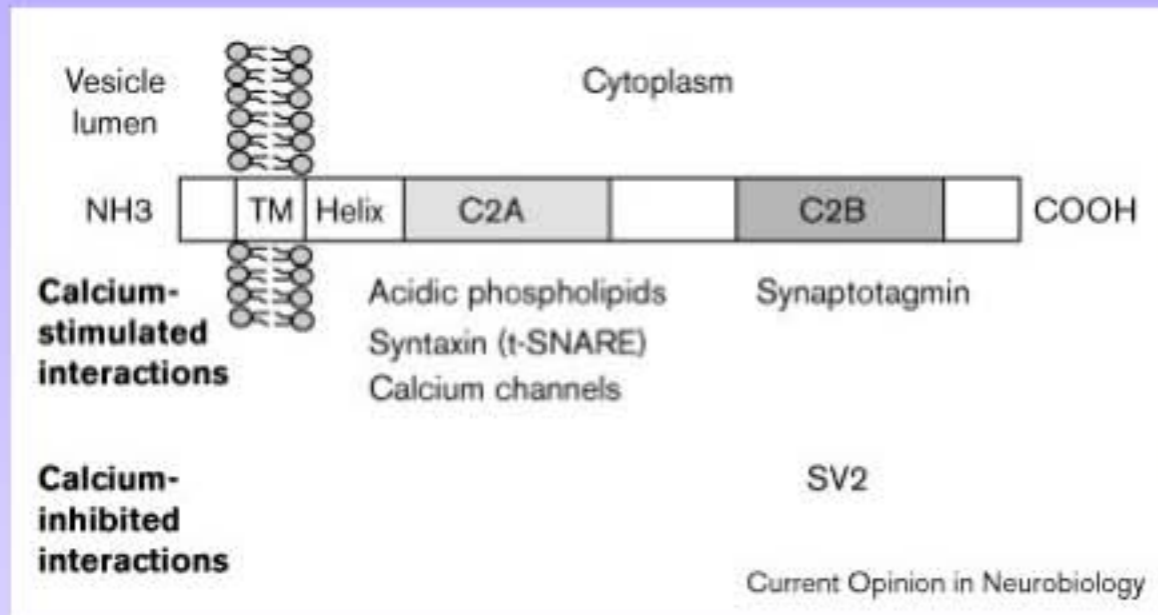


# Régulation de l'exocytose par la synaptotagmine



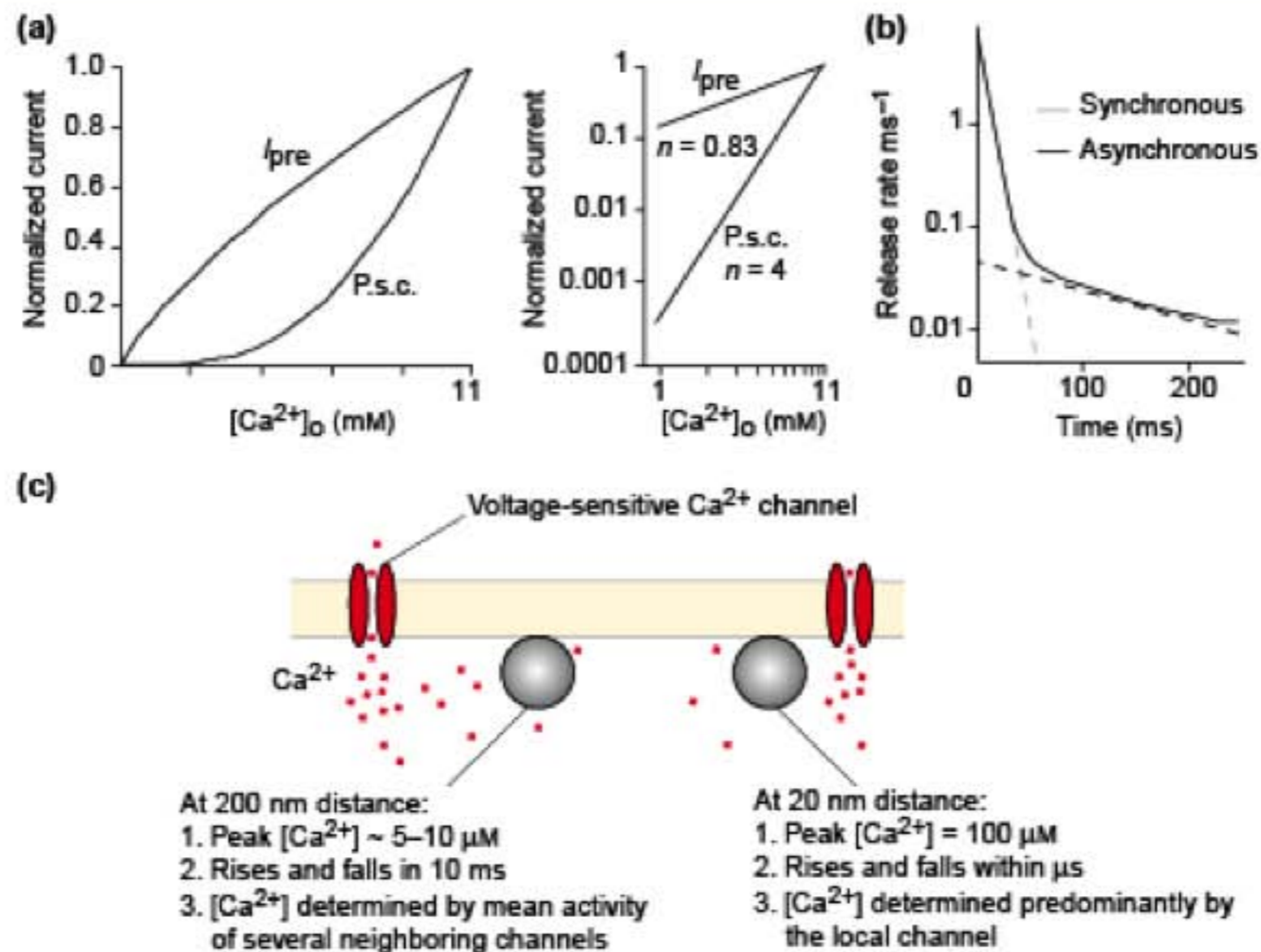


# Régulation de l'exocytose par le calcium





# Calcium et exocytose



TRENDS in Neurosciences

Fig. 1.  $Ca^{2+}$  cooperativity and biphasic neurotransmitter release. (a) Relationships of presynaptic  $Ca^{2+}$  current ( $I_{pre}$ ) and postsynaptic current (P.s.c.) with external  $Ca^{2+}$  concentration,  $[Ca^{2+}]_o$  [4]. Adapted, with permission, from Ref. [4]. The same data are represented schematically on linear (left) and log-log (right) coordinates. The exponential function ( $n$ ) next to each log-log plot is a measure of the  $Ca^{2+}$ -dependent cooperativity of neurotransmitter release (see main text). Note that the differences in the slopes of  $I_{pre}$  and P.s.c. indicate that the cooperativity is mediated by binding sites downstream of the  $Ca^{2+}$  channel – that is, inside the terminal. (b) Under normal conditions, neurotransmitter release at a hippocampal synapse consists of a rapid, synchronous phase followed by a delayed, asynchronous phase. Using data from Ref. [6]. (c) Properties of  $Ca^{2+}$  domains around a  $Ca^{2+}$  channel. Small red circles represent  $Ca^{2+}$  and the gray spheres represent synaptic vesicles docked on the presynaptic membrane. Using data from Ref. [14].



# Mutants de syt

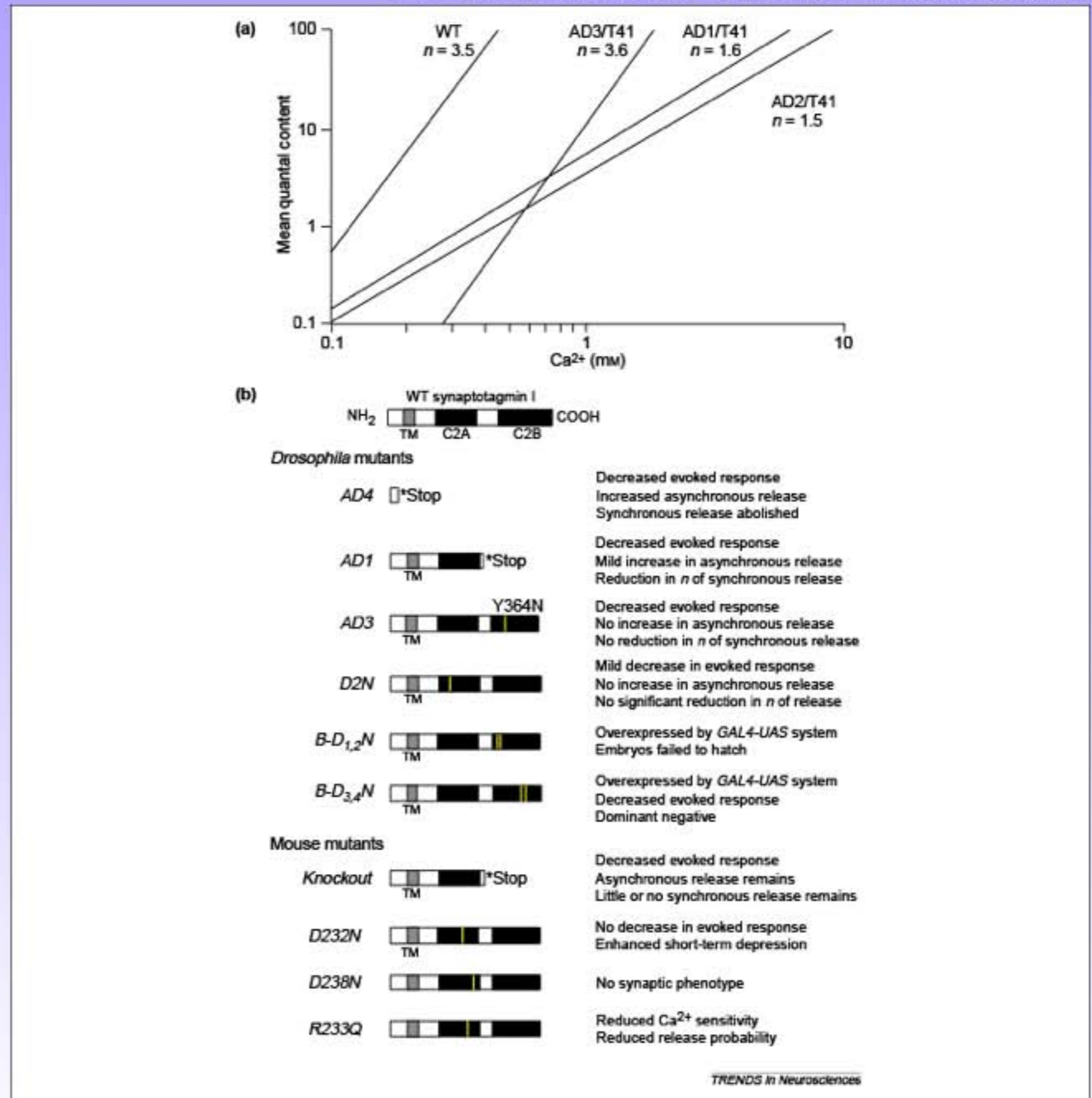


Fig. 3. Properties of synaptotagmin I mutants. (a) A schematic log-log plot of mean quantal content released and external  $Ca^{2+}$  concentration, showing the alteration of  $Ca^{2+}$  cooperativity at the neuromuscular junction of *Drosophila* third-instar larvae carrying allelic combinations of synaptotagmin I mutations compared with wild-type (WT) larvae. Adapted from Ref. [37]. (b) Domain structures of a generalized wild-type synaptotagmin I protein and mutant proteins created in *Drosophila* and mouse. Note that the mouse knockout mutant expresses the truncated protein at ~5% wild-type level. Gray boxes indicate the transmembrane domain (TM) and black boxes indicate the C2A and C2B domains. Yellow bars indicate the positions of point mutations. Effects of each mutation are listed.



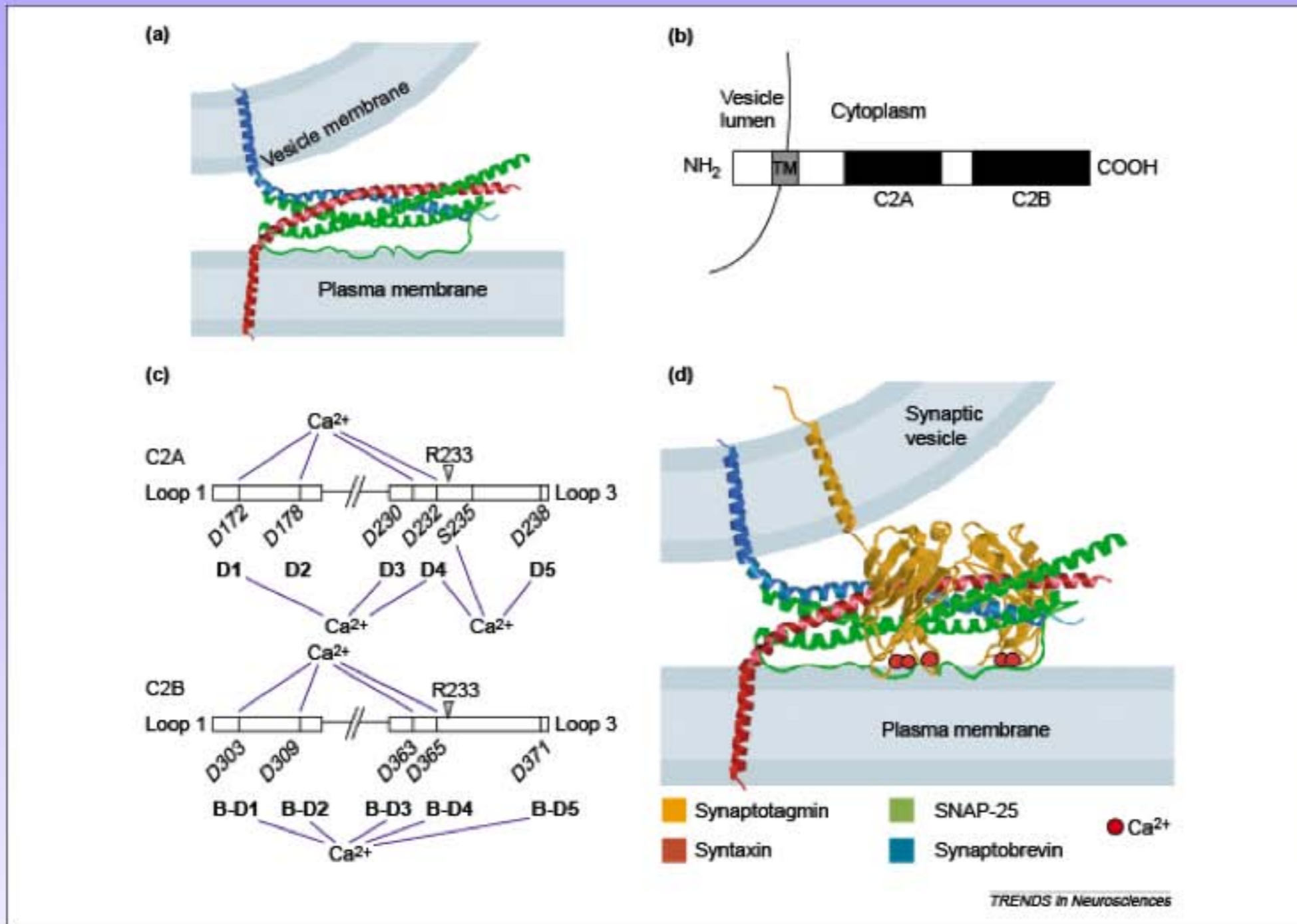
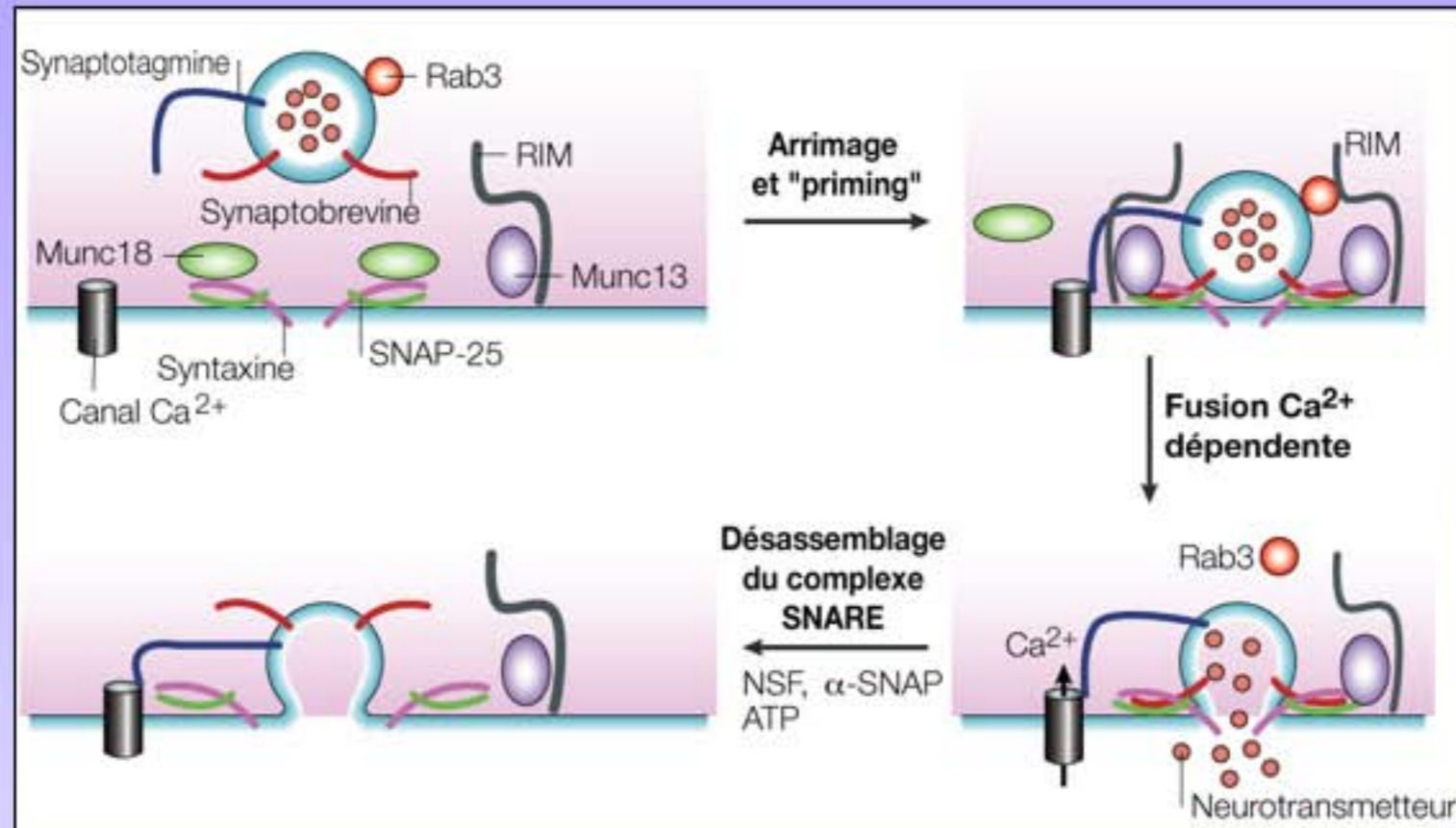


Fig. 2. Structures of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein receptor (SNARE) complex and synaptotagmin I. (a) Structure of the four-helix bundle of the SNARE complex. Adapted, with permission, from Ref. [15], q (1998) Nature Publishing Group ( <http://www.nature.com/> ). Shown are synaptobrevin (blue), the syntaxin transmembrane domain and C-terminal helix (red), and the helical domains of synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25; green), which are thought to be connected by an unstructured loop. (b) Domain structure of synaptotagmin I, showing the transmembrane domain in gray (TM) and the C2A and C2B  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domains in black. (c) Schematic diagram of the C2A and the C2B domains, showing the amino acid residues ( $\text{Ca}^{2+}$  ligands) that provide the side chains that coordinate  $\text{Ca}^{2+}$ . The R233 arginine residue (arrow head) is not a  $\text{Ca}^{2+}$  ligand but an Arg233Gln mutation leads to a twofold reduction in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipid binding [59]. (d) Cartoon showing the C2A and C2B domains (yellow) flanking the four-helix bundle formed by the SNARE fusion complex. Not shown here are the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent oligomerization of synaptotagmin I via the C2B domain (discussed in the main text) or the  $\text{Ca}^{2+}$ -independent oligomerization of synaptotagmin I with itself and with other related synaptotagmin proteins via the cytosolic juxtamembrane cysteine residues. The physiological role of the juxtamembrane cysteine residues of synaptotagmin I has not been demonstrated and the biochemical characterization of this domain is discussed elsewhere [29]. The SNARE complex is adapted from Ref. [15]. The structures of the synaptotagmin I C2A and C2B domains [23,71] are downloaded from the Protein Data Bank (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, <http://www.rcsb.org/pdb/index.html>) and rendered using the RasTop Version 2.0.3 software (Copyright q Philippe Valadon 2000–2003). Red circles represent the  $\text{Ca}^{2+}$  ions chelated by the loops within the C2A and C2B domains of synaptotagmin I.



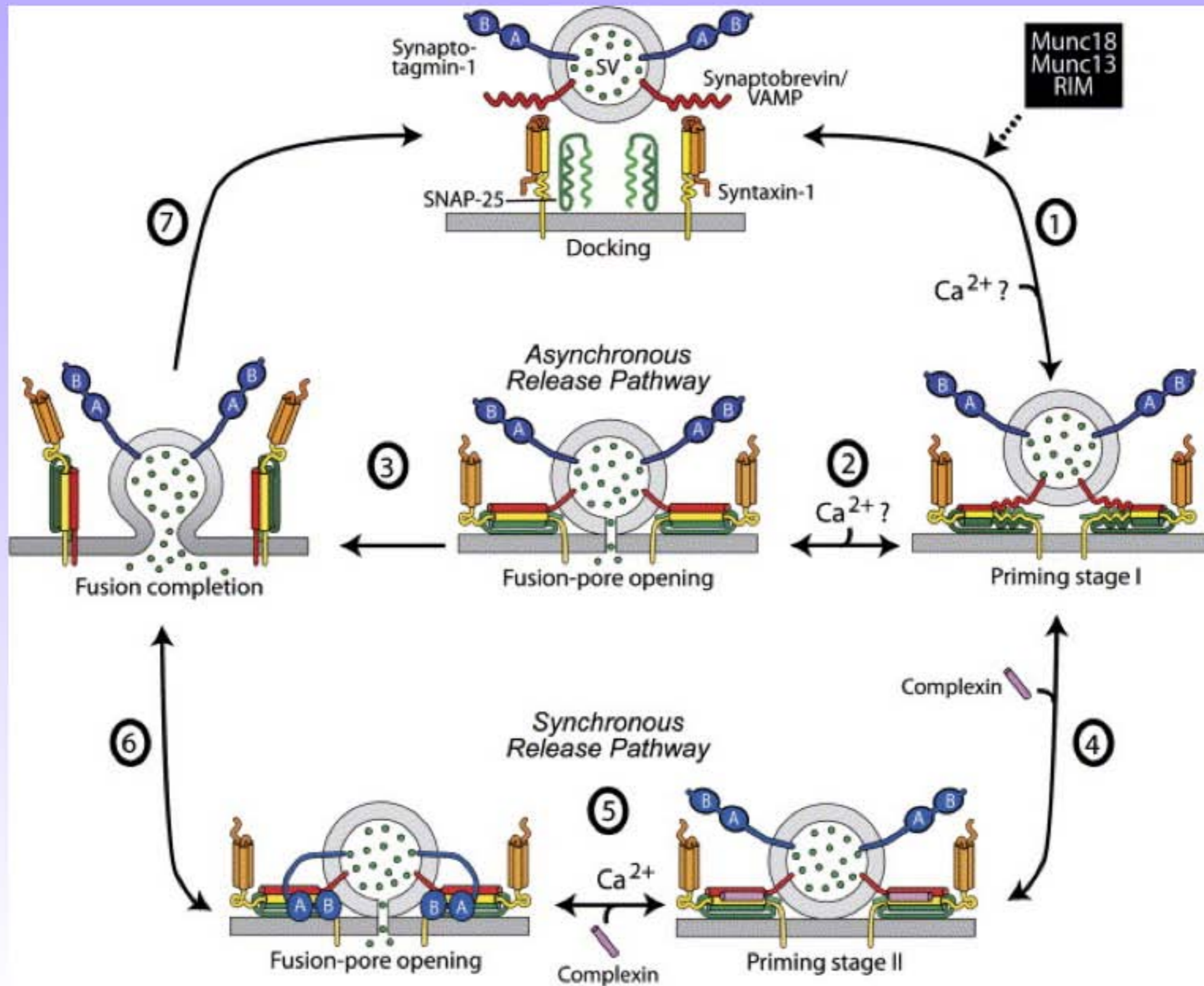
# Régulation de l'exocytose



TRENDS in Neurosciences

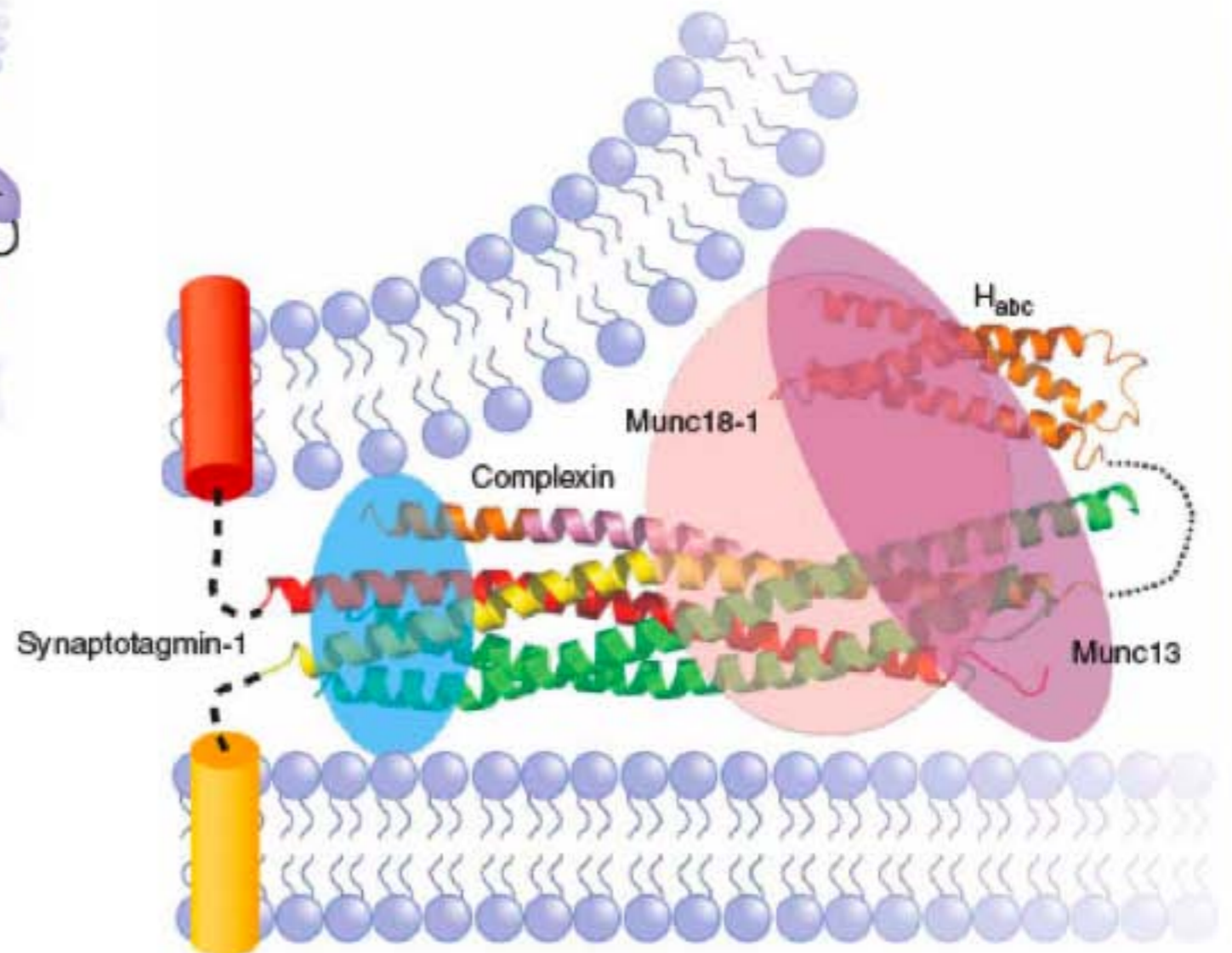
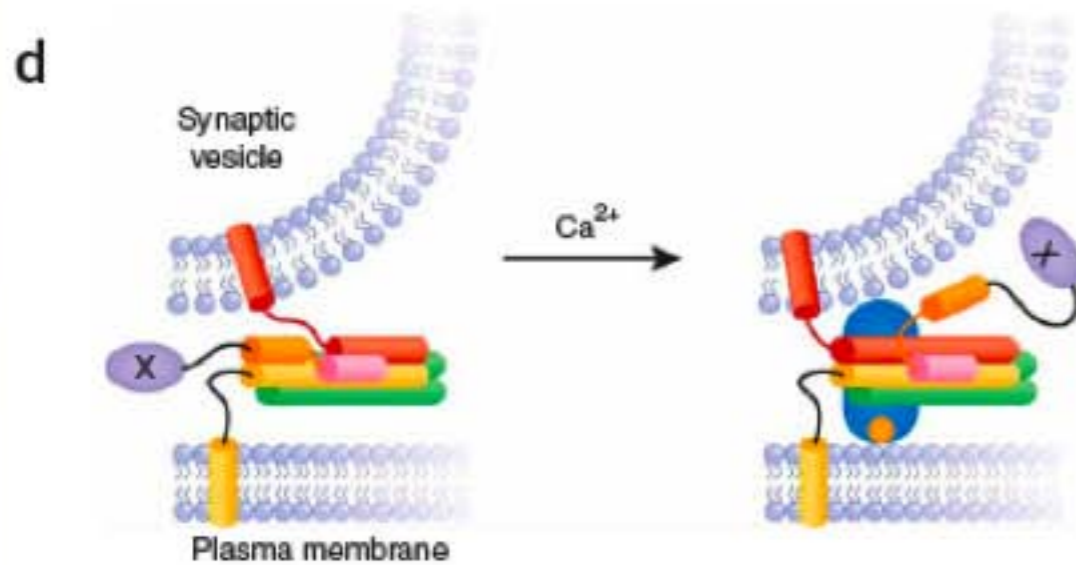
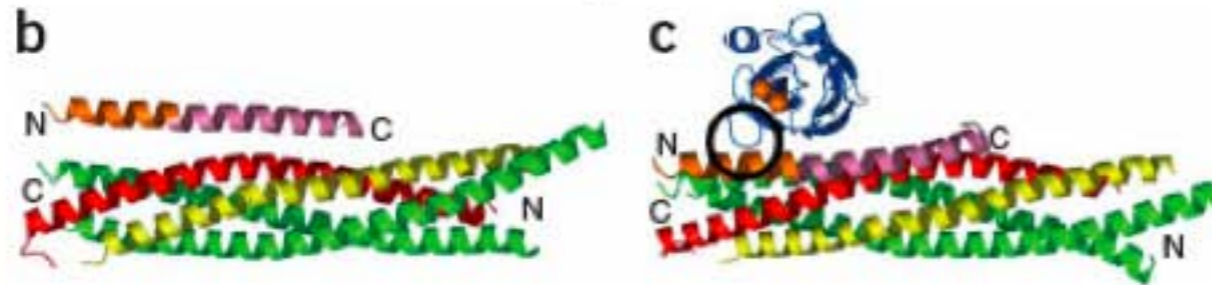
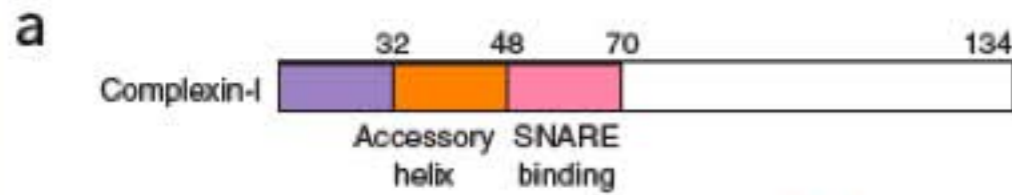


# Régulation par la complexine





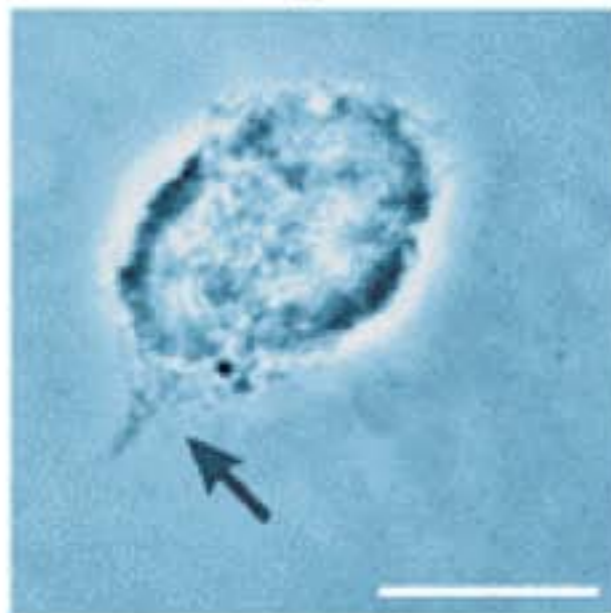
# Régulation par la complexine



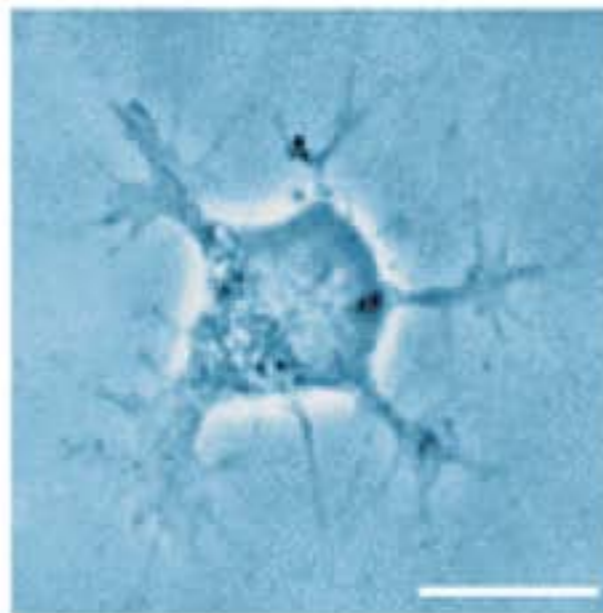


# Rôle des SNARE dans la neuritogenèse

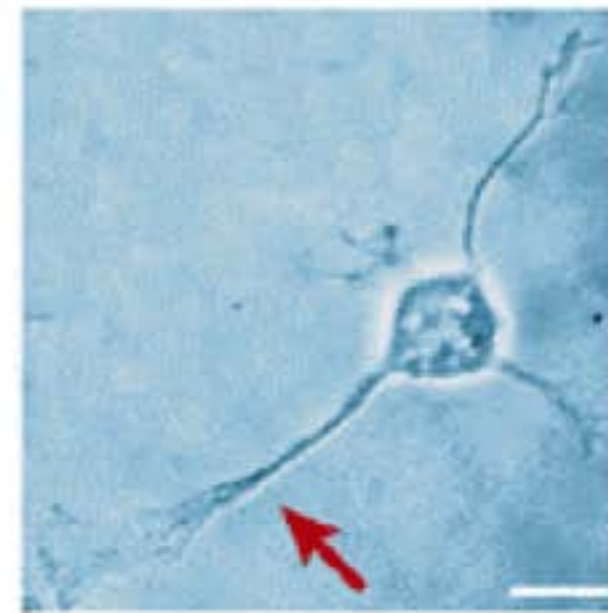
**a** Initial budding



Neurite formation



Polarization



**b** Initial budding



Neurite formation



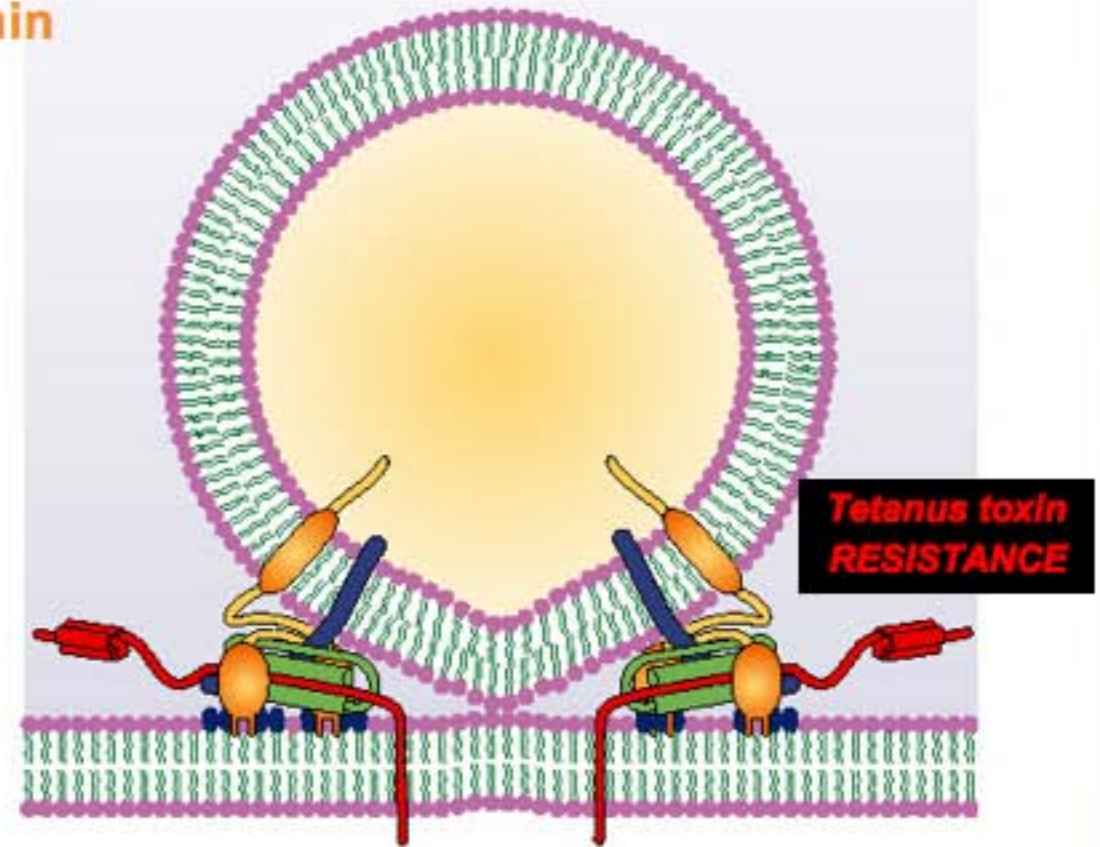
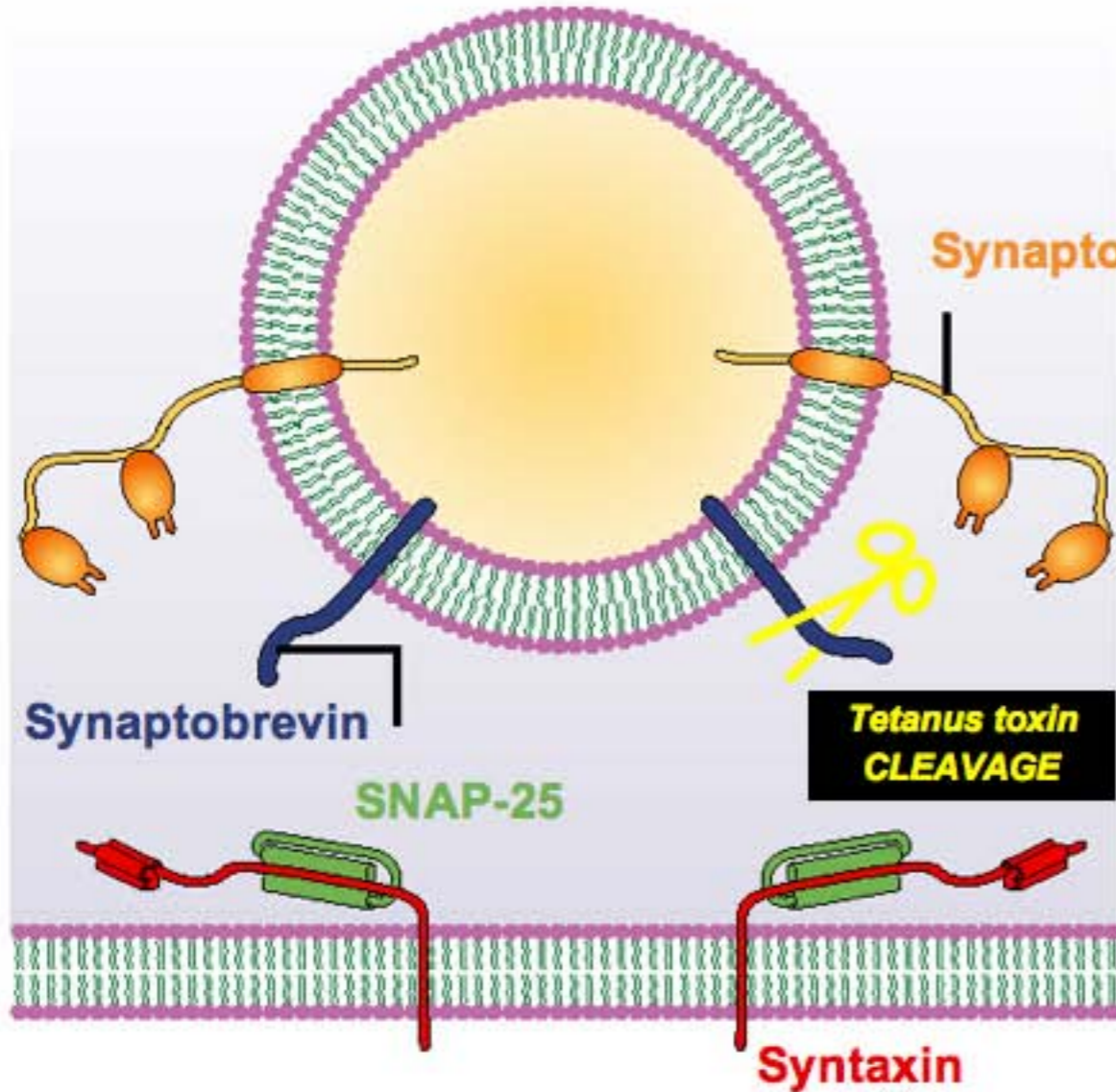
Polarization



**Tetanus  
Neurotoxin  
resistant**



# Tetanus toxin efficiency



Modified from E.R. Chapman, Nat Rev Mol Cell biol (2002) & Xu et al. Nat. Neurosci (1998)

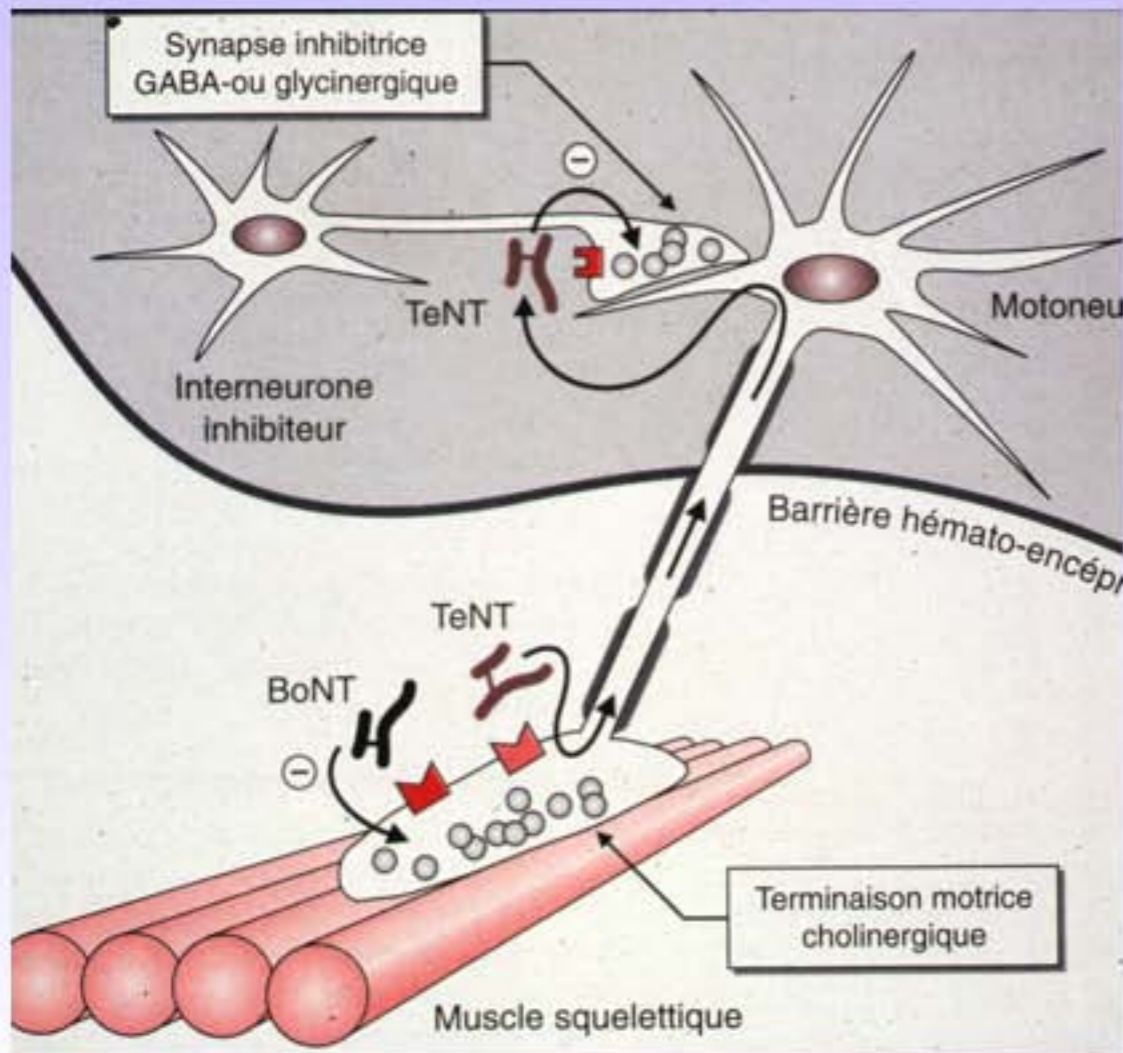
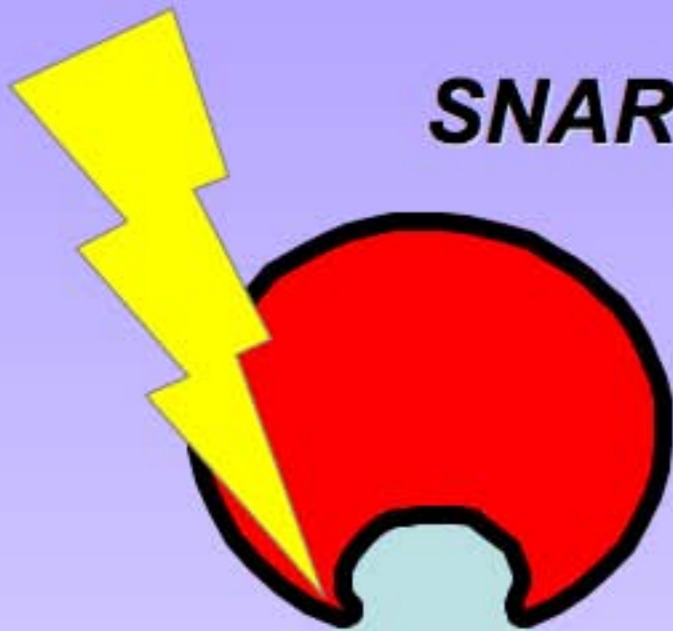
**Tetanus toxin  
CLEAVAGE**

**Tetanus toxin  
RESISTANT**

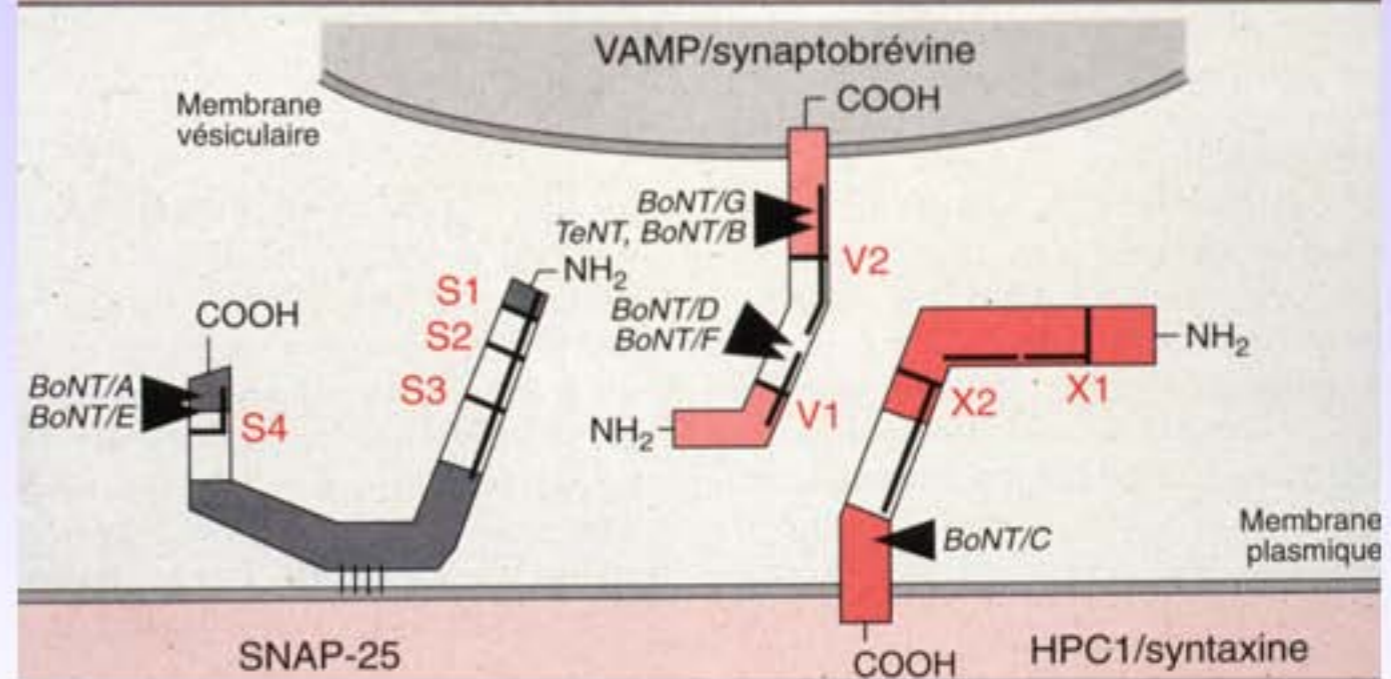
**Tetanus toxin can not cleave the synaptobrevin in SNARE complexe**



# SNAREs: cibles des neurotoxines clostridiales

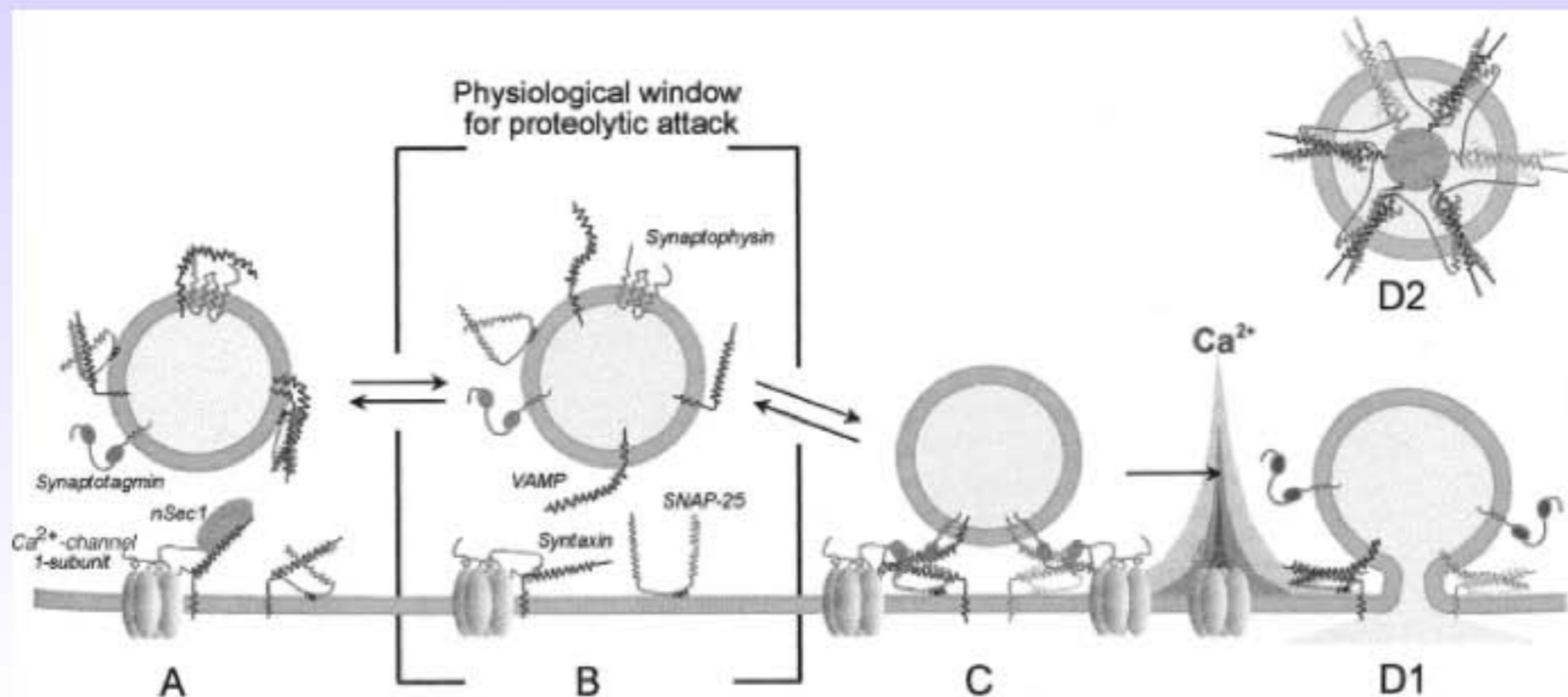
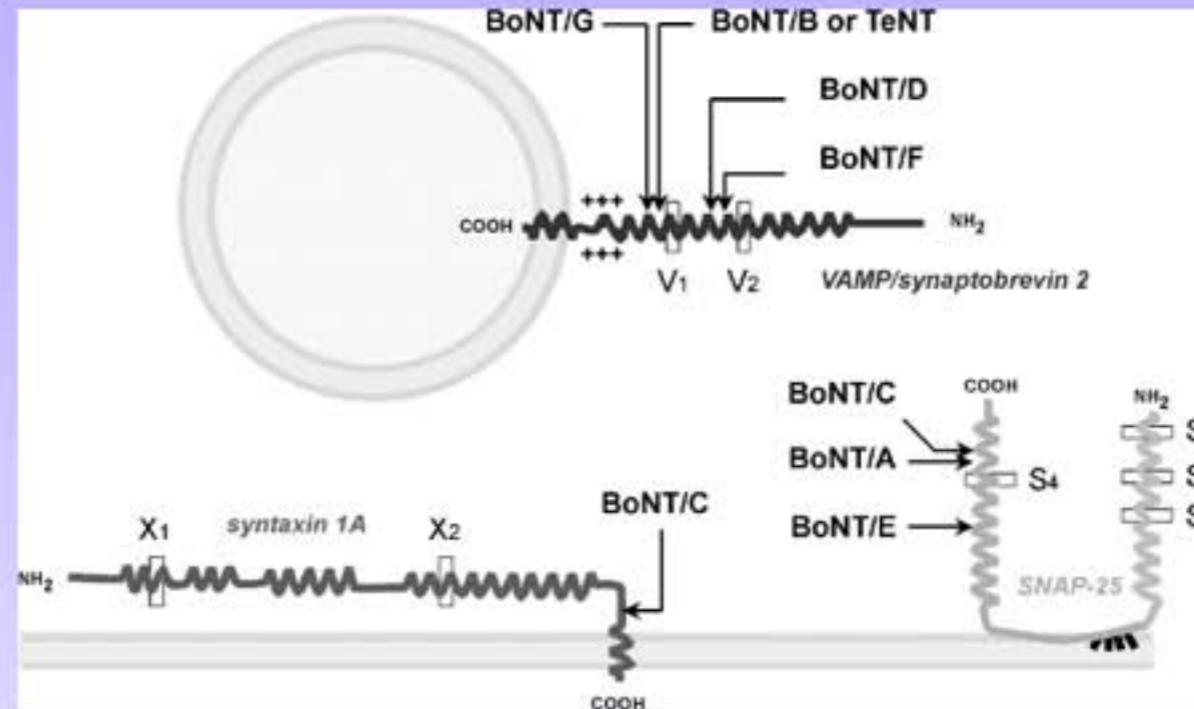
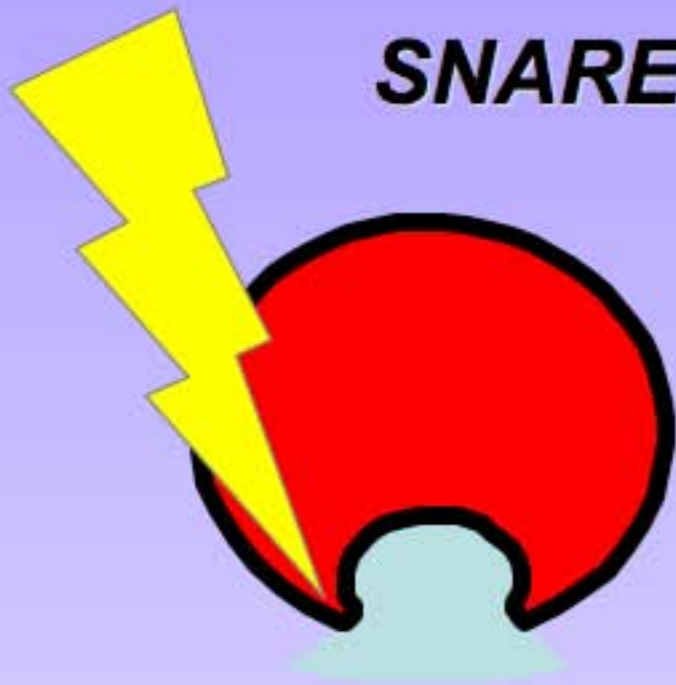


Toxine	Cible	Site de reconnaissance	Site de clivage
TeNT	VAMP	V2 : ELDDRADALQ	ASQFETS
BoNT/B	VAMP	V2 : ELDDRADALQ	ASQFETS
BoNT/D	VAMP	V1 : QVDEVVDIMR	DQKLSEL
BoNT/F	VAMP	V1 : QVDEVVDIMR	RDQKLSE
BoNT/G	VAMP	V2 : ELDDRADALQ	ESAAKLK
BoNT/A	SNAP-25	S4 : EMDENLEQVSG	ANQRATK
BoNT/E	SNAP-25	S4 : EMDENLEQVSG	KTRIDEA
BoNT/C	Syntaxine	X2 : ELEDMLSEGN	TKKAVKY
motif consensus		xh--xh-xhp	





# SNAREs: cibles des neurotoxines clostridiales





# Applications des Neurotoxines ...

**Dysport**  
TOXINE BOTULIQUE TYPE A • 500 UNITÉS SPEYWOOD

*La maîtrise biopharmaceutique...*

*Une action focalisée sur la clé synaptique*

*... au service des Dystonies*

*Une cible spécifique : la jonction neuromusculaire*

Vésicule d'acétylcholine  
Fente synaptique  
Fibre musculaire contractile

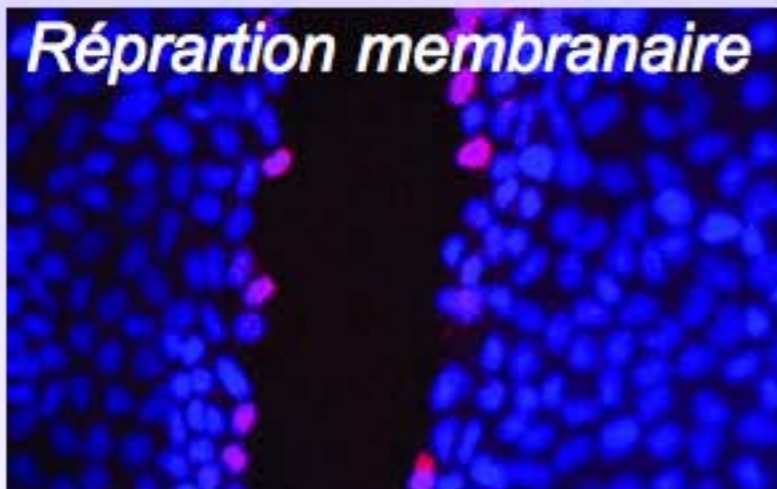
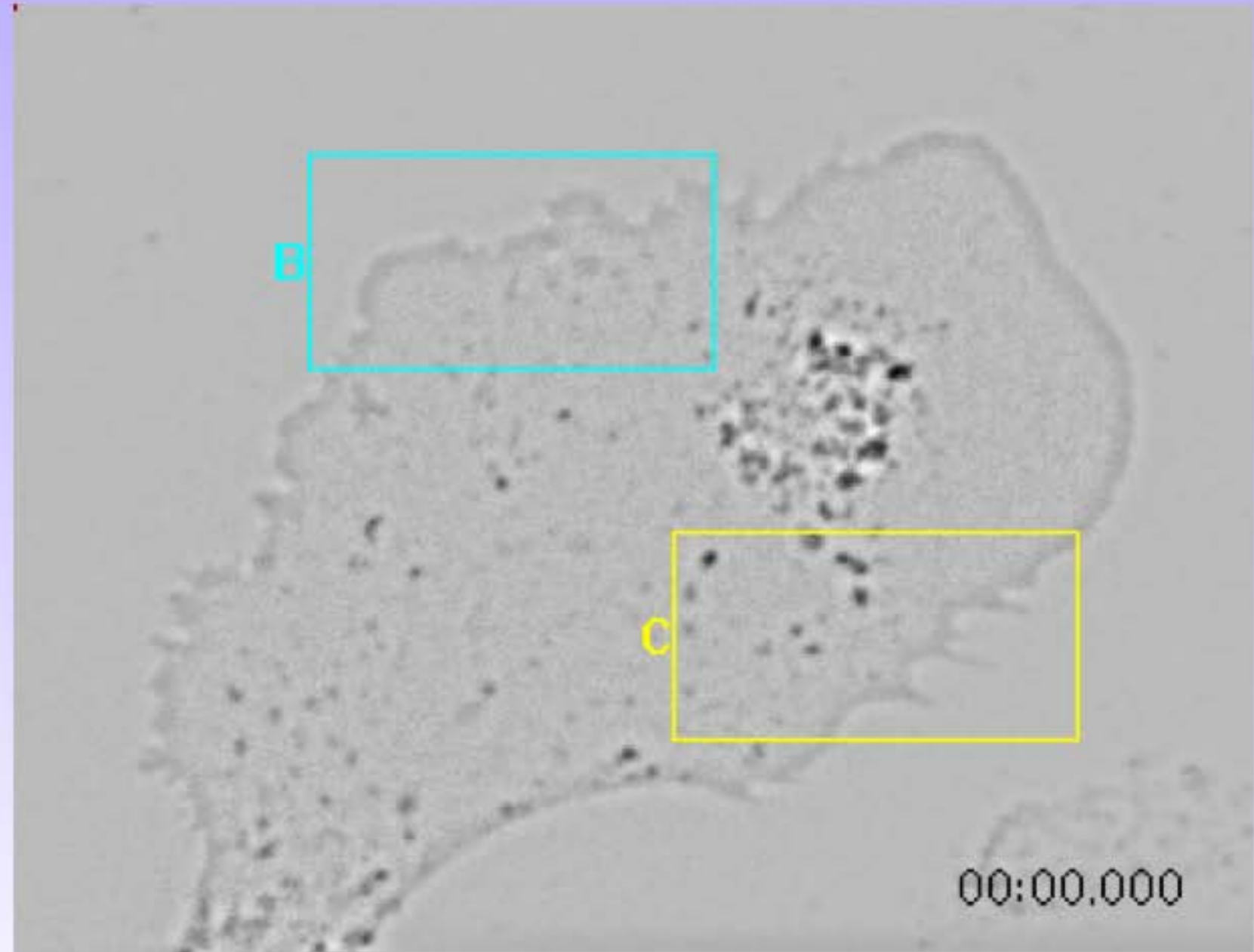
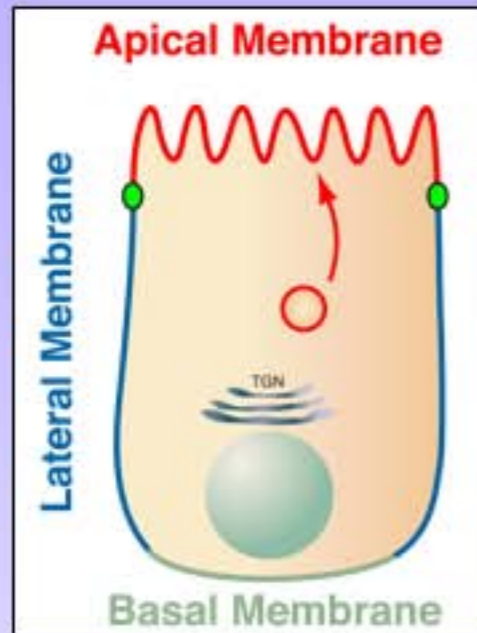


Traitement des dystonies (hypercontractions musculaires involontaires et douloureuses).

Esthétique: injection de « BOTOX »:  
Paralysie musculaire pendant 5 à 6 mois.



# La cellubrevine est nécessaire à la réparation membranaire et la migration des cellules épithéliales

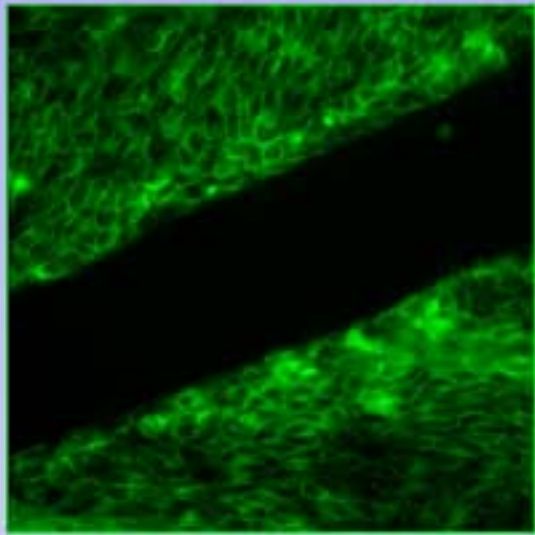


(Proux-Gillardeaux, 2007)

Proux-Gillardeaux & al, PNAS 2005



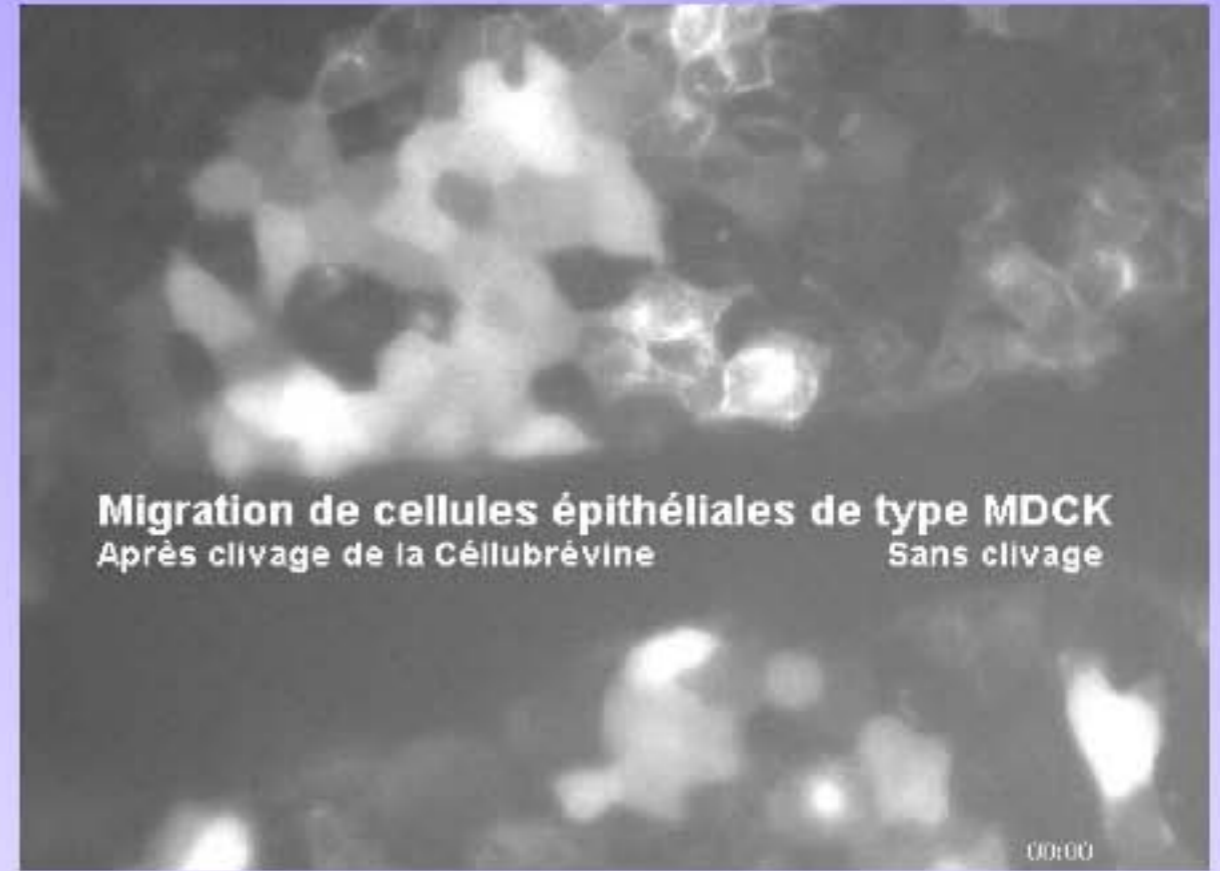
# La toxine tétanique clive la cellubrévine et ralentit la migration des cellules épithéliales



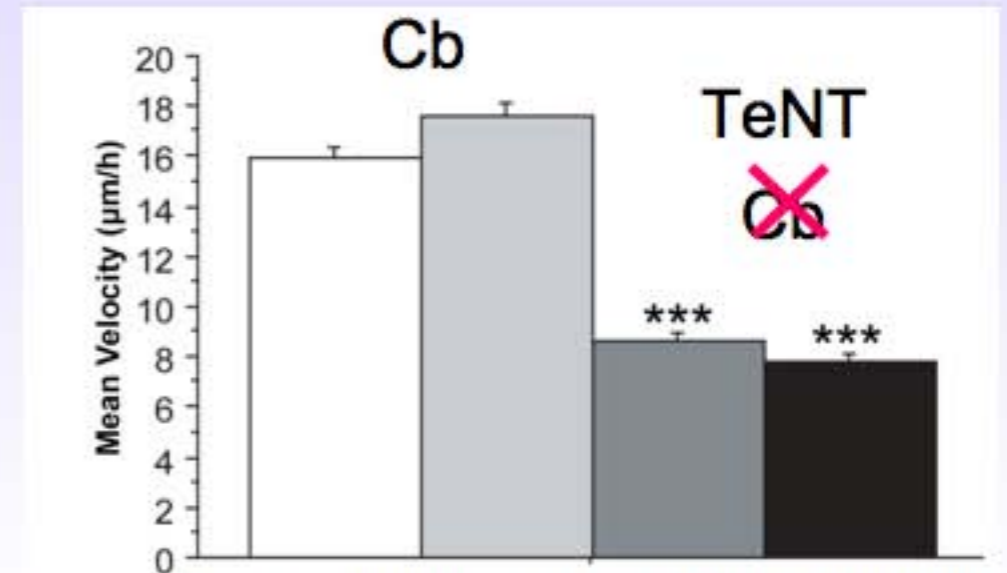
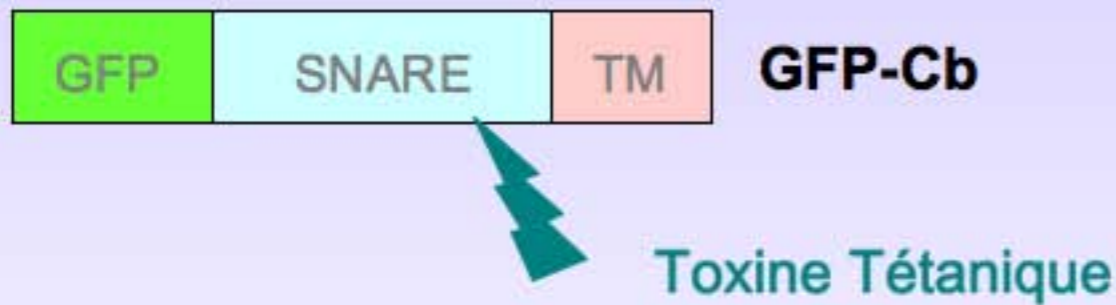
Blessure réalisée sur un tapis de cellule épithéliale :  
-> favorise la migration

GFP-Cb

*Proux-Gillardeaux & al, PNAS 2005, BoC 2007*



Migration de cellules épithéliales de type MDCK  
Après clivage de la Célubrévine      Sans clivage



*Proux-Gillardeaux & al, PNAS 2005, BoC 2007*



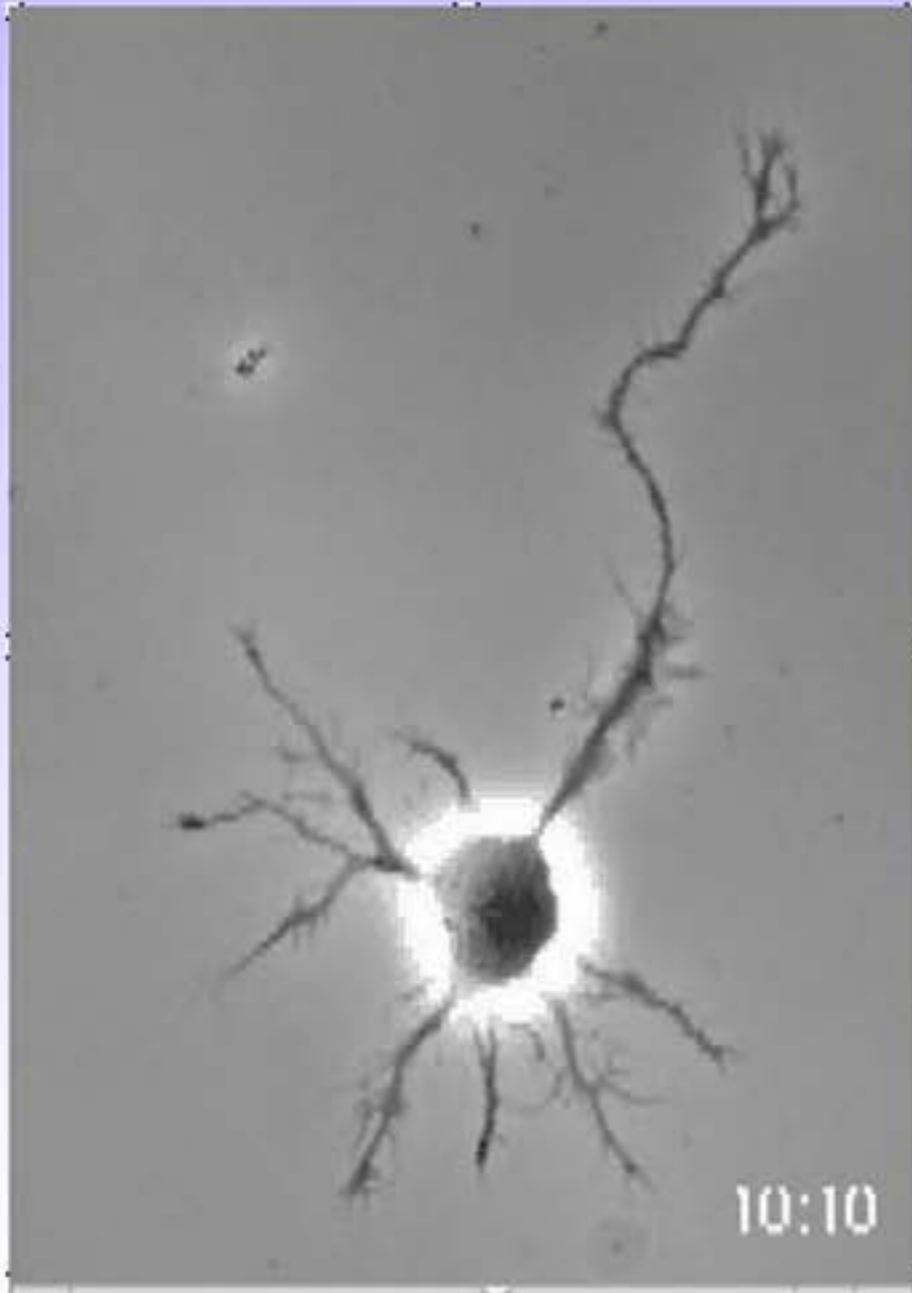
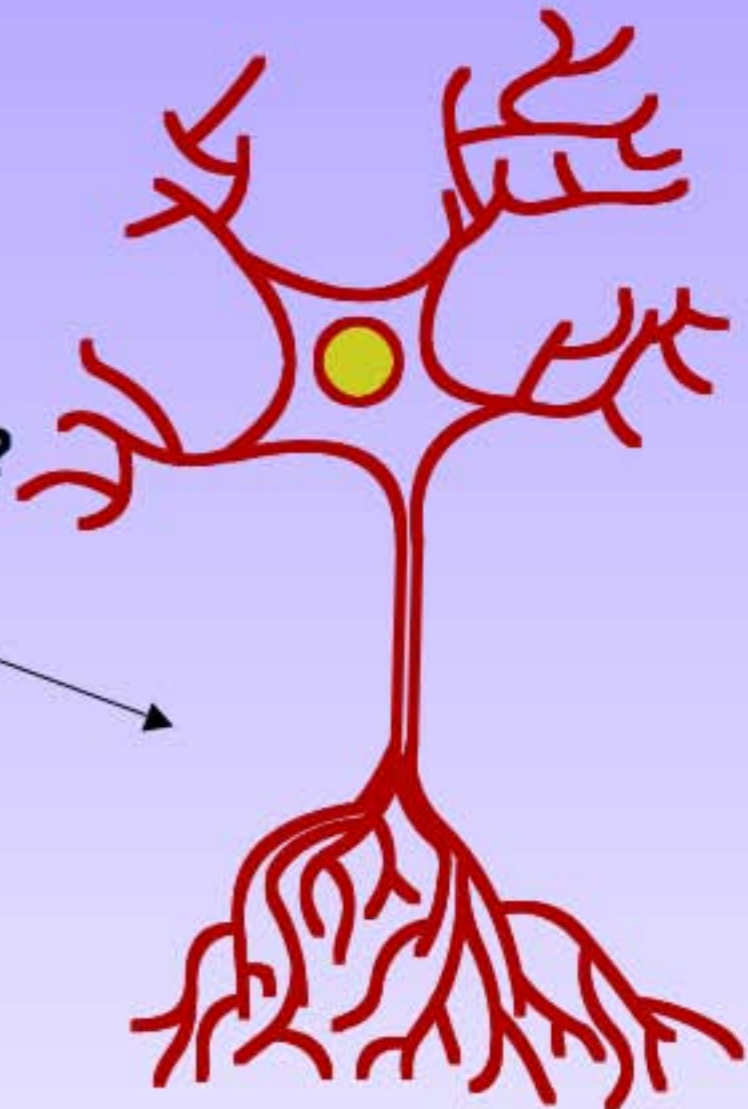
# SNARE et croissance neuritique



Syb2 ?



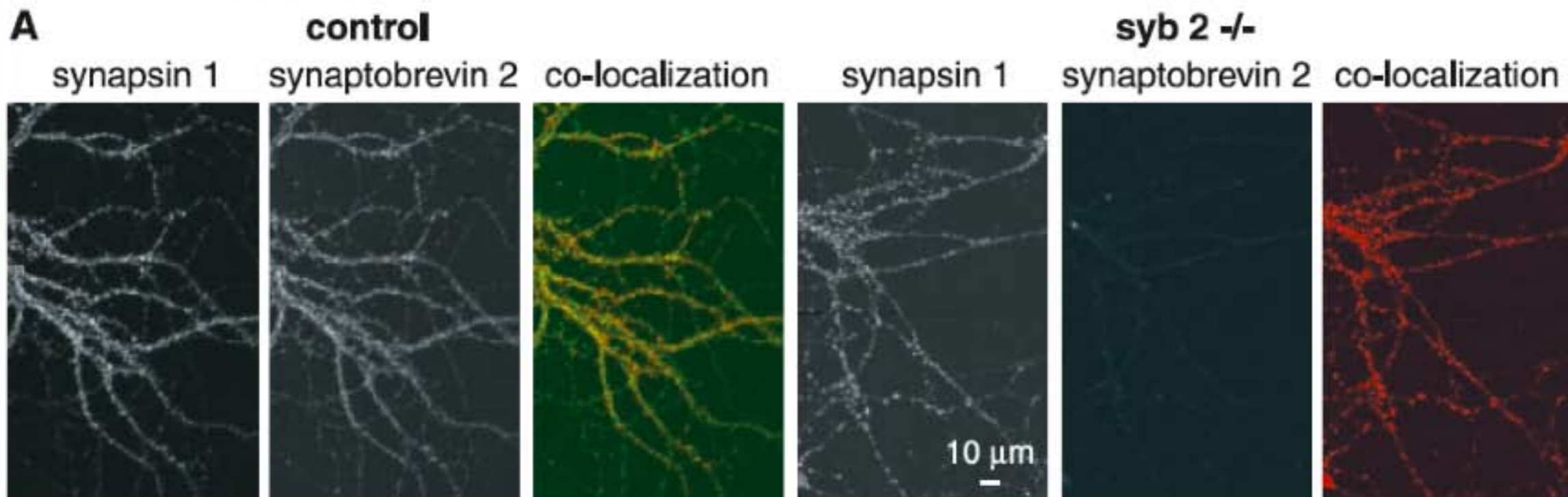
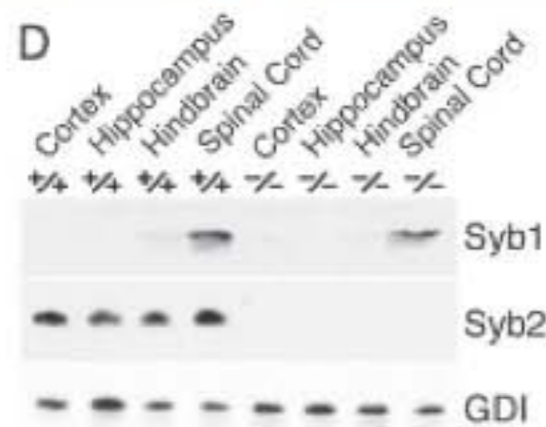
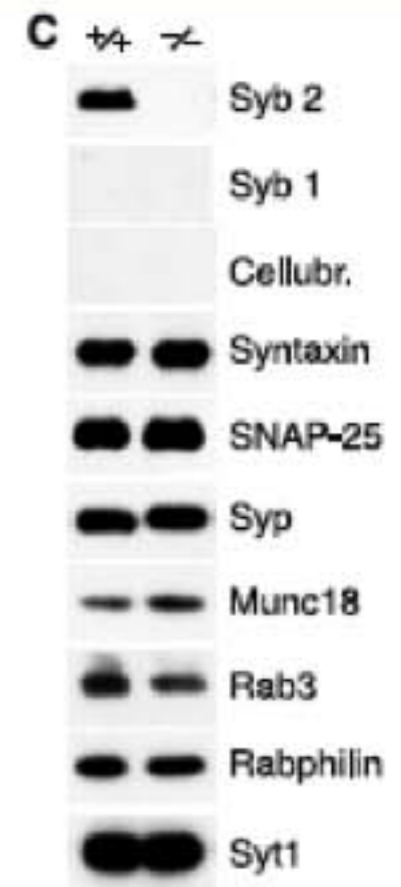
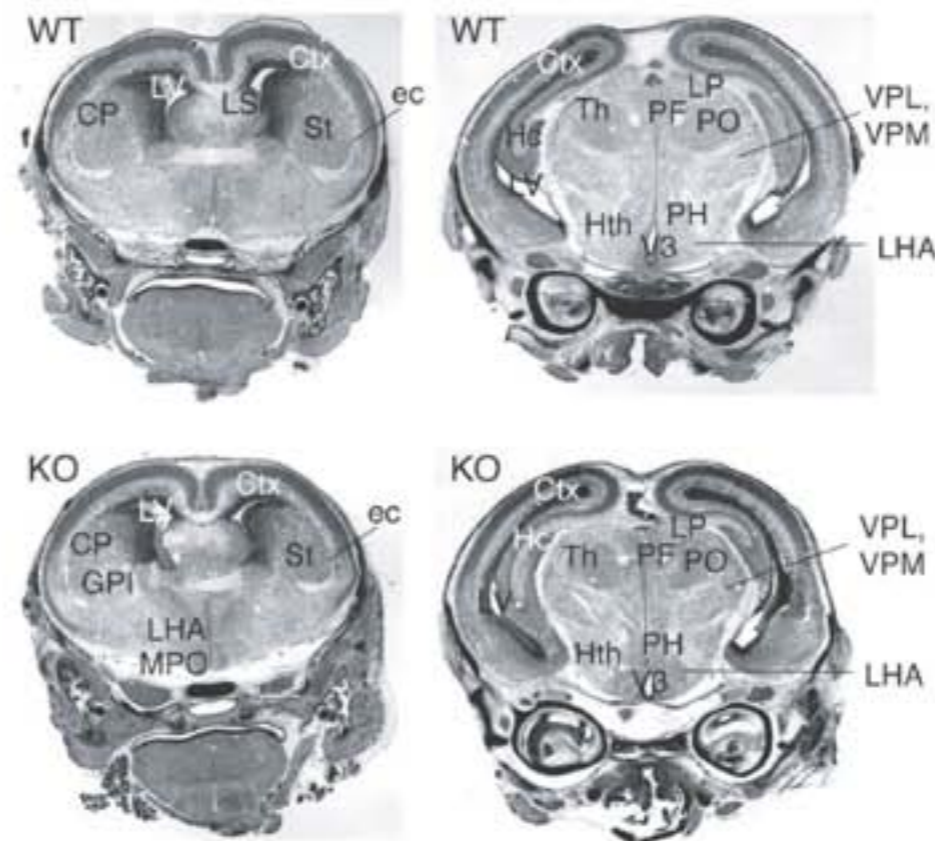
TI-VAMP ?



TIVAMP



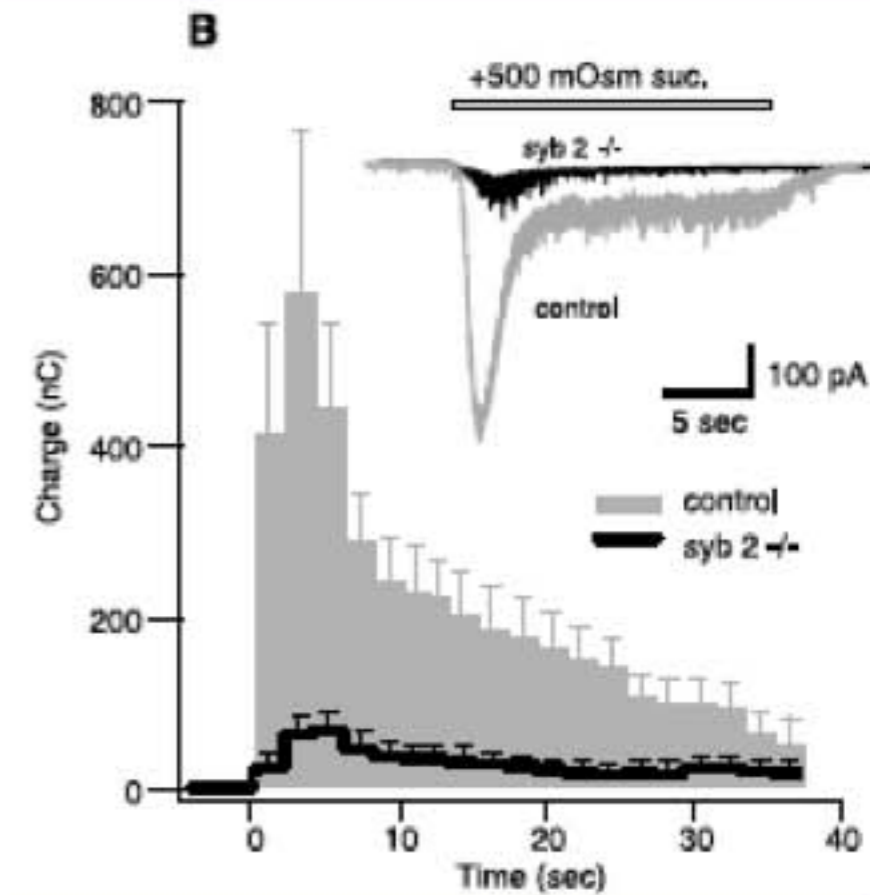
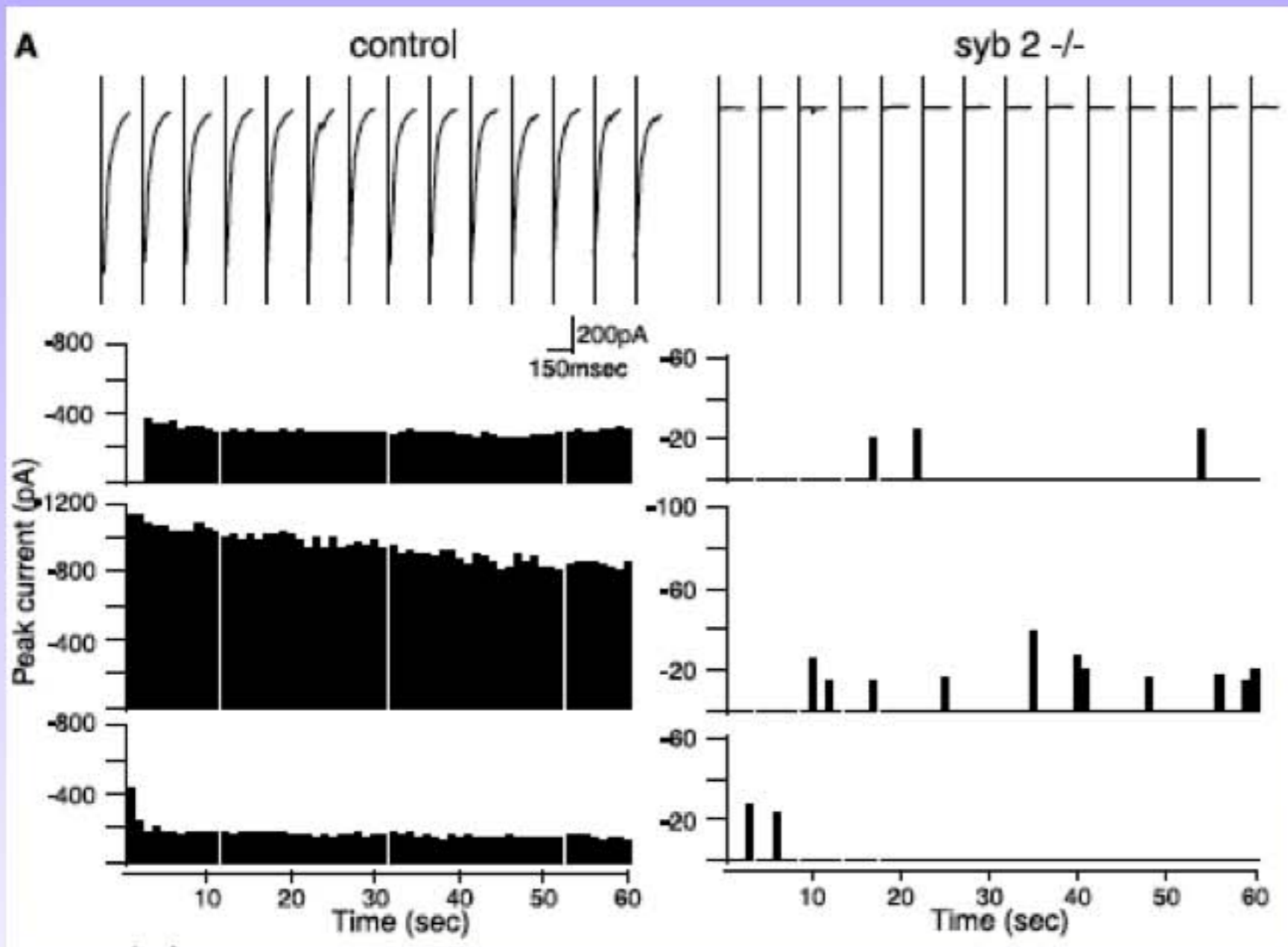
# Synaptobrevin2 (Syb2) KO



En l'absence de Syb2, les synapses sont toujours présentes, le cerveau se forme normalement mais les animaux meurent à la naissance.



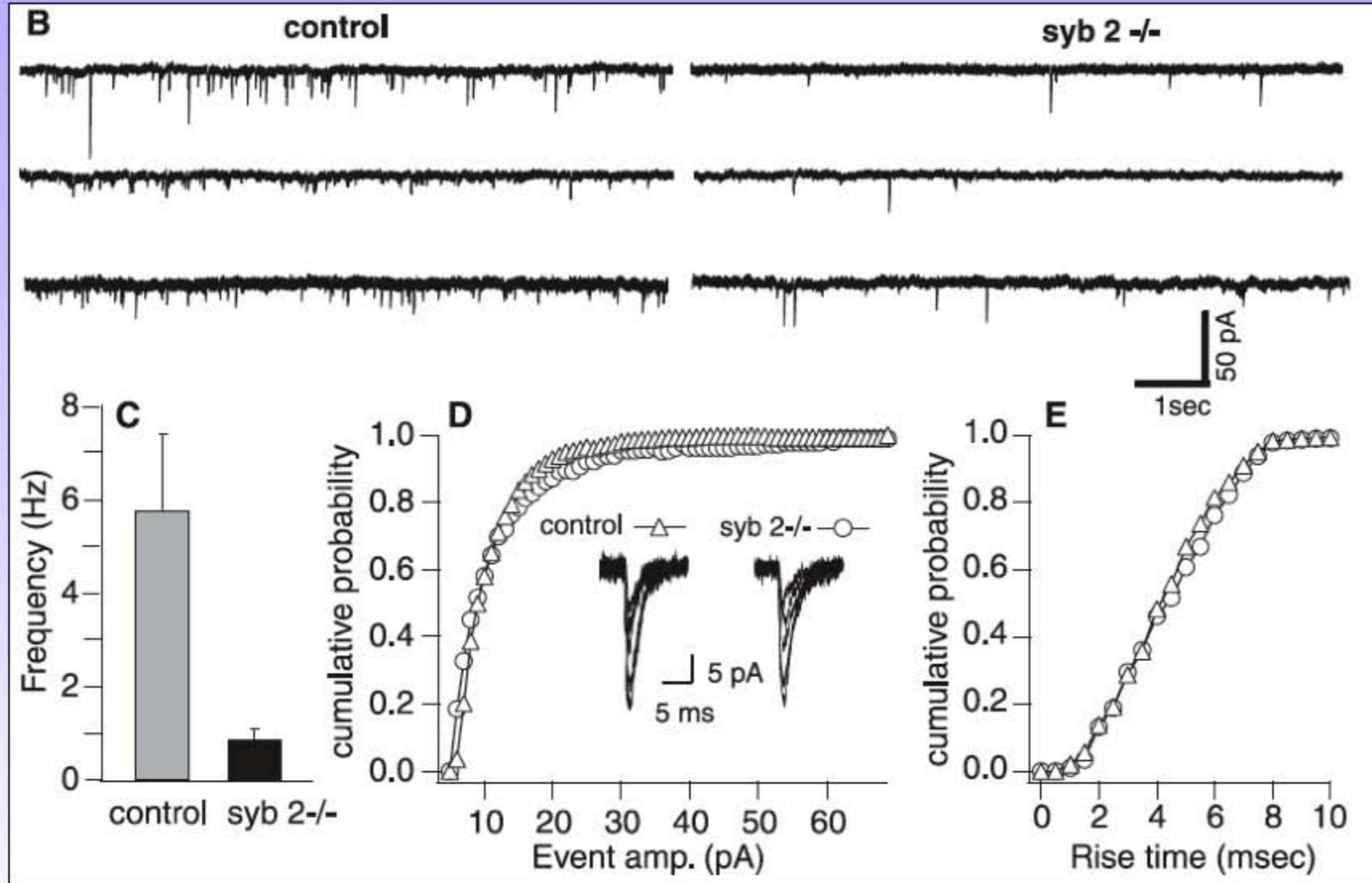
# Synaptobrevin2 (Syb2) KO



En l'absence de Syb2, la réponse évoquée est réduite d'un facteur 100.



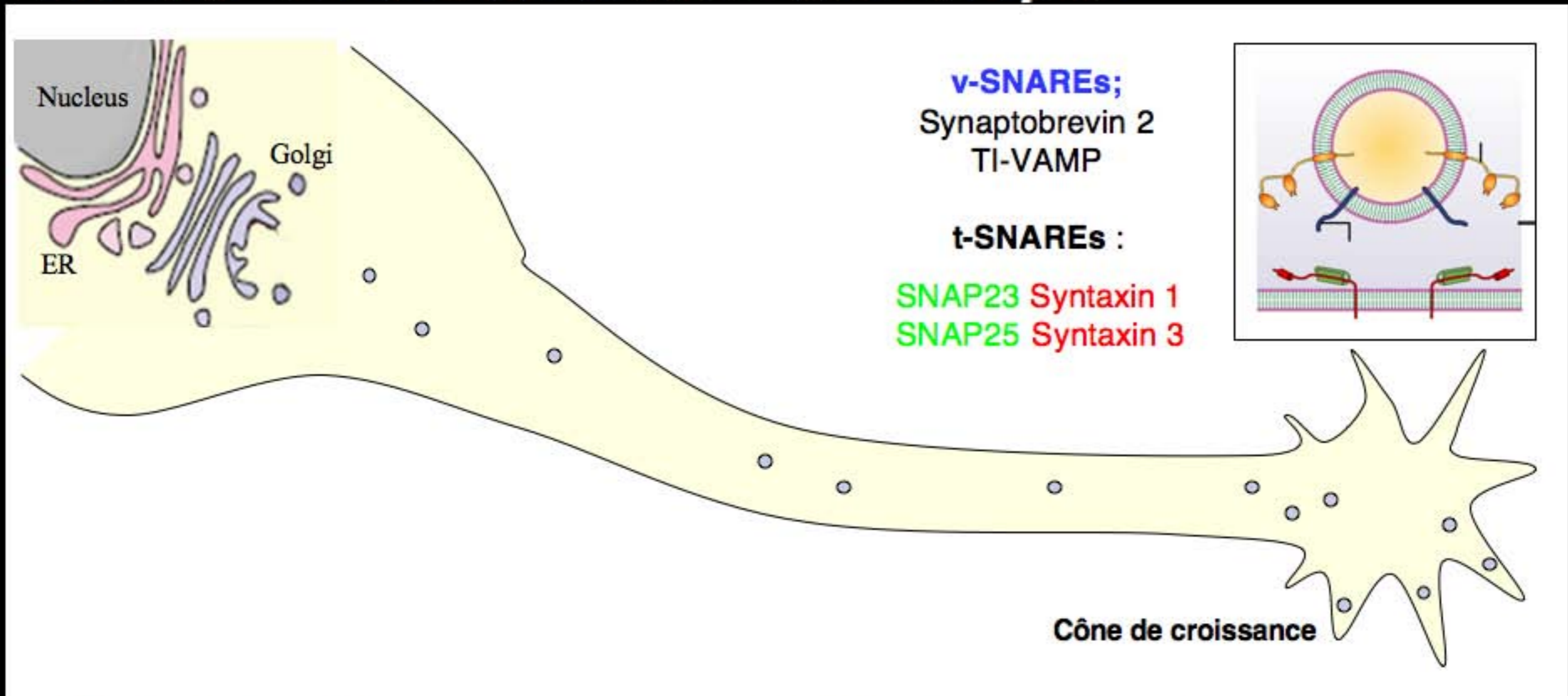
# Synaptobrevin2 (Syb2) KO



En l'absence de Syb2, la réponse spontanée est réduite d'un facteur 10.



# SNAREs et croissance neuritique



## SNAREs à la synapse

## SNAREs au cône de croissance

**v-SNAREs:**

**t-SNAREs :**

**v-SNAREs:**

**t-SNAREs :**

Synaptobrevin 2

Syntaxin 1  
SNAP25

Synaptobrevin 2  
TI-VAMP

Syntaxin 1,3  
SNAP23,25

Perte de Syb2 ou SNAP25:  
Perte de sécrétion évoquée

Devpt cerveau normal, croissance neur. normale

Croissance neuritique:

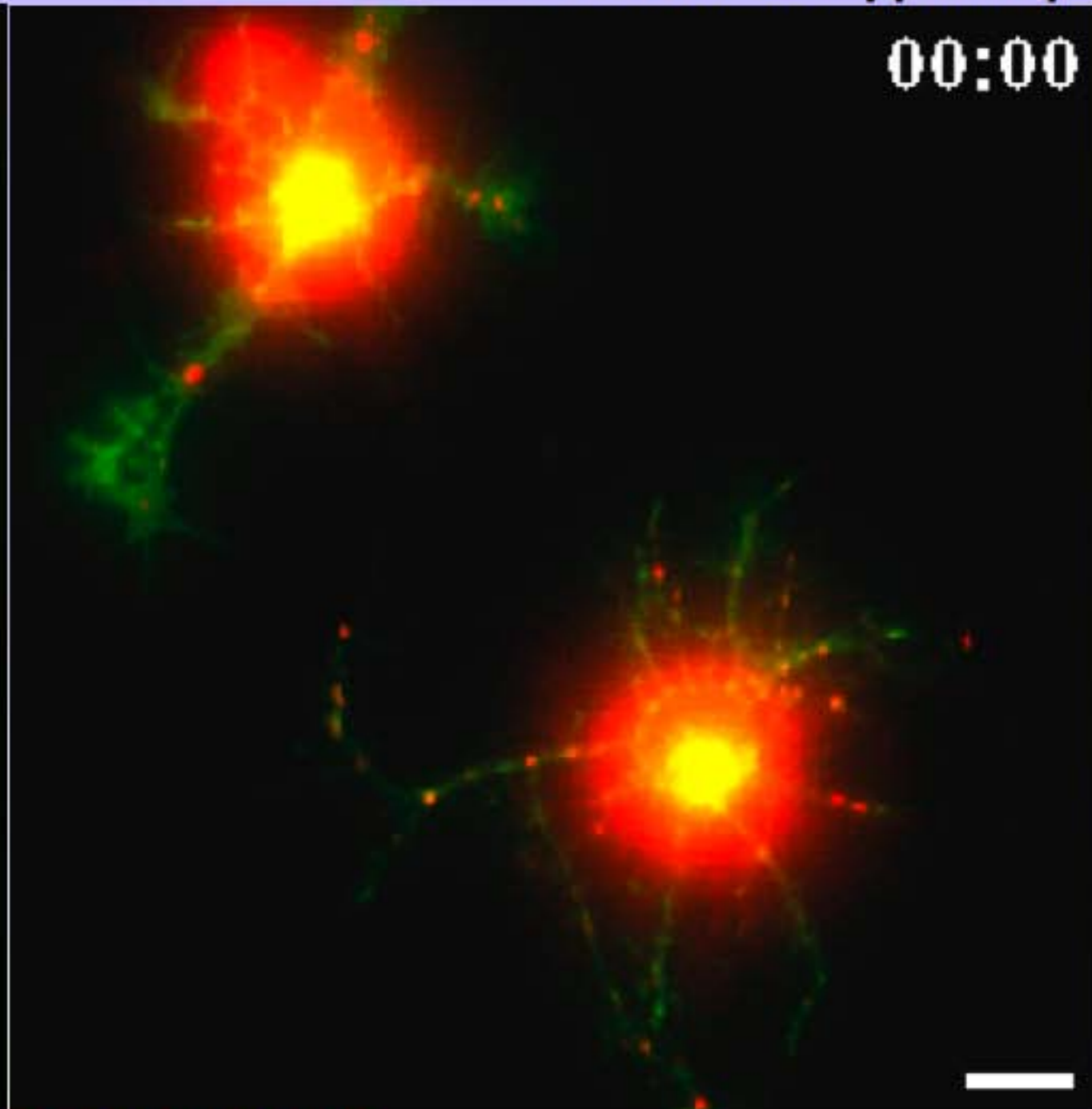
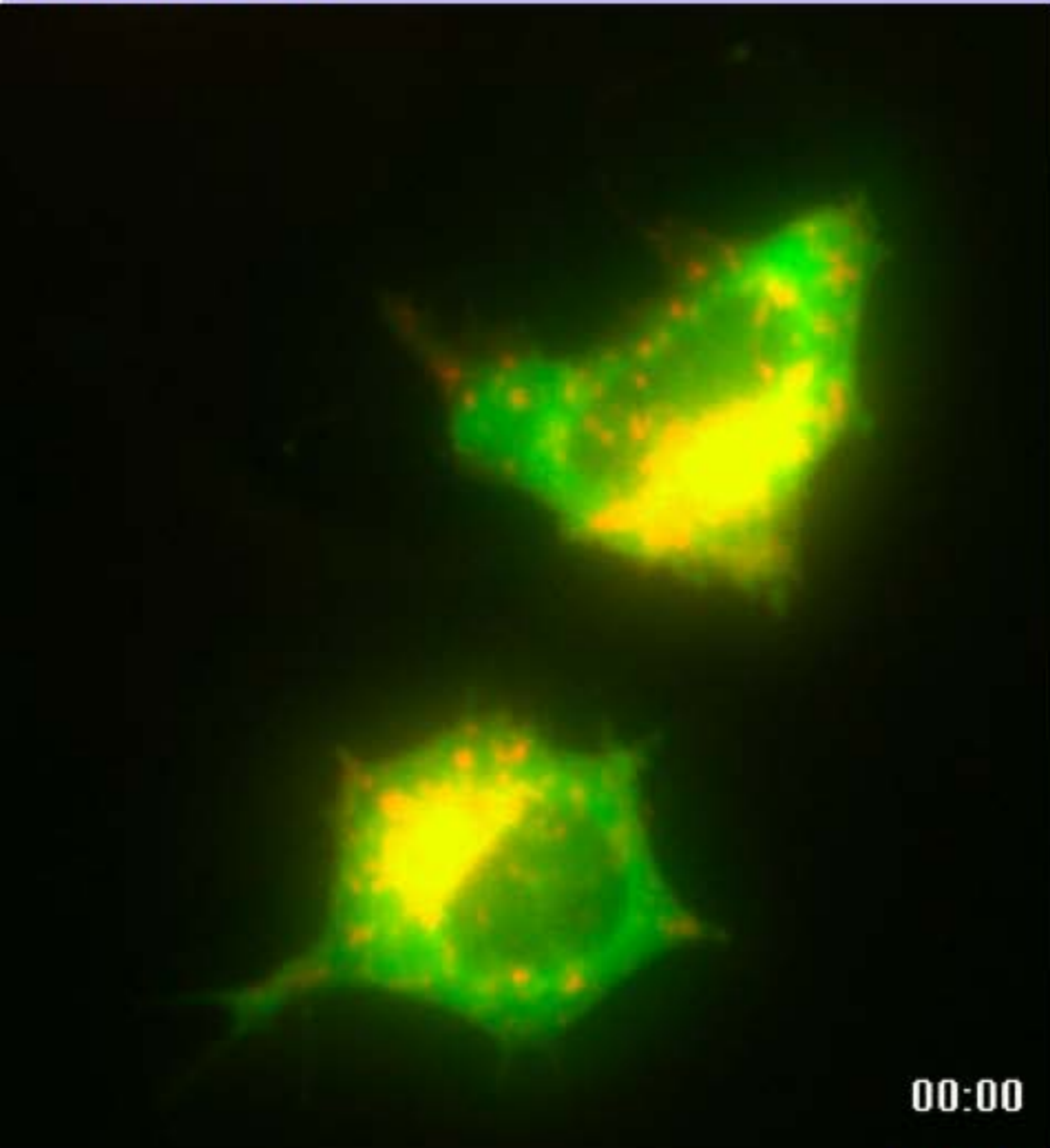
Résistante à la TeNT qui clive Syb2  
Nécessite TI-VAMP et stx3



# ***TI-VAMP et la croissance neuritique***

***Cellules PC12***

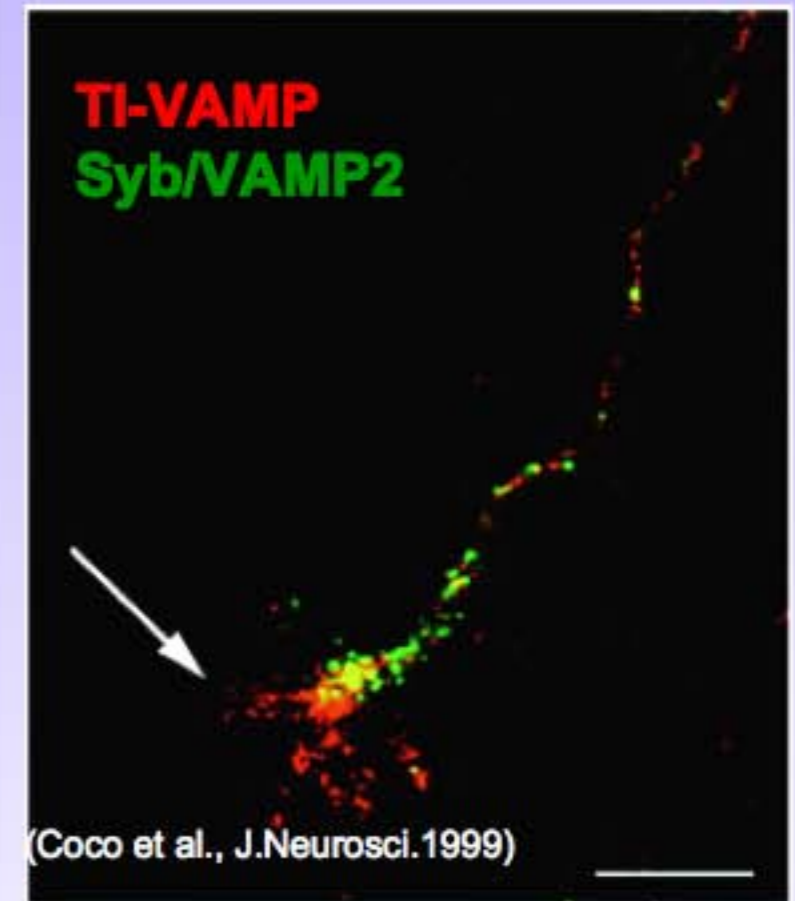
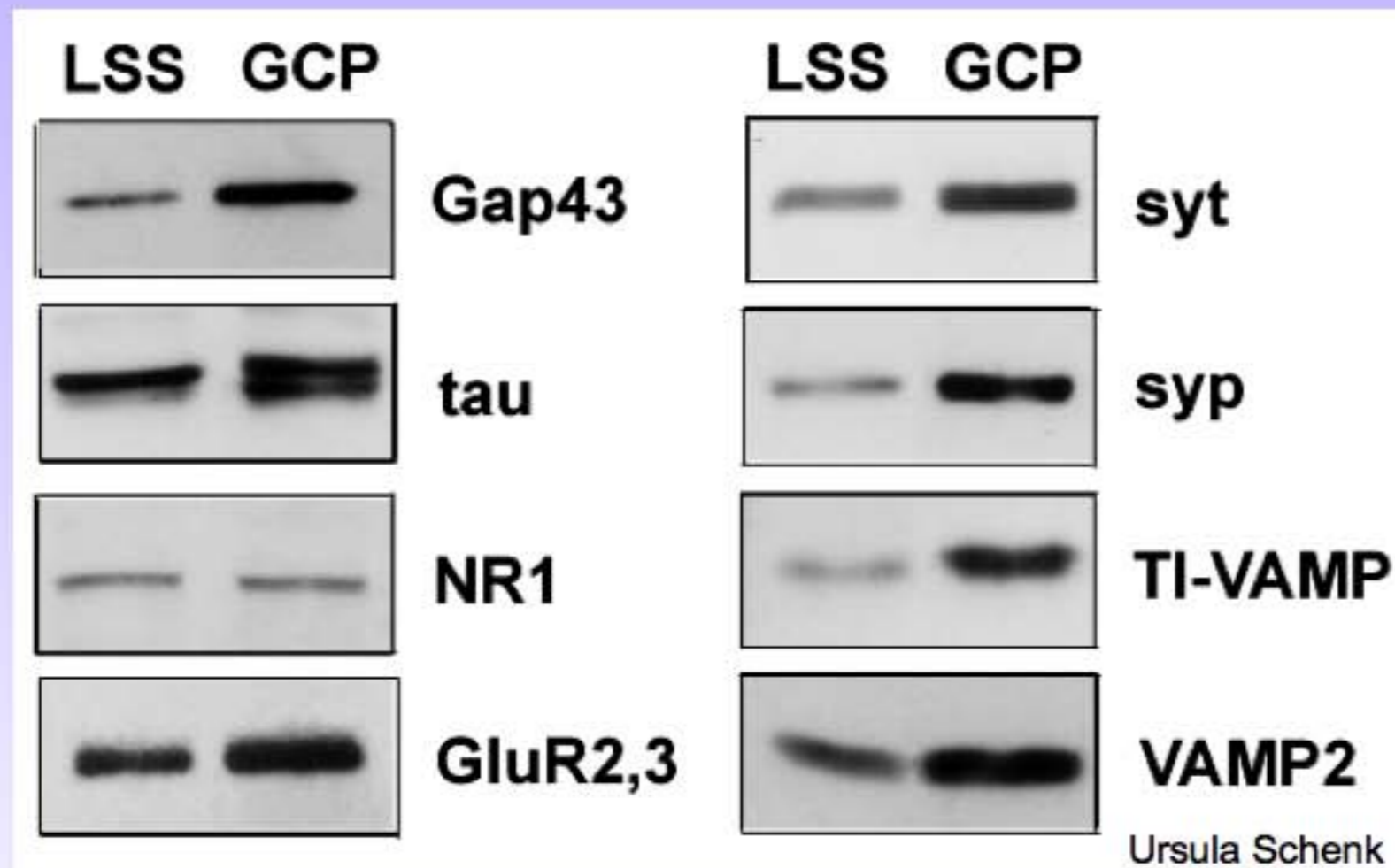
***Neurones d'hippocampe***



**Tubulin RFP-TI-VAMP**



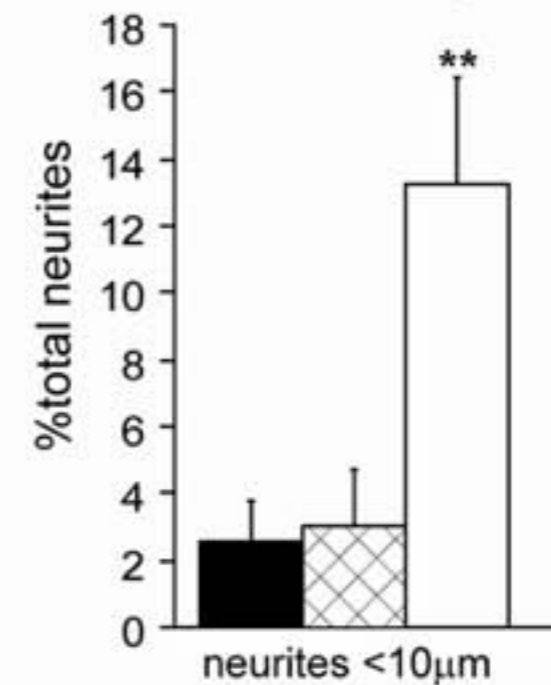
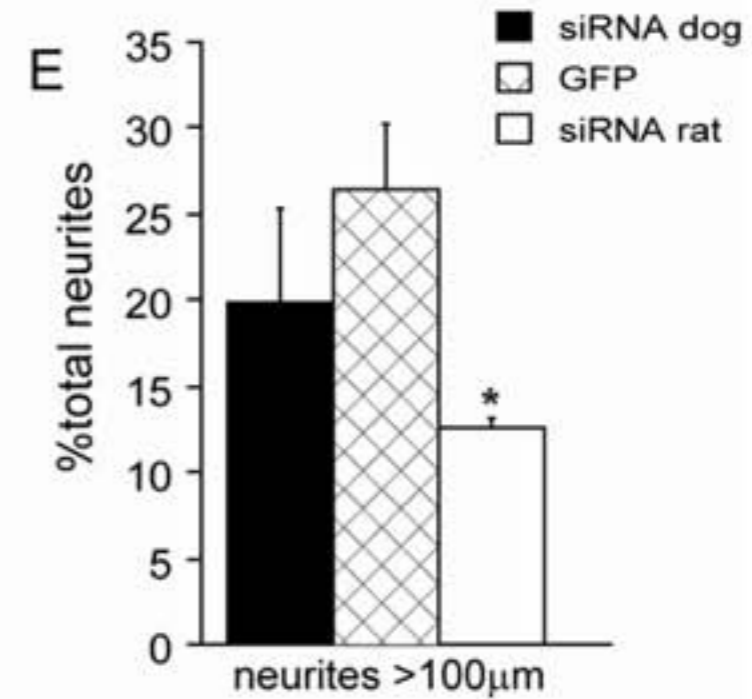
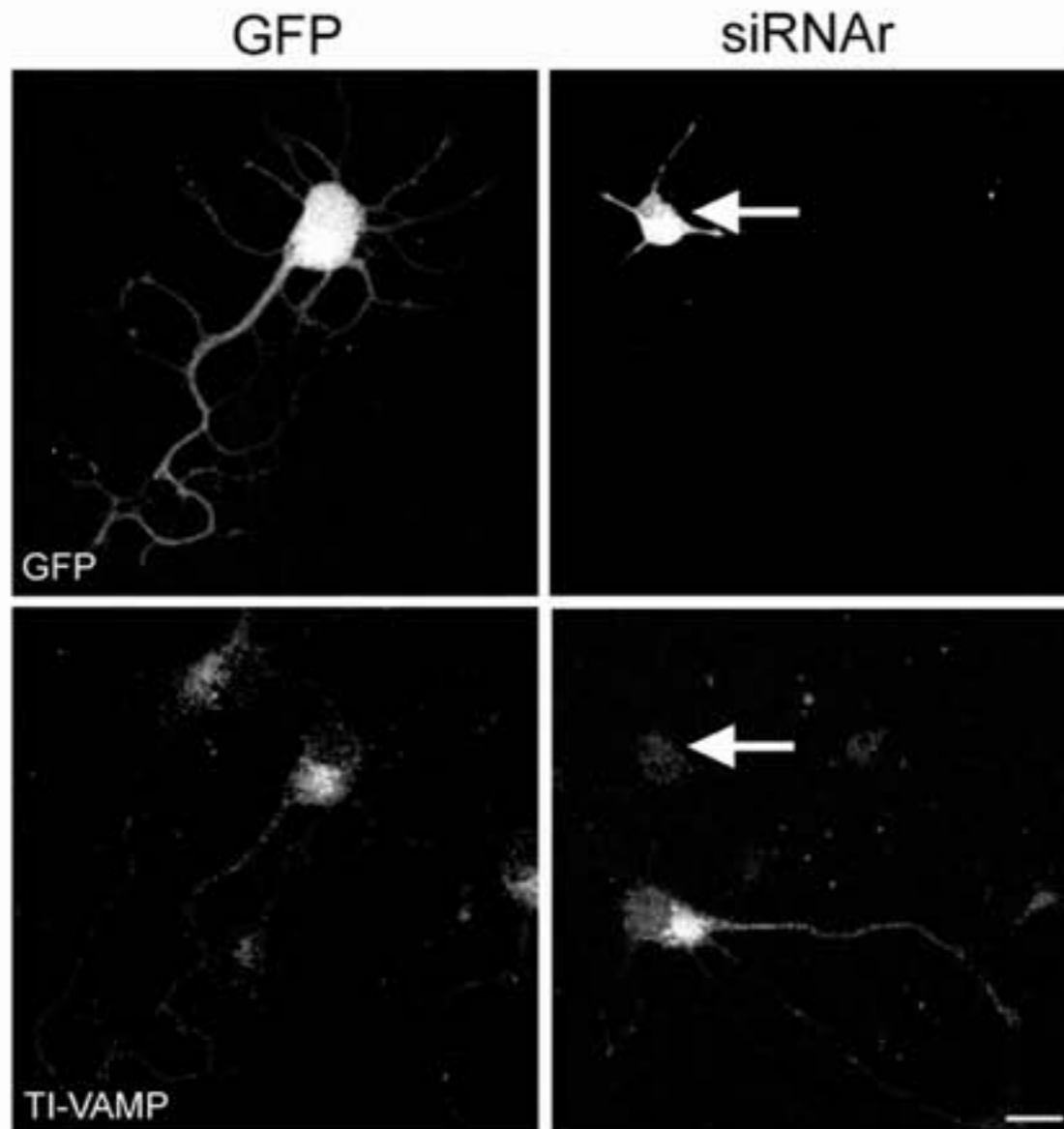
# ***TI-VAMP dans les cones de croissance***



Les marqueurs présynaptiques sont enrichis dans les préparations de cones de croissance (GCP).

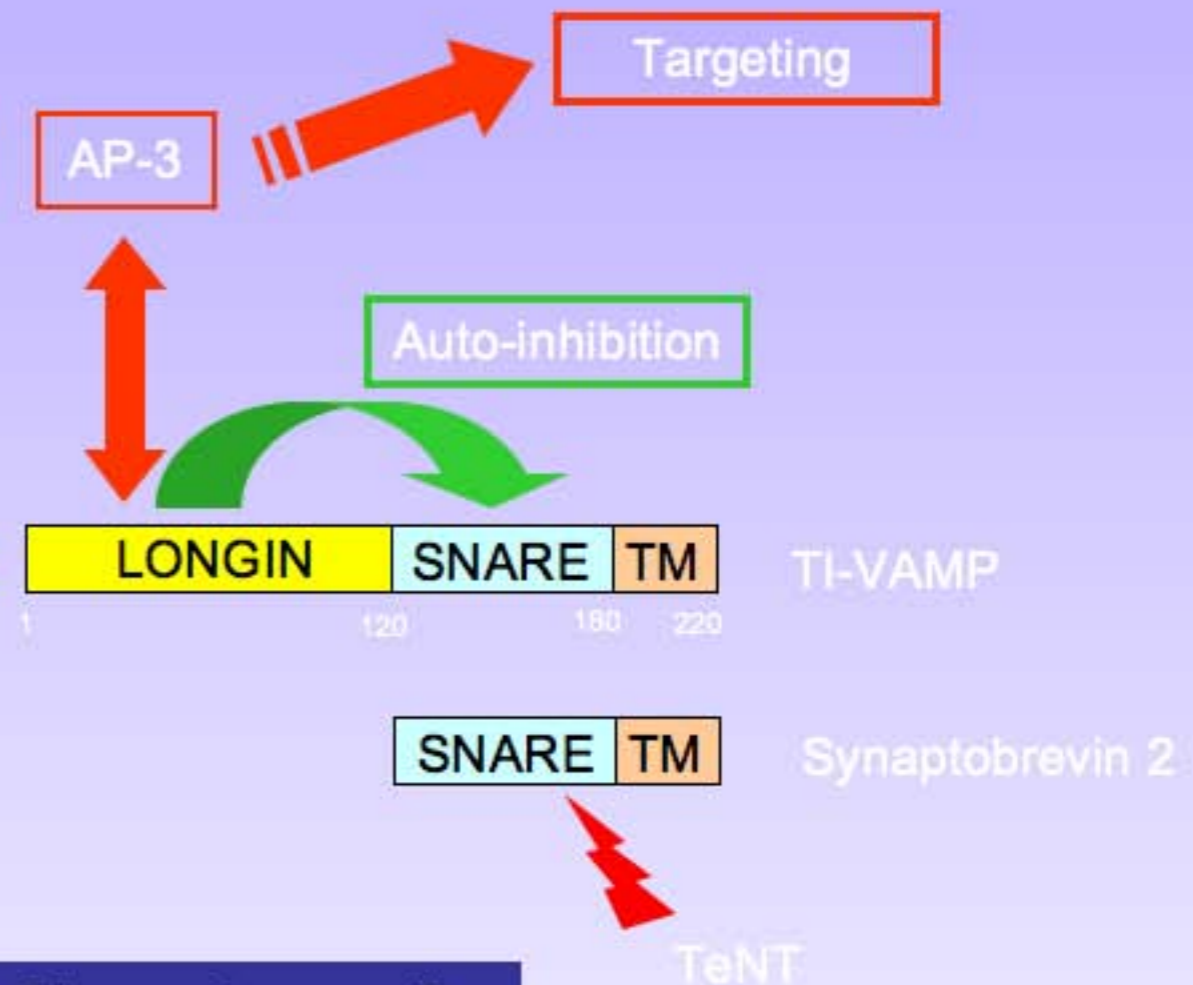
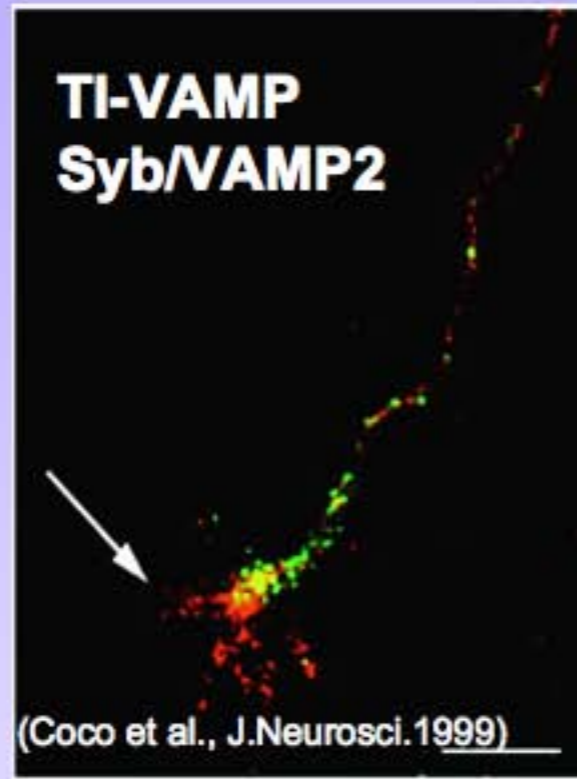
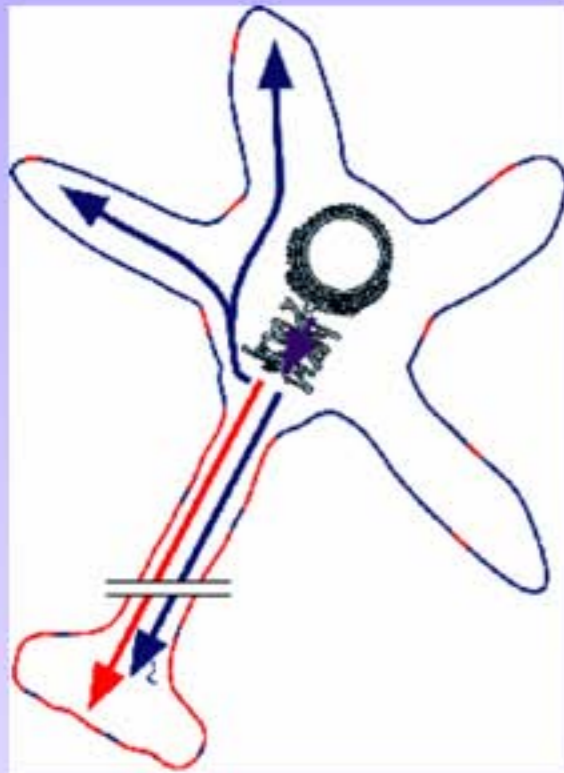


# ***TI-VAMP est essentiel à la croissance neuritique***



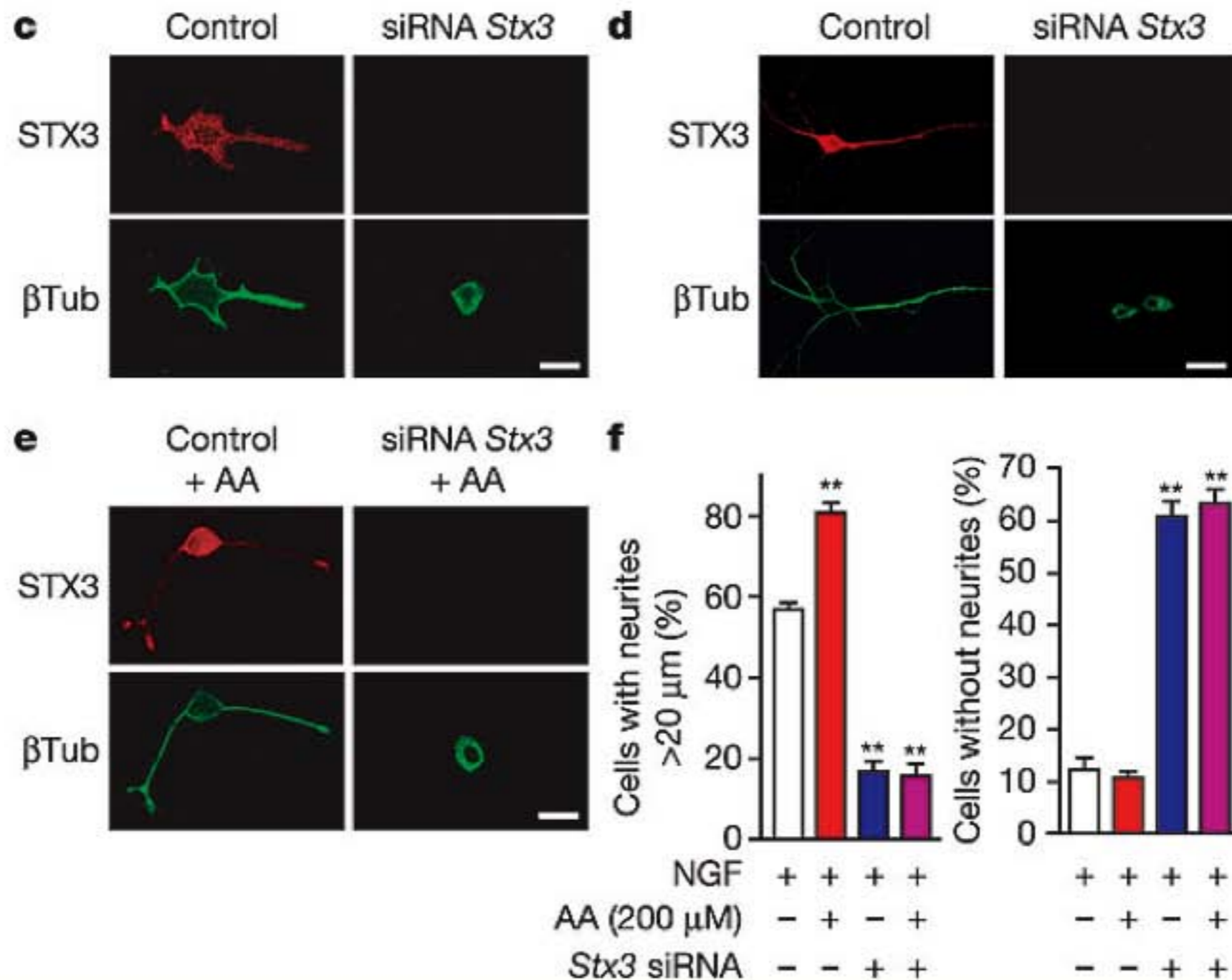


# TI-VAMP: v-SNARE mediating neurite outgrowth



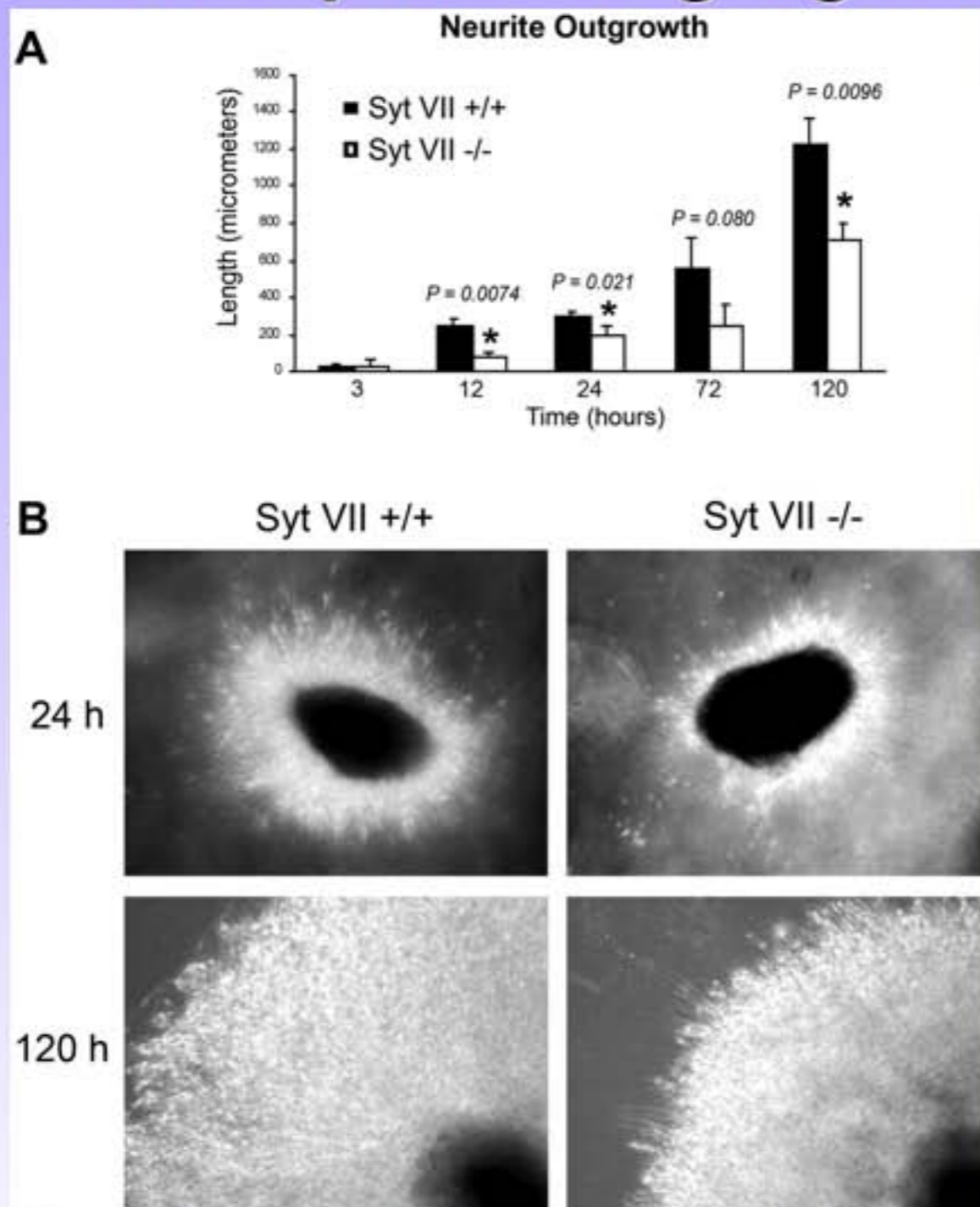


# Implication de la syntaxine 3 dans la croissance neuritique

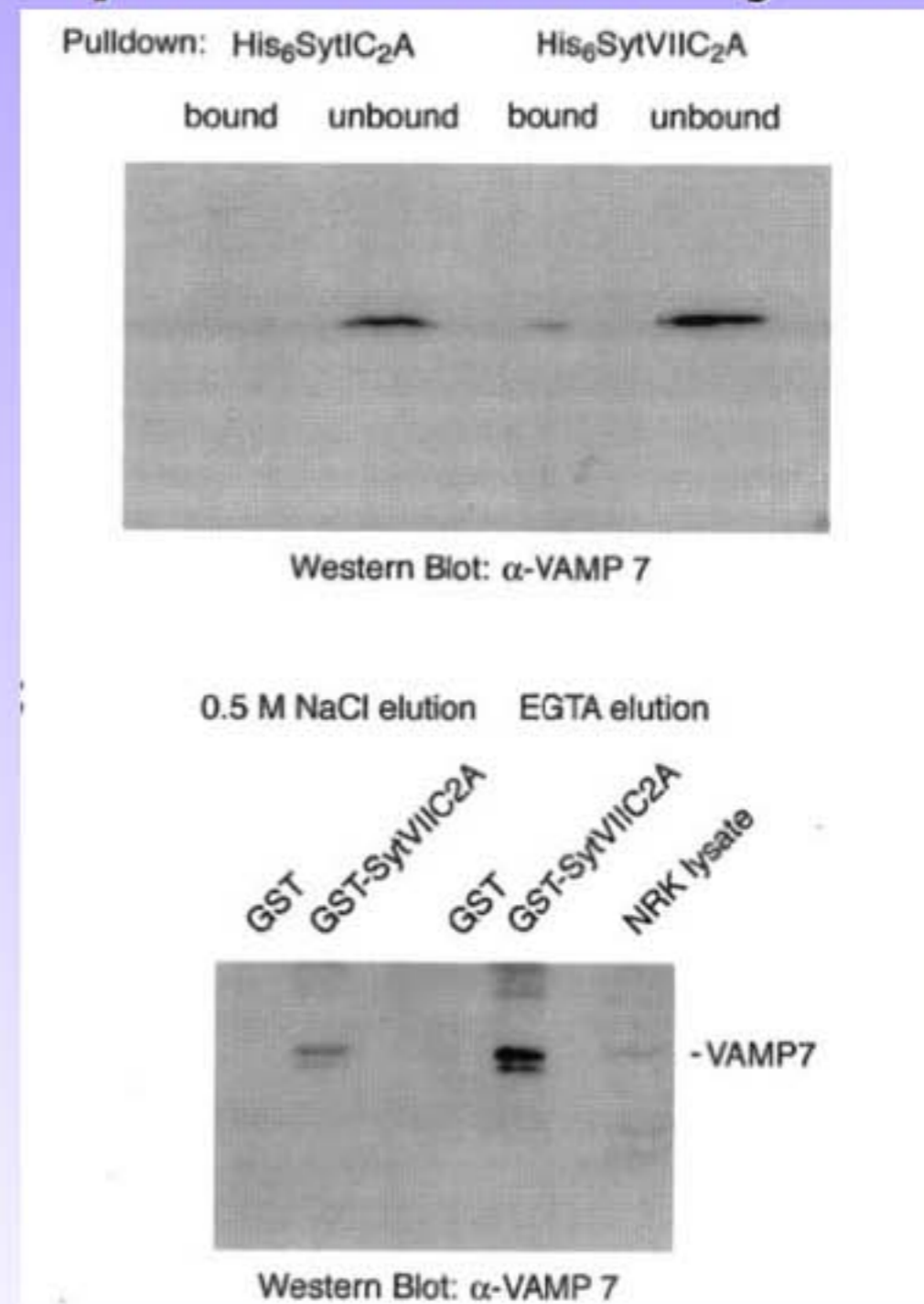




# La croissance neuritique est diminuée dans les explants de ganglions spinal de souris *SytVII* $-/-$



Arantes & al J. Neurosci. 2006



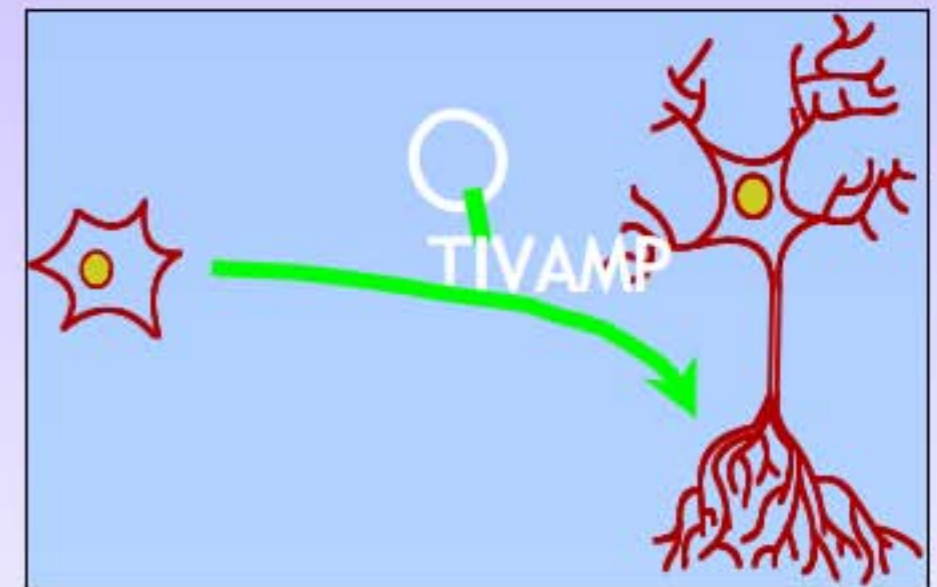
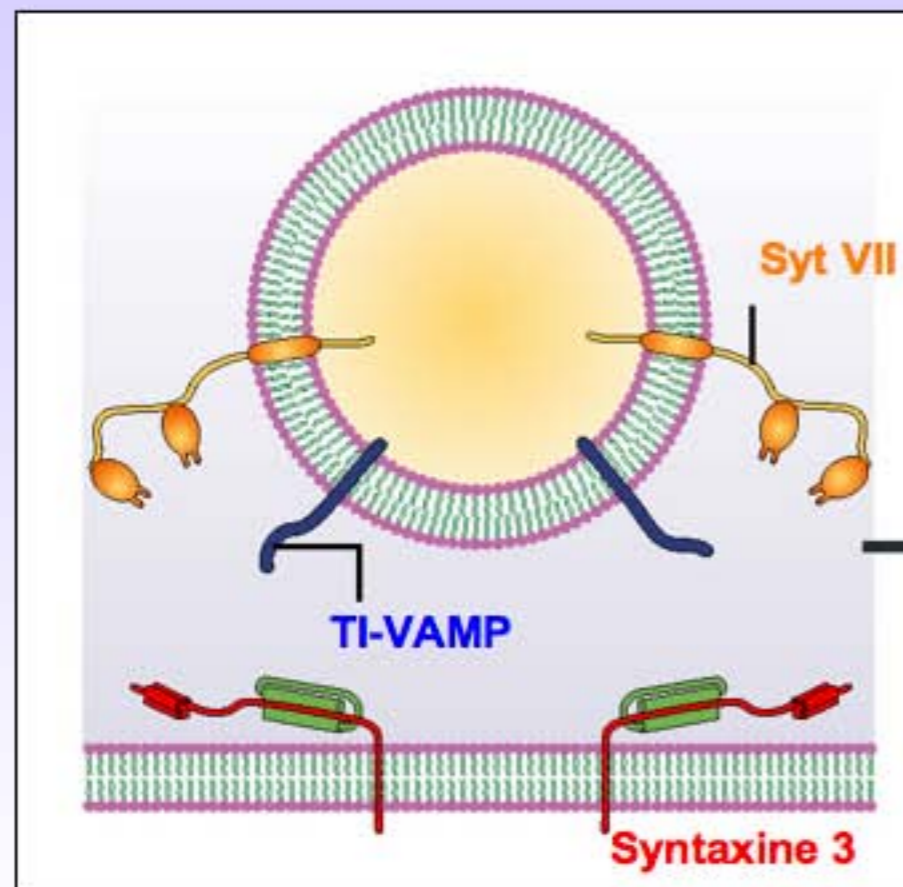
Rao & al JBC 2004



# Role de l'exocytose dans la croissance neuritique

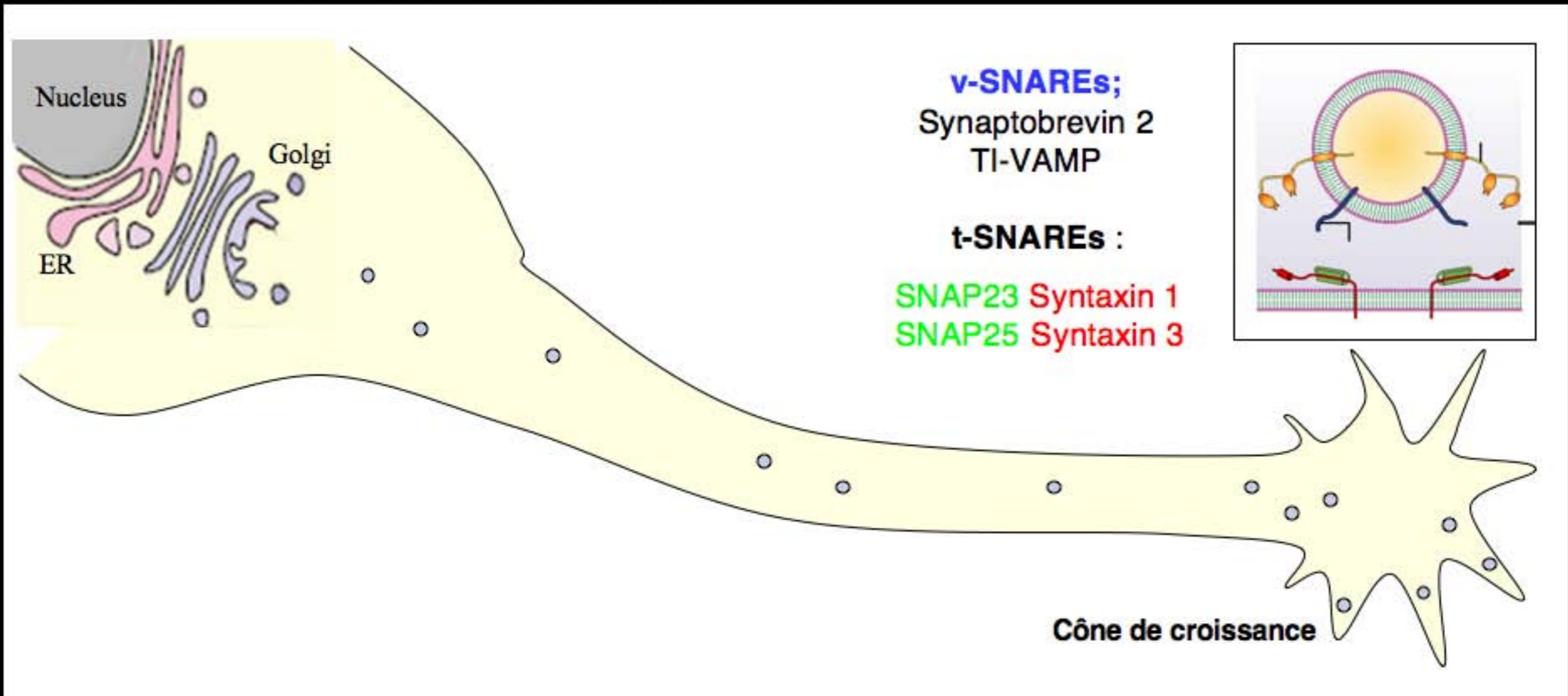
Mécanisme moléculaire impliquant:

- TIVAMP come v-SNARE
- Syntaxine 3 comme t-SNARE
- Synaptotagmin VII





# SNAREs et exocytose



## SNAREs à la synapse

## SNAREs au cône de croissance

**v-SNAREs:**

**t-SNAREs :**

**v-SNAREs:**

**t-SNAREs :**

Synaptobrevin 2

Syntaxin 1  
SNAP25

Synaptobrevin 2  
TI-VAMP

Syntaxin 1,3  
SNAP23,25

Perte de Syb2 ou SNAP25:  
Perte de sécrétion évoquée

Devpt cerveau normal, croissance neur. normale

Croissance neuritique:

Résistante à la TeNT qui clive Syb2  
Nécessite TI-VAMP et stx3



# L'essentiel à retenir ...

## 1. Exocytose et complexe SNARE

Le complexe SNARE : 1vSNARE + 2 ou 3 t-SNAREs  
 Nomenclature v-SNARE ou R-SNARE  
 t-SNARE ou Q-SNARE

## 2. Historique de la découverte de NSF et des SNARE

NSF est nécessaire au désassemblage des complexes SNARES  
 NSF se lie par l'intermédiaire des SNAP

## 3. Le cycle des vésicules synaptiques

Voie lente: endocytose médiée par la clathrine  
 Voie courte: kiss and run  
 Trois pool vésiculaires : réserve, recyclage, prêt-à-être libéré

## 4. Comment mesurer l'exocytose ?

Capacitance : proportionnel à la surface de mb  
 Ampérométrie : proportionnel à la qté de molécules libérées  
 GFP pH sensible( la Phluorin): s'allume si exocytose

## 5. Comment mesurer le recyclage ?

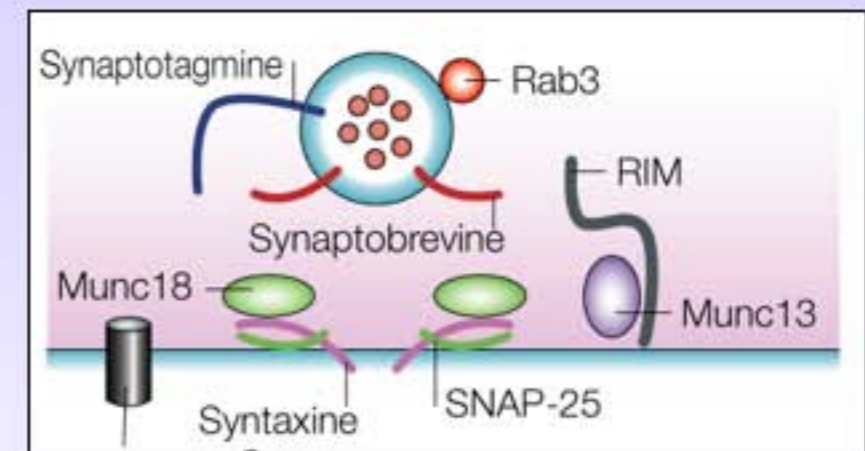
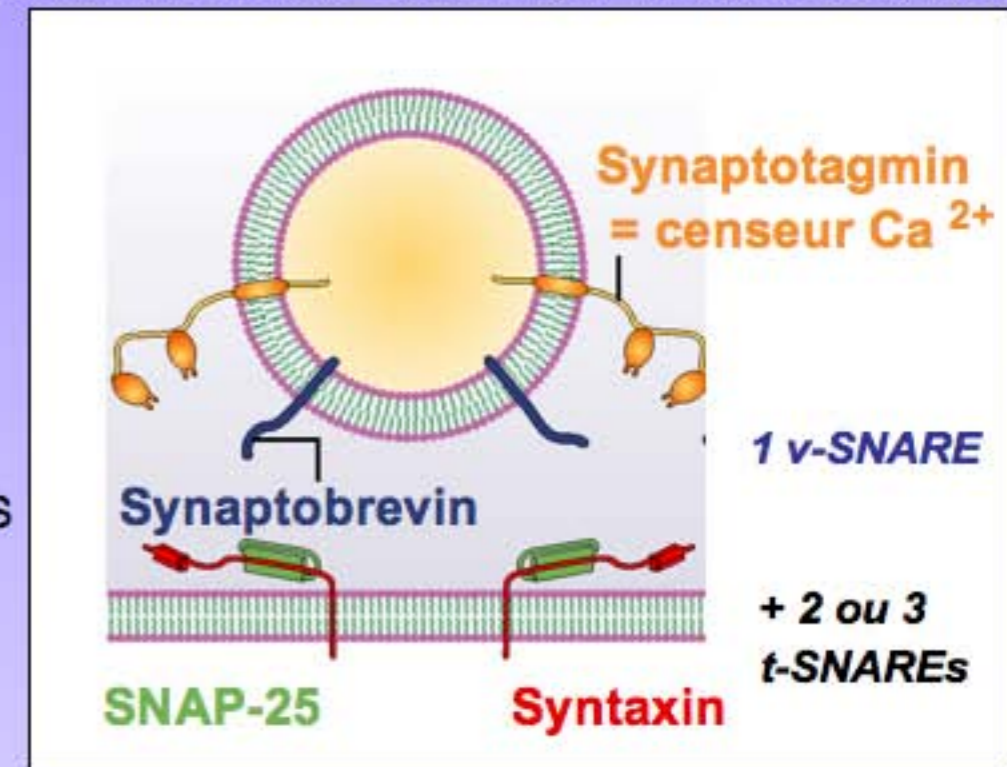
Utilisation des anti-synaptotagmine  
 Sondes fluorescentes de type FM

## 6. Régulation de l'exocytose

Munc-18 et les protéines SM : nécessaire à l'assemblage  
 Munc 13, RIM et Rab3 : nécessaire au priming  
 Rôle de la synaptotagmine: censeur du calcium

## 7. Fonctions des SNARES selon le type cellulaire

Rôle de la Cellubrevine dans la migration des cellules épithéliales  
 Rôle de la synaptobrevine dans la libération des NT  
 Roles de TI-VAMP dans la croissance neuritique  
 Roles de Stx3 et SytVII dans la croissance neuritique



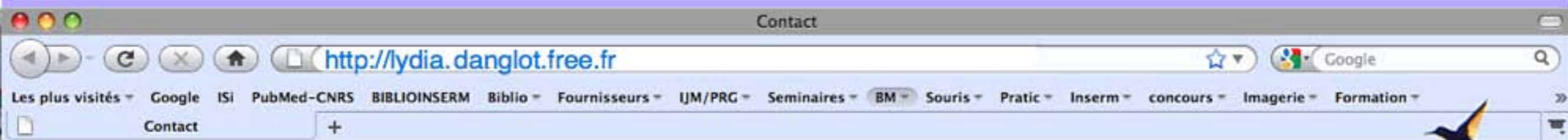
Dr Lydia Danglot

Institut Jacques Monod

lydia.danglot@inserm.fr



Si vous avez des questions ...



## Lydia Danglot web page

Life Science & Imaging

Octobre 31, 2010

- ▶ Research
- ▶ Publications
- ▶ Teaching
- ▶ Favorite links
- ▶ CONTACT



[French](#)



[English](#)

### Contact

**Lydia DANGLOT, PhD**

[Institut Jacques Monod](#), CNRS UMR7592

Inserm U950 [Thierry Galli](#):

"Membrane traffic and epithelial and neuronal morphogenesis"

15 rue Hélène Brion, Bâtiment Buffon, room 316B

Paris Diderot University

75 013 Paris, FRANCE.

Phone: 33 1 57 27 80 37

email: [danglot@ijm.univ-paris-diderot.fr](mailto:danglot@ijm.univ-paris-diderot.fr)

ou [lydia.danglot@inserm.fr](mailto:lydia.danglot@inserm.fr)





Pour télécharger le cours ...

<http://lydia.danglot.free.fr/cours>

Firefox Fichier Édition Affichage Historique Marque-pages Outils Fenêtre Aide  
Page de démarrage Mozilla Firefox  
Lydia Danglot - Cours de neurosciences et de biologie cellulaire  
<http://lydia.danglot.free.fr/cours> Google

Les plus visités - Google ISI PubMed-CNRS BIBLIOINSERM Biblio - Fournisseurs - IJM/PRG - Seminaires - BM - Souris - Pratic - Inserm

Lydia Danglot - Cours de neurosc... +

**Lydia Danglot web page**  
Life Science & Imaging

Octobre 31, 2010

- Thème de recherche
- Publications
- Enseignement**
- Liens favoris
- CONTACT

French English

## Enseignement

Cours

- Master2 de Neurosciences - UE Synapse et synaptogenèse (code UE : MBIP5019) - Université Pierre et Marie Curie (Paris 6):  
Planning Neuritegenèse et polarité neuronale.
- Master2 de Neurosciences - UE Communication Cellulaire (code UE : MBIP5003) - Université Pierre et Marie Curie (Paris 6):  
Les protéines SNARE et l'exocytose : classification des SNAREs, voie de recyclage des VS, comment mesurer l'exocytose, comment mesurer le recyclage, les protéines régulant l'assemblage des SNARE (Munc18, munc13, Syt, complexine), souris KO Syb2, souris mocha,...
- Master2 de Génétique - Université Paris Diderot (Paris 7), UE Neurobiologie cellulaire et développementale.  
Développement de l'hippocampe et synaptogenèse: Neuroanatomie générale, présentation du SNC, présentation du télencéphale et de l'hippocampe, développement de l'hippocampe, migration des neurones excitateurs et inhibiteurs, modèle des neurones dissociés d'hippocampe en culture, polarité neuronale, formation des synapses.
- Ecole doctorale Frontières du Vivant (Universités Paris V, VI, VII) Club Neurobiologie & Optique: Diversité et usage des protéines fluorescentes en Neurosciences.
- Master2 de Biothérapies Tissulaires Cellulaires et Génétique: Faculté de Médecine Hôpital Henri Mondor (Paris12).  
1. Animaux mutants: identifications, entretien, analyse.  
2. Modèles en psychiatrie: addiction, schizophrénie, hyperactivité et trouble de l'attention, et anxiété.
- Master1 de Biologie - Ecole Normale Supérieure, UE De neurone au système. Module Neurobiologie n°2:  
**La machinerie d'exocytose.**

Travaux pratiques

- Master2 de Génétique - Université Paris Diderot (Paris 7), UE Neurobiologie cellulaire et développementale.  
Travaux pratiques d'imagerie: microscopie à épifluorescence, trajet optique, présentation des filtres dichroïques, acquisition d'images. Mesure d'exocytose (FM1-43) par vidéo-microscopie.

Travaux dirigés

### MANUEL de cours

- Master2- Paris 6 Neuritegenèse et polarité neuronale.  
[Download](#)
- Master2- Paris 6 Complexe SNARE et communication cellulaire.  
[Download](#)
- Master2- Paris 7 Développement de l'hippocampe et synaptogenèse.  
[Download](#)
- Doctorat-Paris 5, 6, 7 Usage et diversité des protéines fluorescentes en Neurosciences.  
[Download](#)
- Master1- ENS- N2 Machinerie d'exocytose.  
[Download](#)

Terminé Terminé