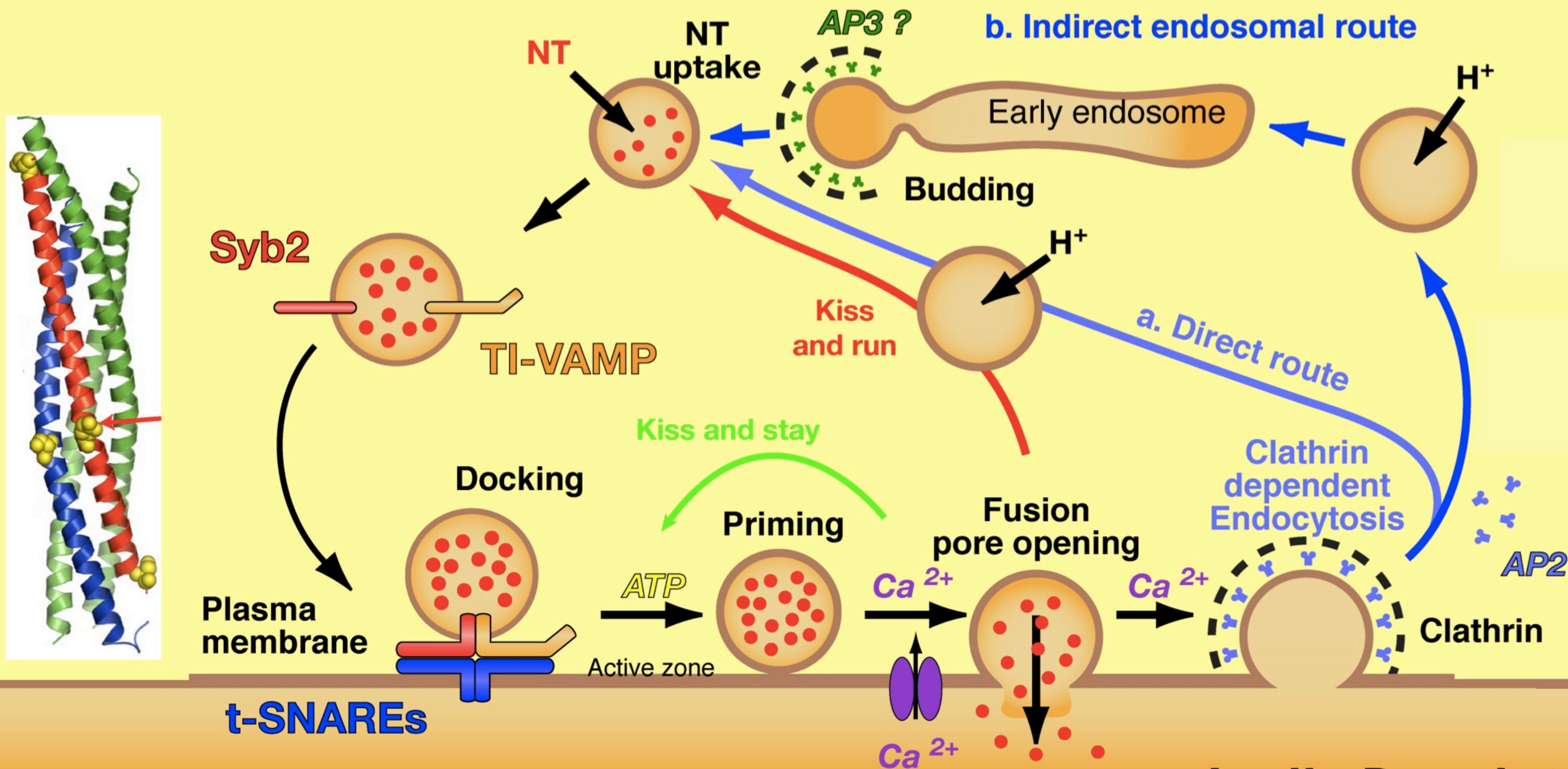


Complexe SNARE et communication cellulaire



Lydia Danglot

Télécharger le cours sur <http://lydia.danglot.free.fr>

Master de Neurosciences, Module « Communication cellulaire »
Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), 7 Novembre 2014

Institut Jacques Monod
Université Paris Diderot-CNRS UMR7592- Inserm ERL950 - Building Buffon - 15 rue Hélène Brion - Paris
Tel.: +33 (0)1 57 27 80 37- lydia.danglot@inserm.fr

INSTITUT JACQUES MONOD



PARIS
DIDEROT
UNIVERSITÉ



Inserm

Le complexe SNARE et la communication cellulaire

1. Exocytose et complexe SNARE

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

2. Exemple de la synapse

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
Utilisation des SNARE inversée

5. Comment mesurer le recyclage ?

Utilisation des anti-synaptotagmine
Sondes fluorescentes de type FM

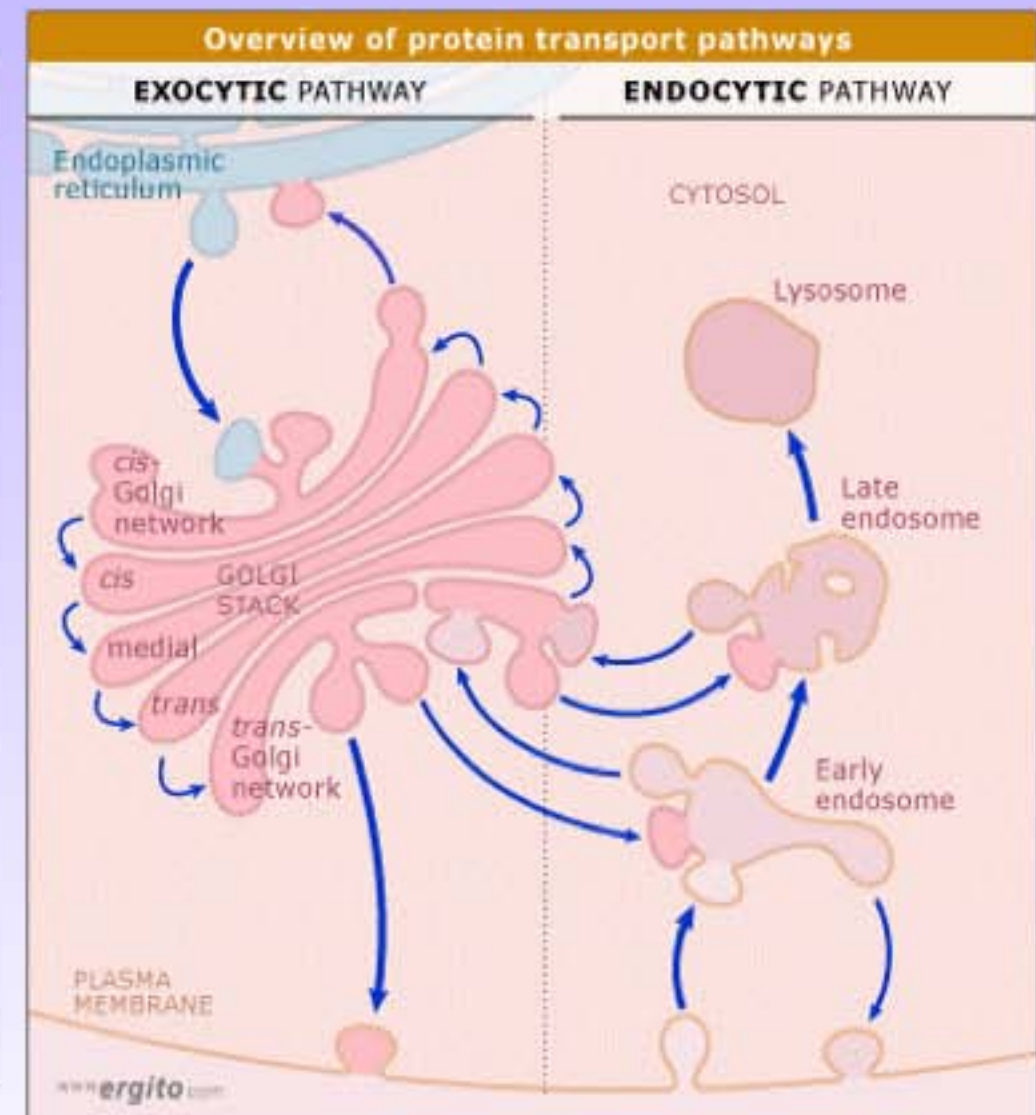
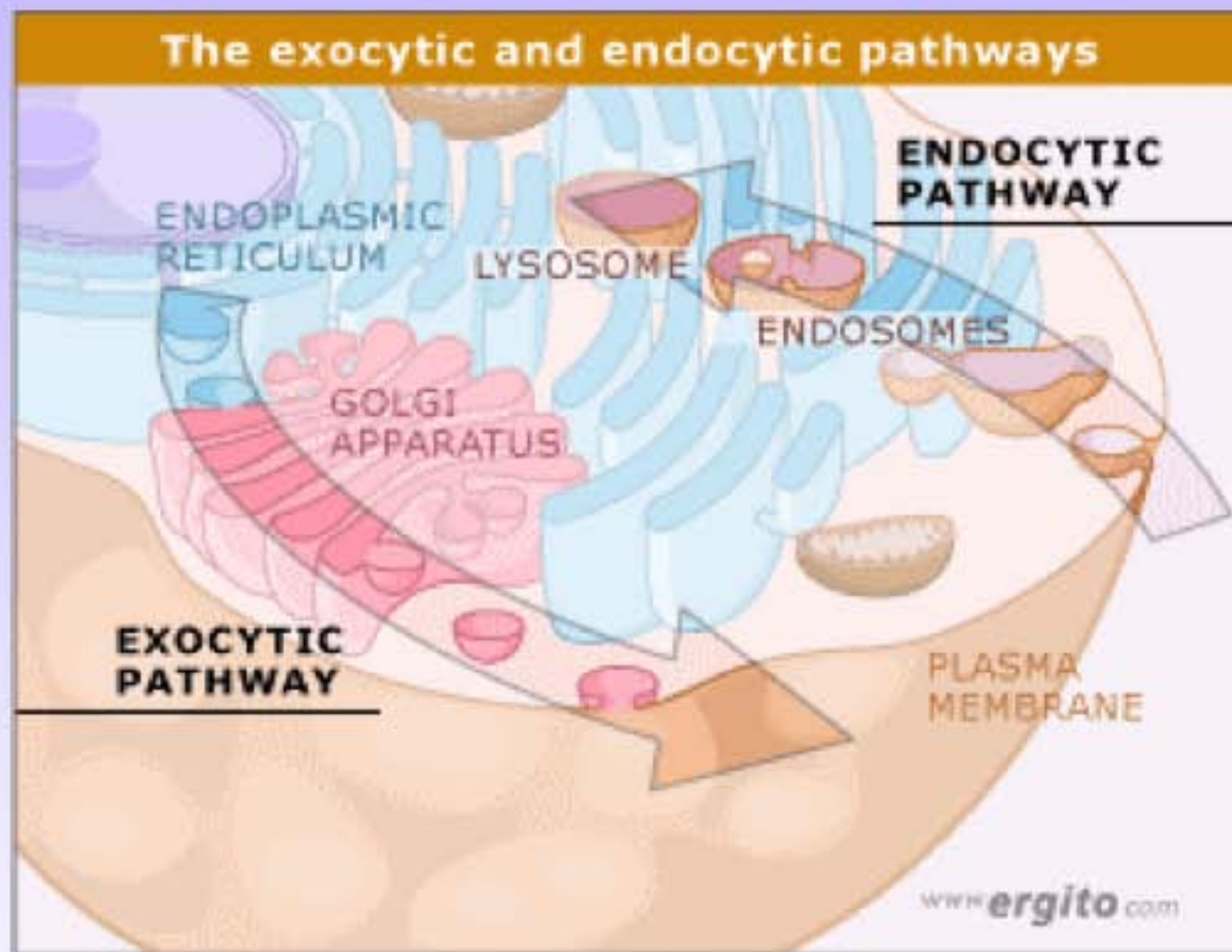
6. Roles des vSNAREs et souris KO

KO de la synaptobrevine
Mutants de l'adaptateur AP-3: les mocha

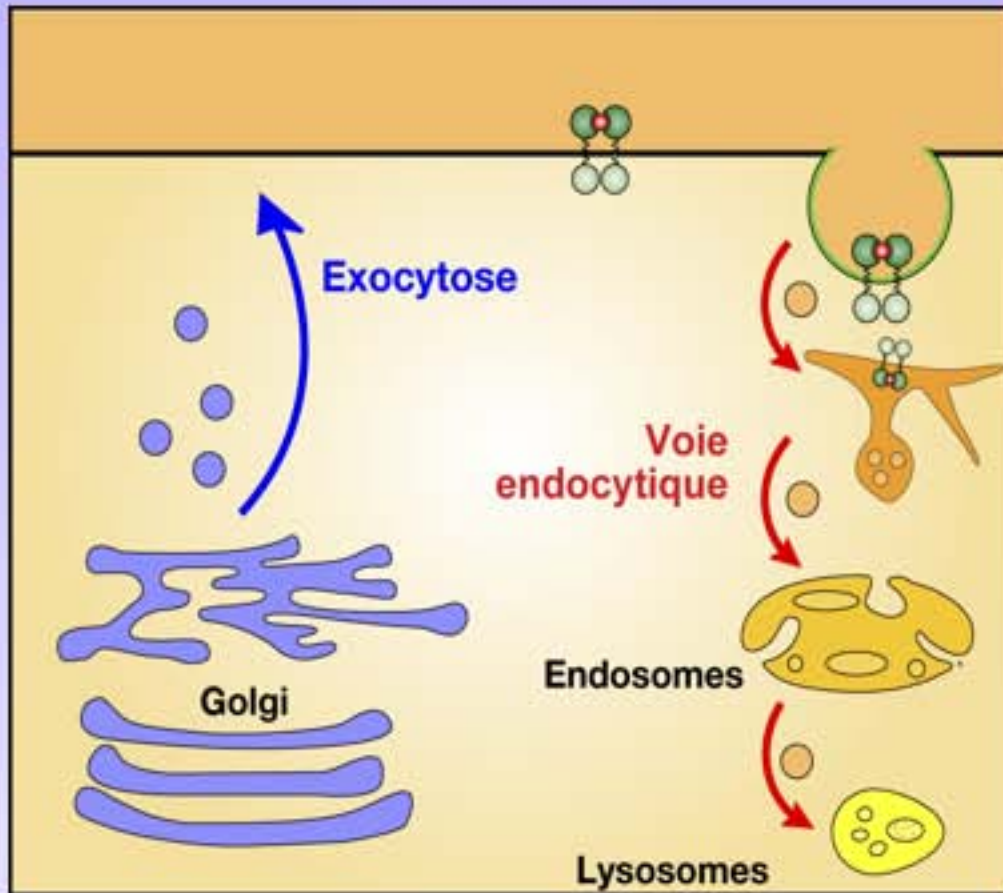
7. Régulation de l'exocytose

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

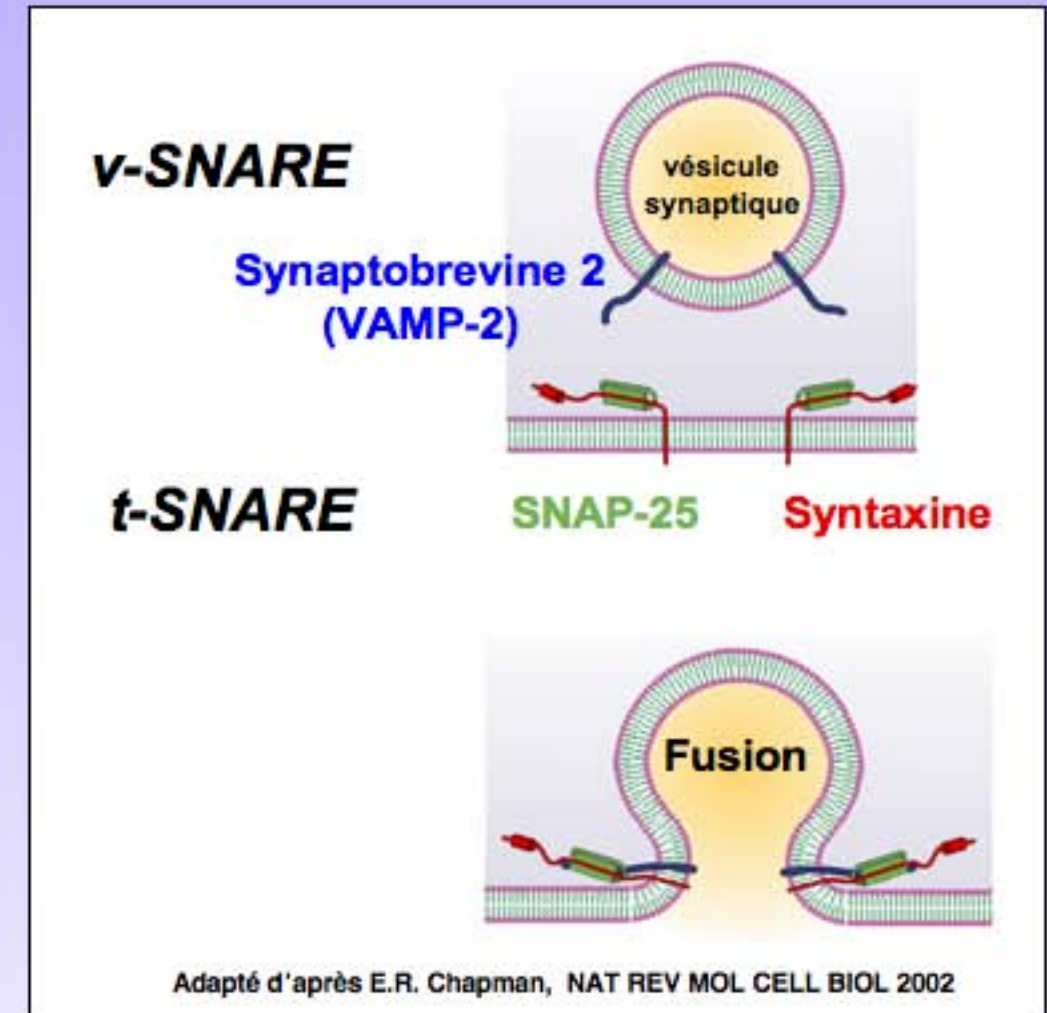
Exo-endocytose



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)**

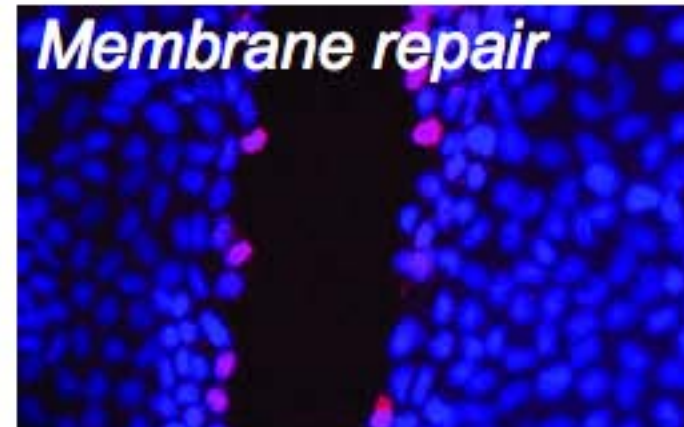
(Pryor et al., 2004; Proux-Gillardeaux 2007)

- **Croissance neuritique**

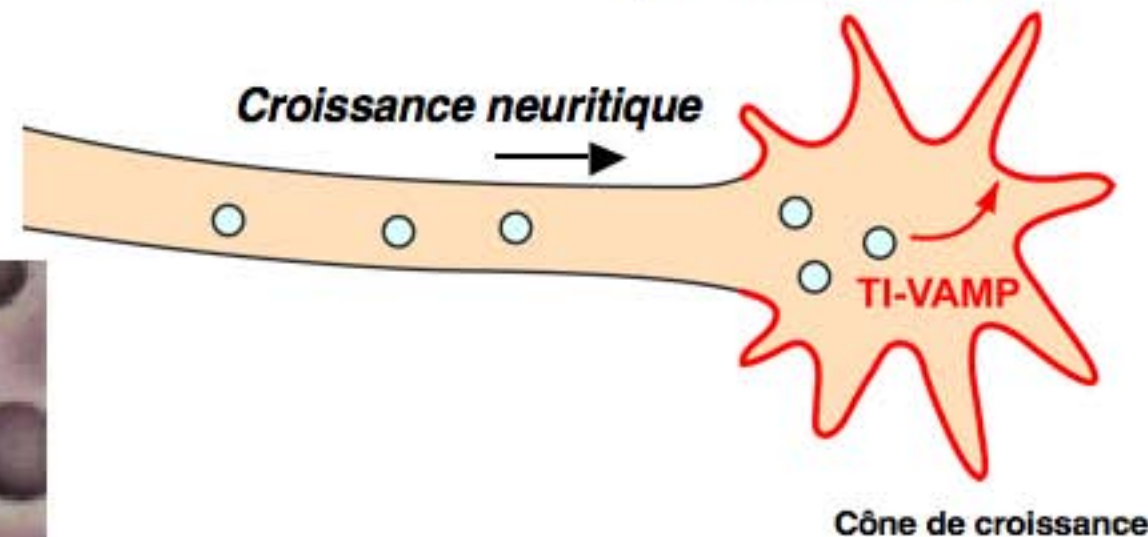
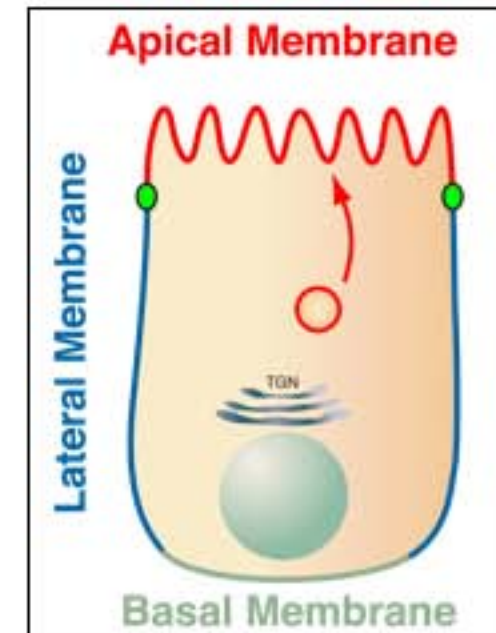
(Martinez-Arca et al.,2003)

- **Exocytose synaptique : libération de NT**

(Danglot et al. PNAS 2006)

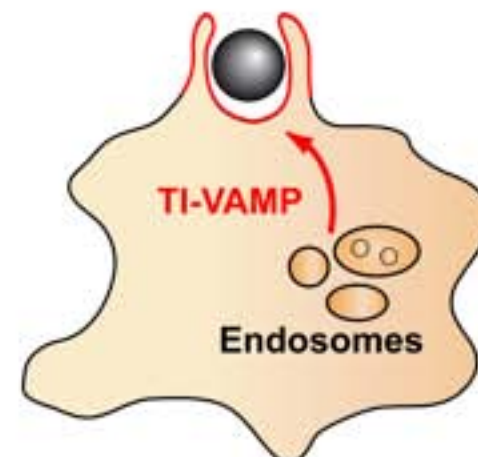


(Proux-Gillardeaux, 2007)



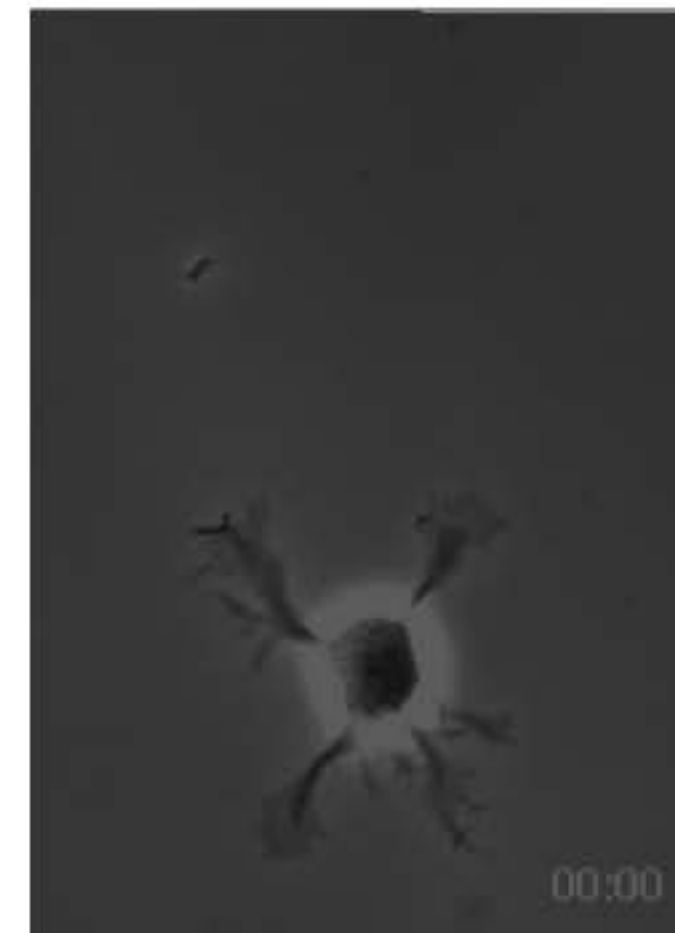
- **Phagocytose**

(Braun and Niedergang., EMBO J, 2004)



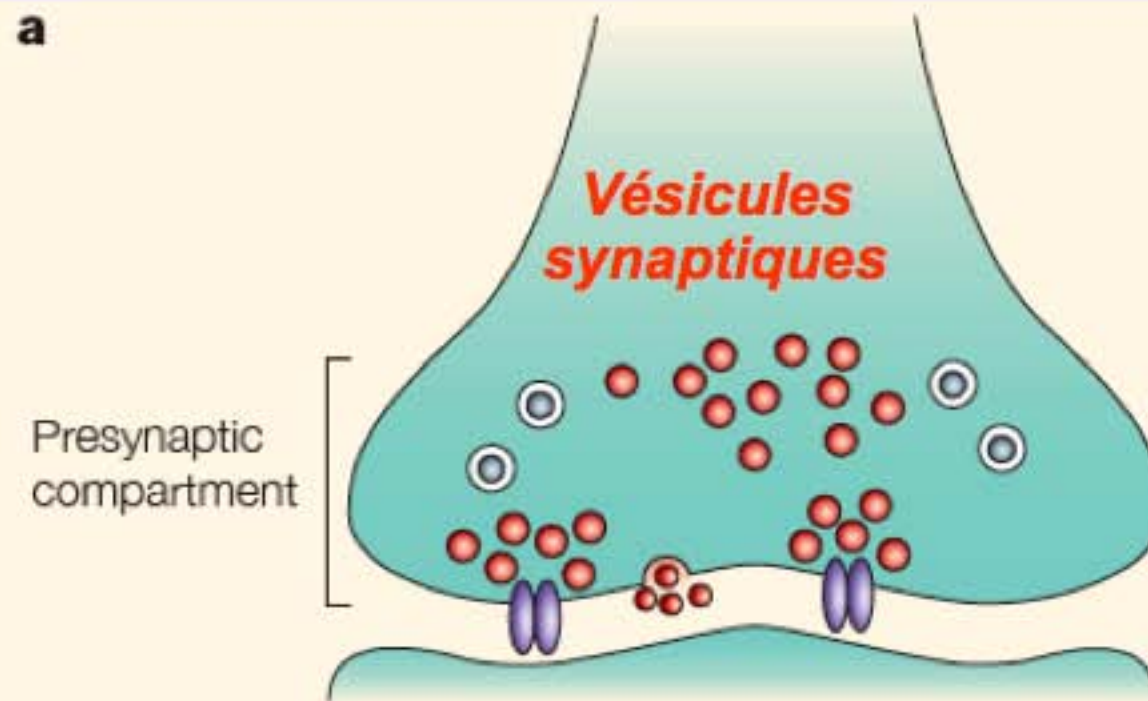
- **Degradation de la matrice dans les metastases (invadopodia)**

(Steffen and Chavrier, Curr Biol, 2008)

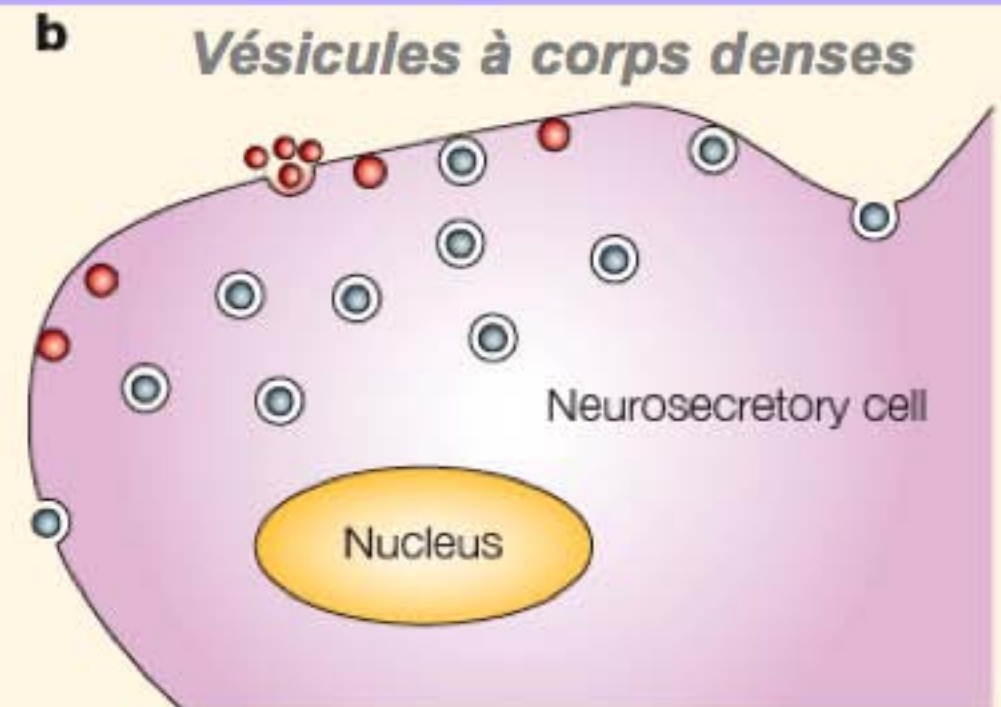


Croissance neuritique

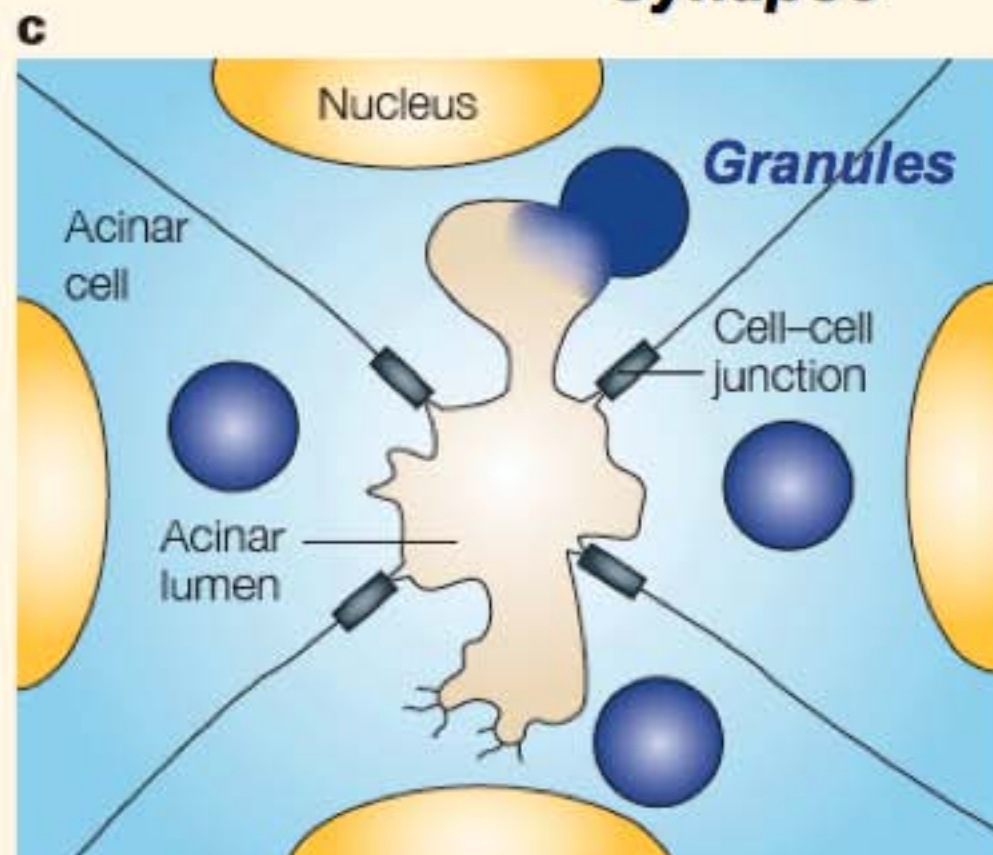
<http://www.silvermanlab.org/>



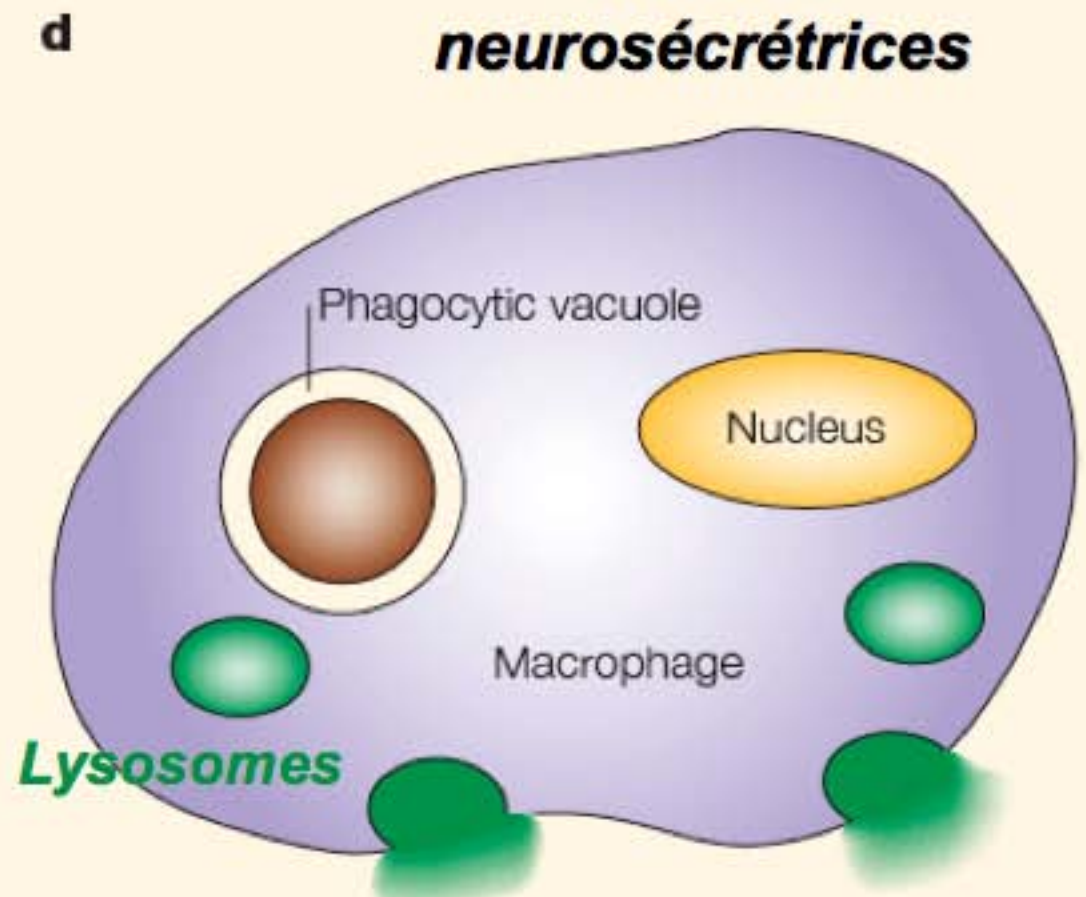
Synapse



Cellules neurosécrétrices

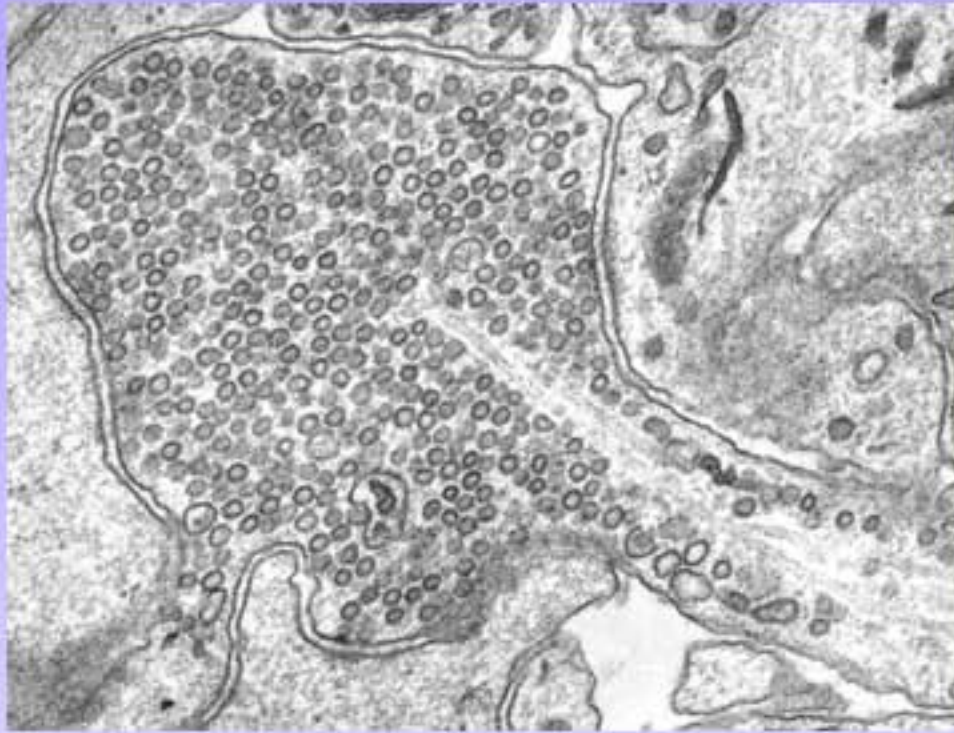


Glandes exocrines

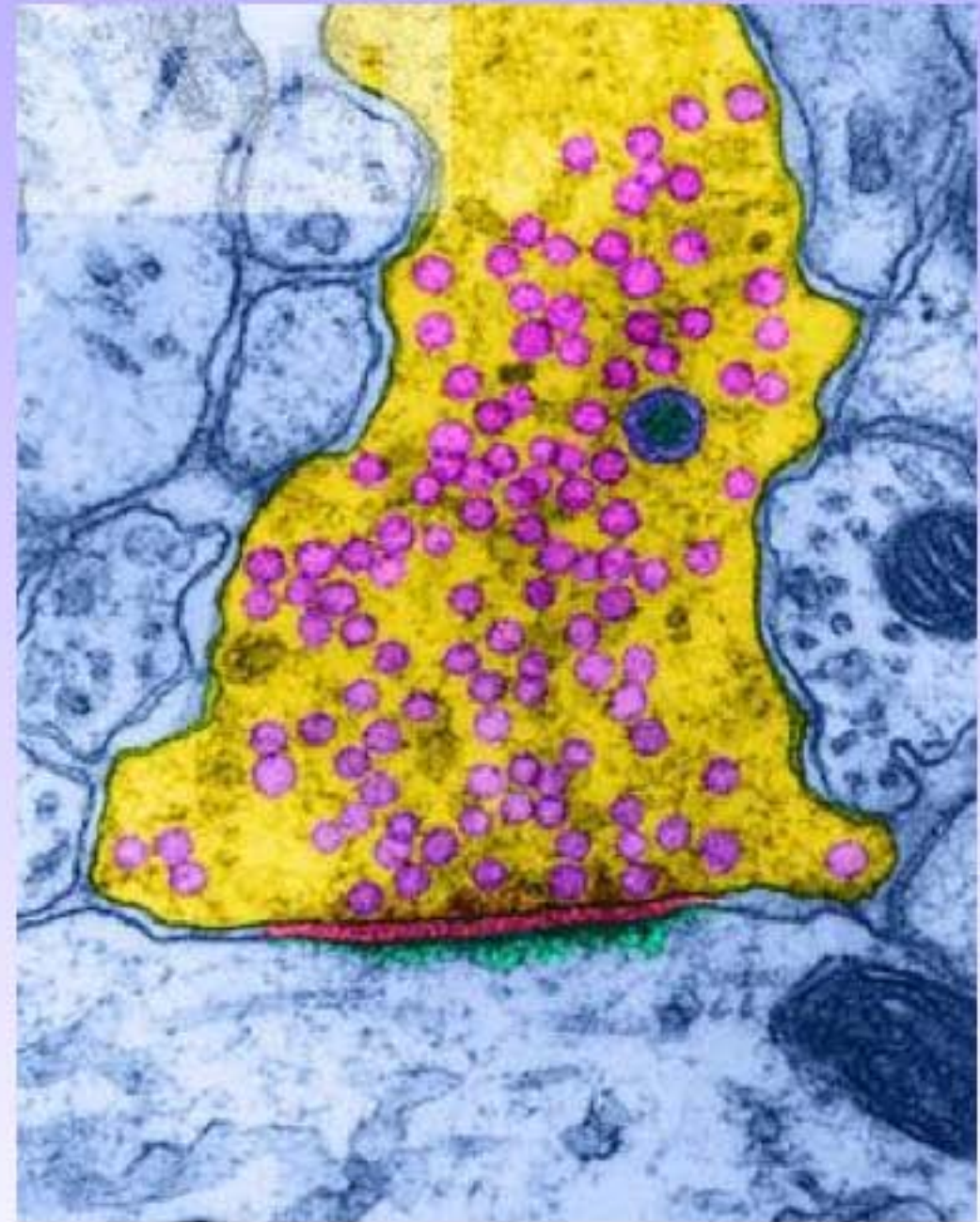


Macrophages

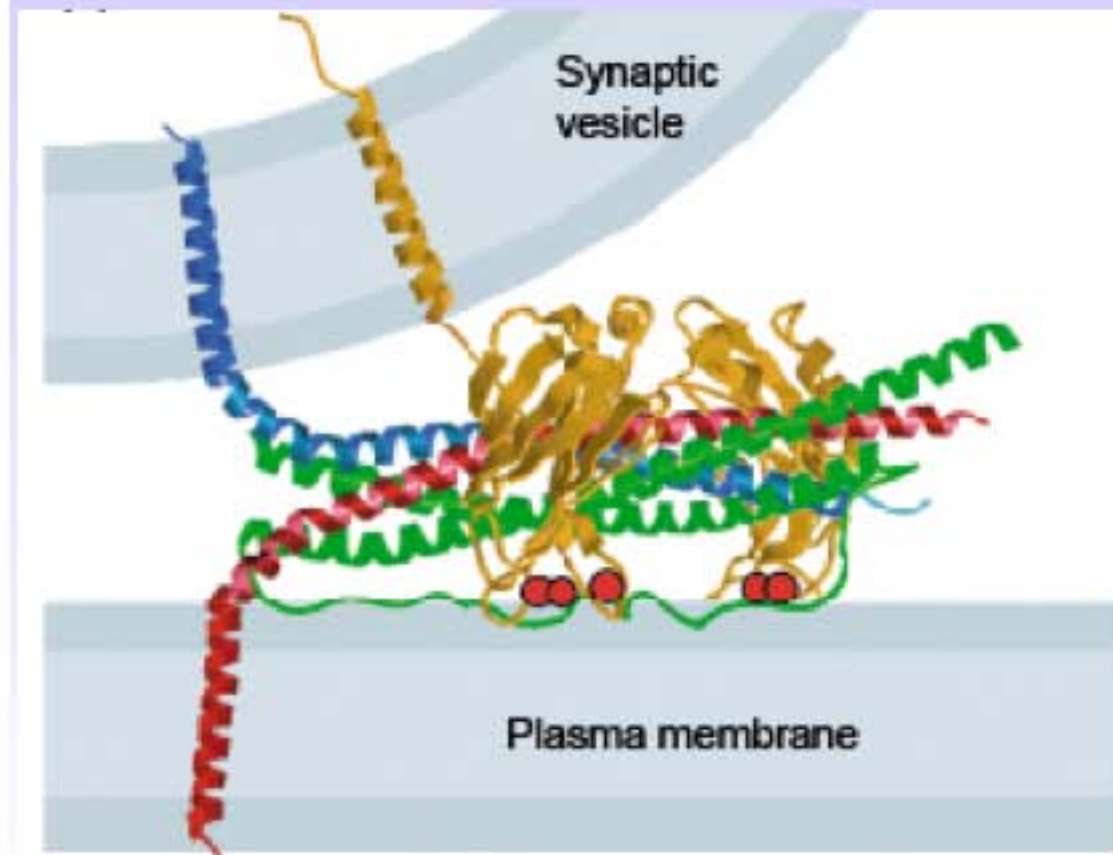
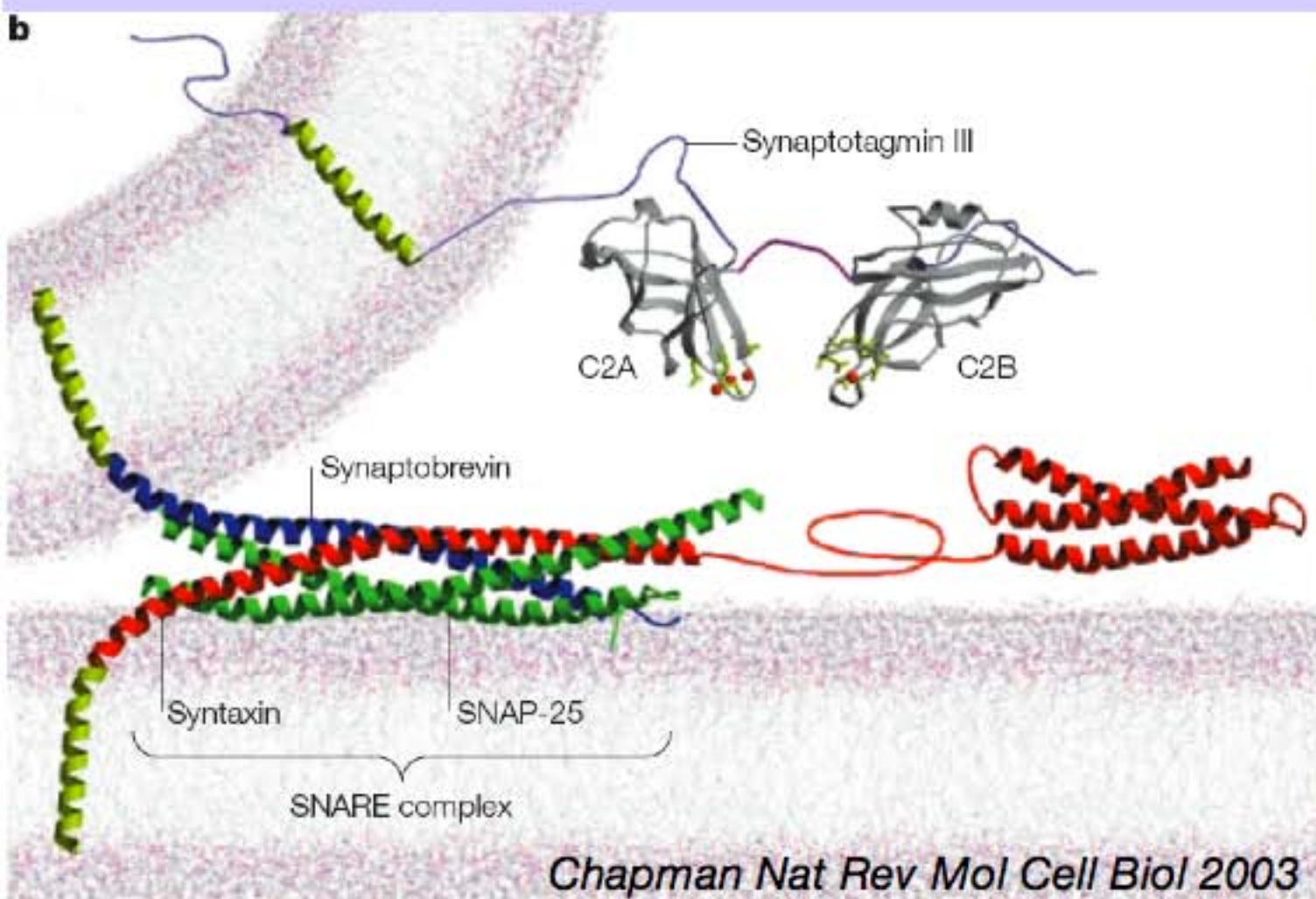
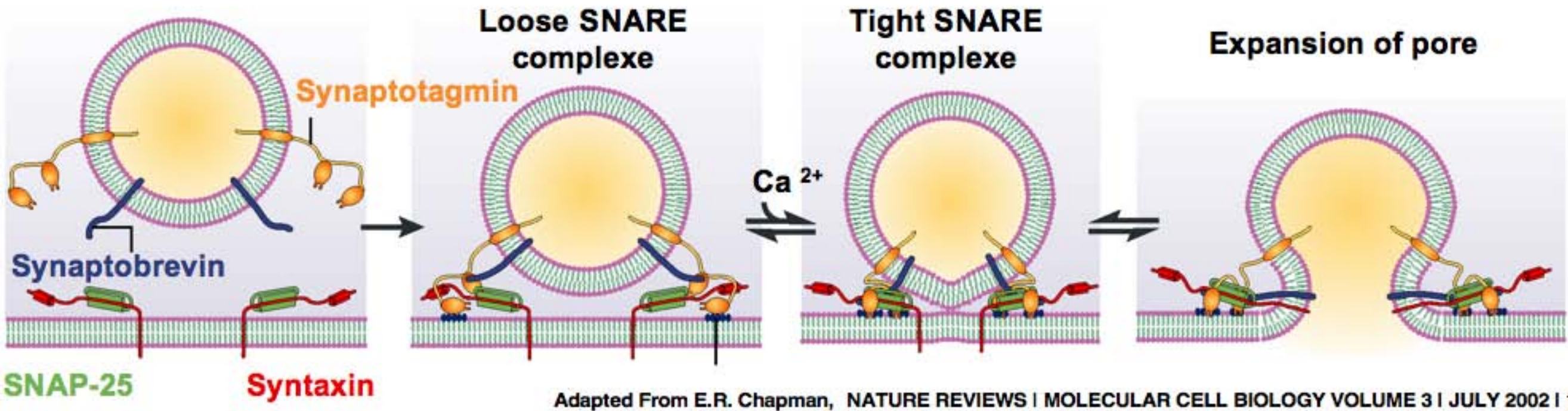
Les vésicules synaptiques



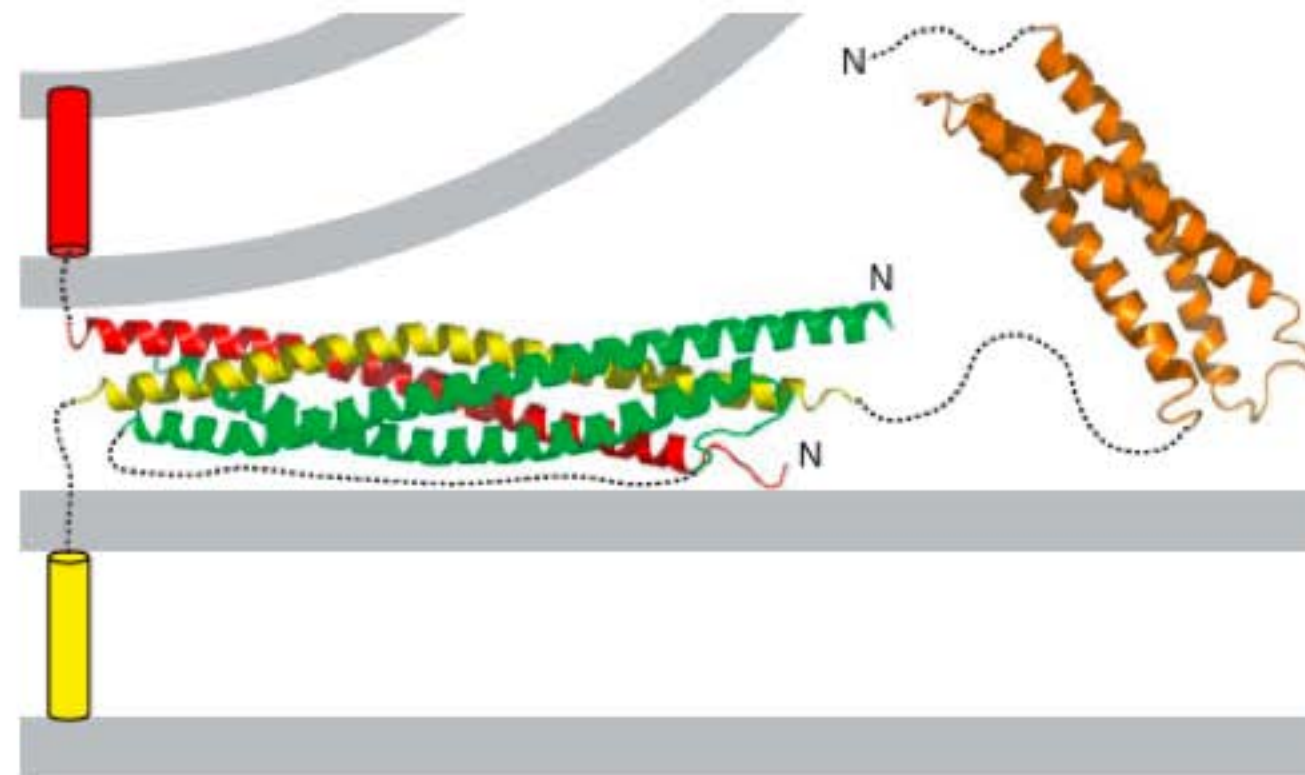
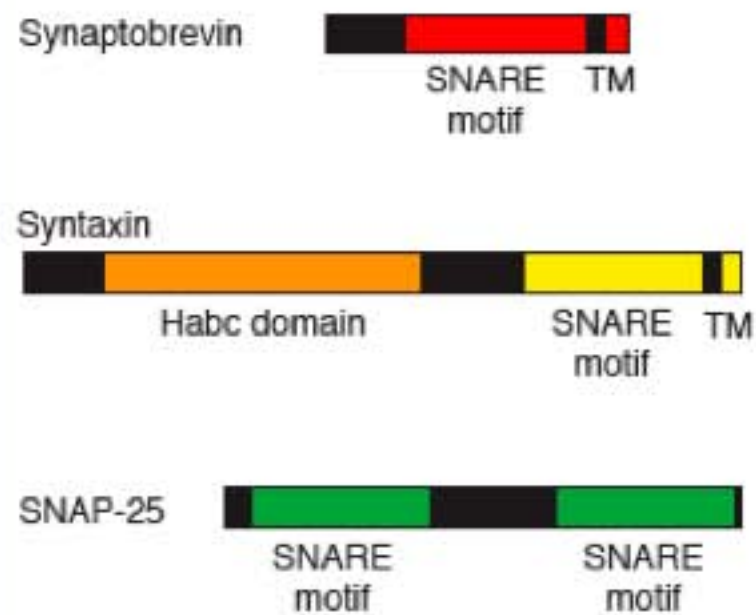
- 50 nm de diamètre
- 500 VS/terminaison
 - $\times 10\,000$ contacts = 10^6 à 10^7 VS/neurone
 - $\times 10^{11}$ neurones = 10^{17} VS/SNC
- cholestérol:phospholipides = 1:2
- 12000 molécules de phospholipides / VS
- phospholipides:protéines = 1:1
- 20 à 40 protéines différentes / VS
- synaptophysine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



Les protéines SNARE et l'exocytose

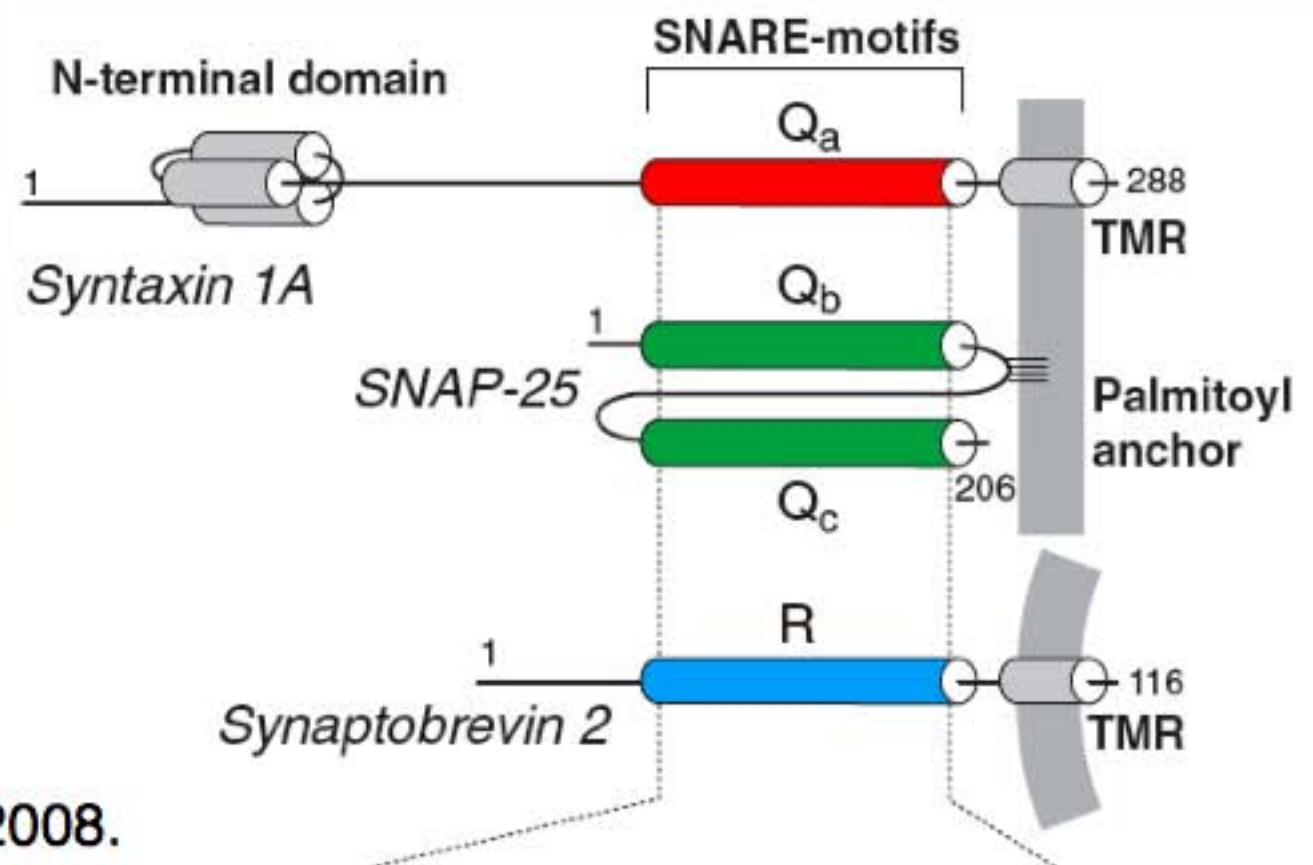


Le complexe SNARE



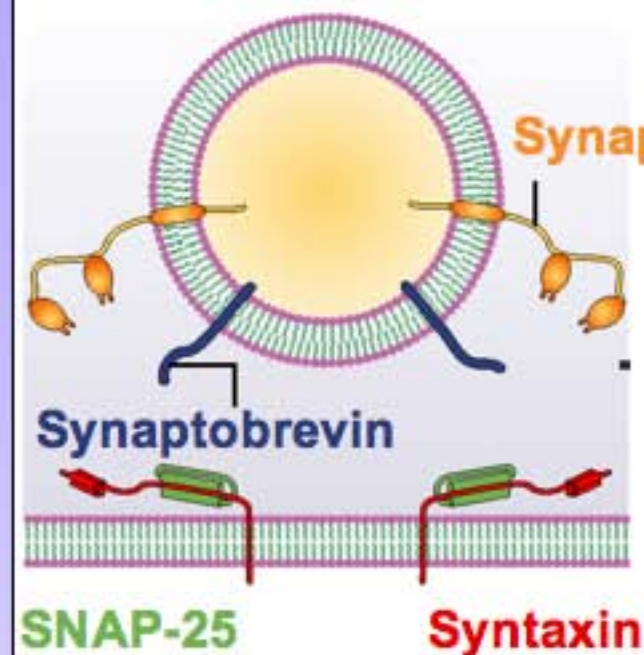
TRENDS in Cell Biology

Rizo, Chen et d'Areç, Tins 2006.

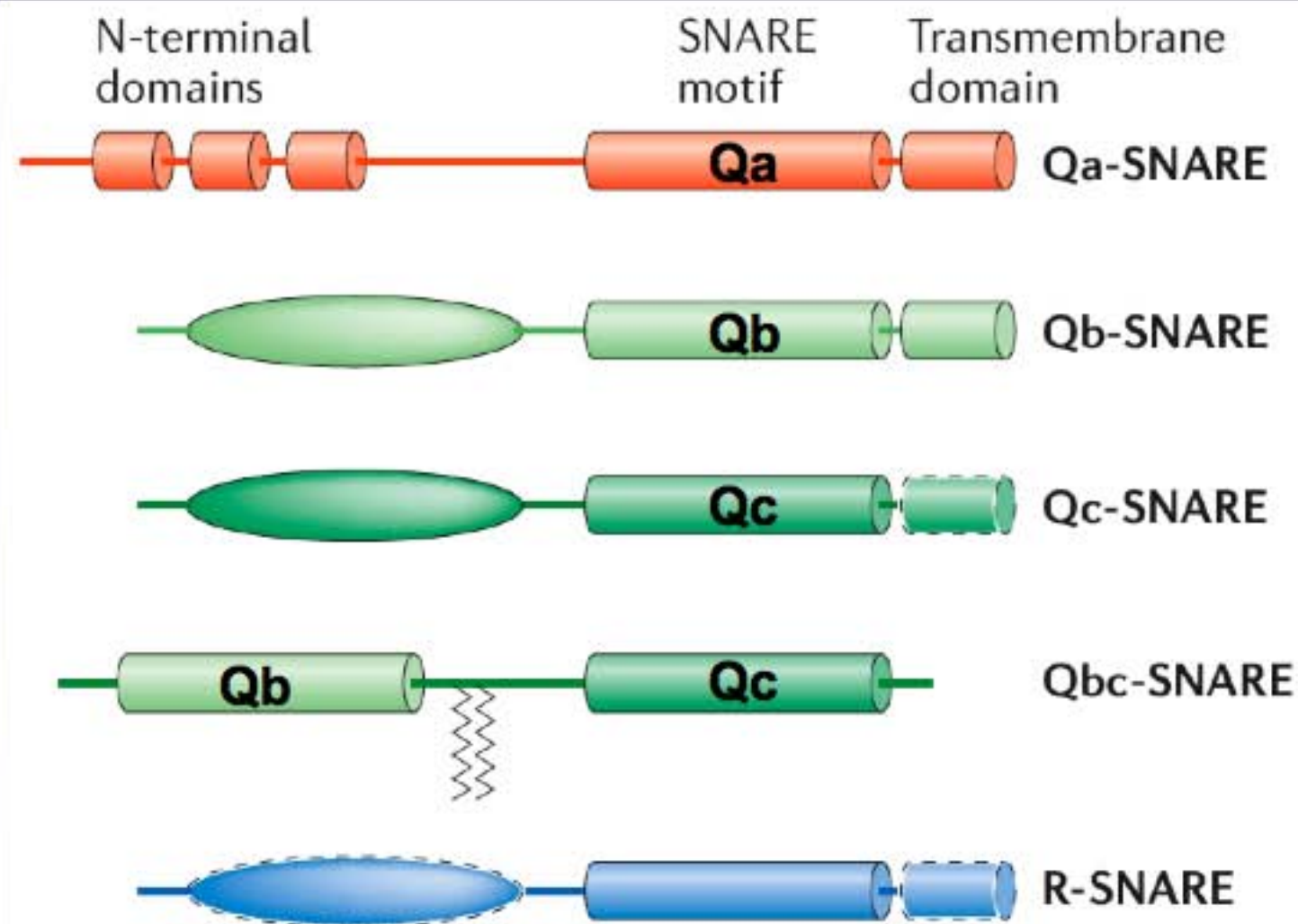


Core Proteins of the Secretory
Lang and Jahn, Pharmacology of NT release, 2008.

Les protéines SNARE et l'exocytose



- **v-SNARE**: sur la vesicule (vesicle)
- **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.

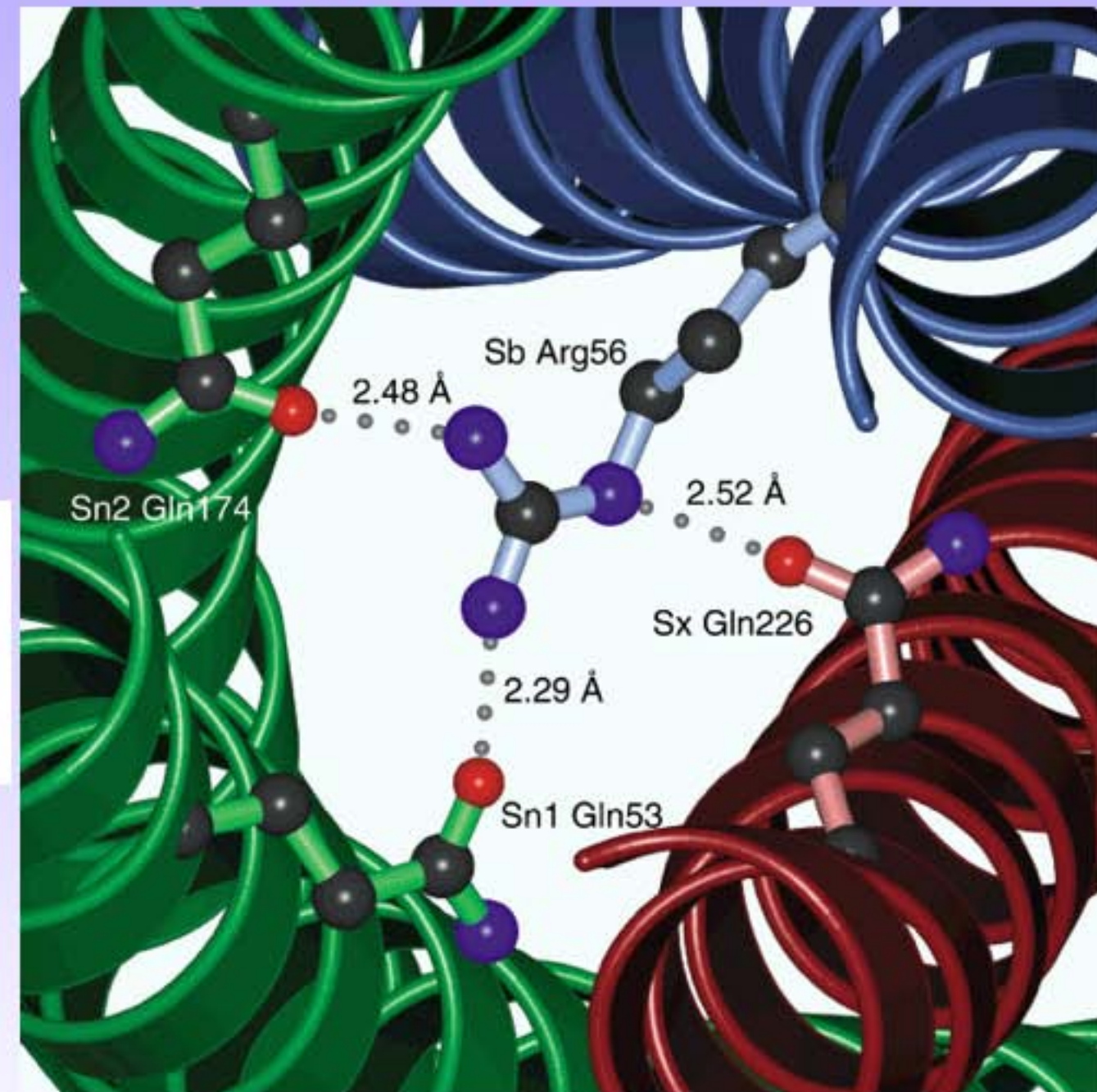
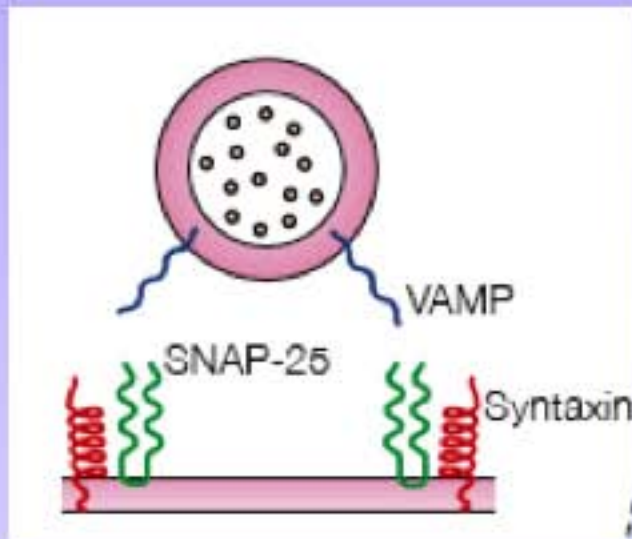
ex: Vti1a, Vti1b, GS27, GS28

ex: Bet21, GS15, stx6, stx8, stx10

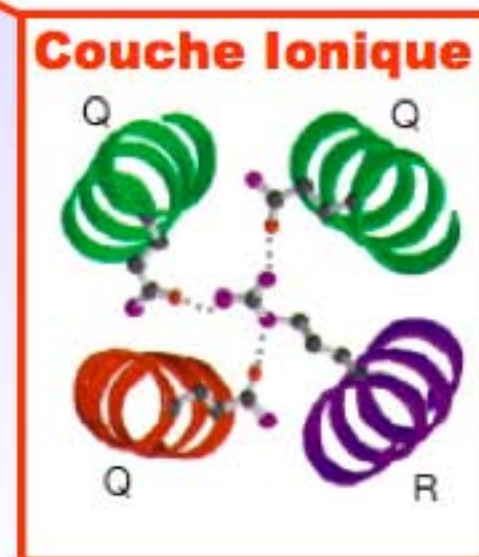
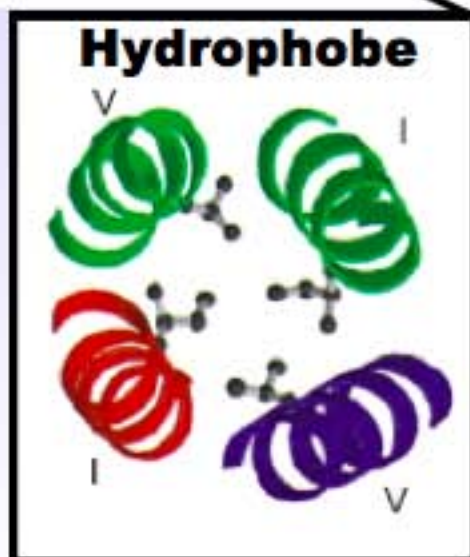
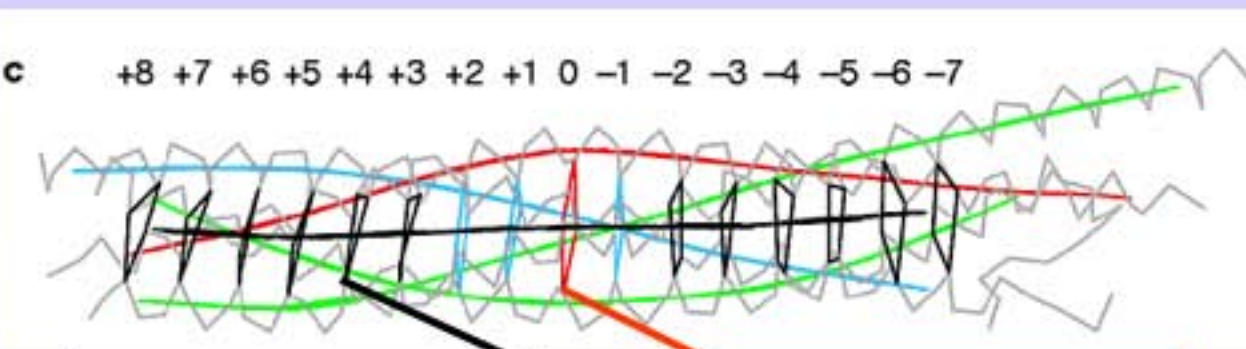
ex: SNAP-25, SNAP-23, SNAP-29

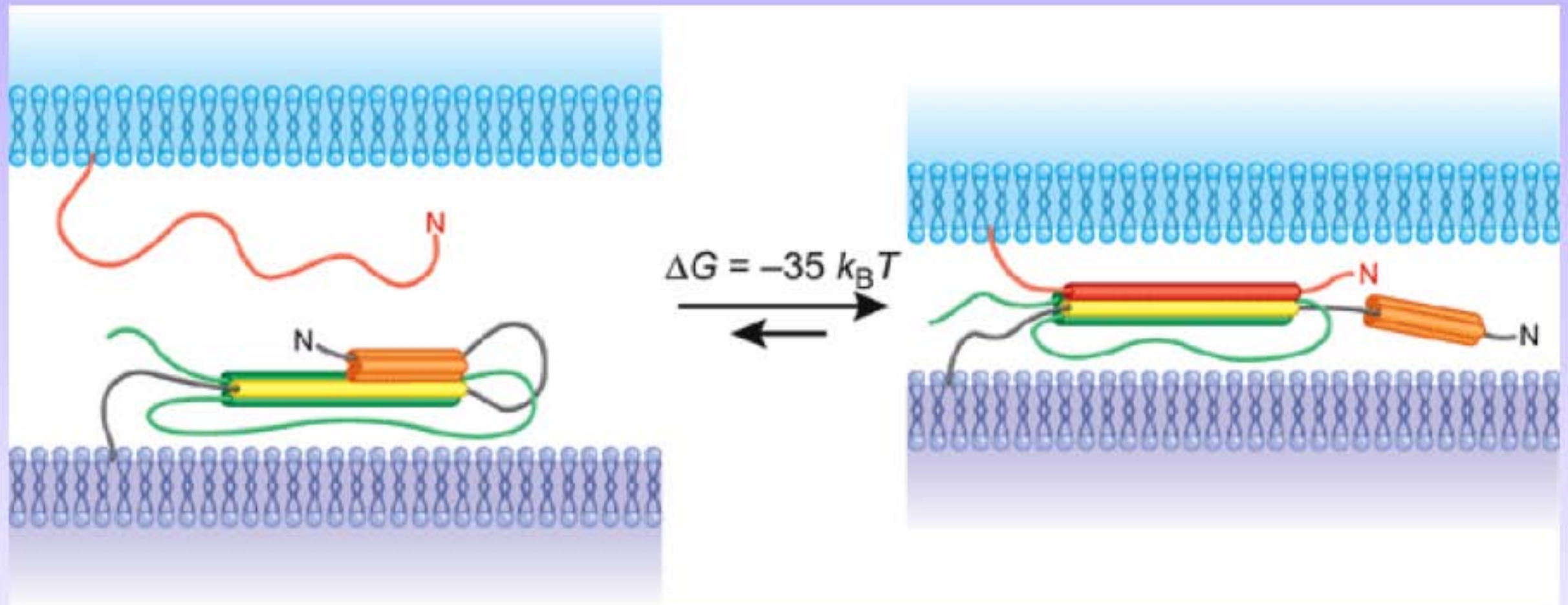
**ex: Syb2, TI-VAMP, Sec22, YKT6
VAMP1 à VAMP8**

Le complexe SNARE : Q-SNARE & R-SNARE



(Sutton et al., Nature 1998)



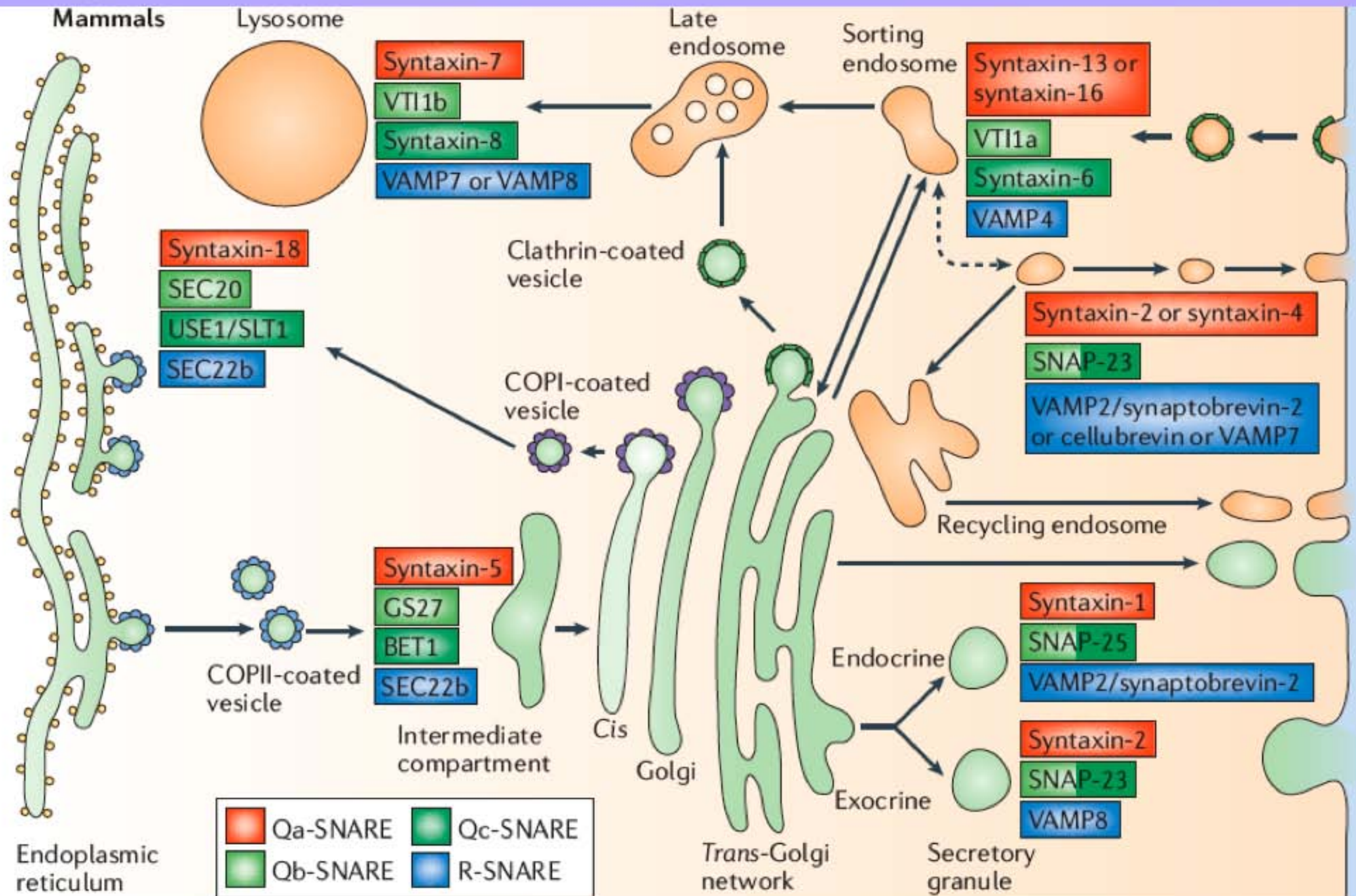


La haute stabilité du complexe SNARE est probablement cruciale pour leur rôle dans la fusion membranaire. L'énergie de stabilisation du complexe SNARE est de 35 kBT (cf. Li. et al. Nat. Struct. Mol. Biol.(2007): 14, 890–896) soit une des plus grande énergie de repliement mesurée.

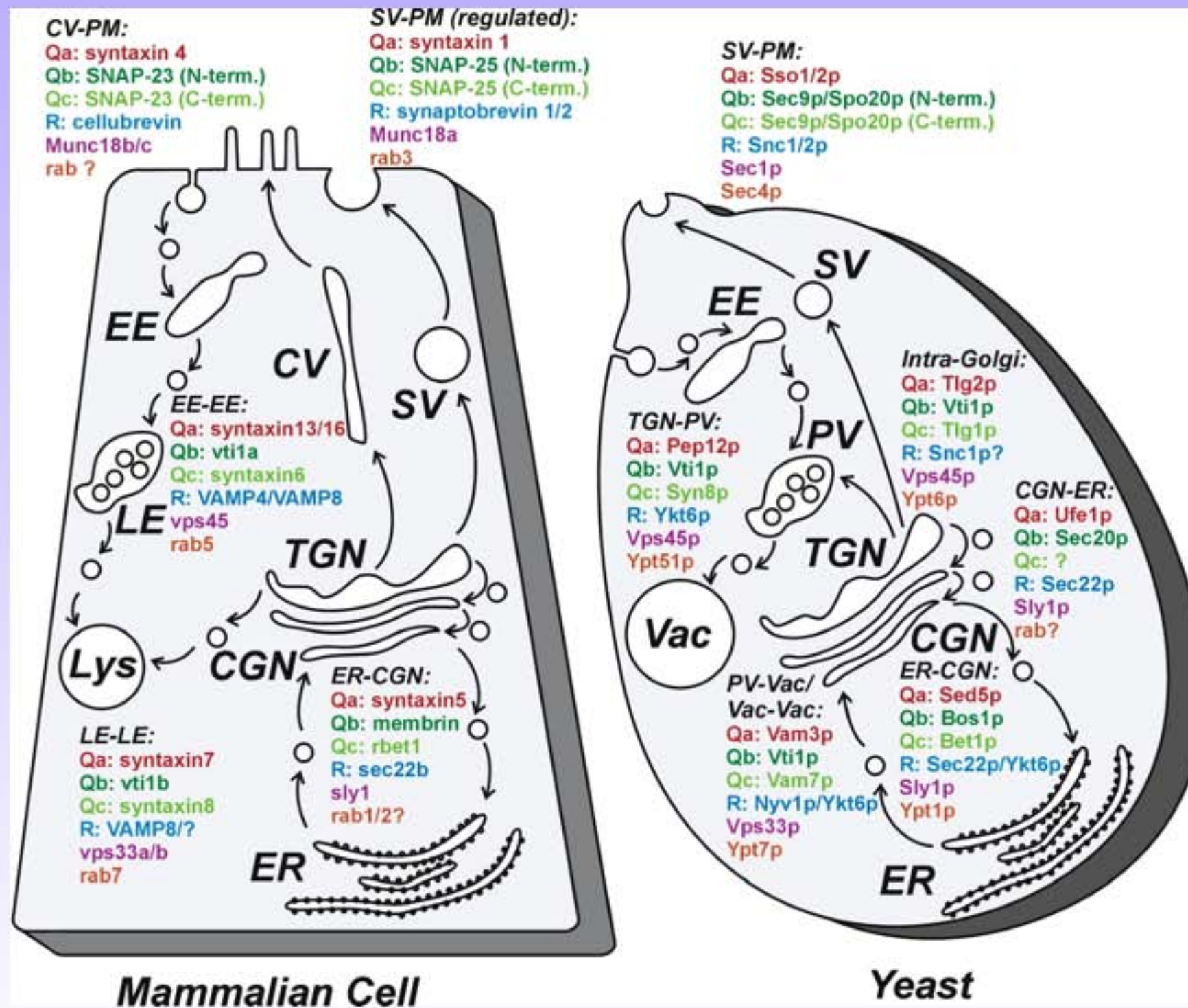
SNARE & compartments

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

Les protéines SNARE et le trafic membranaire dans la cellule

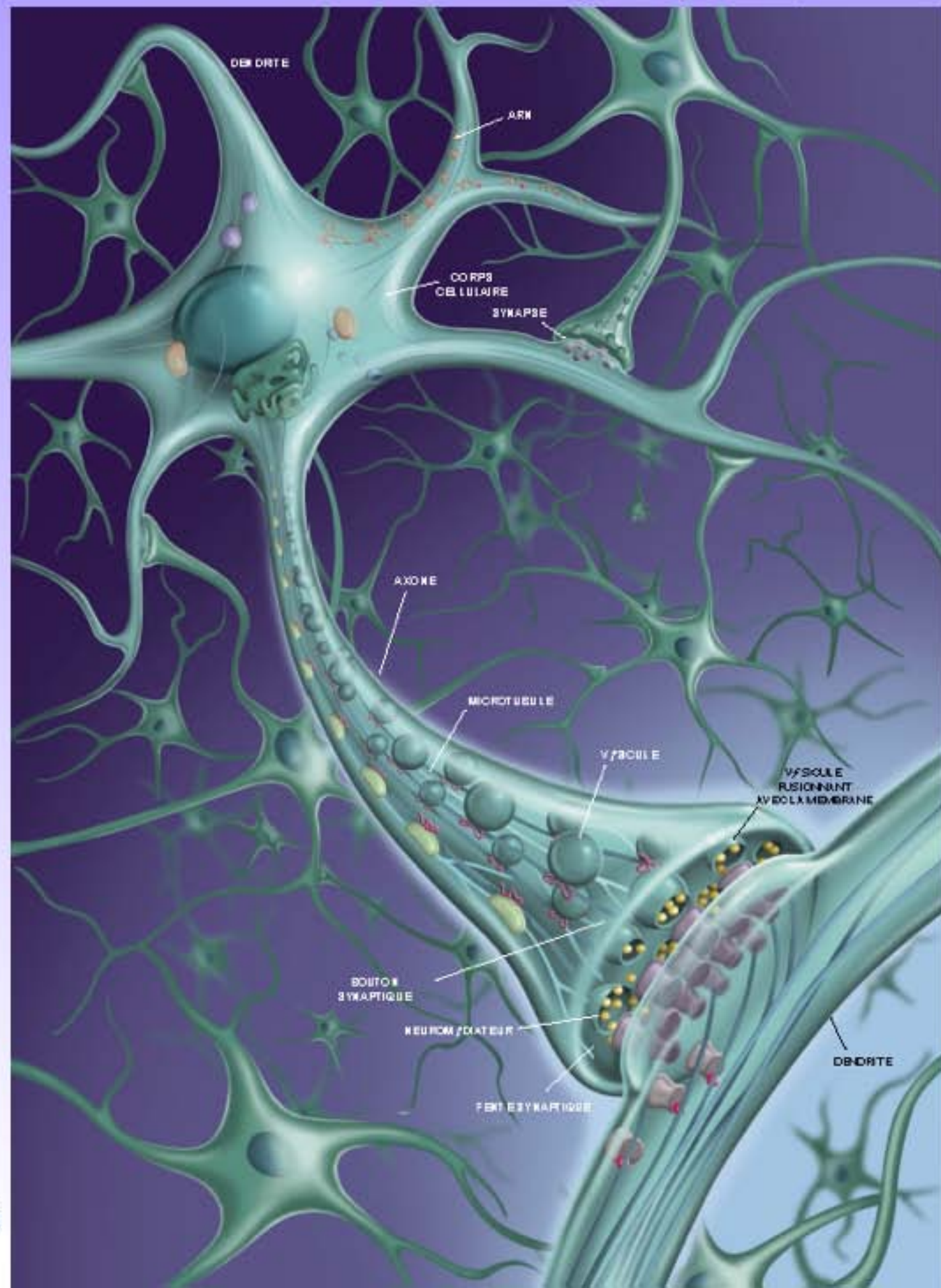


SNARE & compartments



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

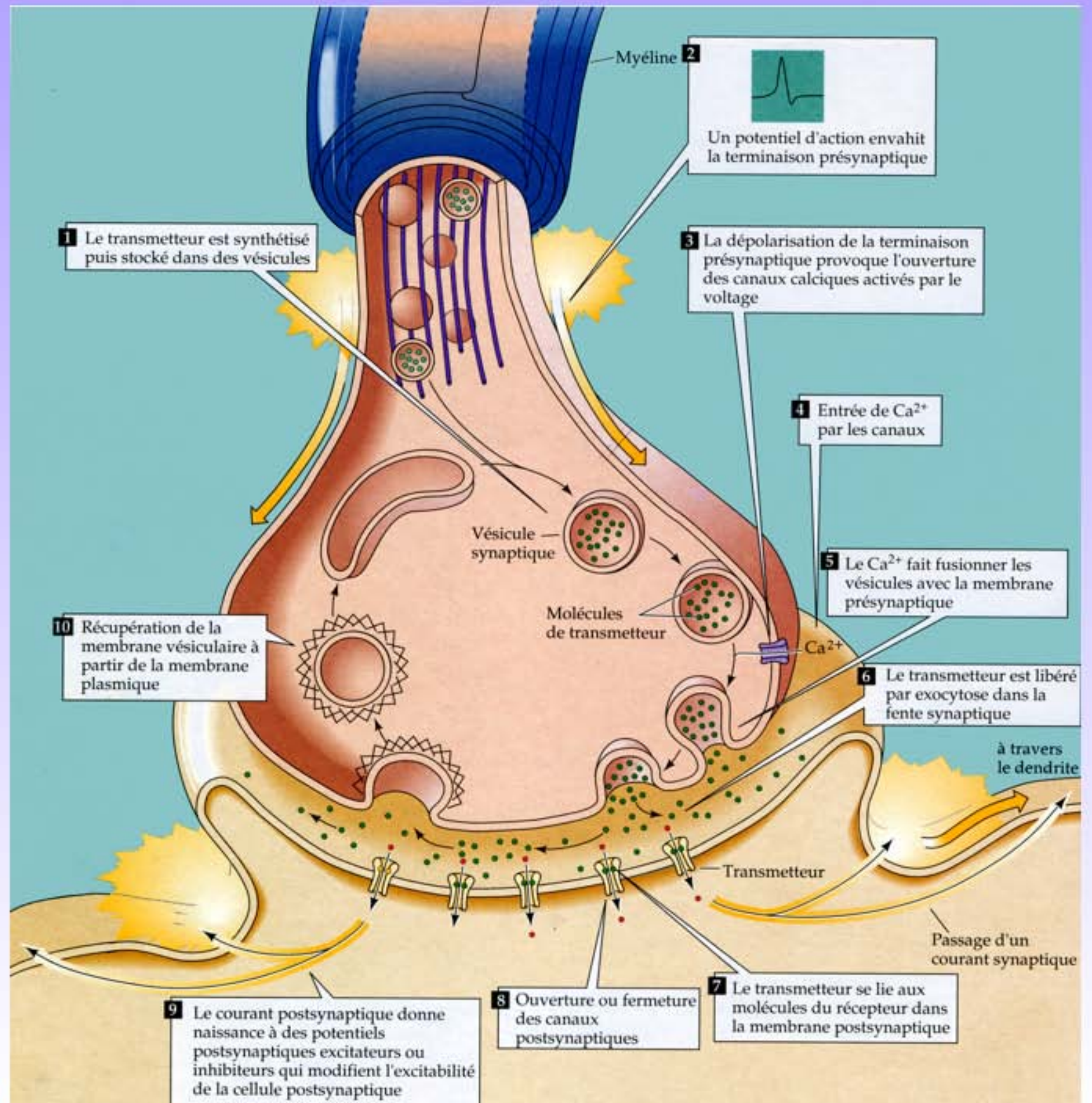
*La fusion vésiculaire entre les
vésicules synaptiques et la
membrane présynaptique permet la
libération des neurotransmetteur.*



Thierry Galli & fabienne Paumet

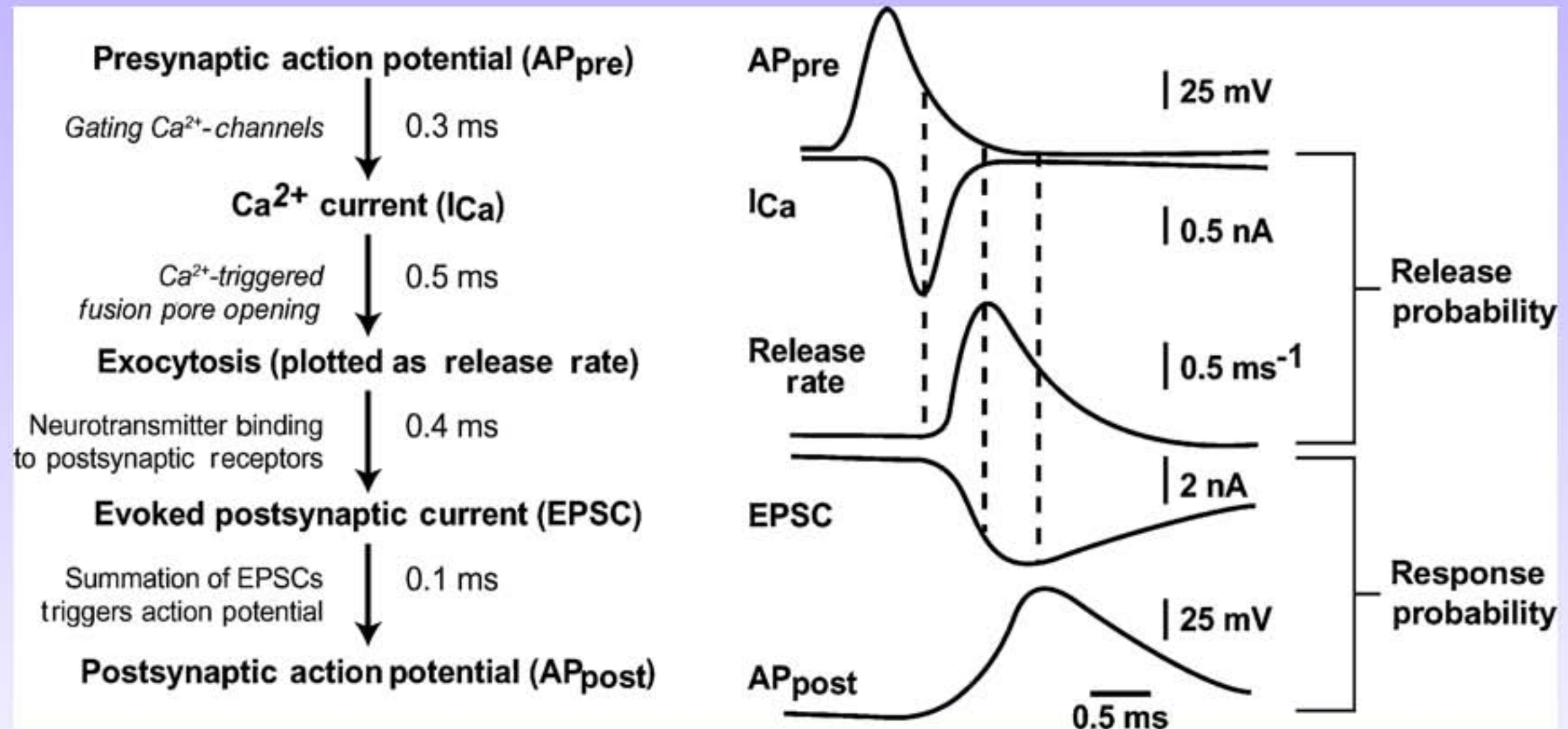
© POUR LA SCIENCE - N° 302 DÉCEMBRE 2002

L'exocytose synaptique



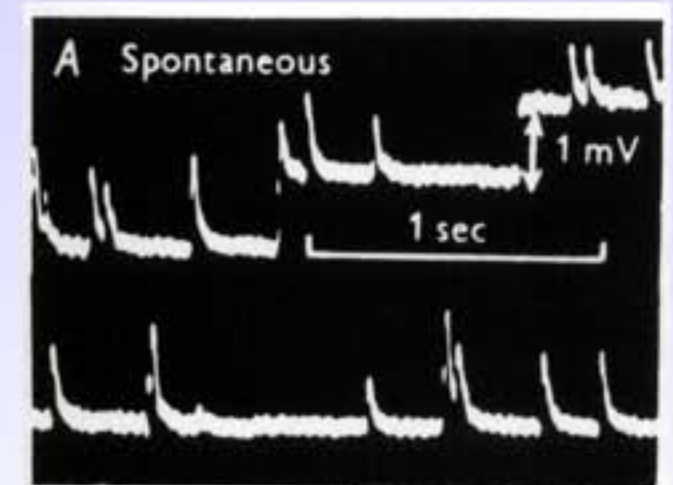
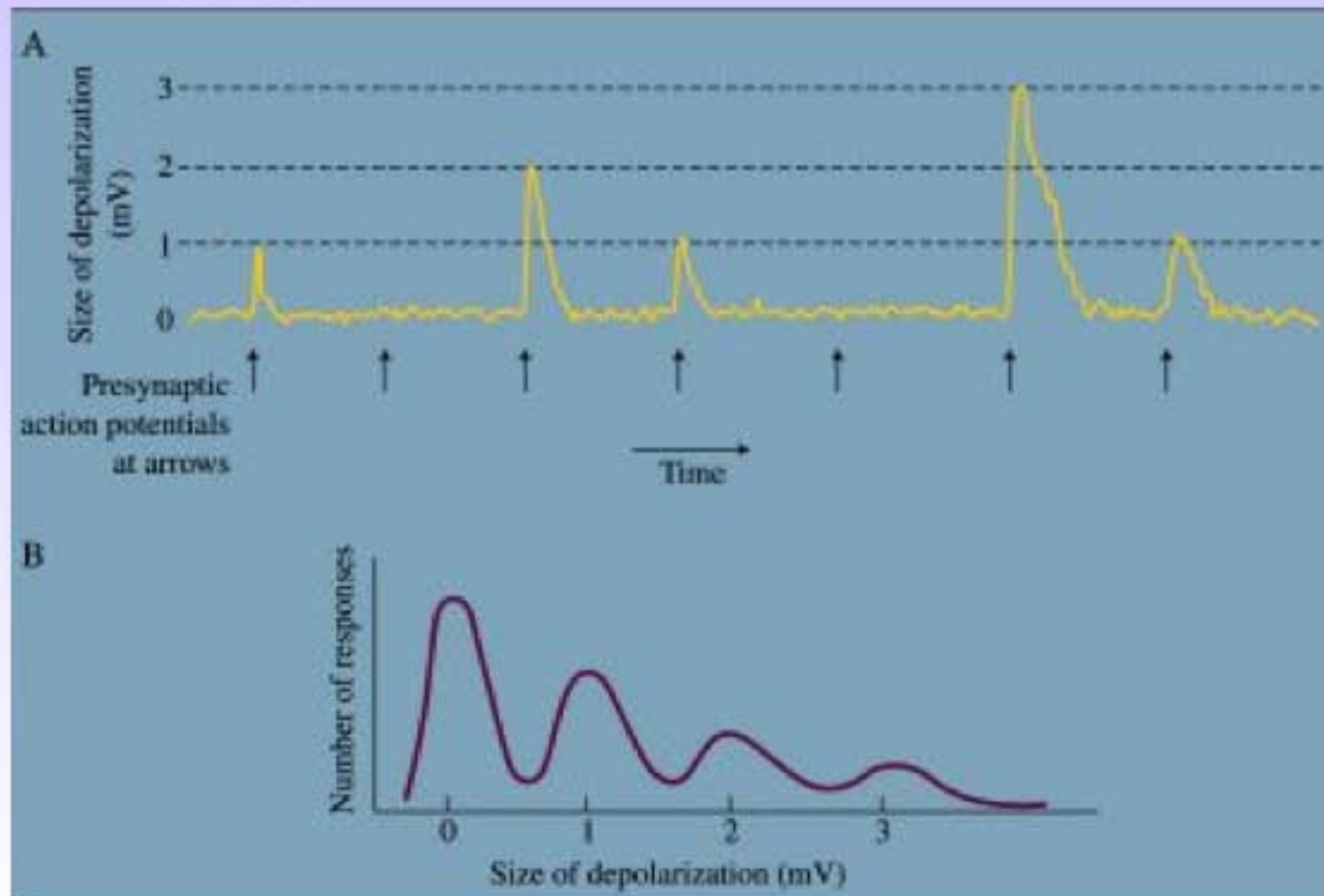
D'après Neurosciences,
à la découverte du cerveau
M. F. Bear

Chronologie: rapidité! Et rôle du calcium



Libération de l'acétylcholine

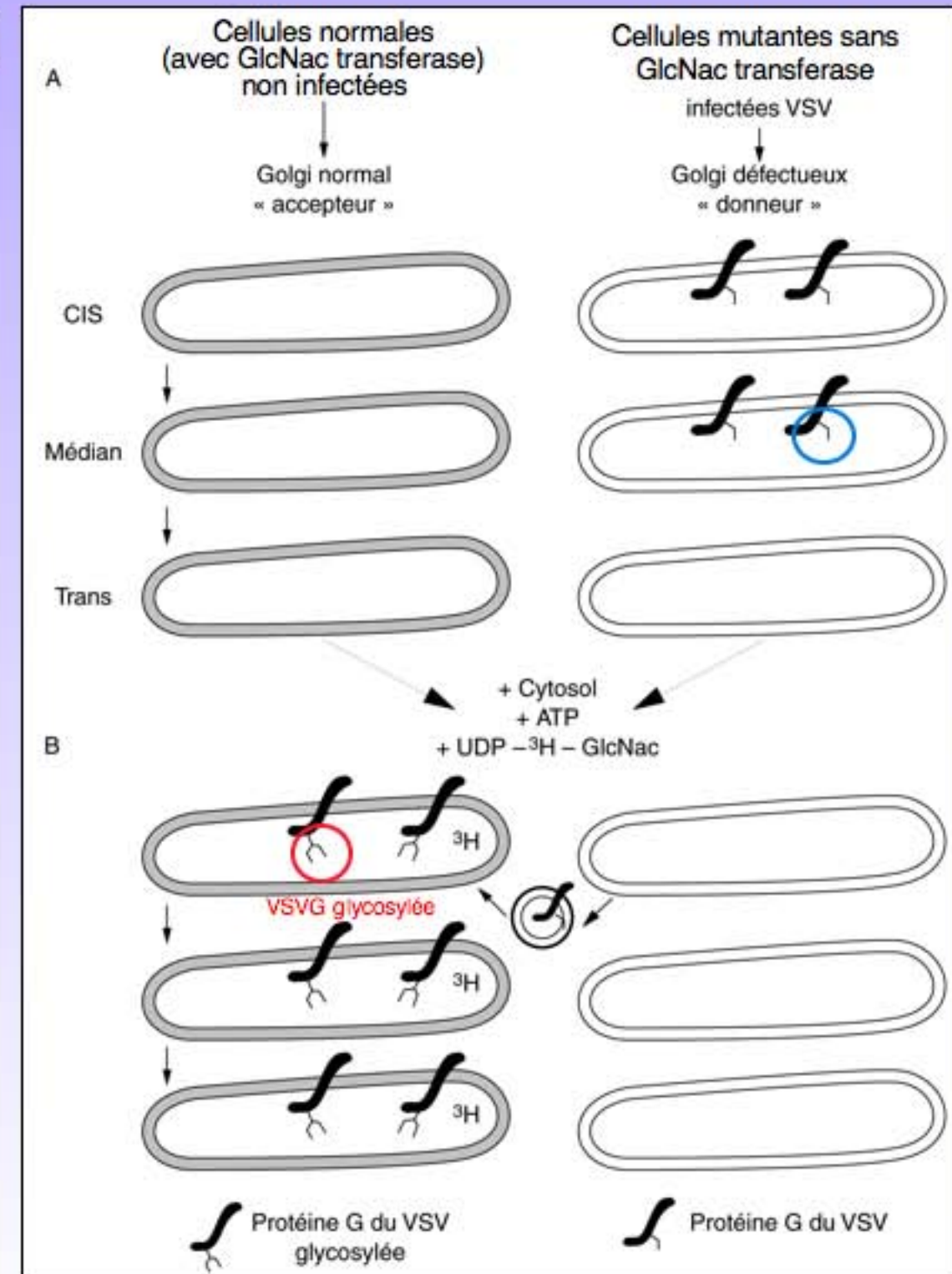
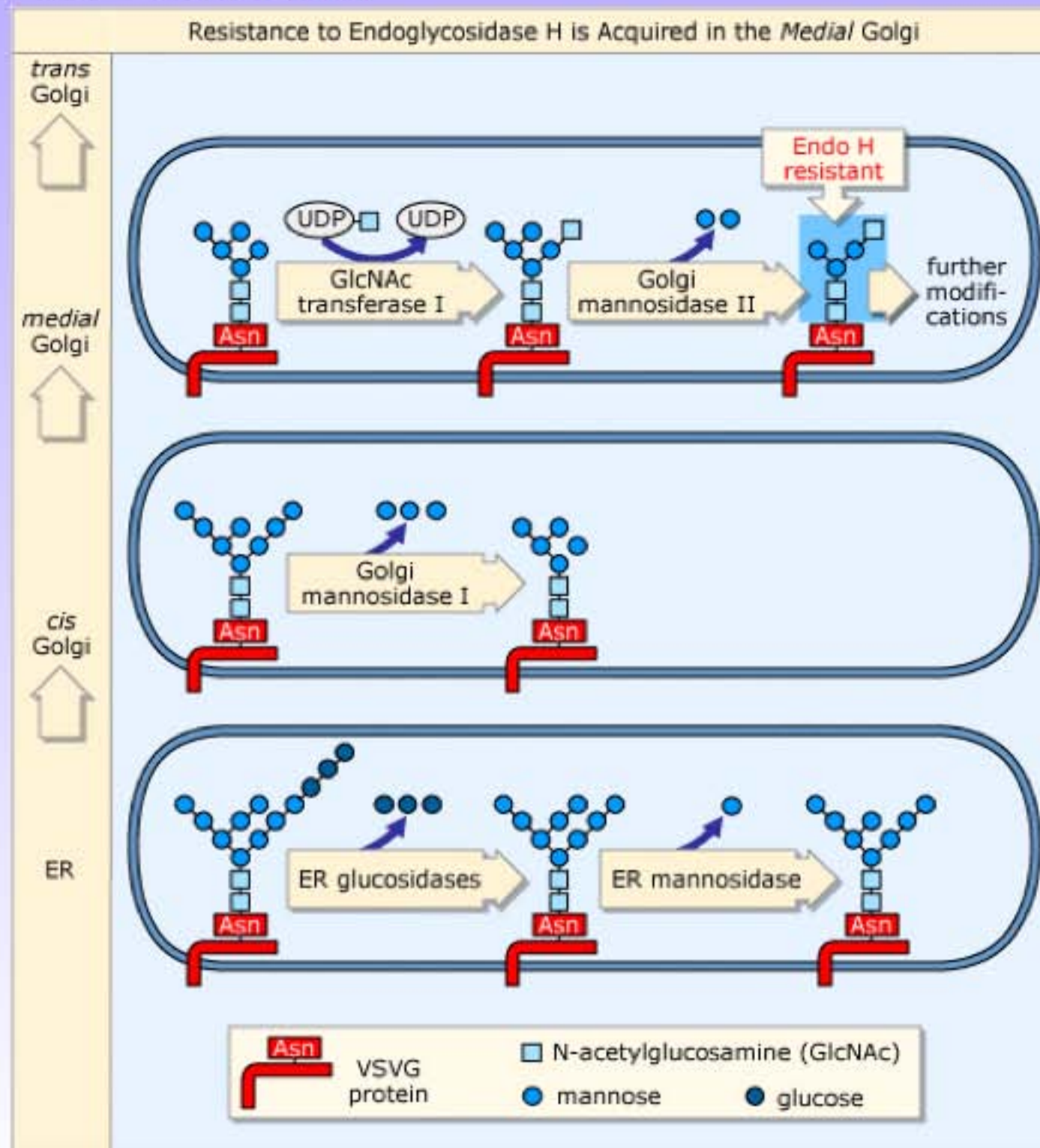
- Théorie quantique: Prix Nobel pour Katz
 - Nt libéré par paquet de taille définie
 - 10,000 molécules d'ACh
- Libération en "tout ou rien"
 - Calcium extracellulaire réduit, seuls quelques quanta sont libérés



Test in vitro de transport membranaire

(Balch et Rothman, Cell (1984))

Jim Rothman



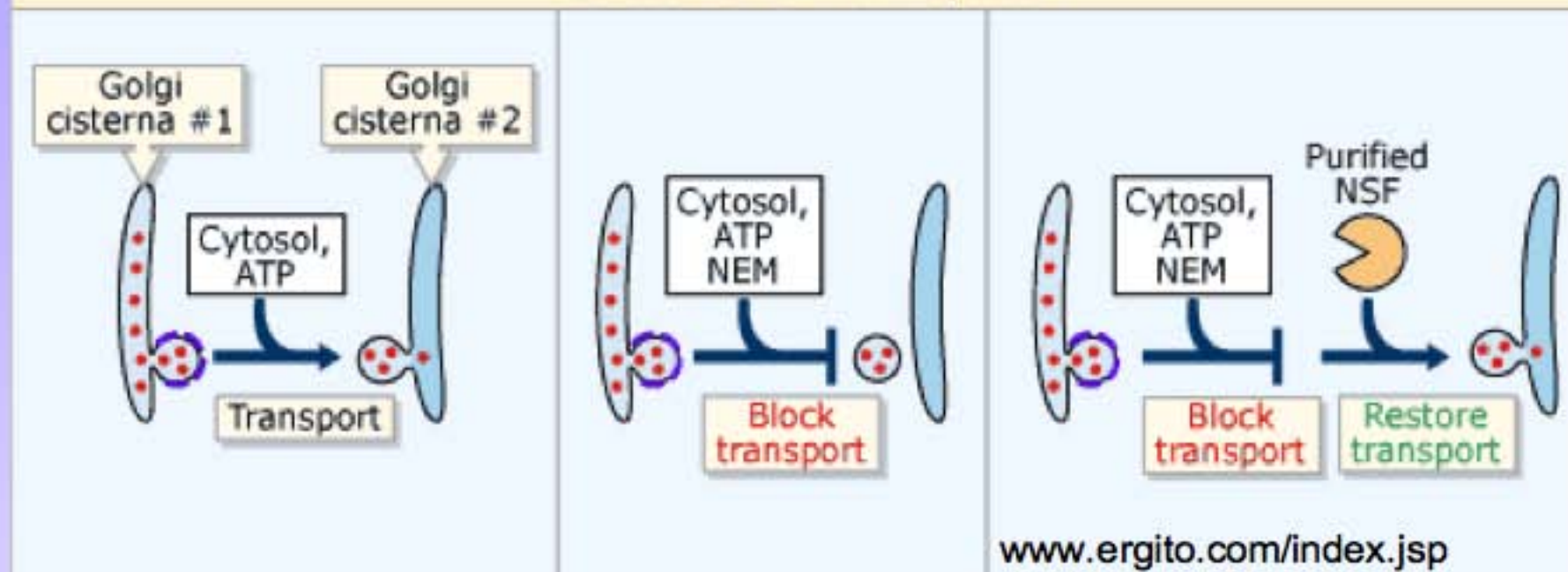
Les citernes restent distinctes, VSVG a été transportée : les auteurs formulent l'hypothèse du **transport vésiculaire**.

Découverte historique de NSF & SNAPs



Jim Rothman

Isolation of NSF from Cytosol

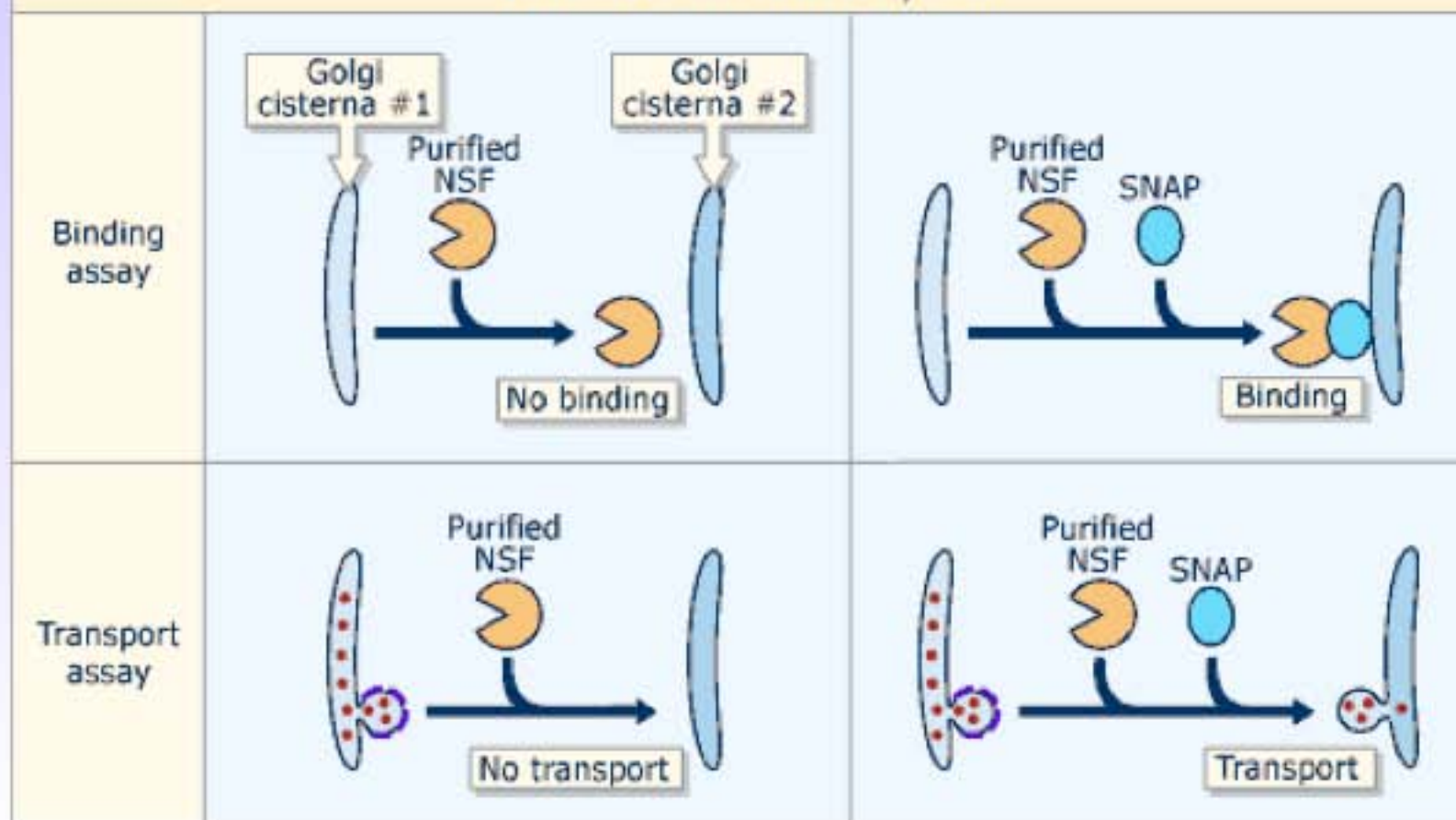


NEM: N-Ethyl-Maleimide
NSF: NEM sensitive factor

NSF est nécessaire à la fusion.

NSF est inhibée par le NEM.

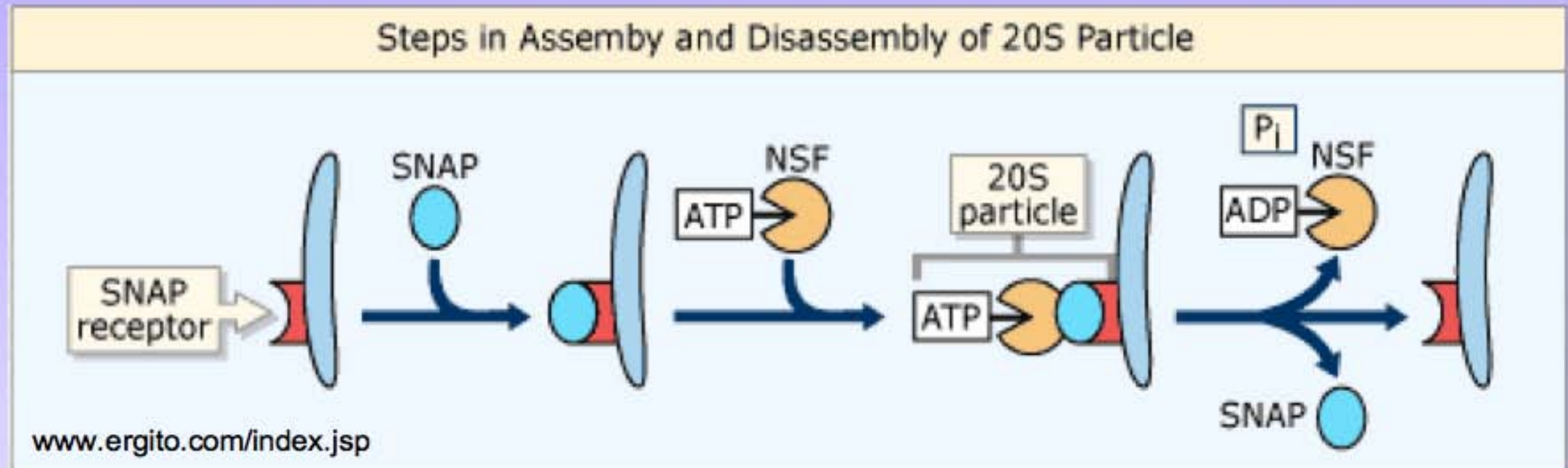
Isolation of SNAPs from Cytosol



SNAP:
Soluble NSF Attachment Factor

NSF est une protéine soluble qui ne peut se lier aux membranes que grâce aux SNAPs (3 isoformes α, β, γ).

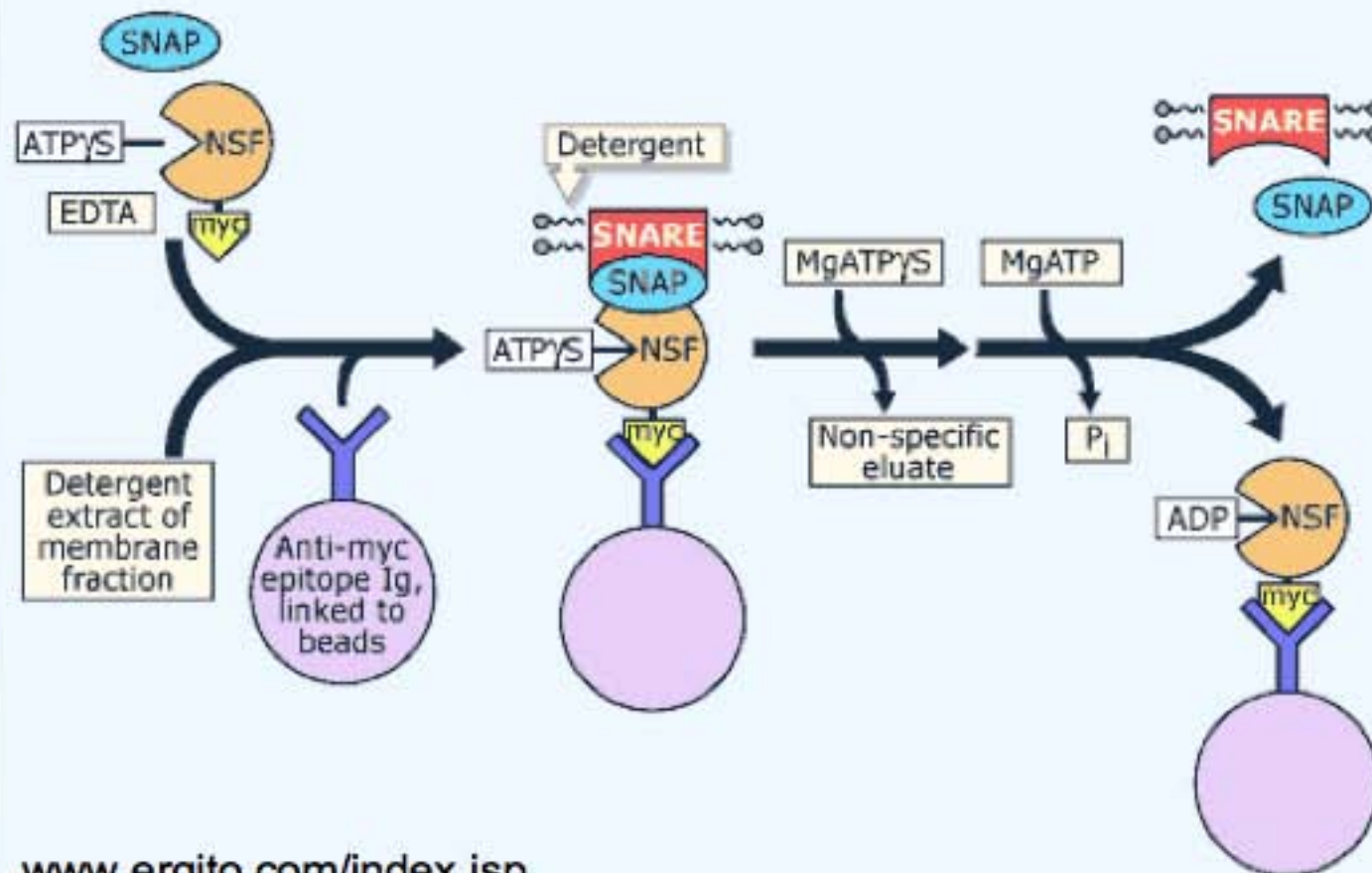
Découverte historique des récepteurs de SNAP: les SNARE



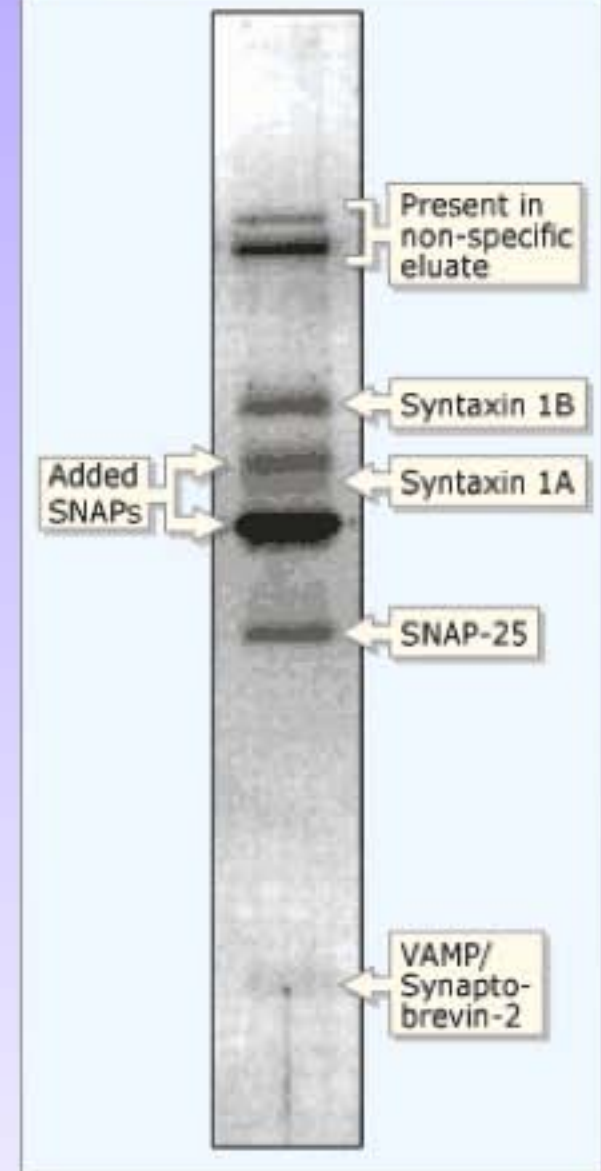
Comment isoler les recepteurs de SNAPs: les SNARE?

Isolement des SNAREs

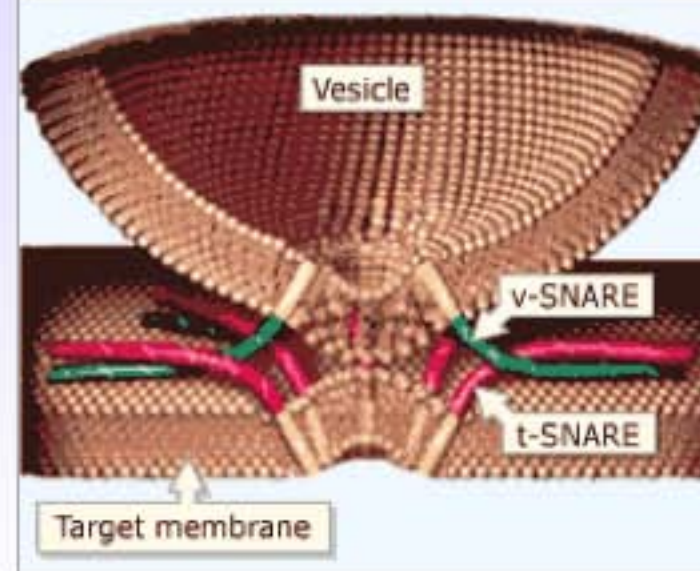
Scheme for Affinity Purification of SNAP Receptors



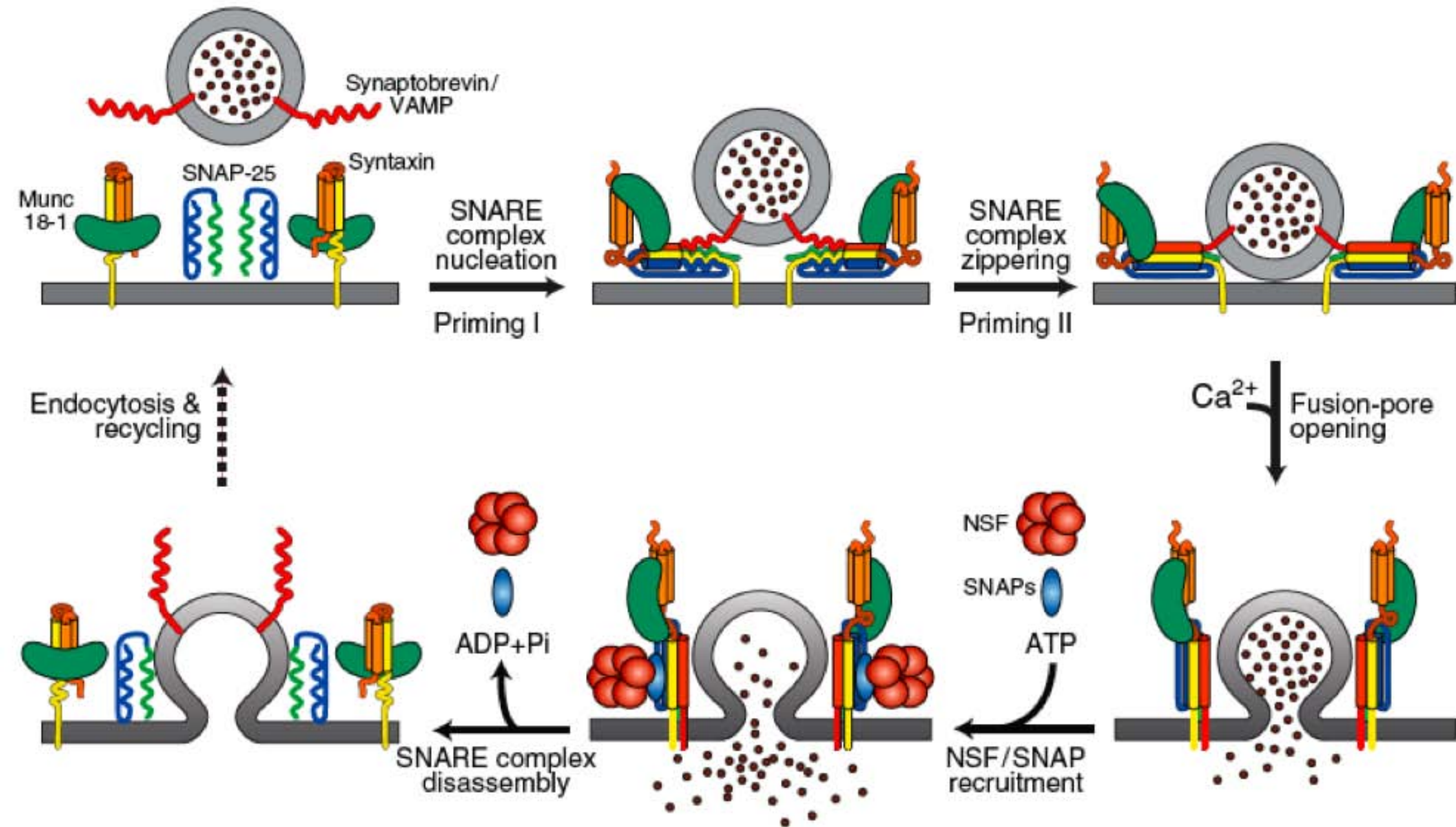
Affinity-purified SNAP Receptors



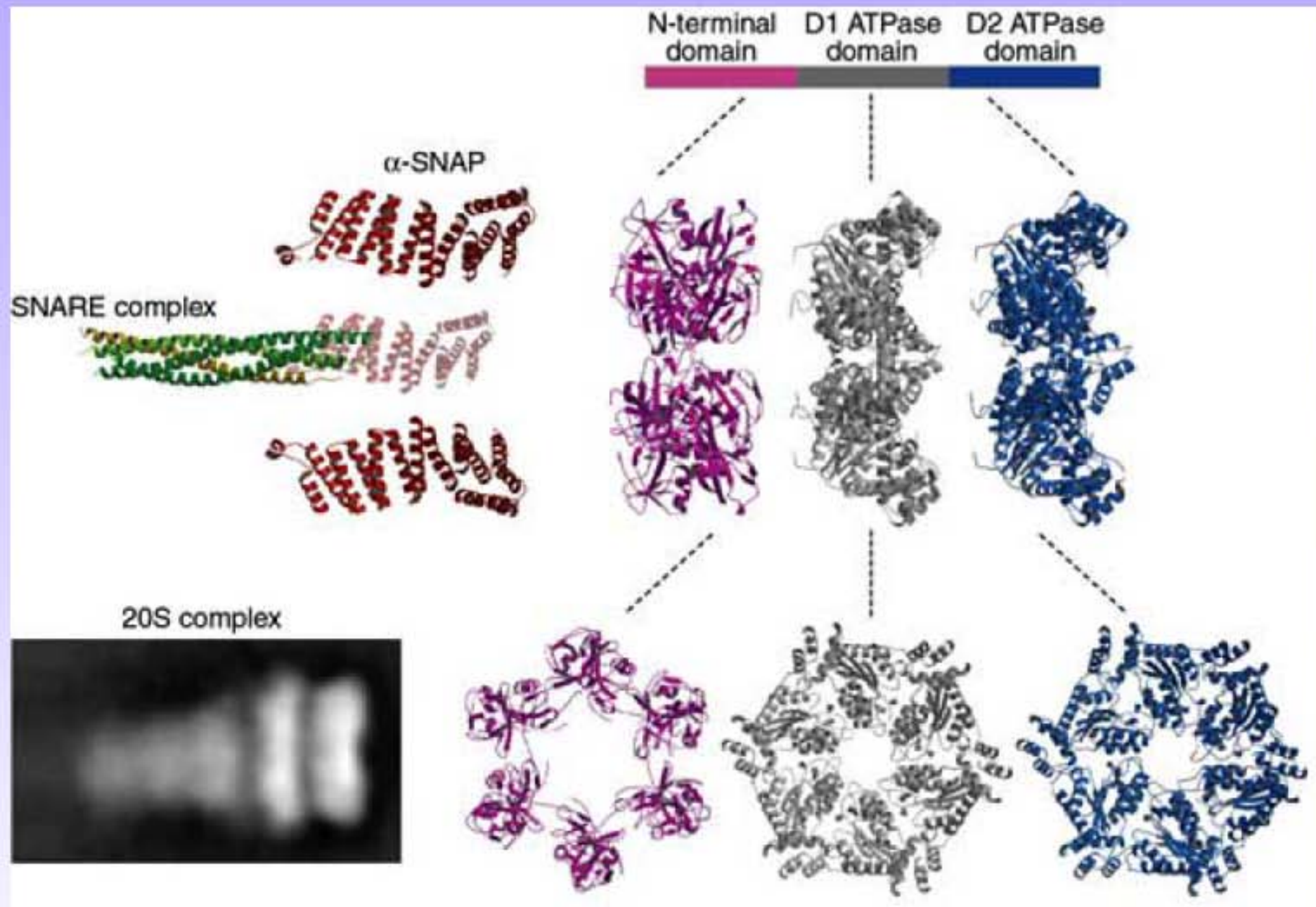
SNAREpins Mediate Lipid Bilayer Fusion



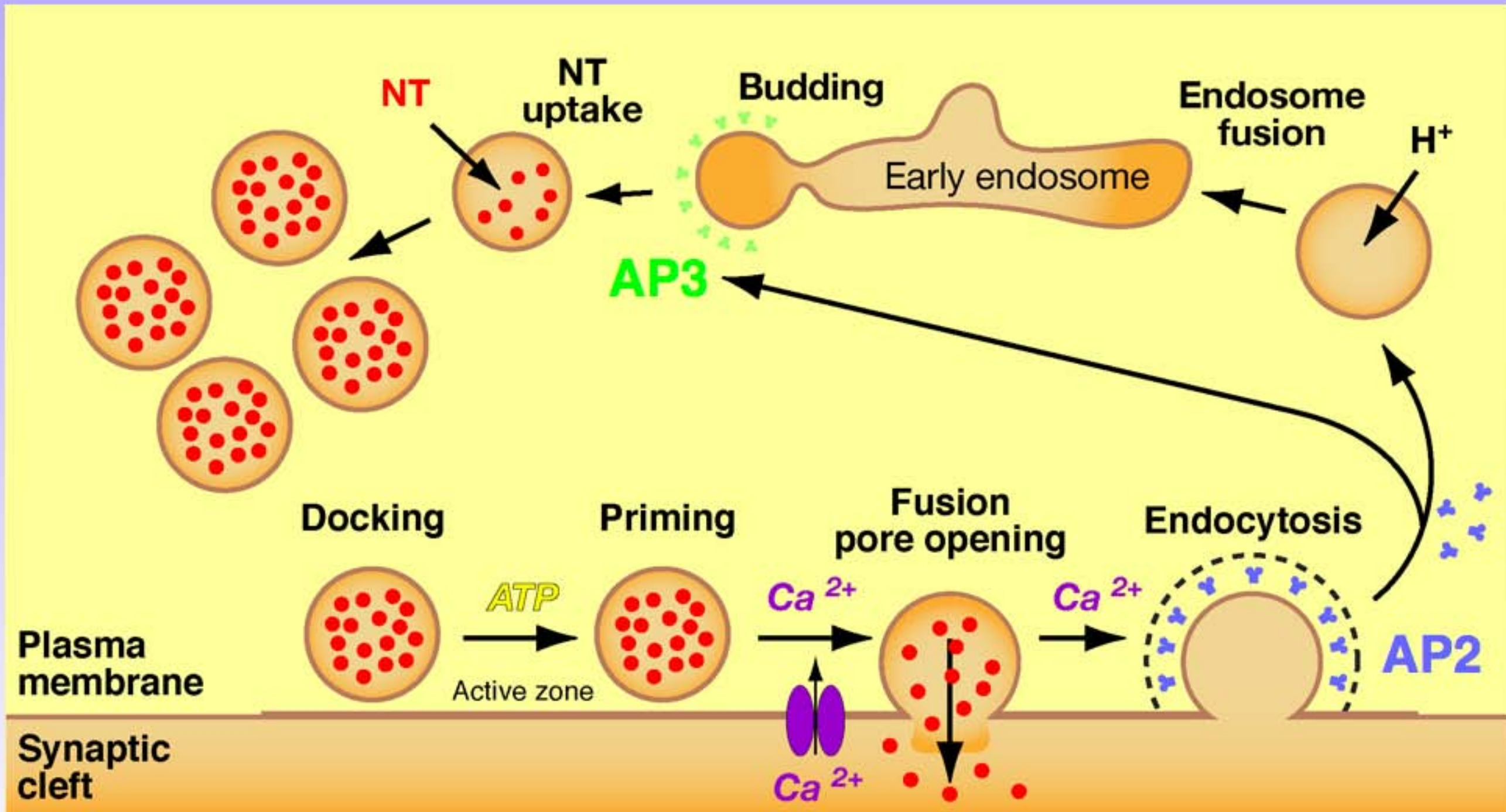
Dissociation des SNARE par NSF



Structure de l'ATPase NSF

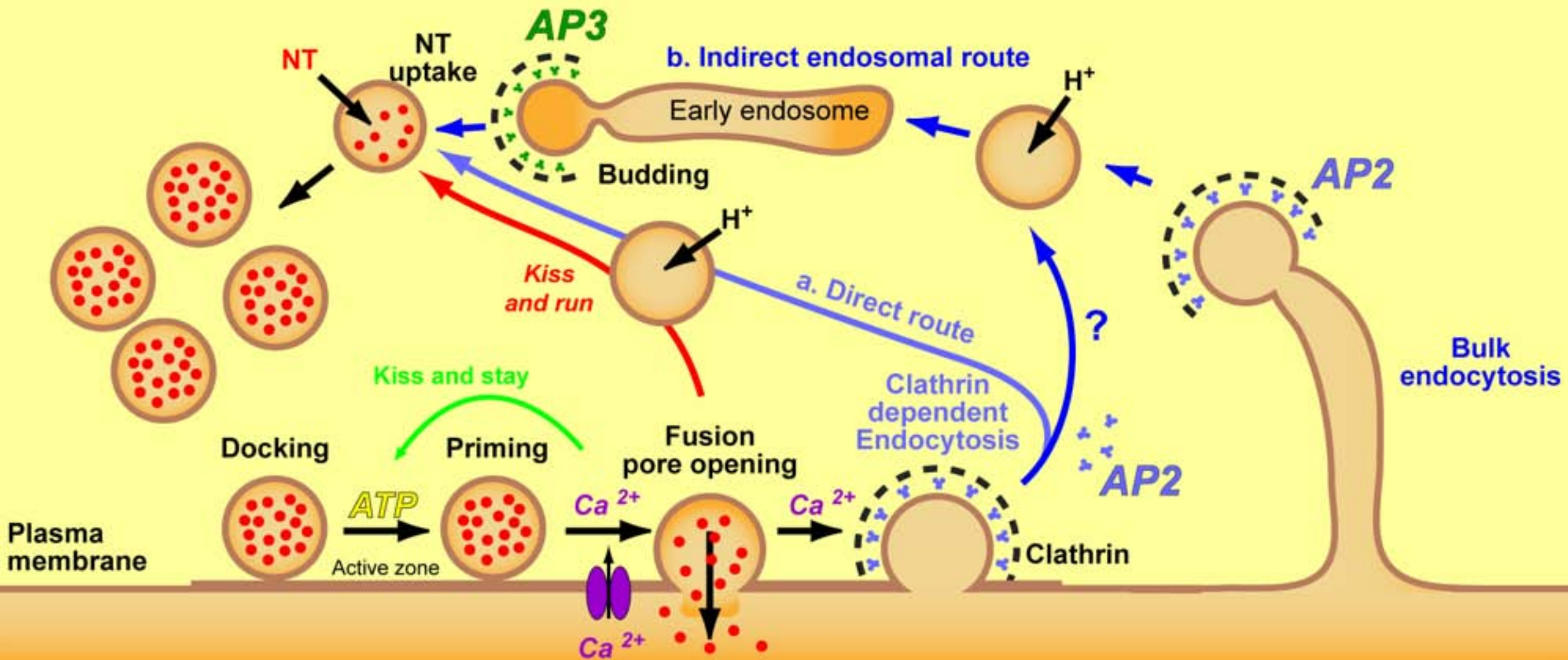


Recyclage des vésicules synaptiques



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

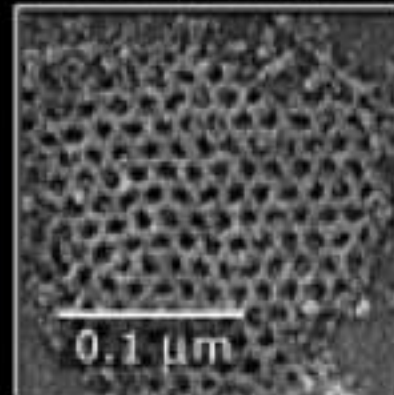
Recyclage des vésicules synaptiques



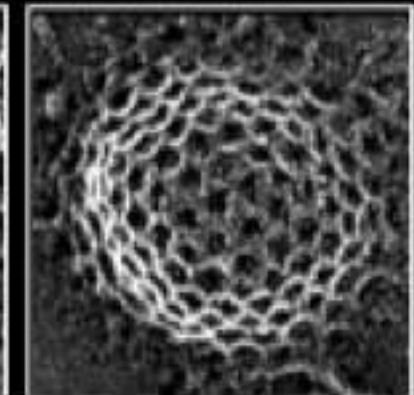
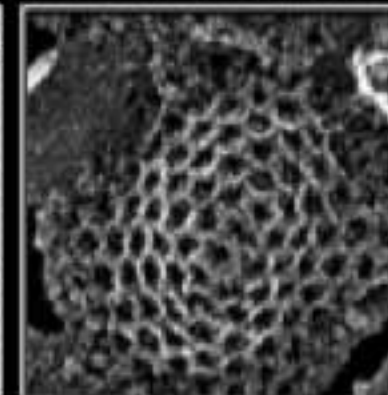
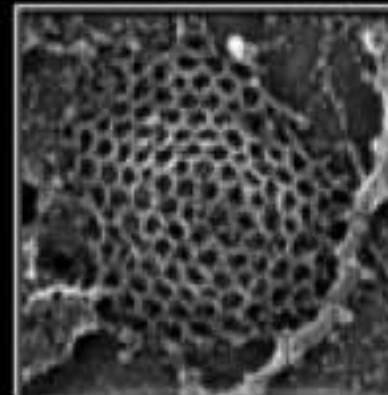
Clathrine

Clathrin forms lattices

FLAT LATTICE

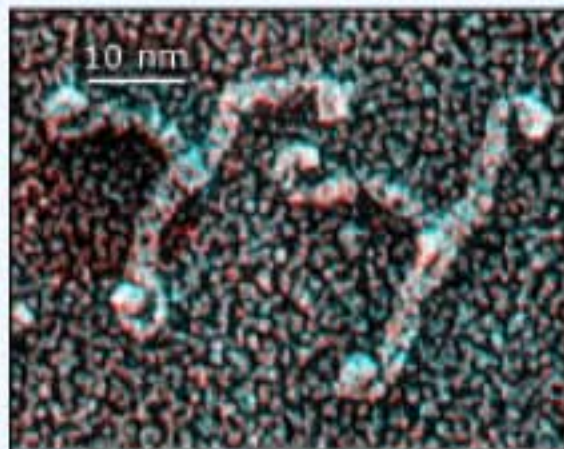


CURVED LATTICES

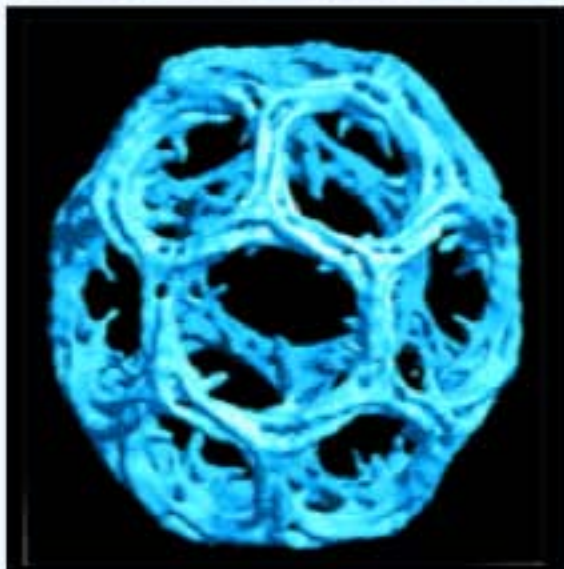
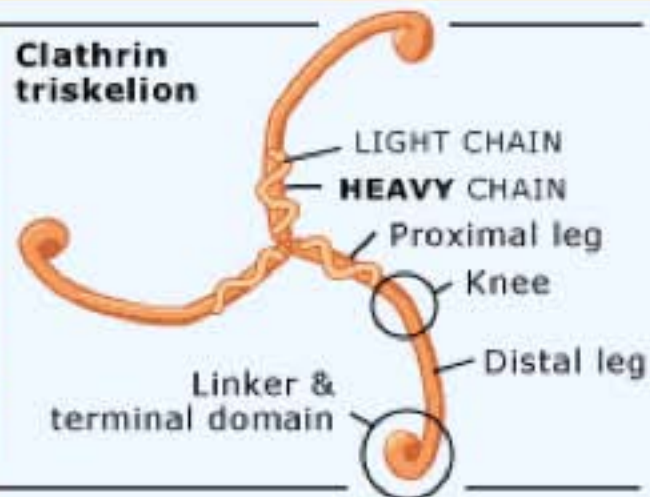


www.ergito.com

Structure of clathrin



Clathrin triskelion

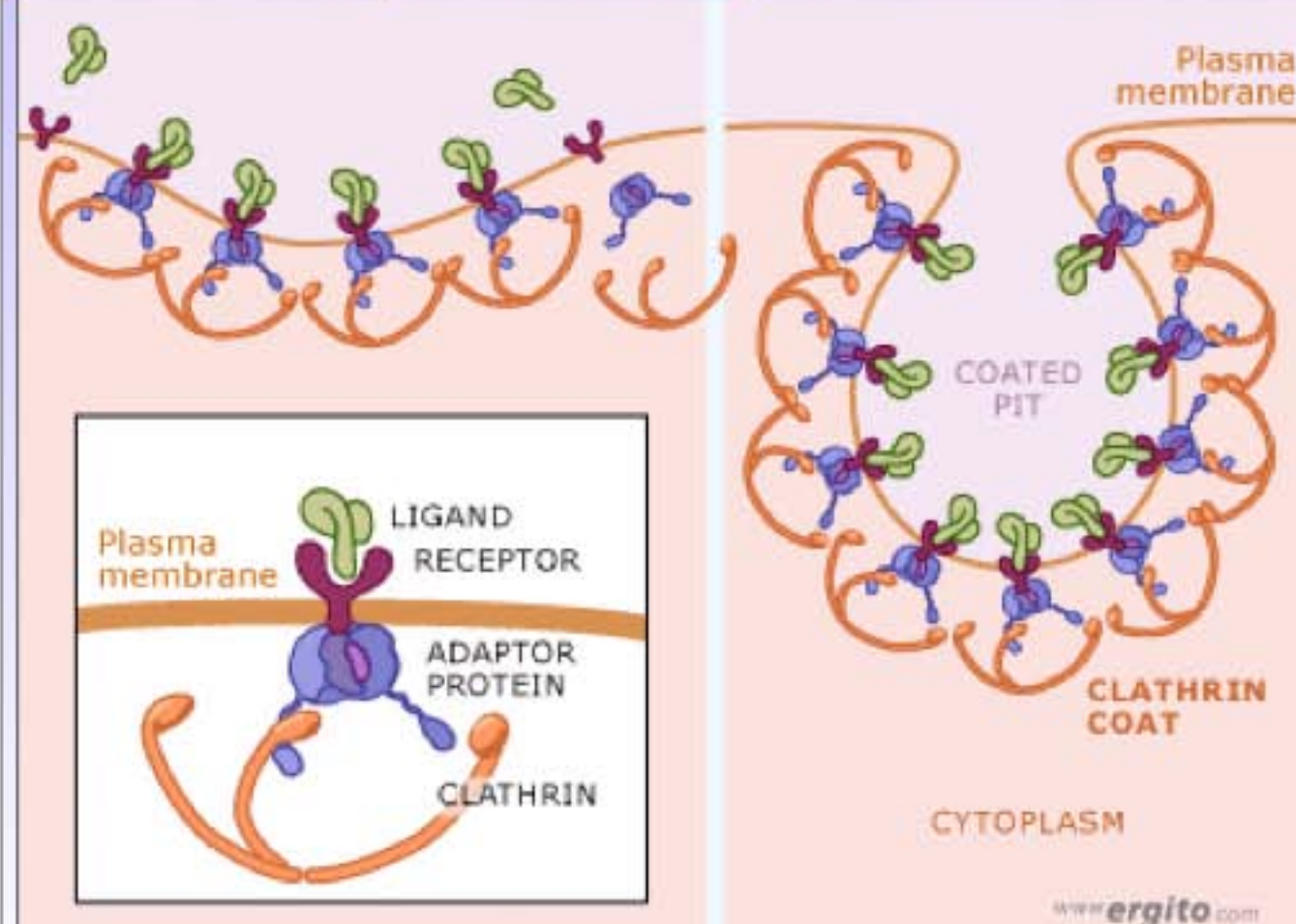


Clathrin lattice



www.ergito.com

Adapters links cargo & clathrin



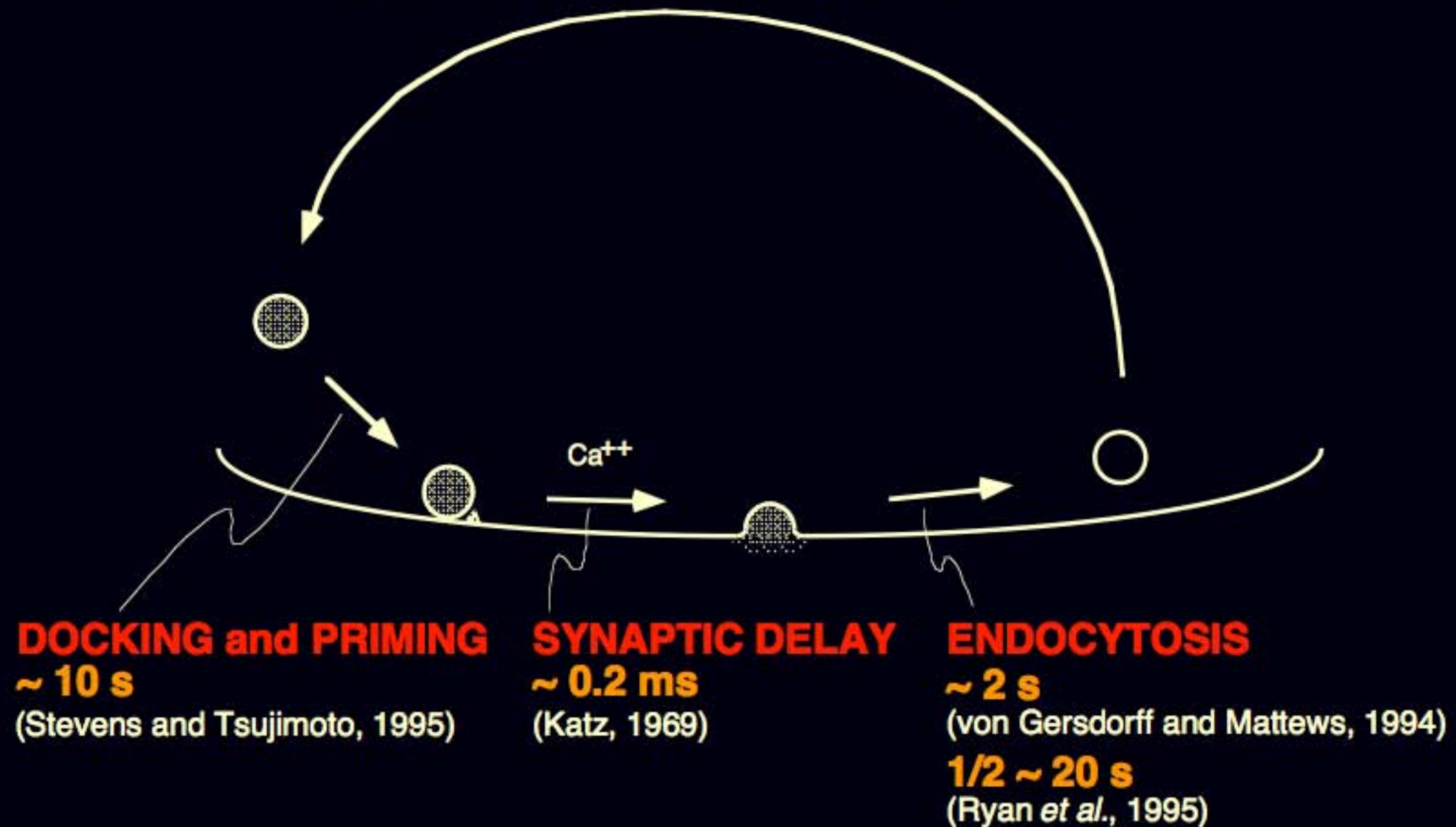
www.ergito.com/index.jsp

Recyclage des vésicules synaptiques

RECYCLING TIME

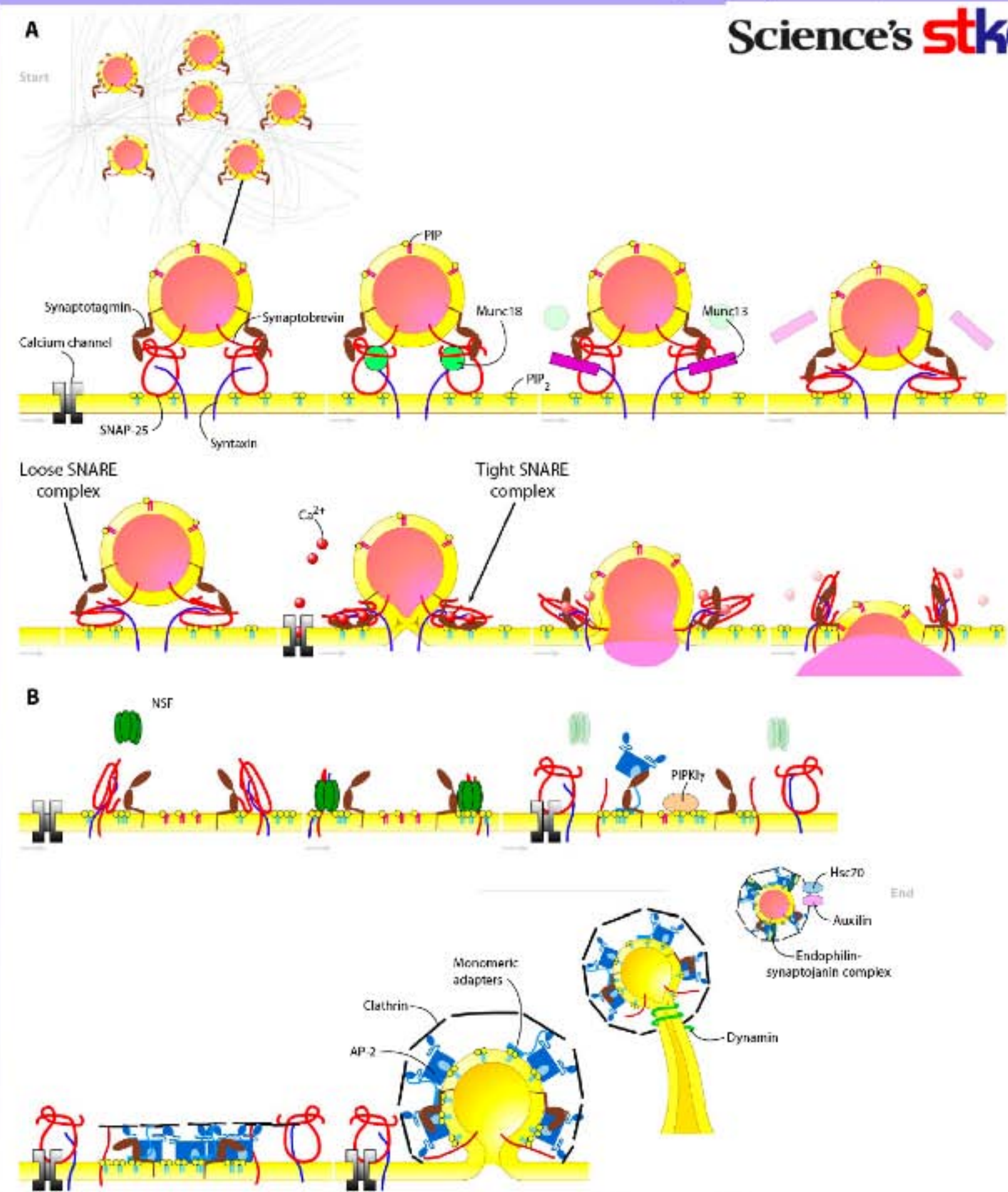
less than 60 s

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



**Recyclage des
Vésicules
synaptiques:

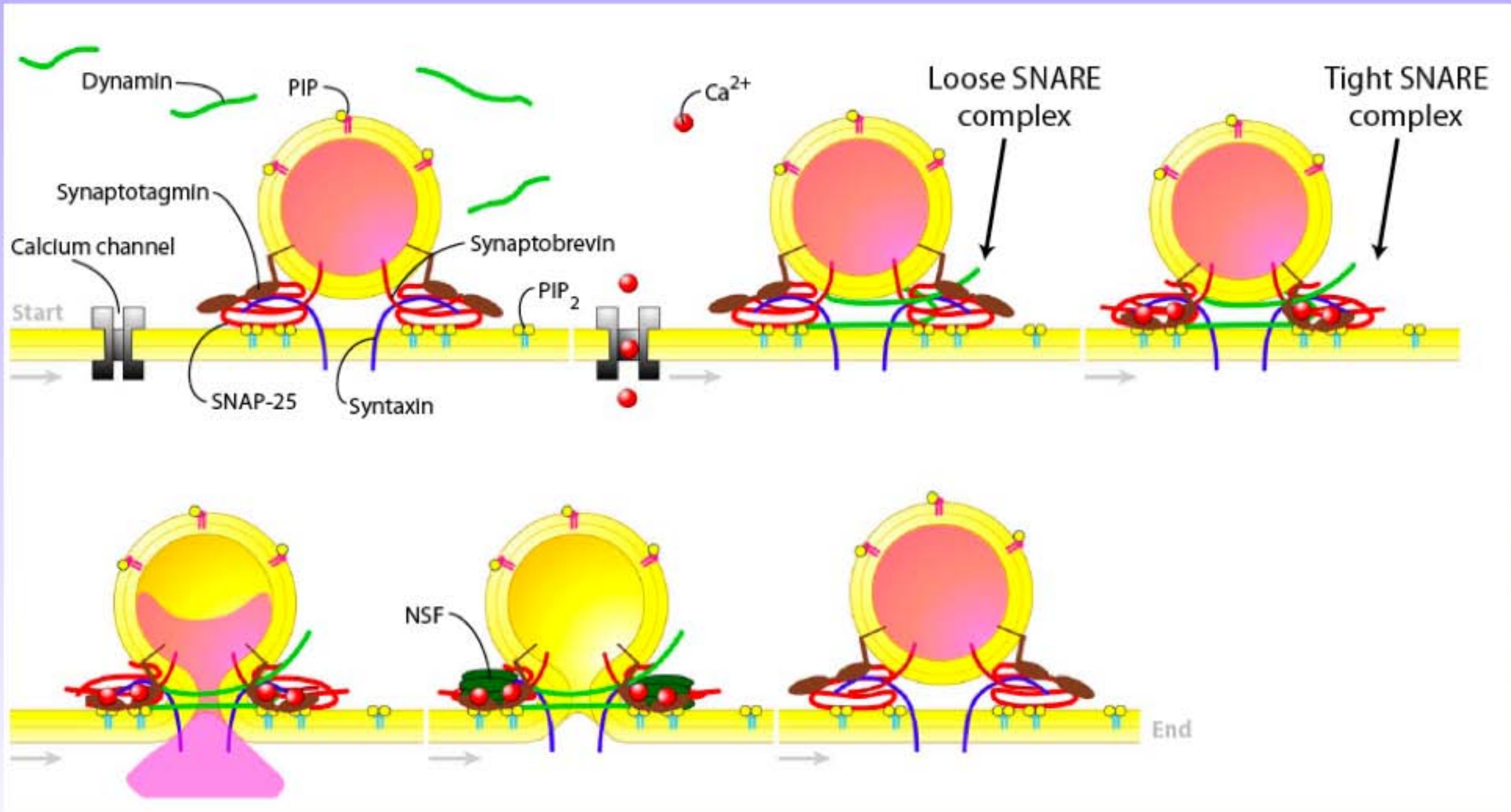
endocytose
mediée par la
clathrine
(la voie lente)**



Thierry Galli¹ and Volker Haucke

www.stke.org/cgi/content/full/sigtrans;2004/264/re19

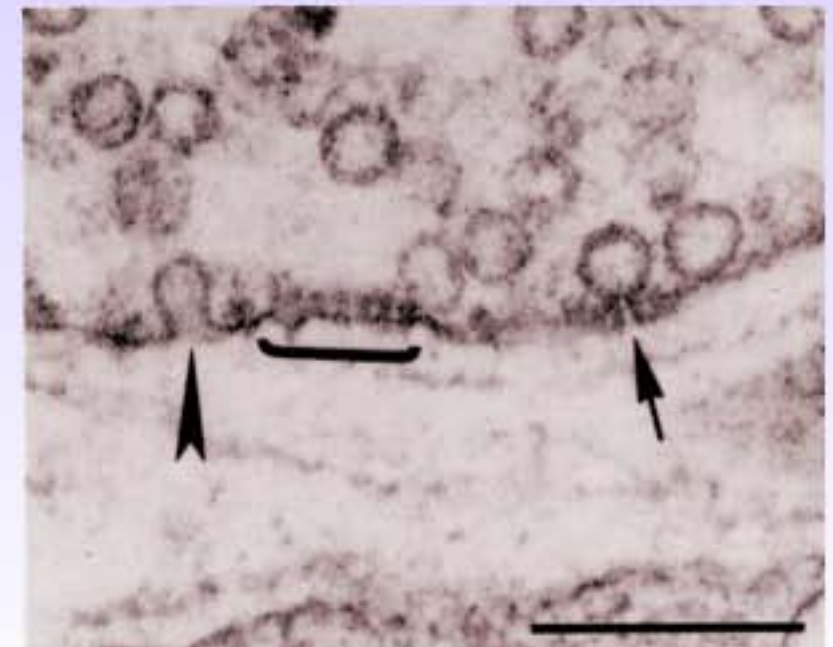
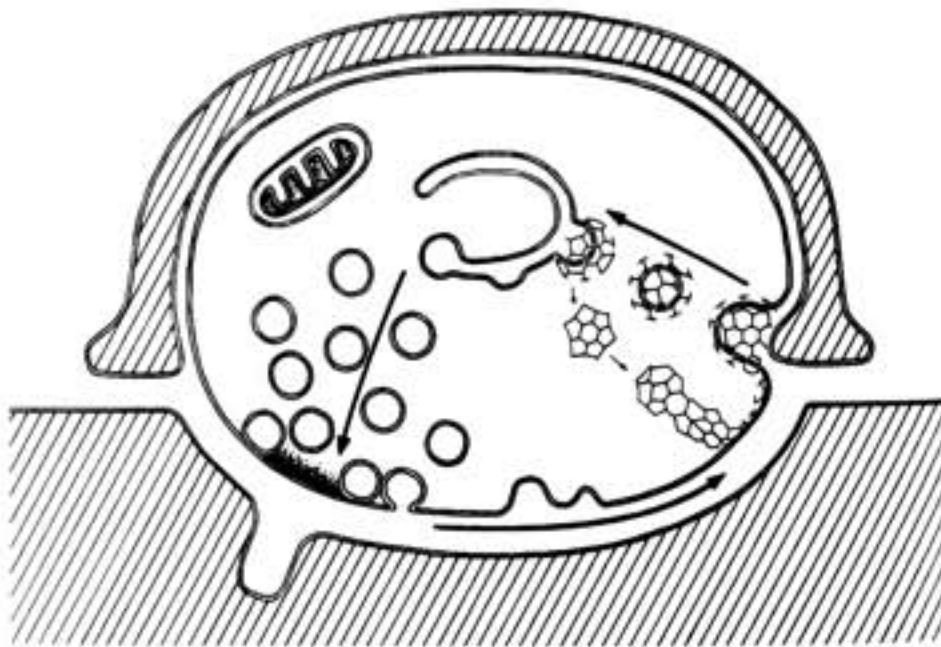
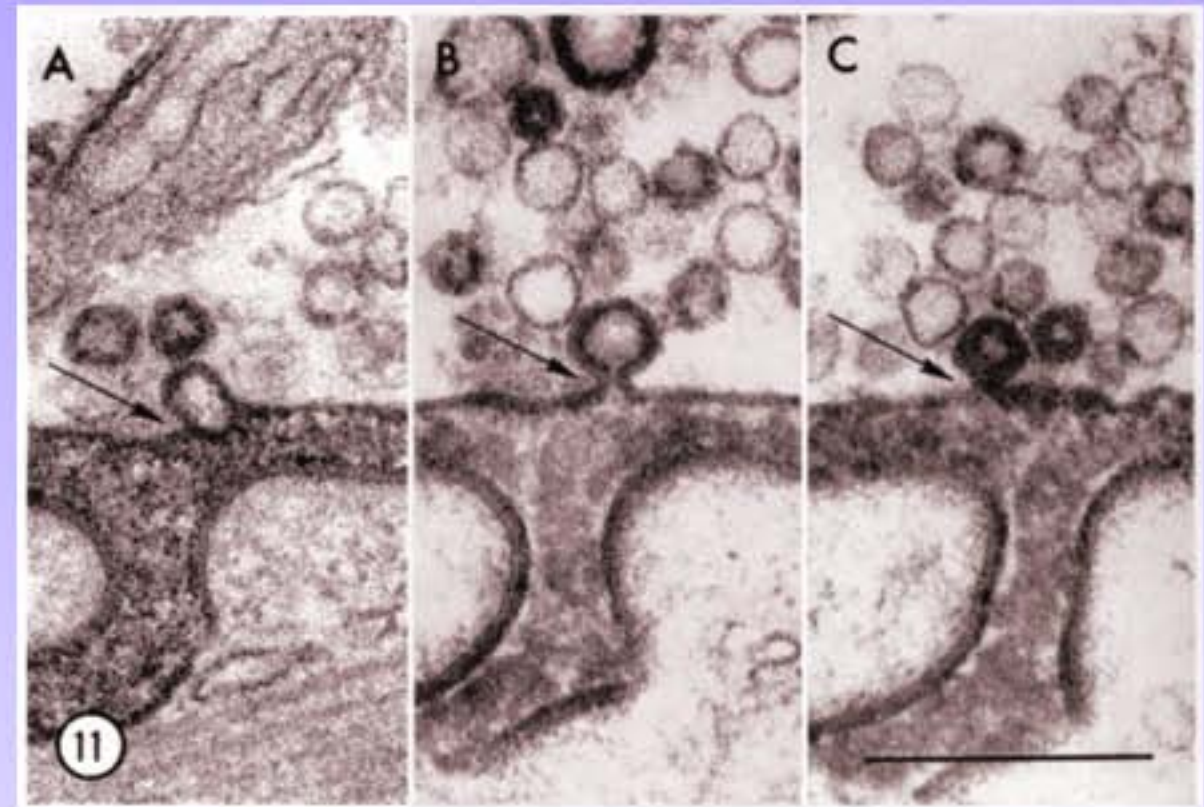
Kiss and Run ?



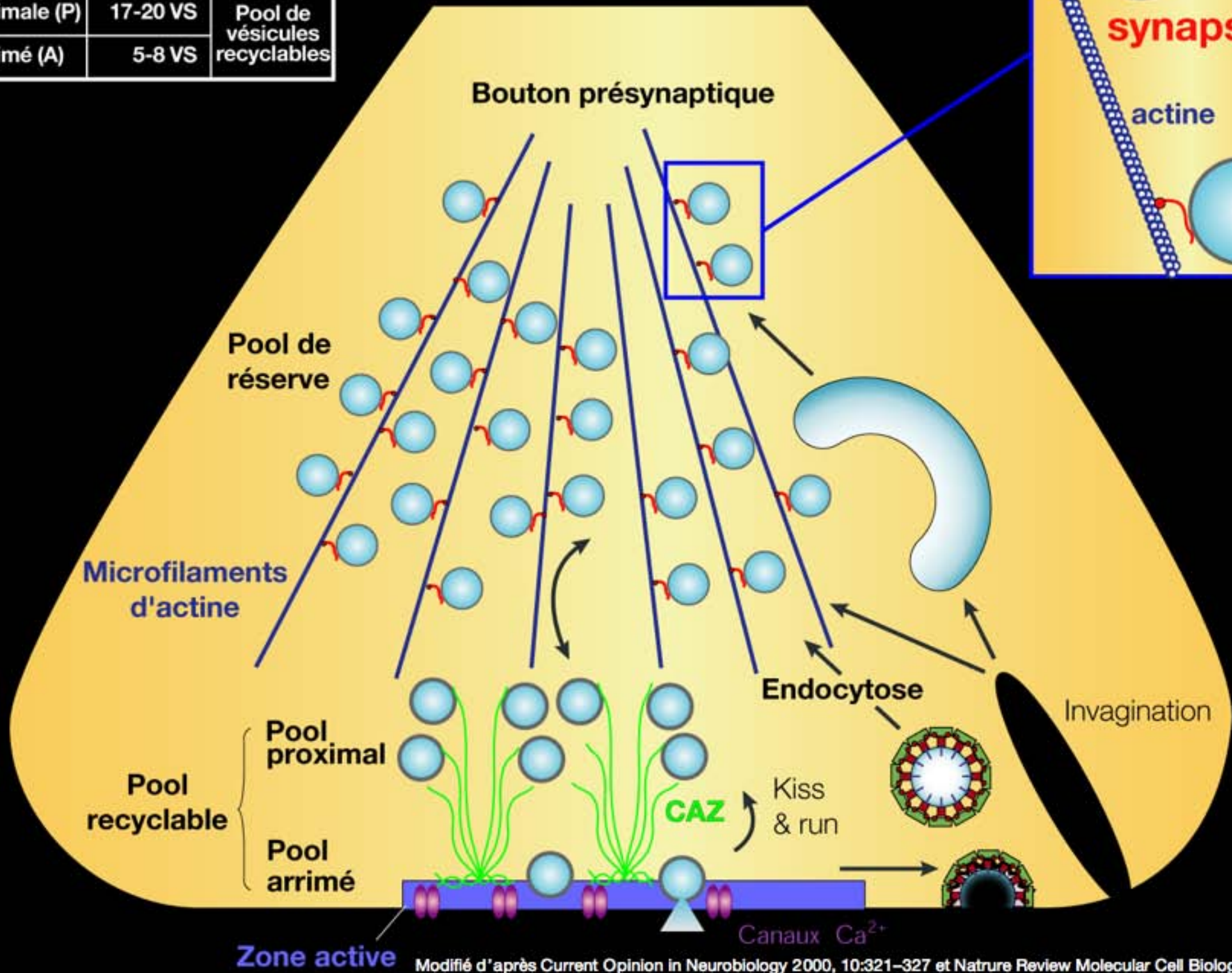
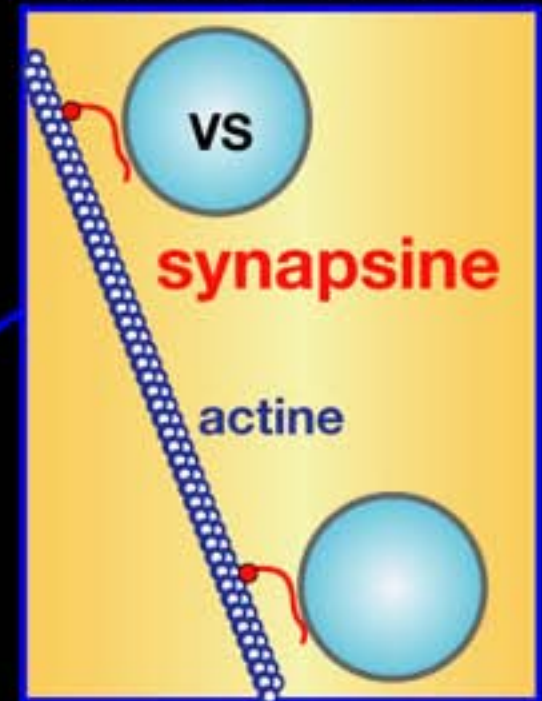
Thierry Galli¹ and Volker Haucke

www.stke.org/cgi/content/full/sigtrans;2004/264/re19

***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	



Comment mesurer l'exocytose ?

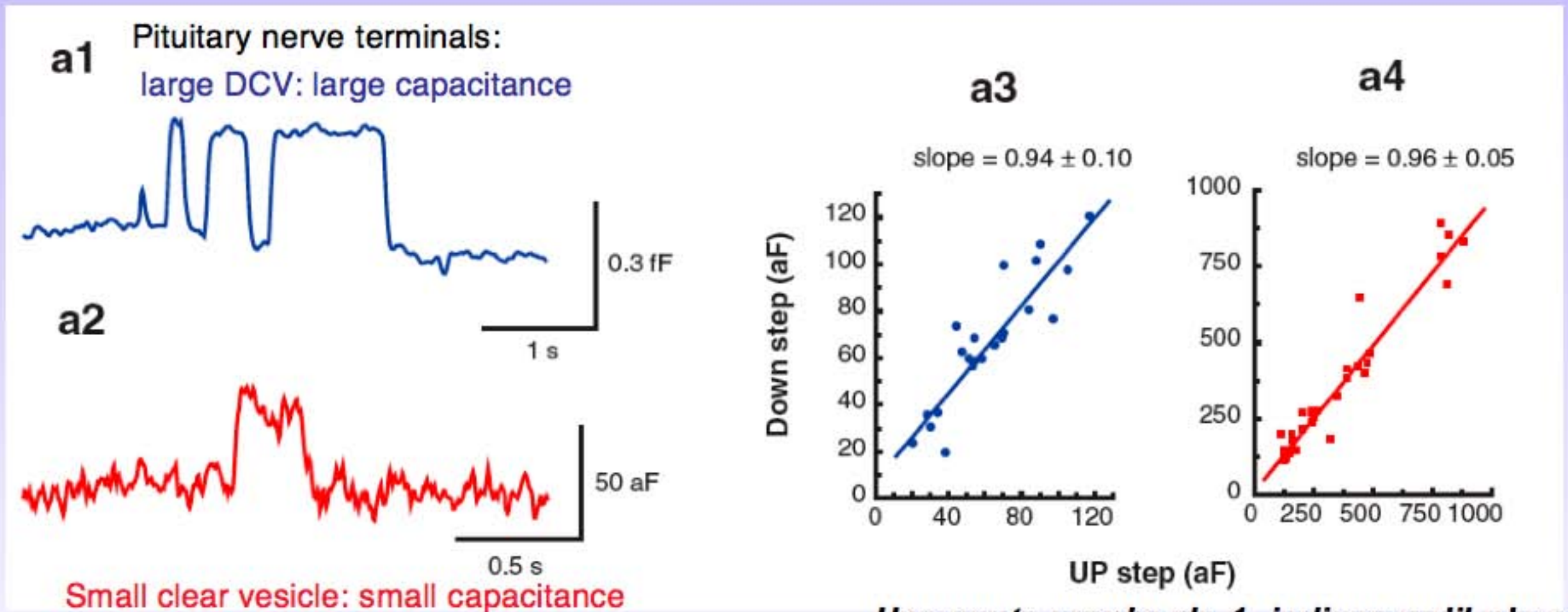
1) Capacitance:

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

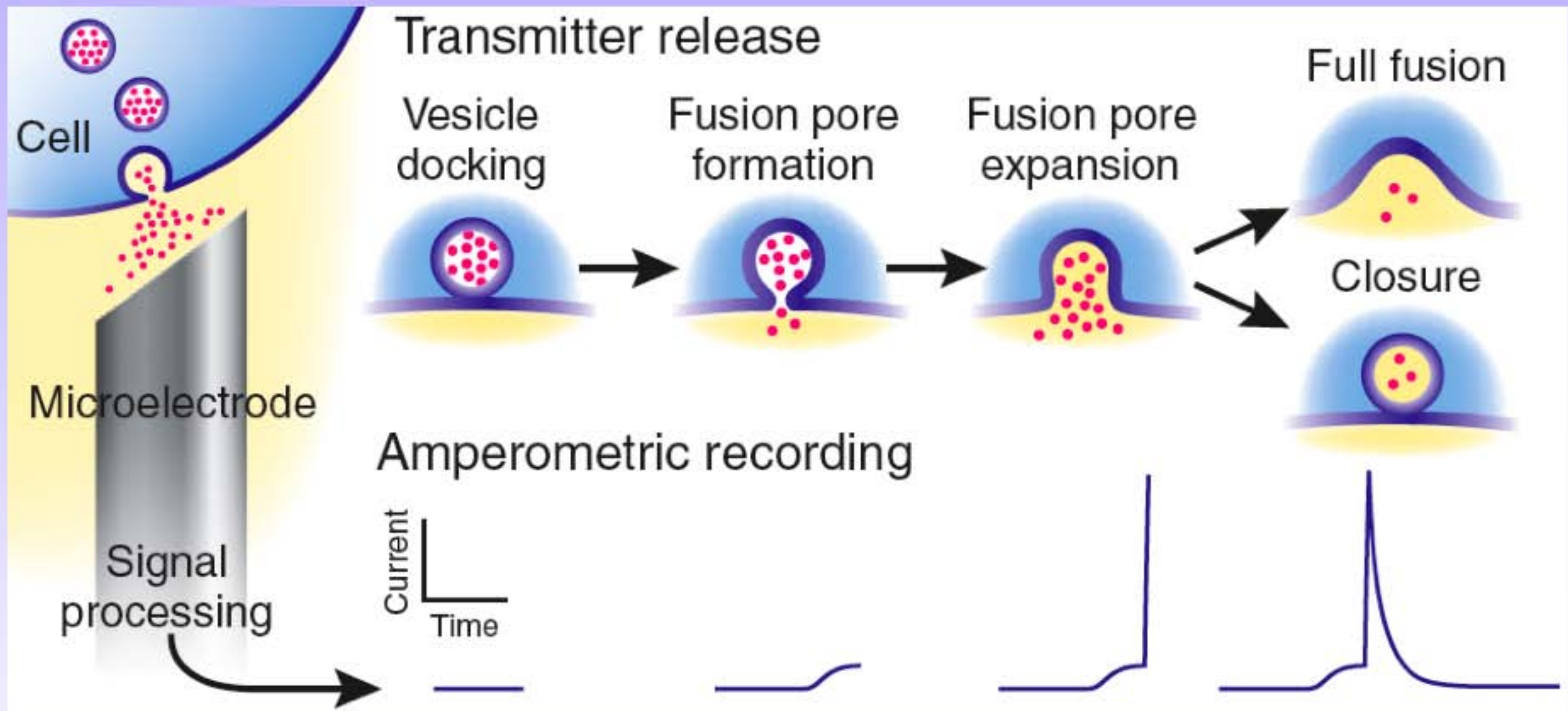


Une pente proche de 1, indique qu'il n'y a pas de transfert de membrane et indique plutôt un événement de type kiss-and-run.

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.



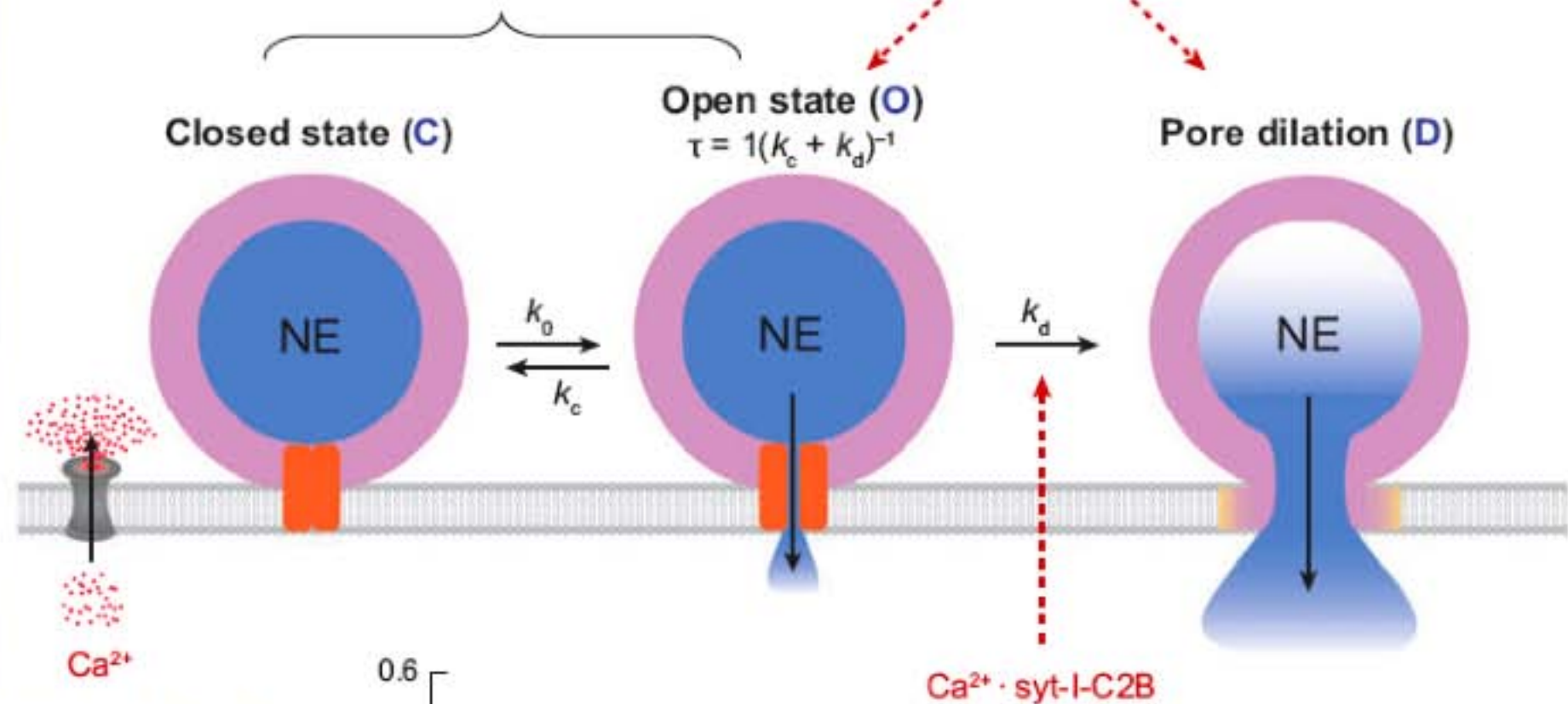
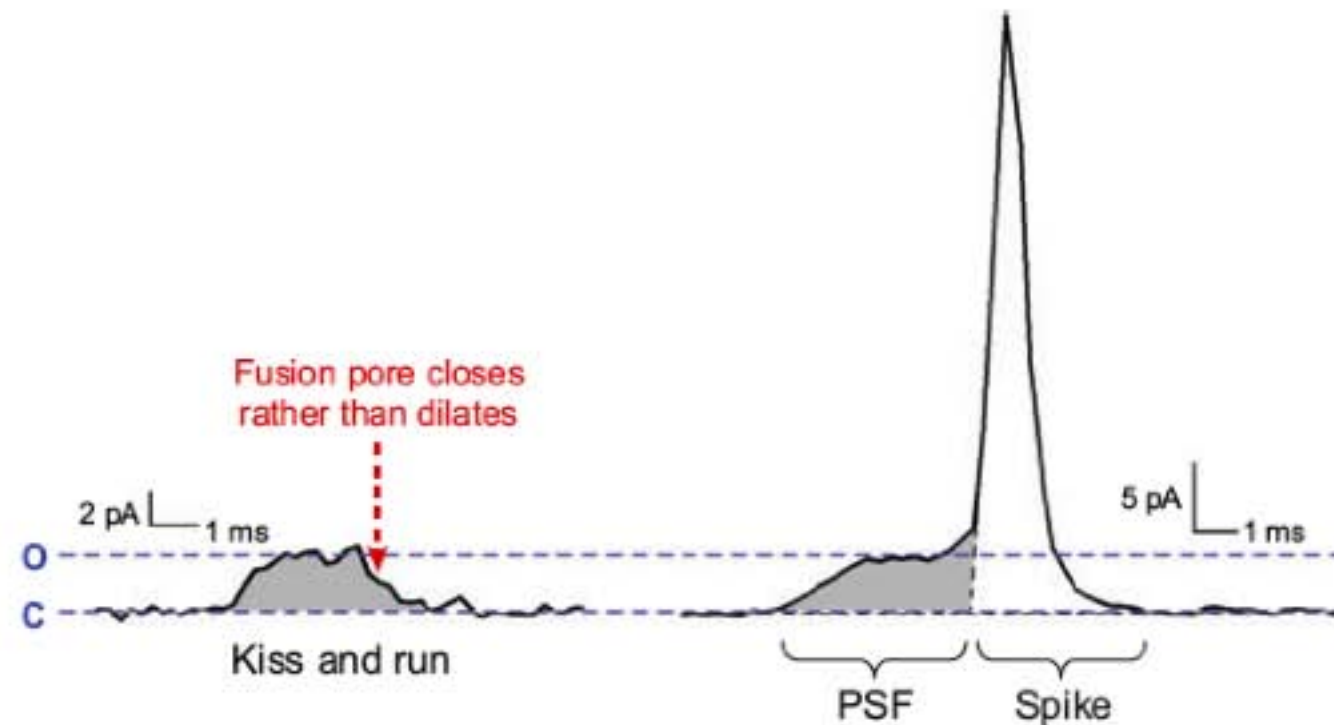
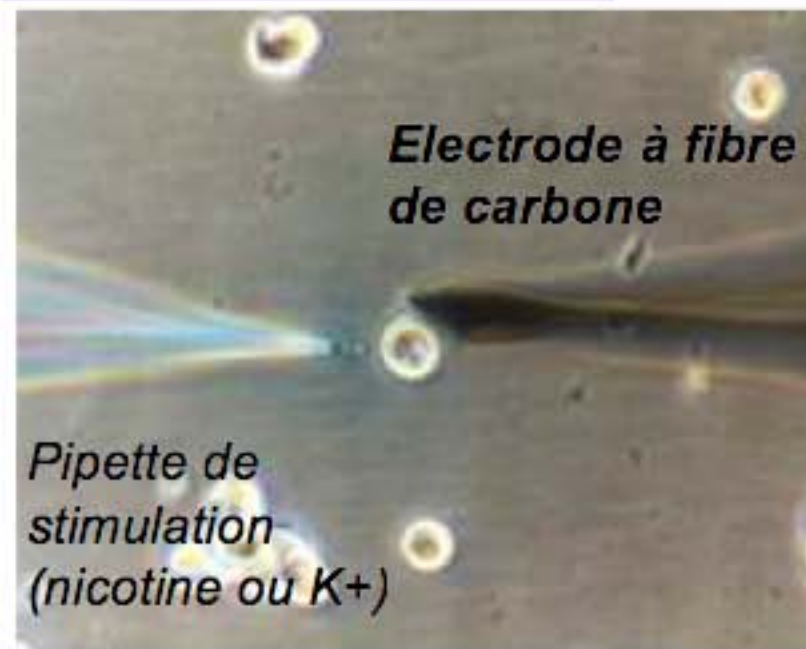
Cellules mesurées: cellules chromaffines (noradrénaline, adrénaline), mastocytes (histamines, serotoninines), et cellules β du pancreas (insuline).

Résolution temporelle: $<1\text{ms}$

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

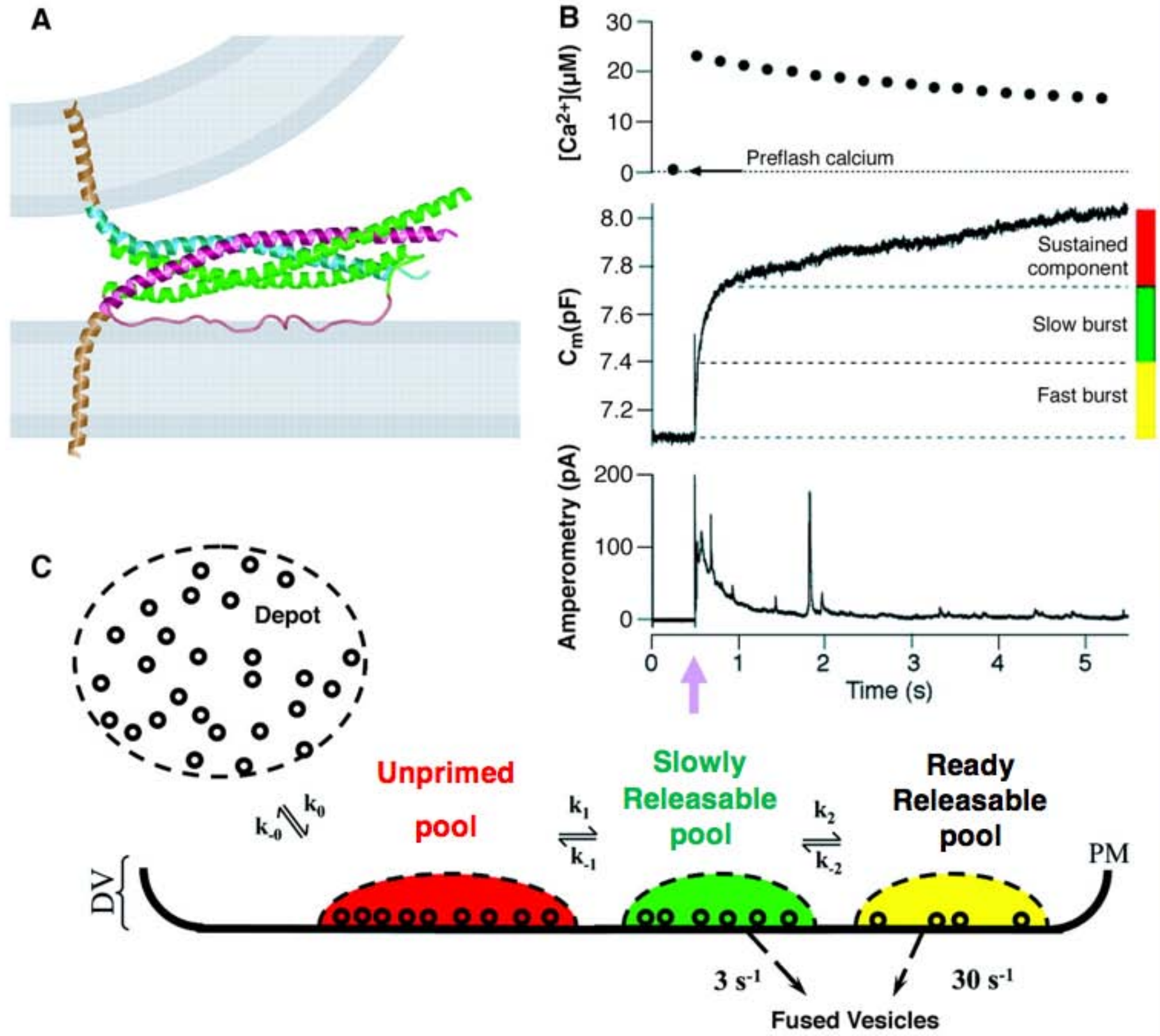
Comment mesurer l'exocytose ?

2) L'ampérométrie à fibre de carbone:



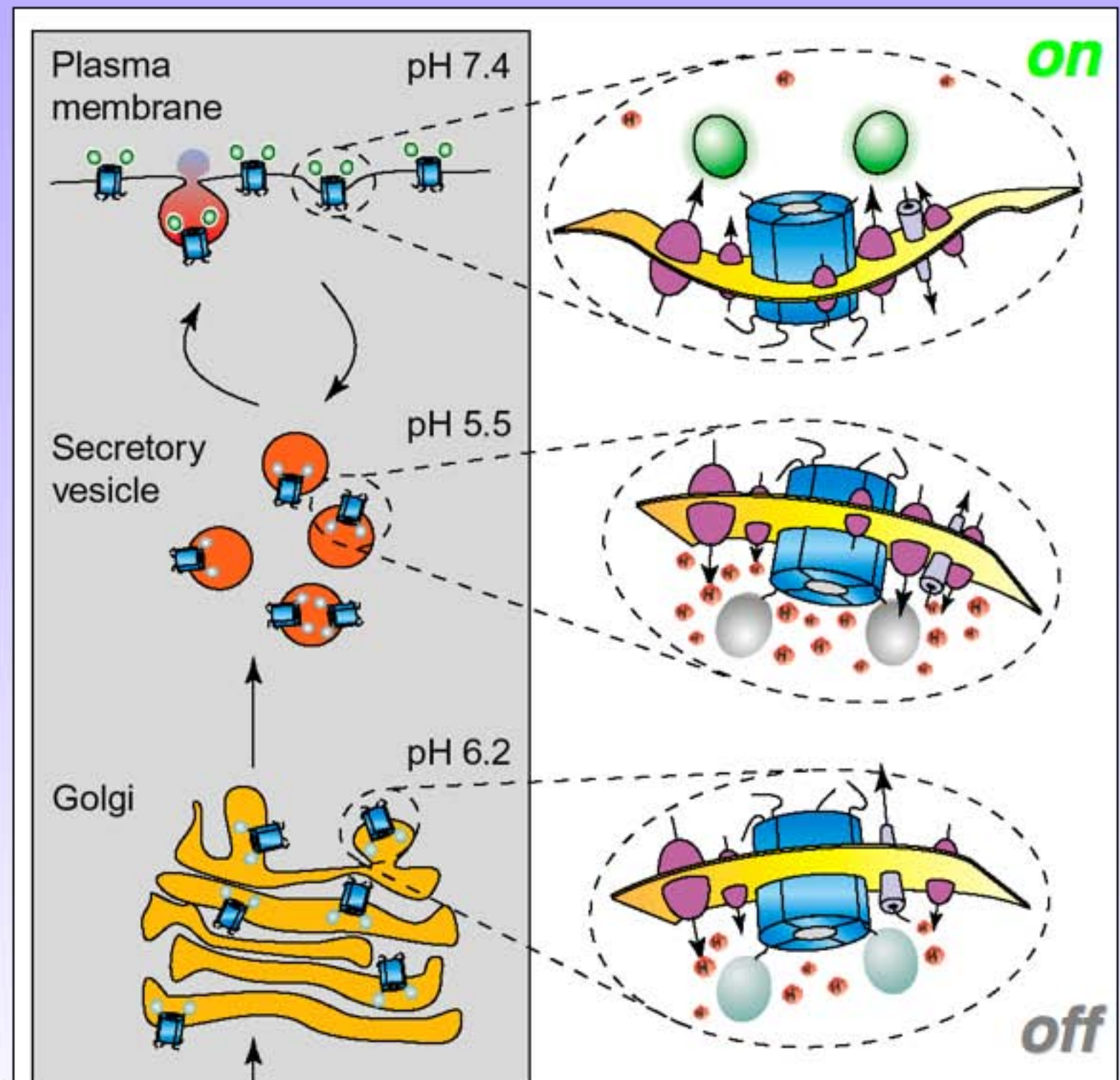
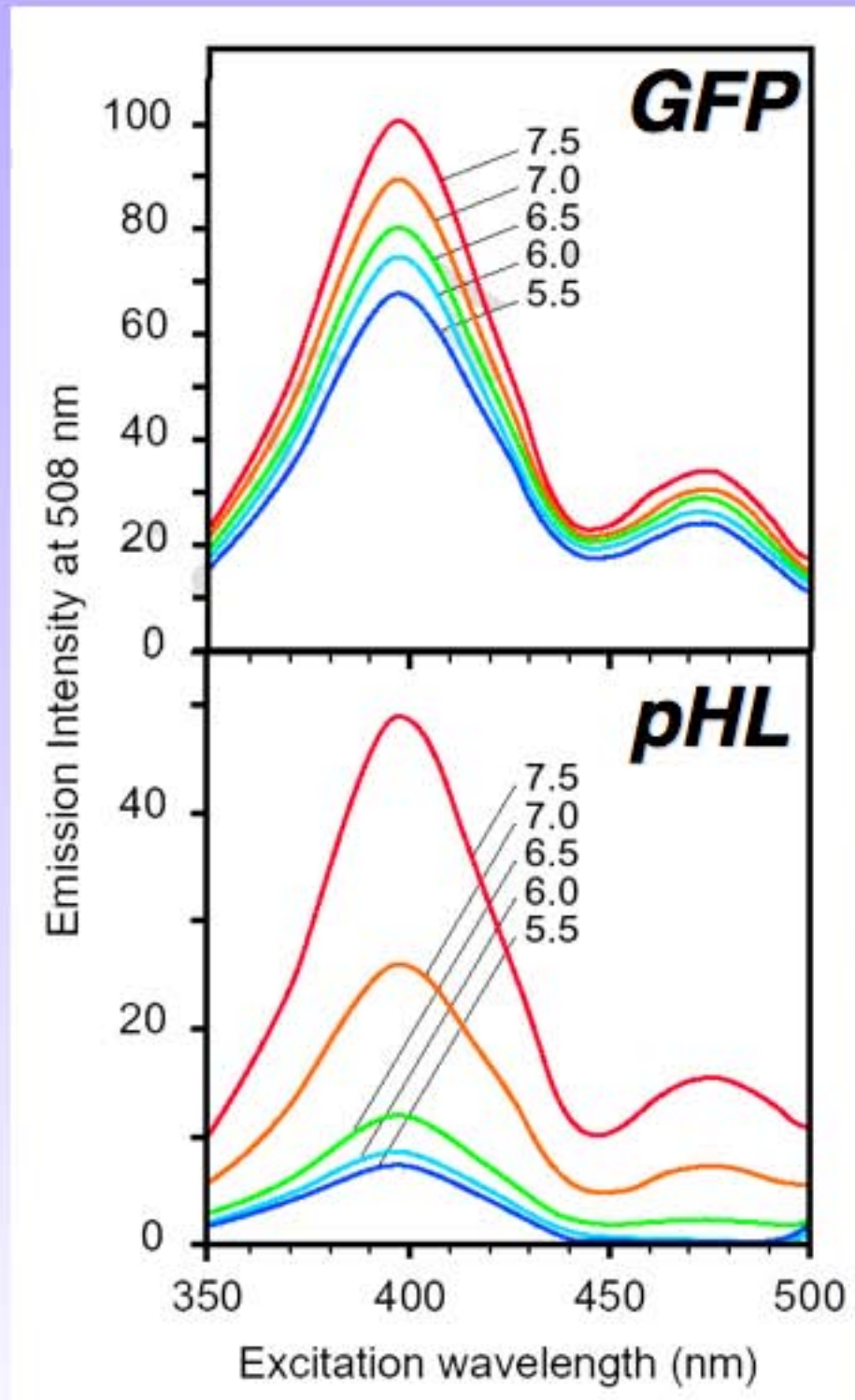
Ex: Syt1 prolonge le PSF, Syt4 le diminue.

Réserve, Amorçage, Fusion



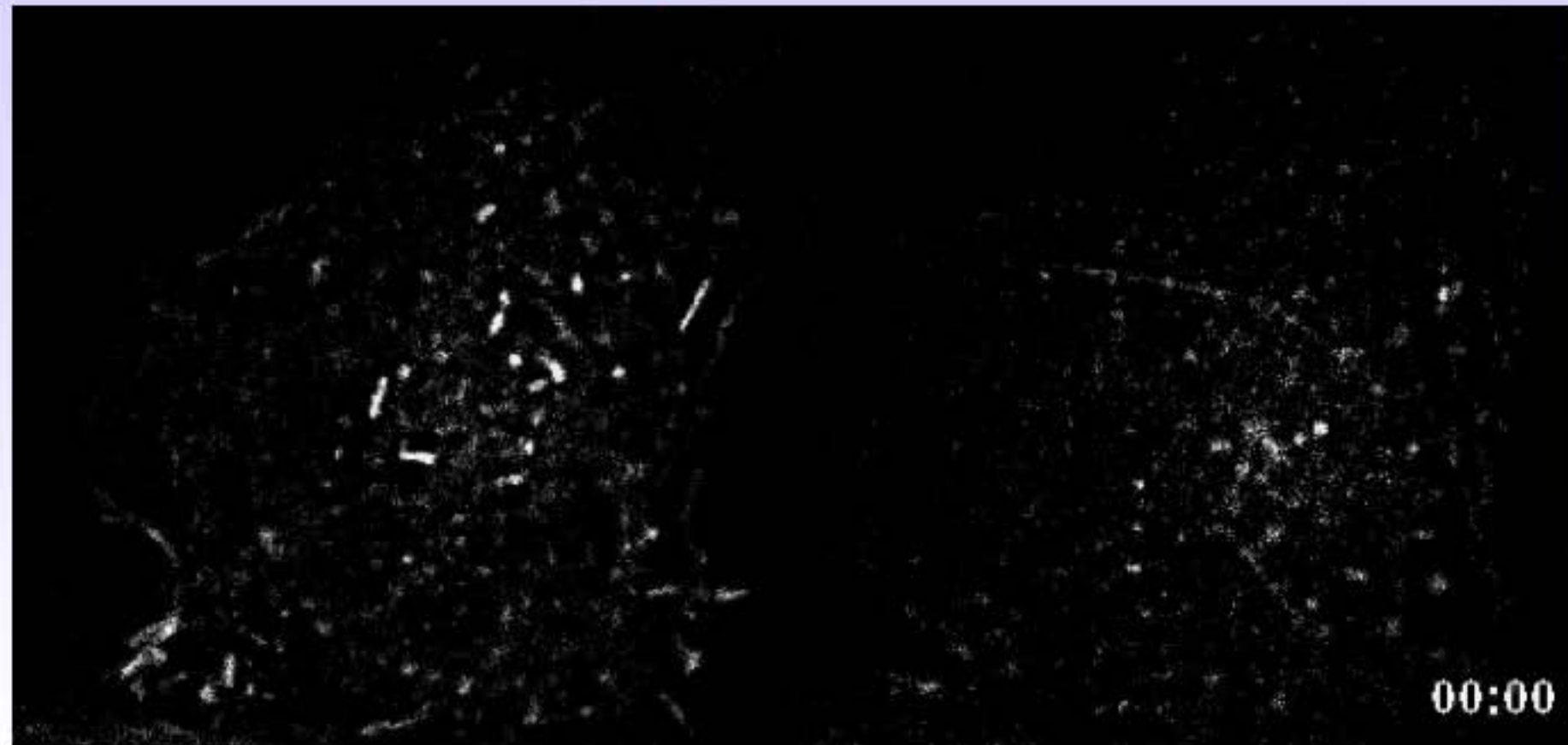
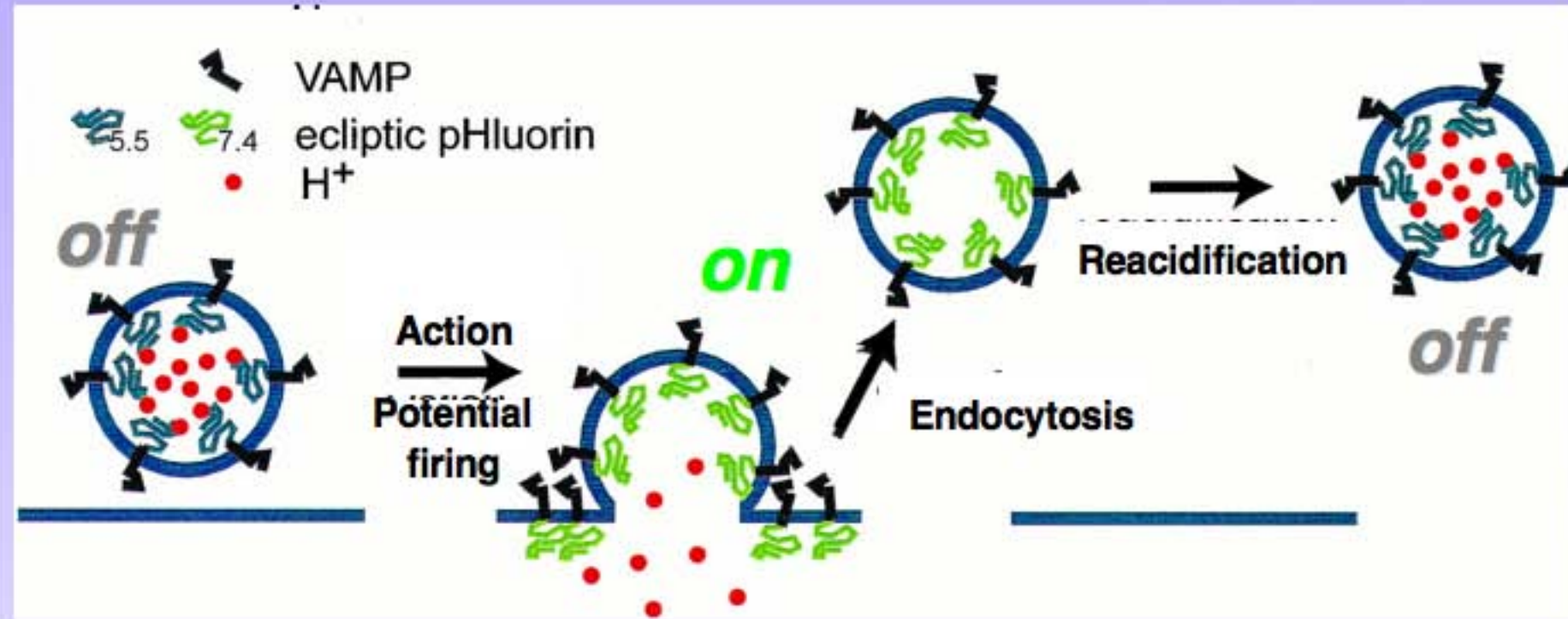
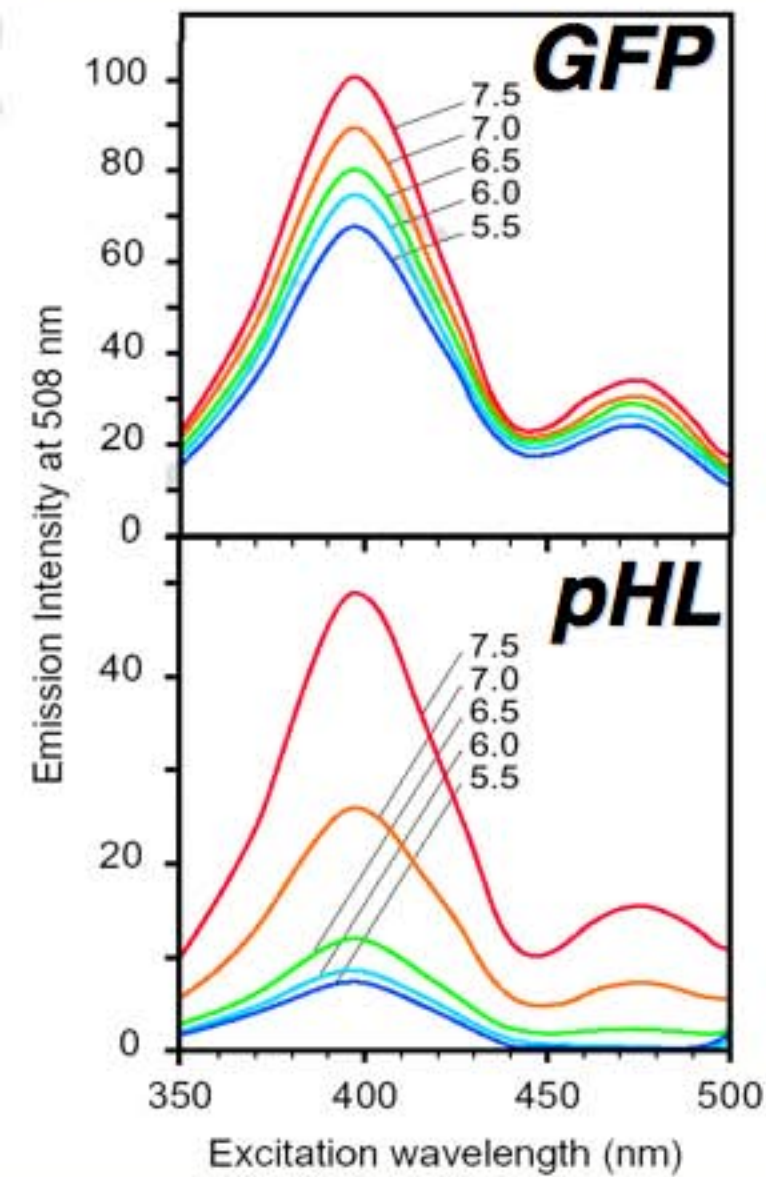
Comment mesurer l'exocytose ?

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



Comment mesurer l'exocytose ?

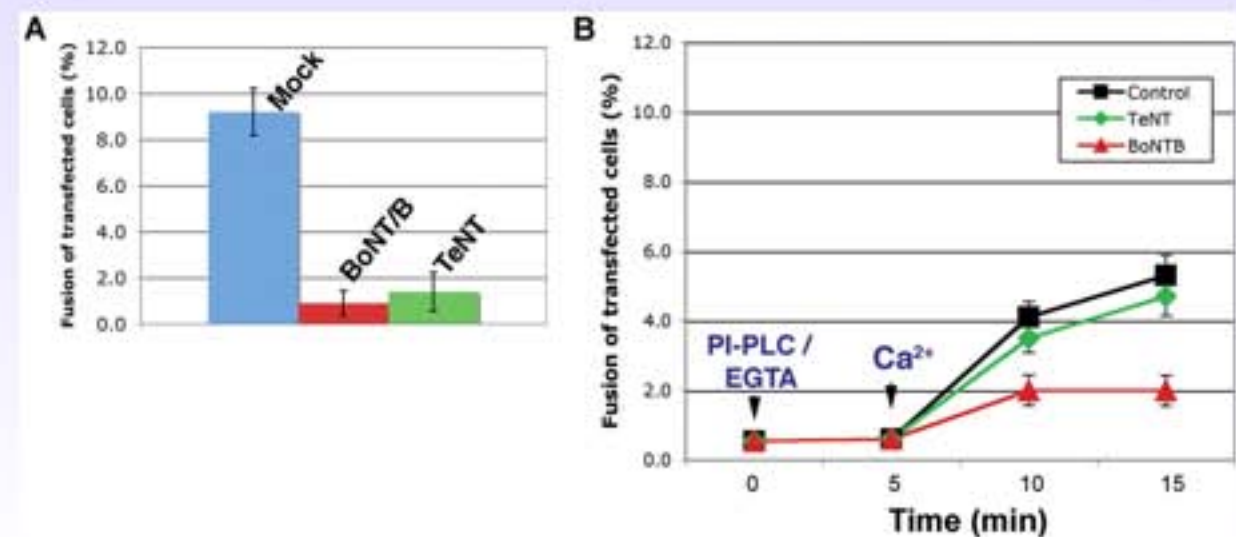
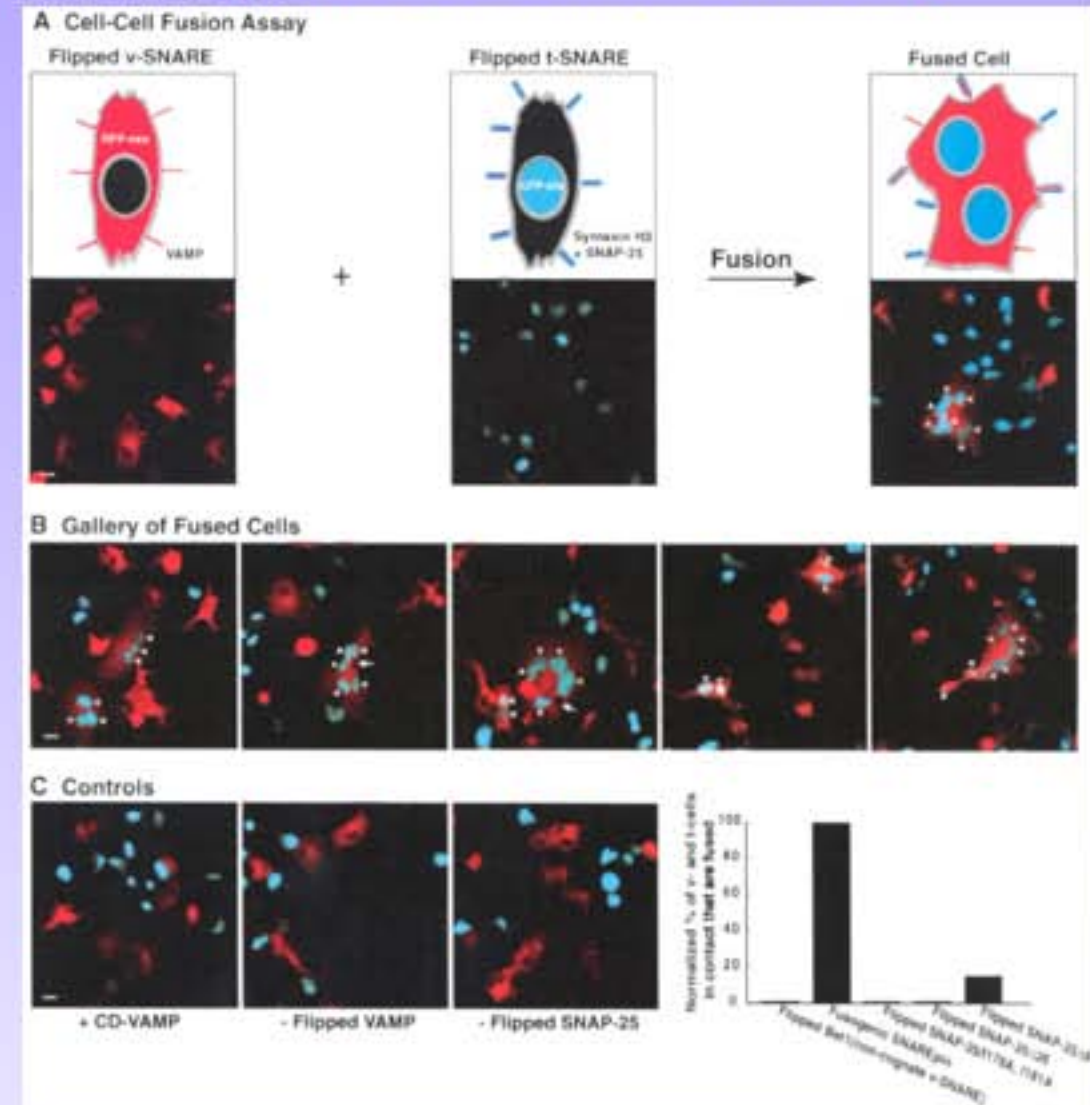
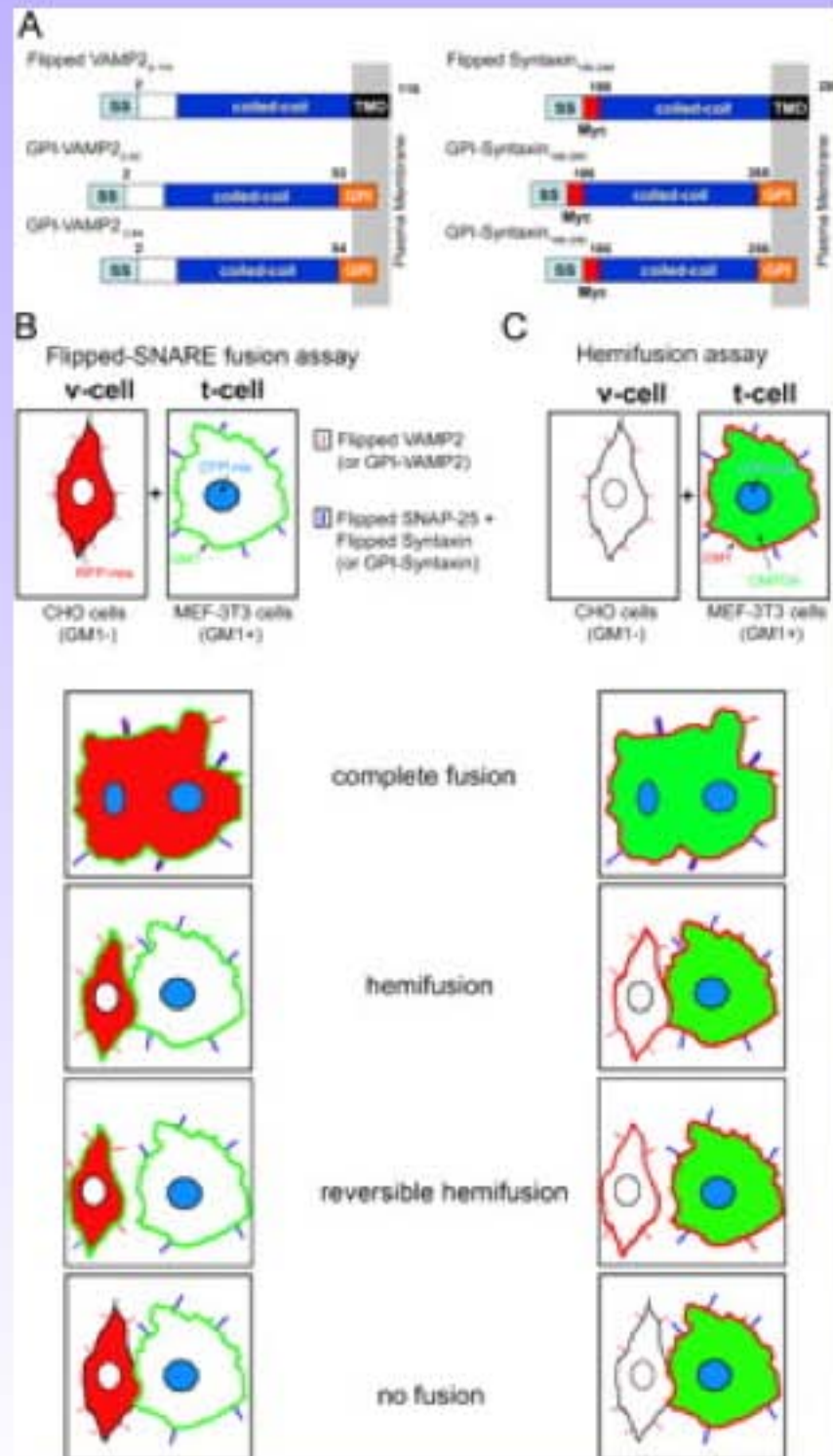
3) Mesure de fluorescence avec la GFP sensible au pH : la pHluorin





Comment mesurer l'exocytose ?

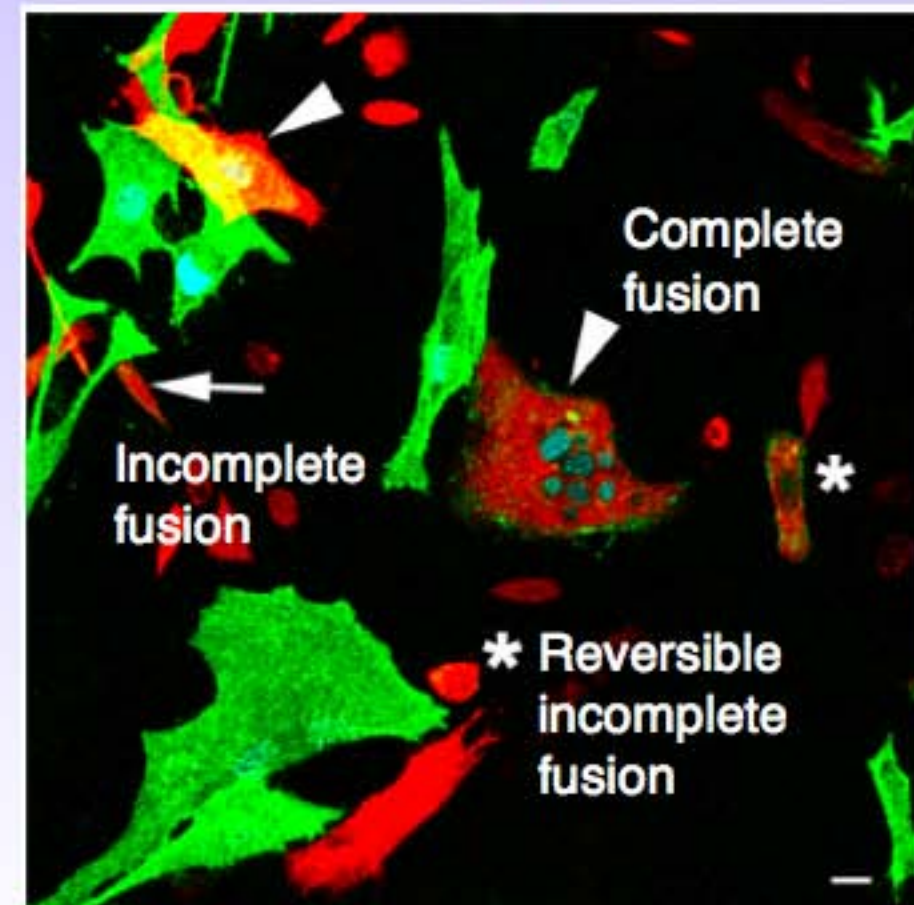
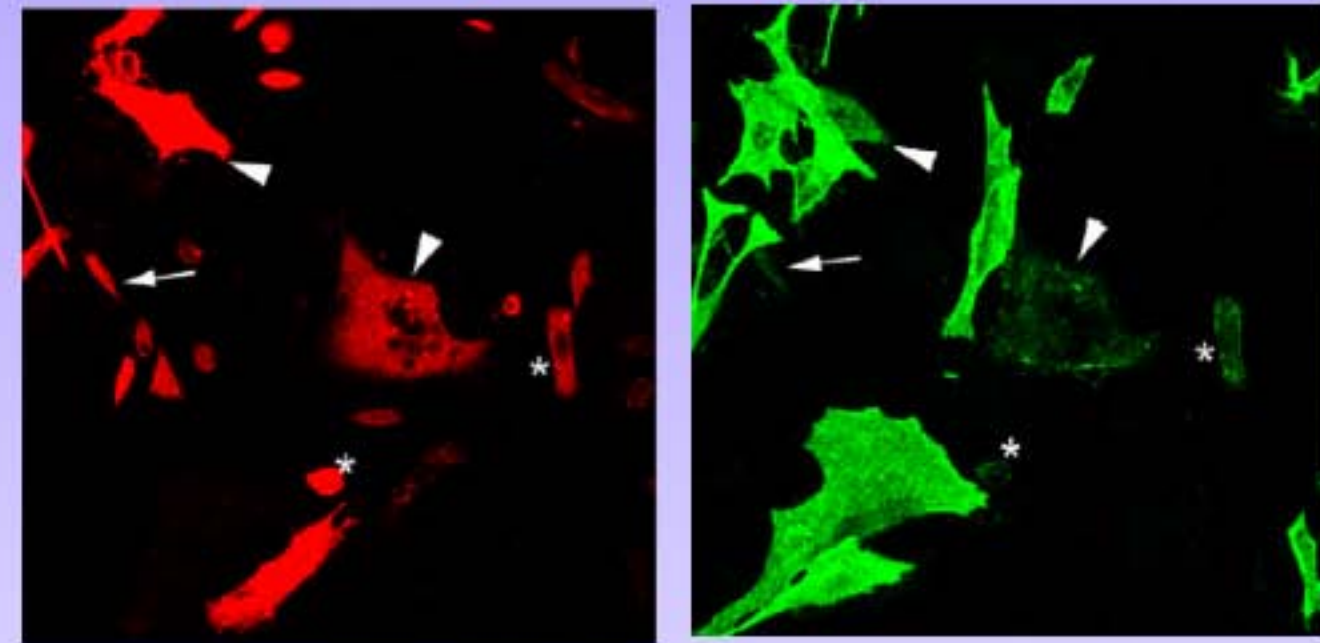
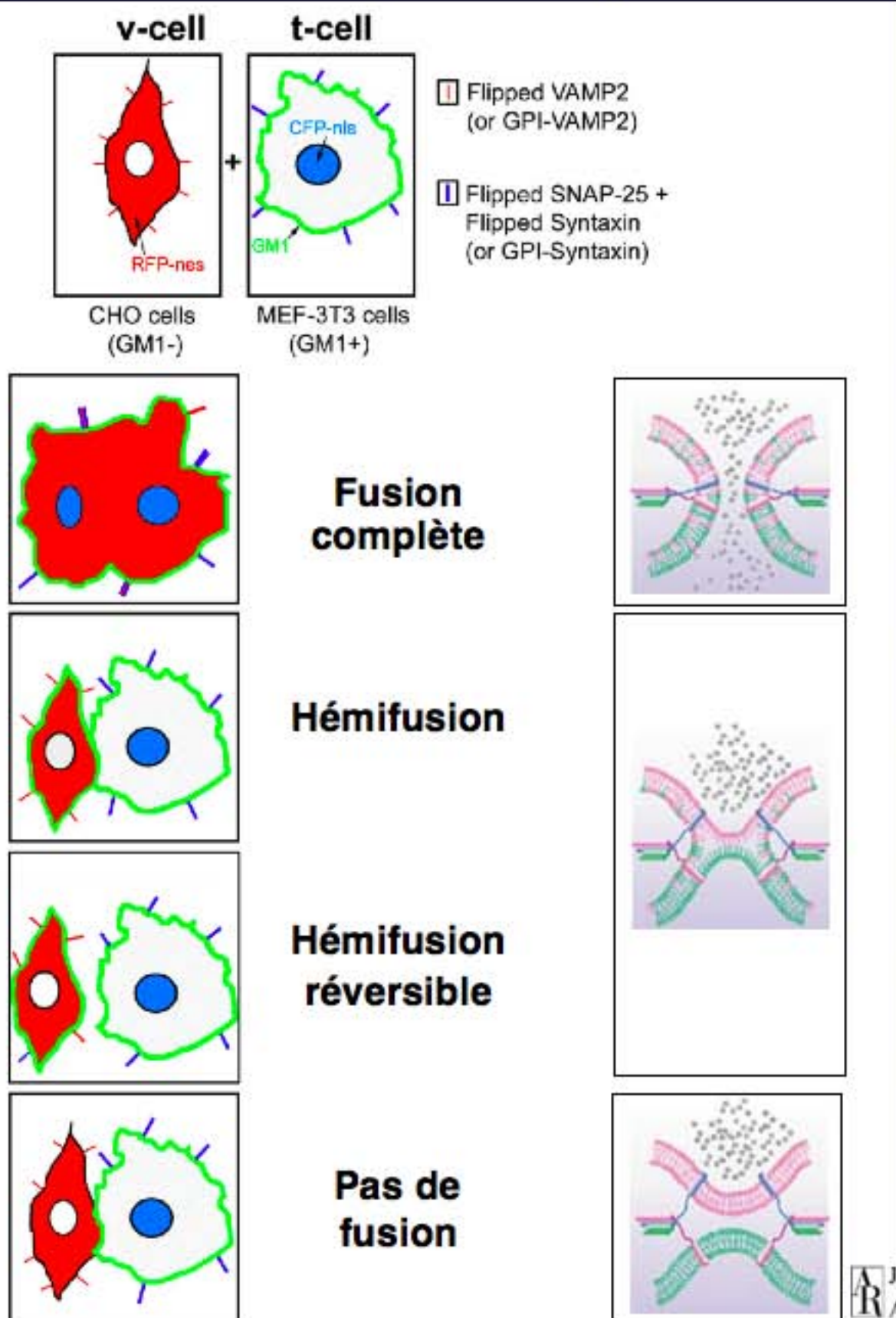
4) Mesure de fusion par la technique des SNARE inversées (flipped SNARE fusion assay)





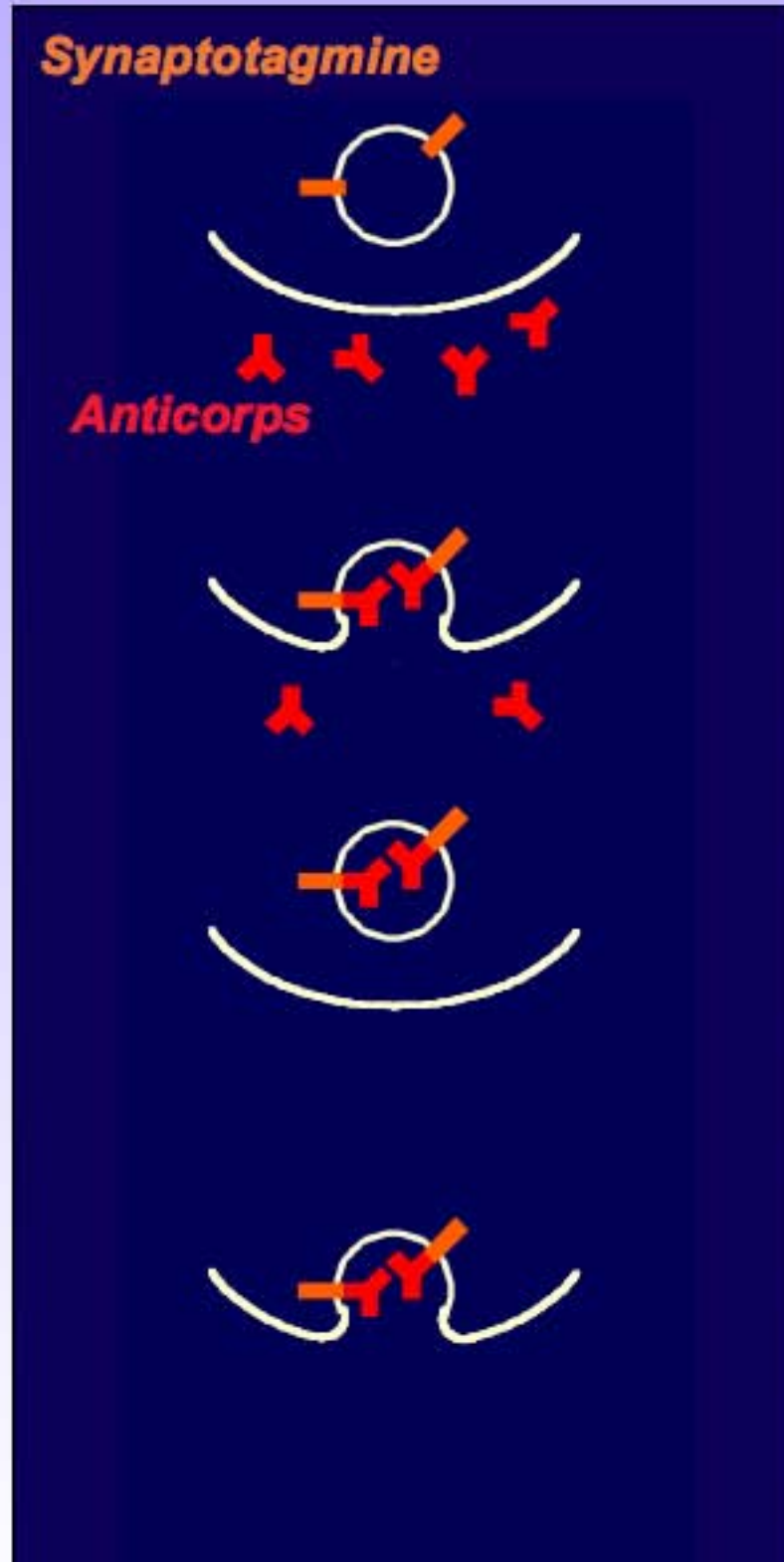
Comment mesurer l'exocytose ?

4) Evaluer la fusion par la technique des SNARE inversées (flipped SNARE fusion assay)



Comment mesurer le recyclage ?

1) L'utilisation d'anticorps anti-synaptotagmine



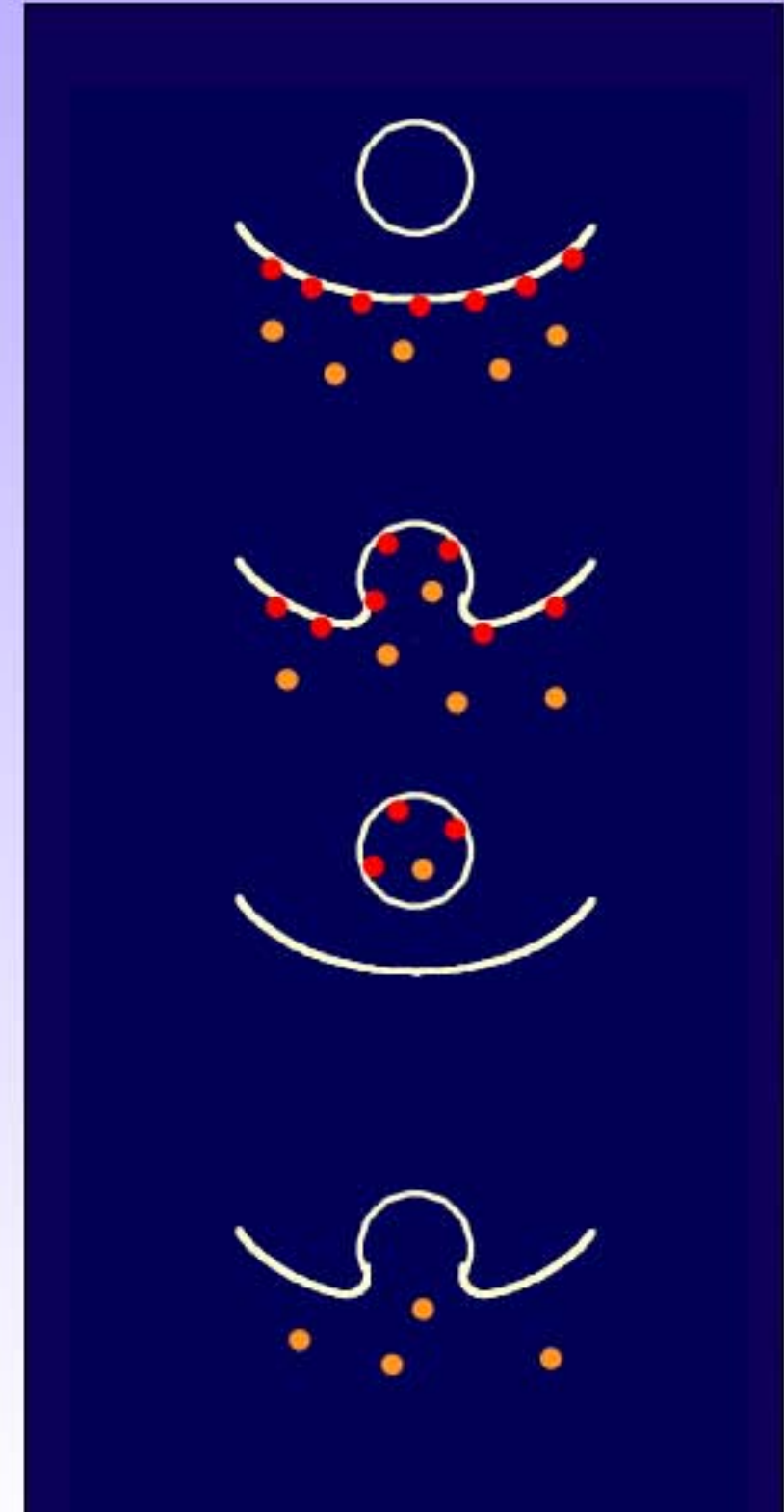
**Incubation
avec anticorps
ou sonde**

Endocytose

**Vésicules
chargées**

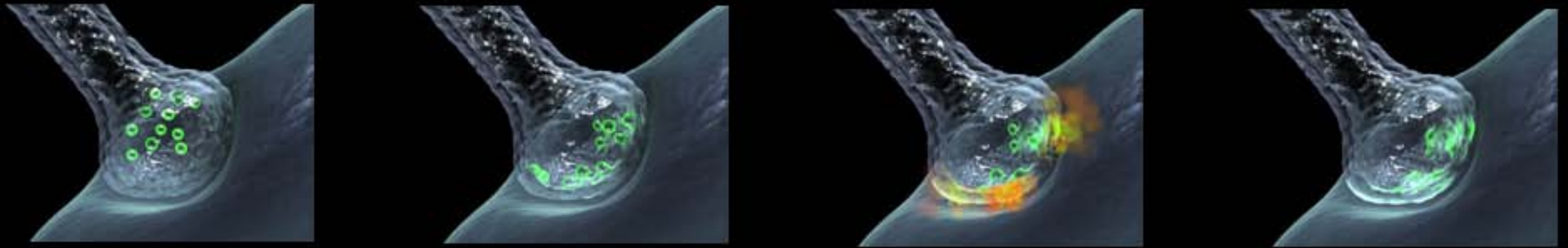
Exocytose

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



Neuronal transmission: exocytosis

Master2 Neurosciences - Paris6
Lydia Danglot - Complexes SNARE



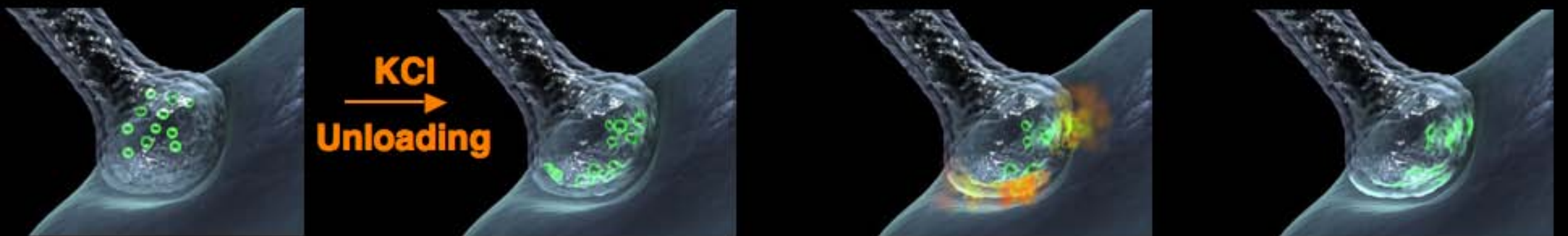
FM experiments

1. Loading of fluorescent dyes



Zero Ca^{2+} : block ExoC

2. Measurement of the unloading of FM dyes



Basic properties of the FM dyes

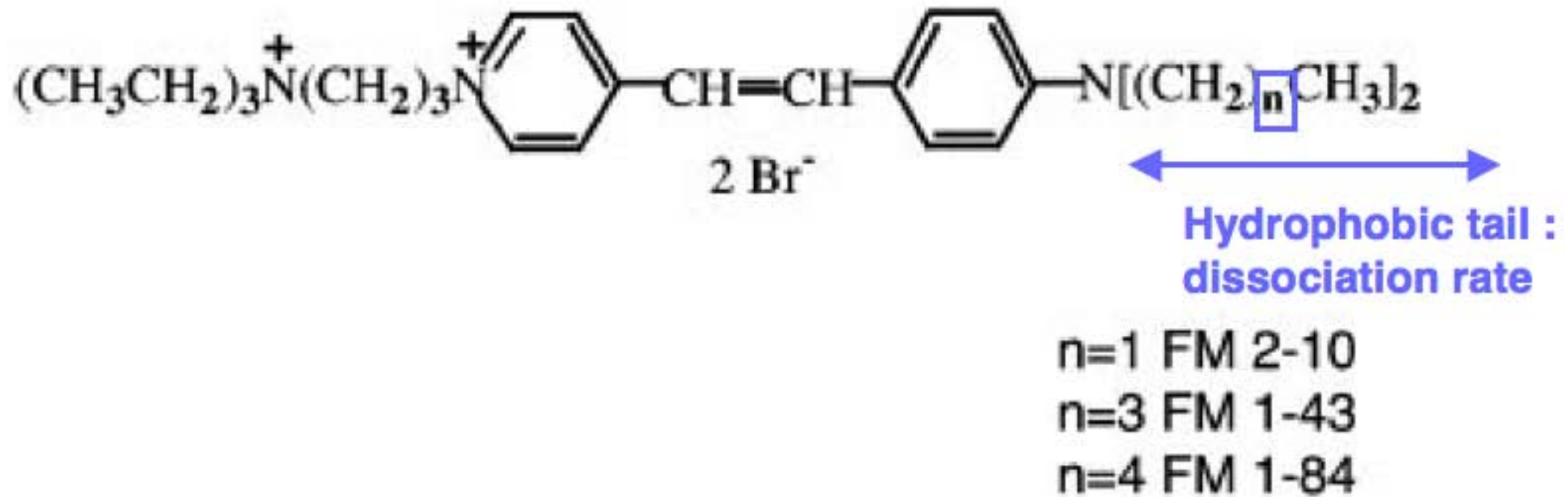
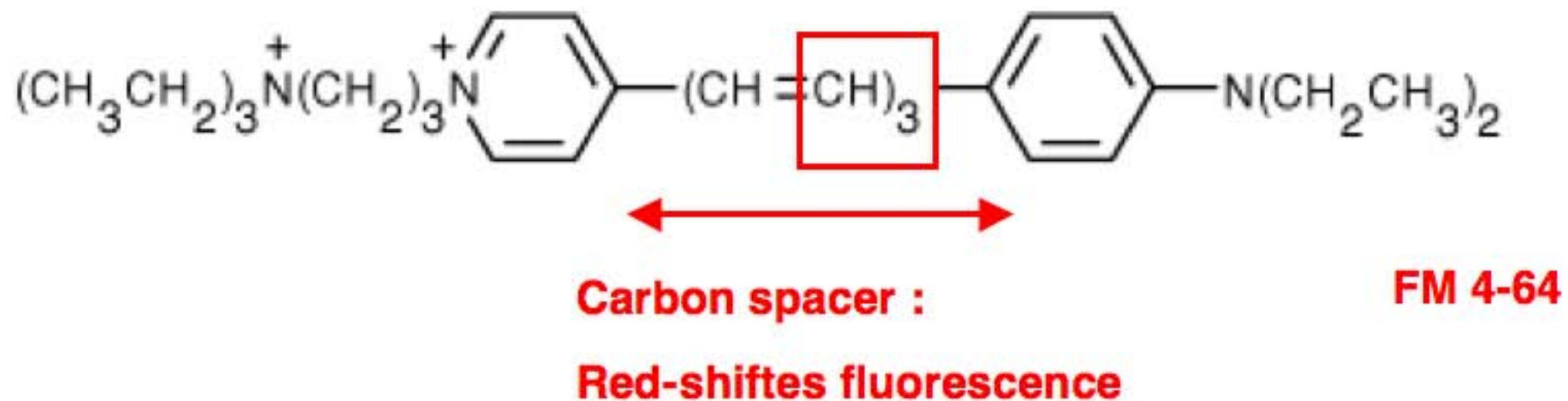


FIG. 1. Chemical structures of FM 2-10, FM 1-43, and FM 1-84.



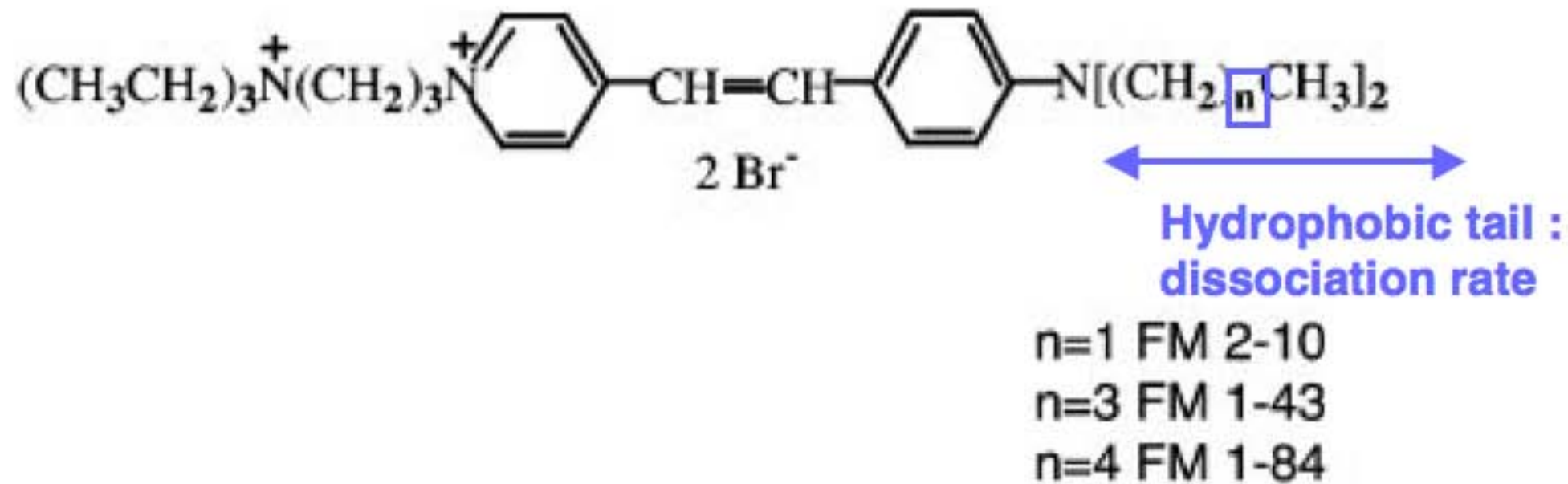
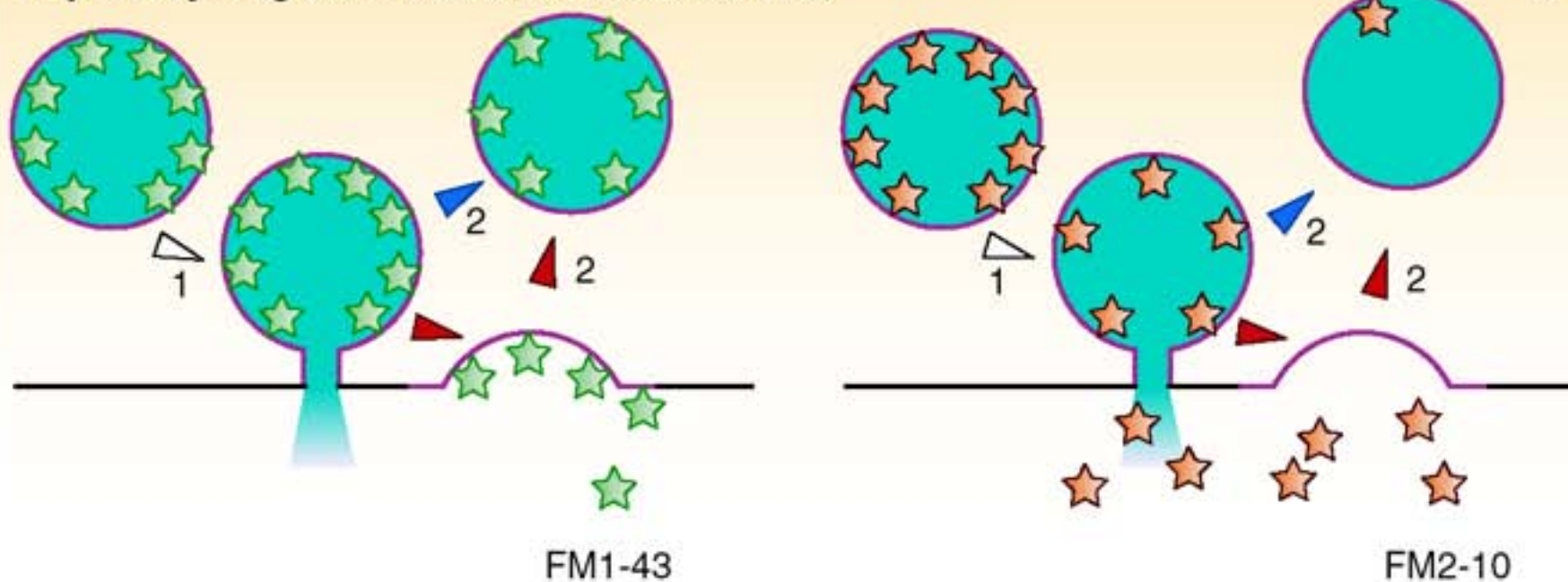


FIG. 1. Chemical structures of FM 2-10, FM 1-43, and FM 1-84.

NATURE CELL BIOLOGY | VOL 4 | NOVEMBER 2002 |

Rapid recycling Short membrane residence time

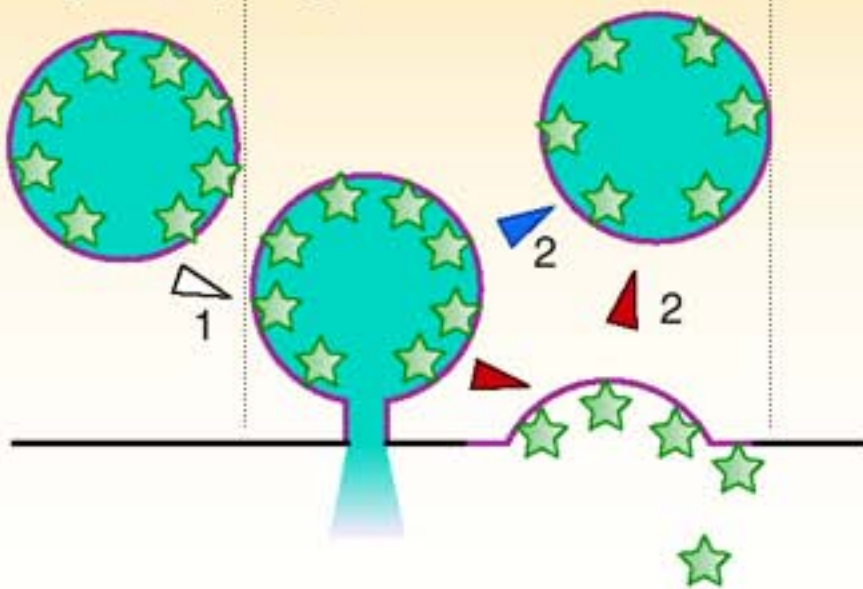


**FM2-10 is faster
than FM1-43**

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

Residence Time
ExoC Internalization

Rapid recycling Short membrane residence time

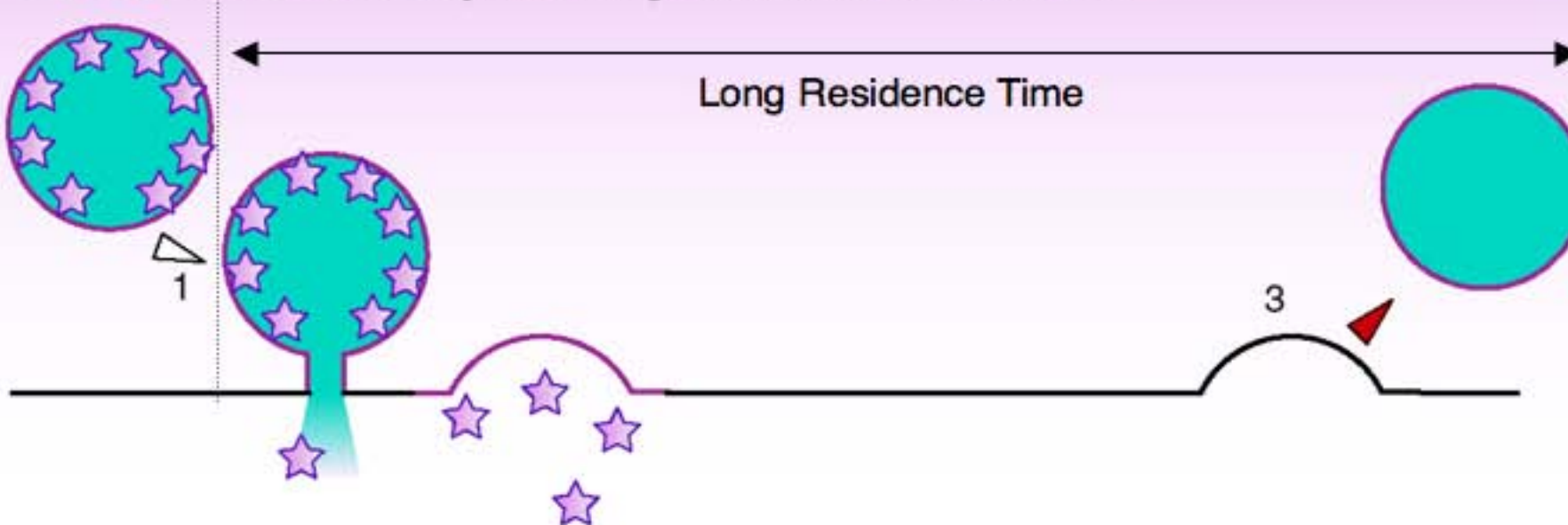


How to discriminate between Kiss & run and Endocytosis

Kiss and run :

Short Residence time (Res.T)

Clathrin-mediated endocytosis Long membrane residence time



Clathrin mediated endocytosis:

Long Residence time

★ Dye with slow 'off time'

— Vesicle membrane

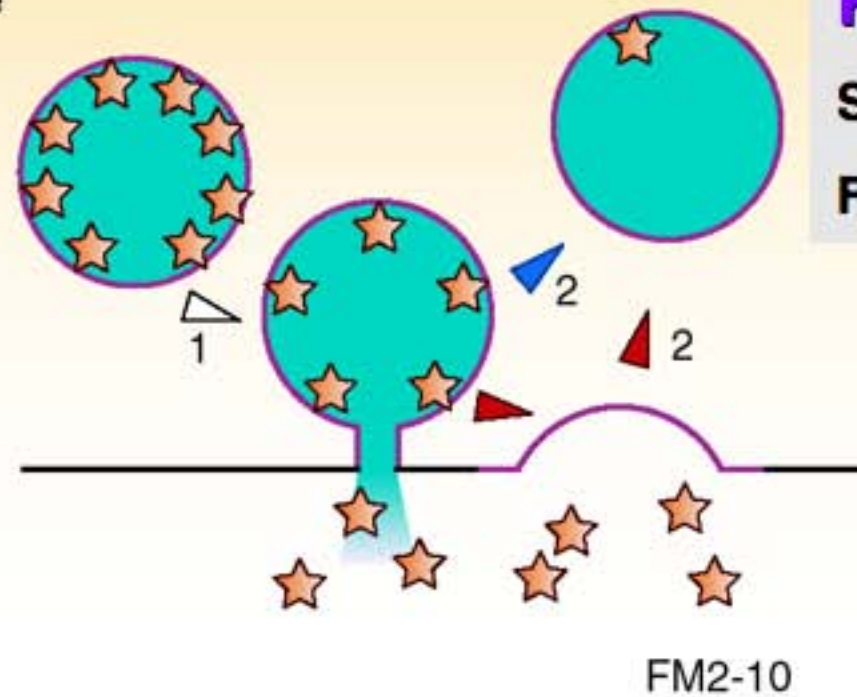
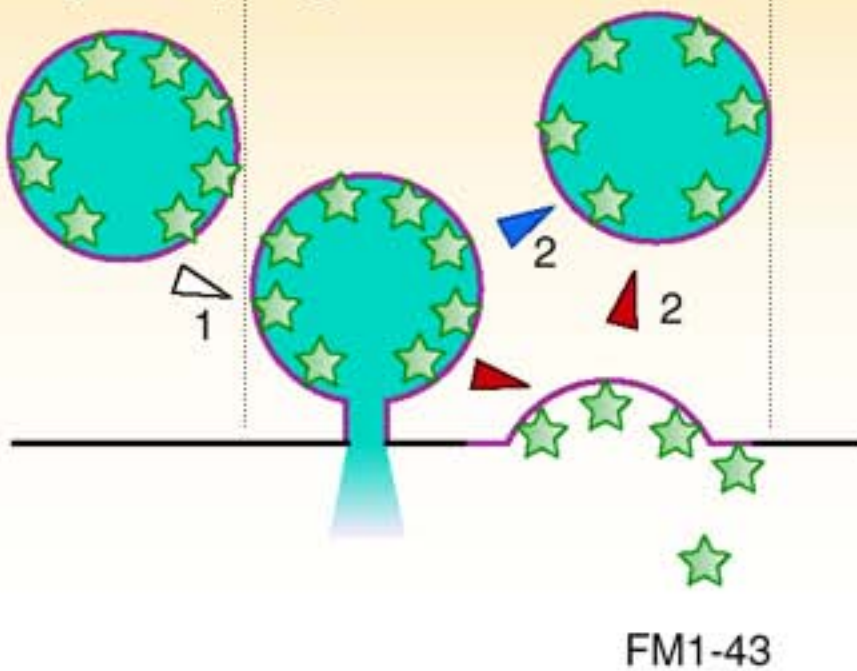
■ Neurotransmitter

★ Dye with fast 'off time'

— Pre-synaptic membrane

Residence Time
ExoC Internalization

Rapid recycling Short membrane residence time



Kiss and run :

Short Residence time (Res.T)

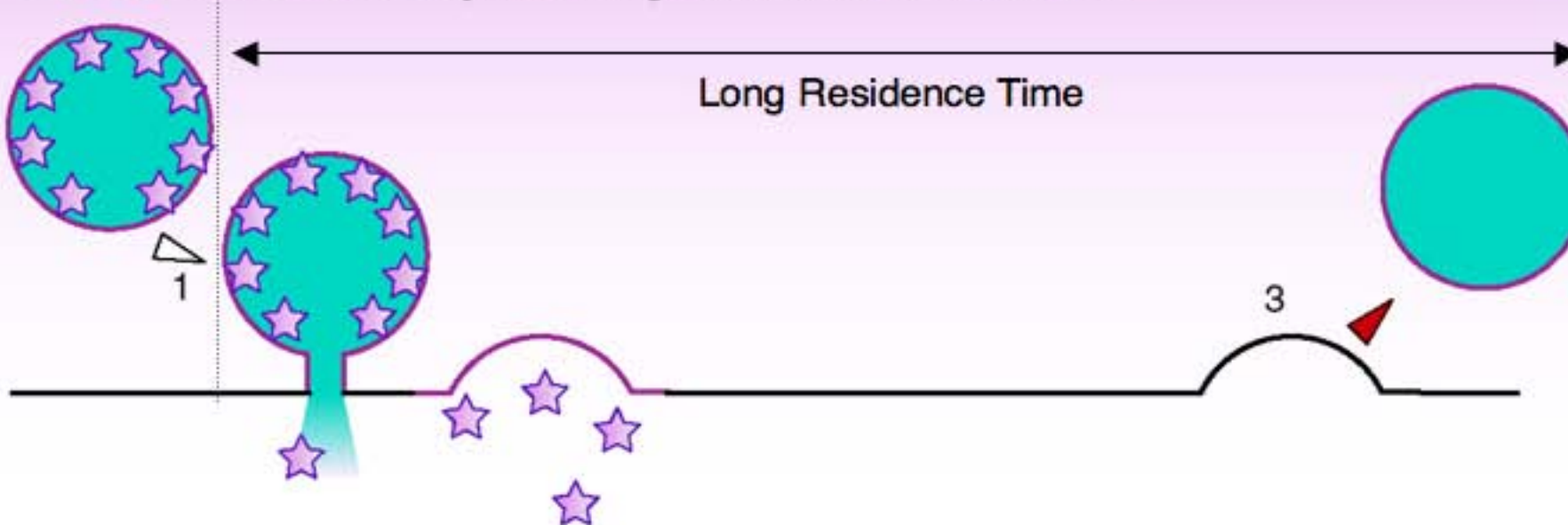
$FM2-10 < Res. T < FM\ 1-43$

**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**

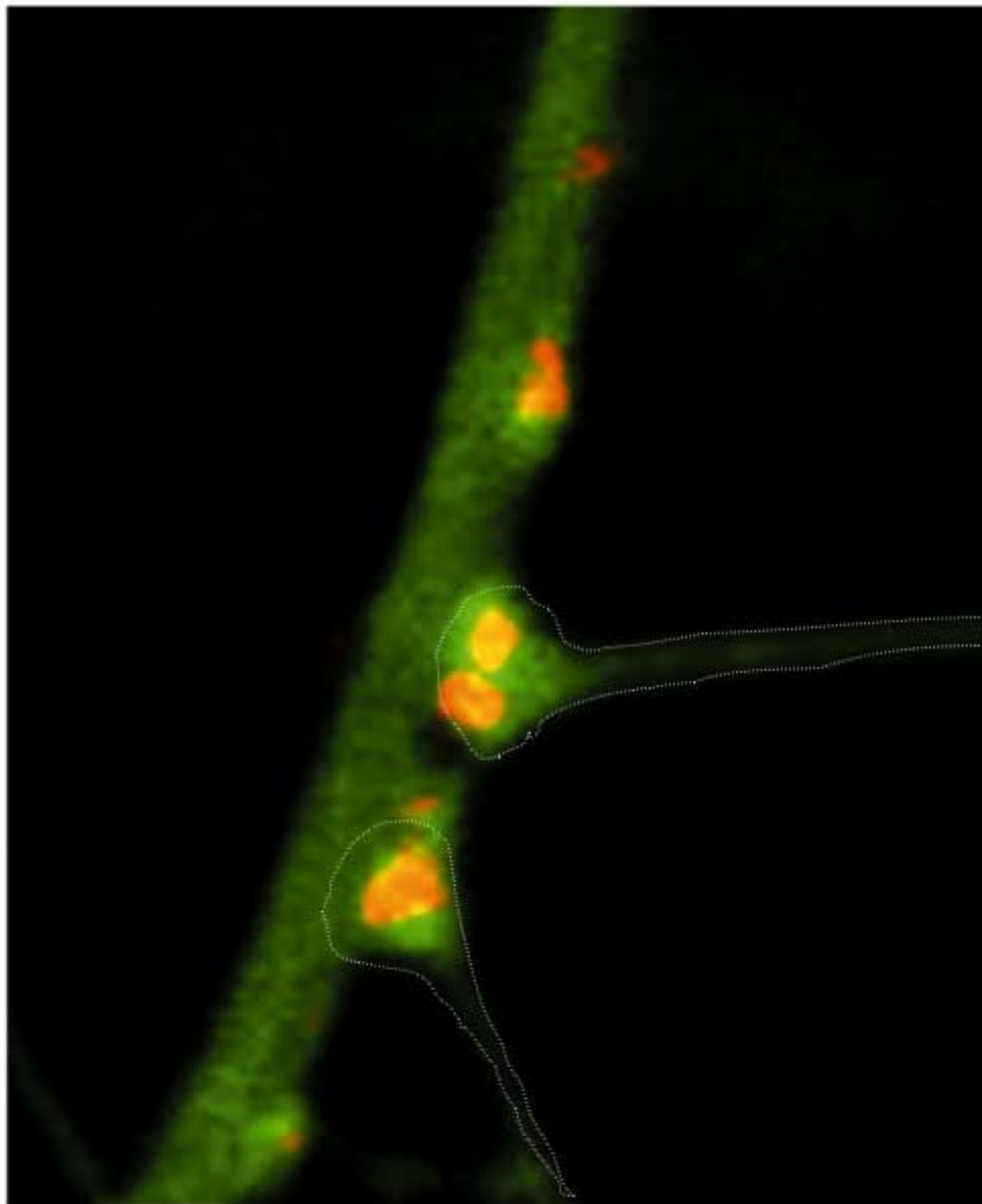
☆ Dye with slow 'off time'

— 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.

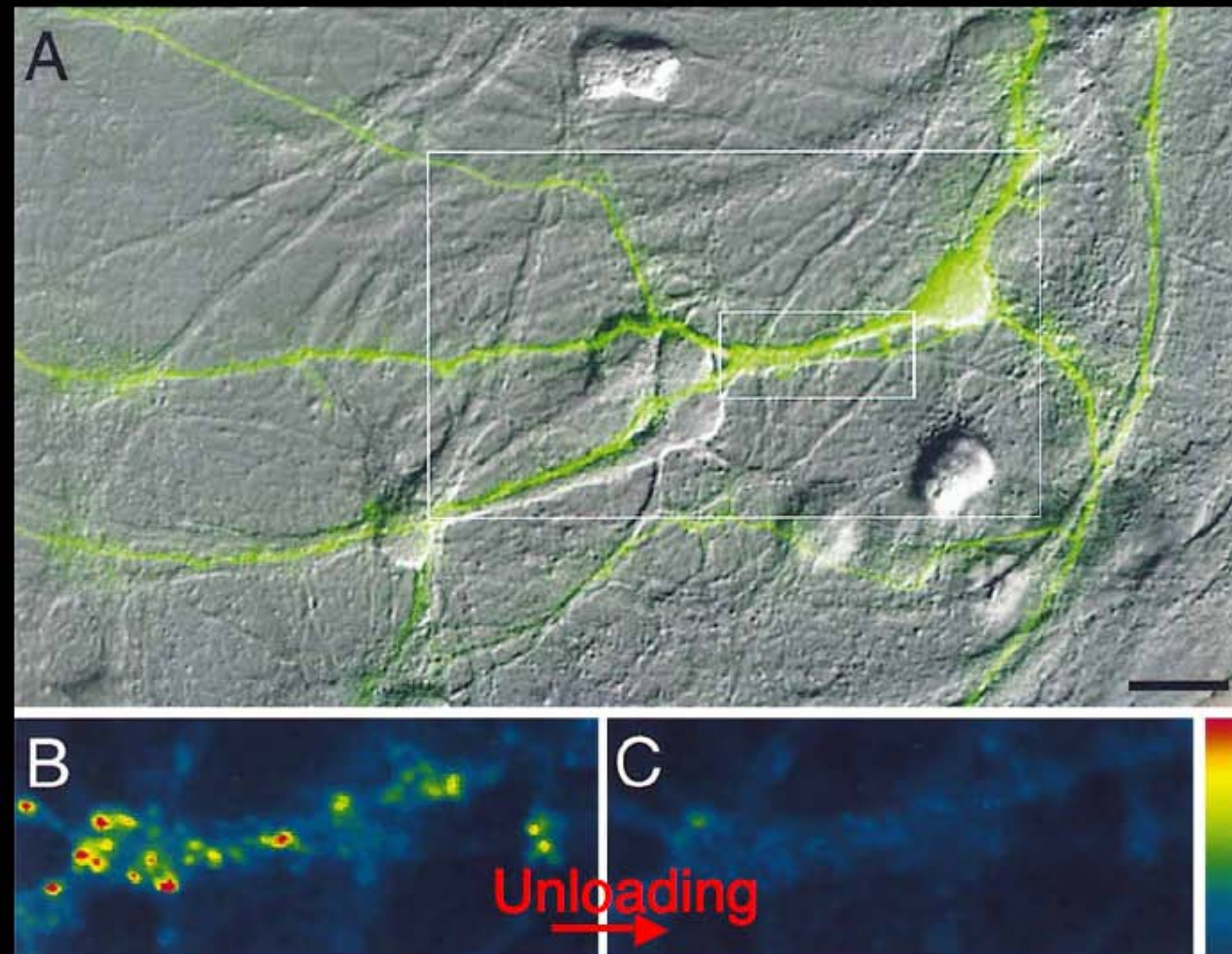


Figure 1. Imaging of Dendritic Structure and Presynaptic Boutons in Live Cultured Hippocampal Neurons

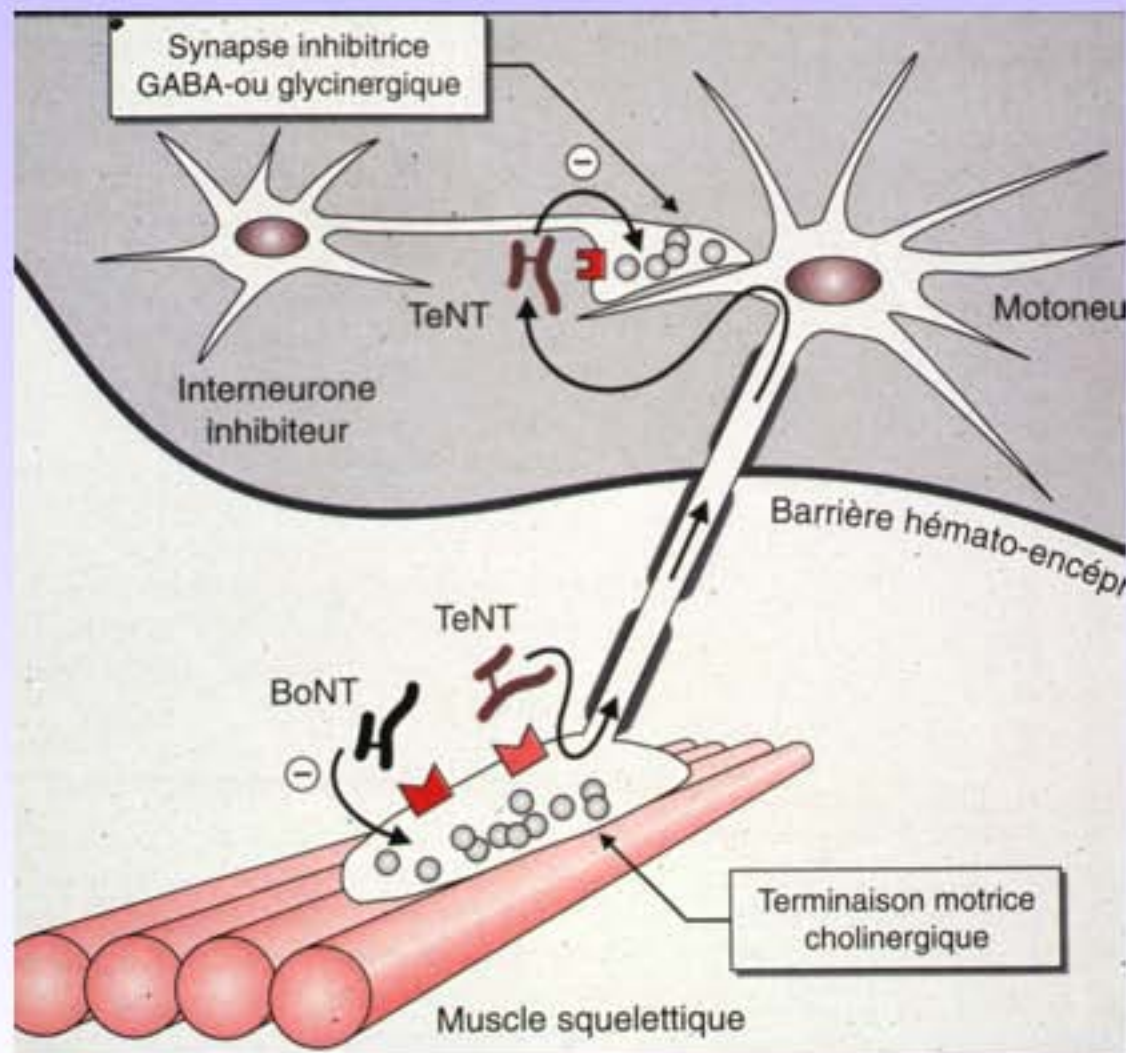
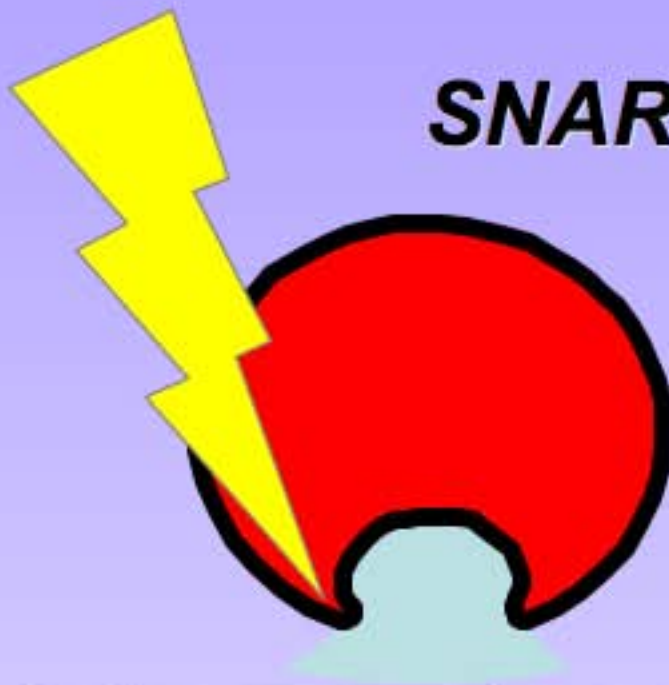
(A) A fluorescence image of a single pyramidal neuron labeled with FAST DiO, digitally overlaid on a DIC image of the same field. The neurons shown in this figure were grown for 13 DIV prior to the experiment.

(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.

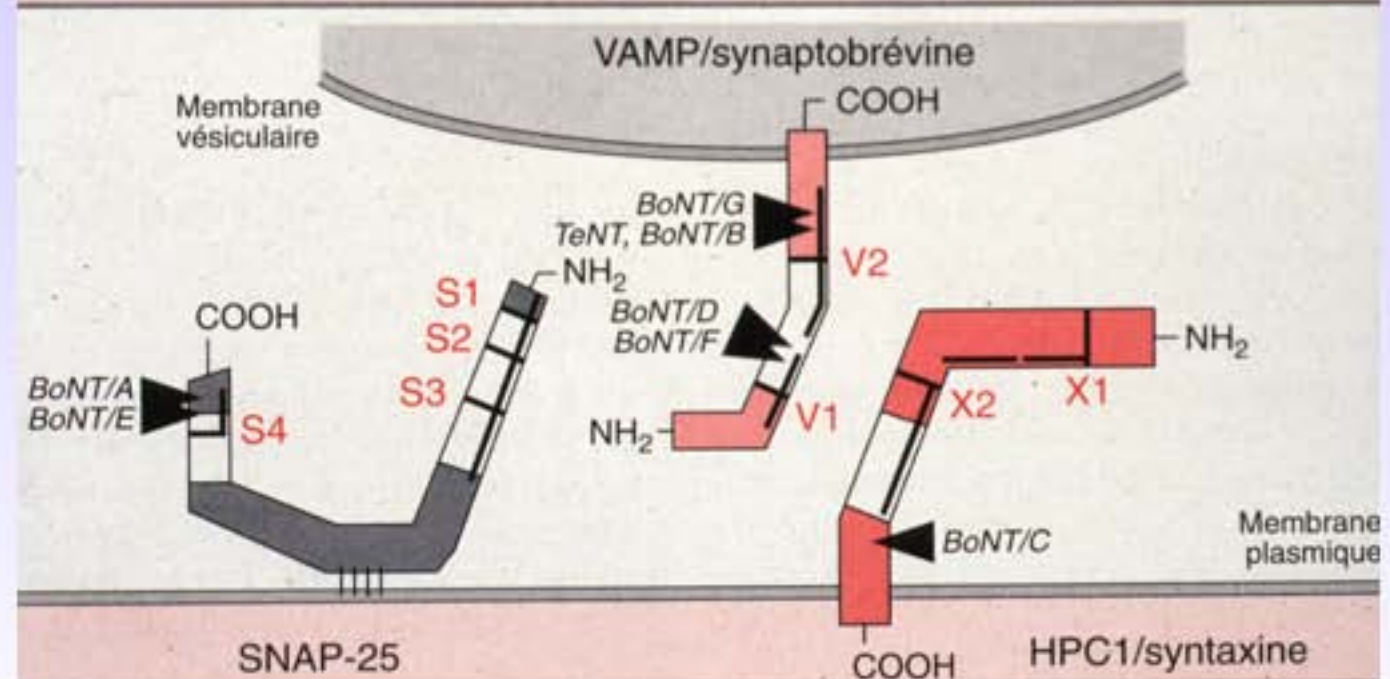
(C) The same field shown in (B) after the dye was unloaded by stimulating the neurons to fire action potentials for 60 s at 10 Hz.

(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 μm (A) and 10 μm (D).

SNAREs: cibles des neurotoxines clostridiales



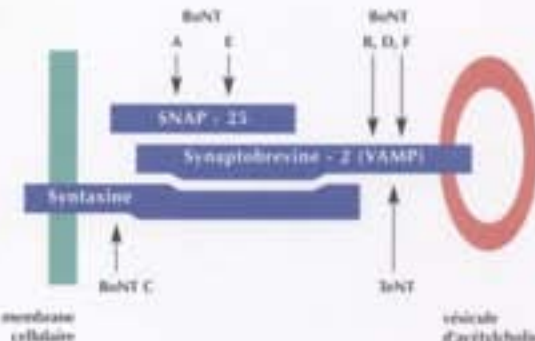
Toxine	Cible	Site de reconnaissance	Site de clivage
TeNT	VAMP	V2 : ELDDRADALQ	ASQFETS
BoNT/B	VAMP	V2 : ELDDRADALQ	ASQFETS
BoNT/D	VAMP	V1 : QVDEVVDIMR	DQKLSEL
BoNT/F	VAMP	V1 : QVDEVVDIMR	RDQKLSE
BoNT/G	VAMP	V2 : ELDDRADALQ	ESAALKL
BoNT/A	SNAP-25	S4 : EMDENLEQVSG	ANQRATK
BoNT/E	SNAP-25	S4 : EMDENLEQVSG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



Applications des Neurotoxines ...

Dysport
TOXINE BOTULIQUE TYPE A • 500 UNITÉS SPEYWOOD

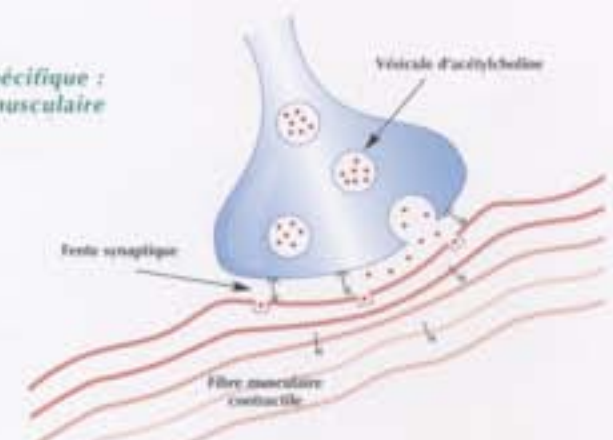
La maîtrise biopharmaceutique...



Une action focalisée sur la clef synaptique

... au service des Dystonies

Une cible spécifique : la jonction neuromusculaire

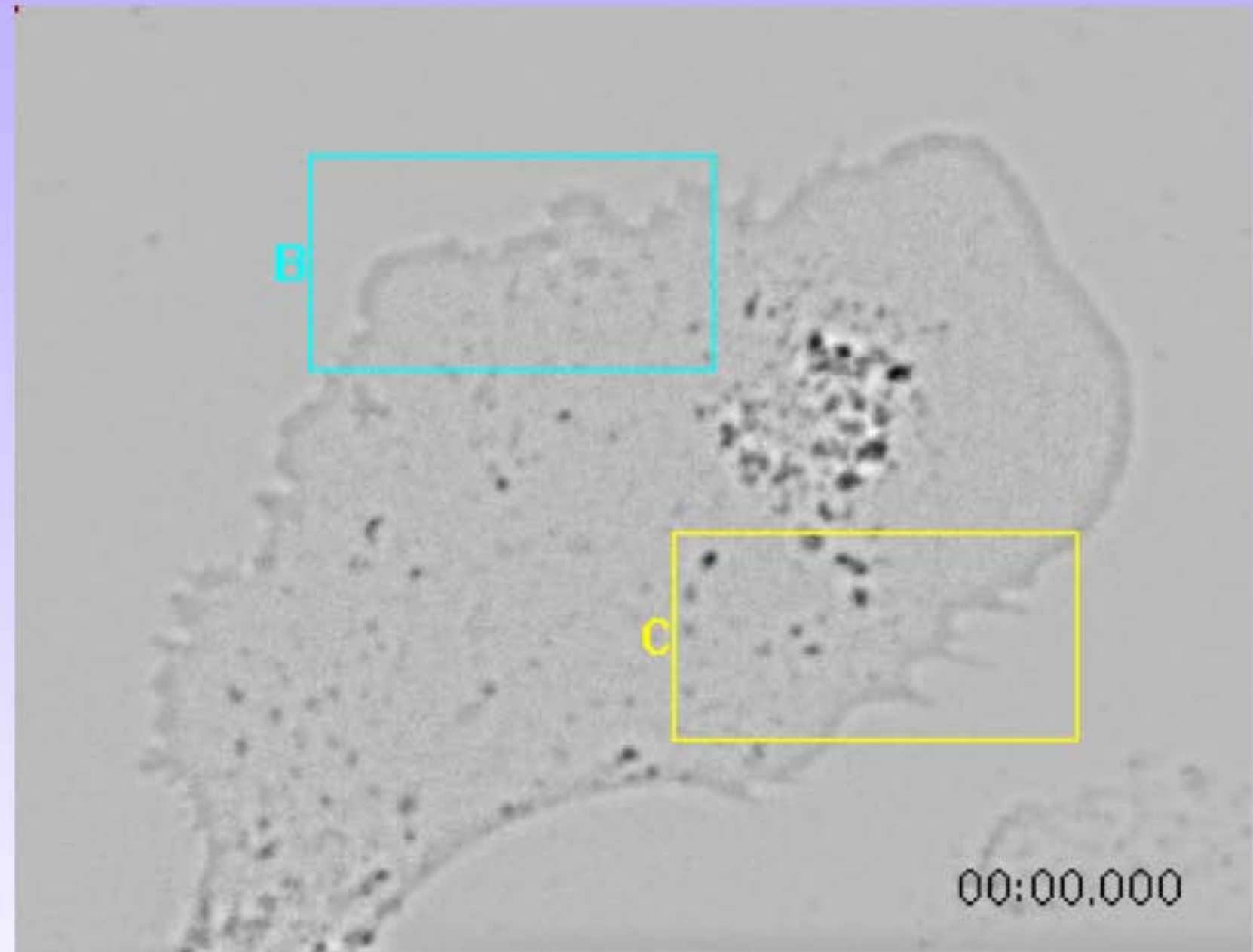
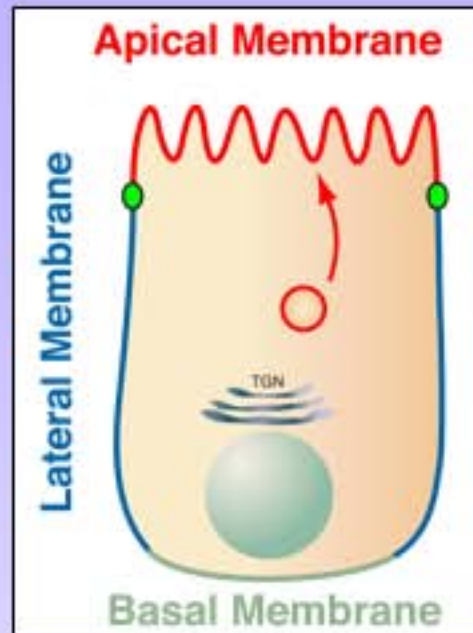


Traitement des dystonies (hypercontractions musculaires involontaires et douloureuses).

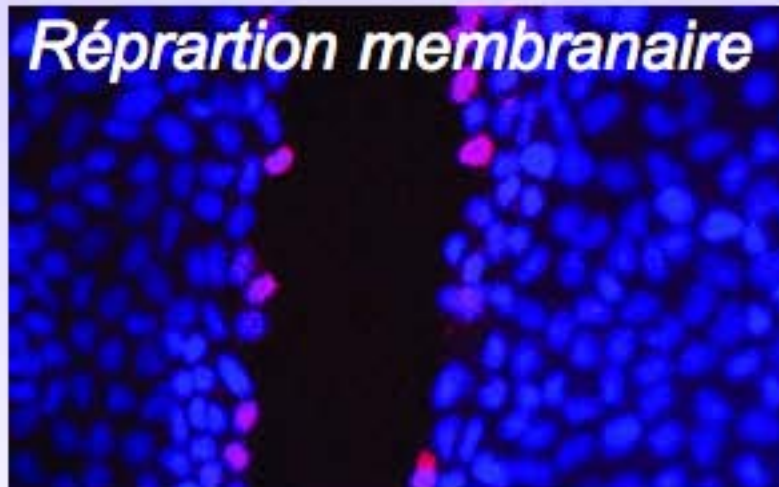


Esthétique: injection de « BOTOX »:
Paralysie musculaire pendant 5 à 6 mois.

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



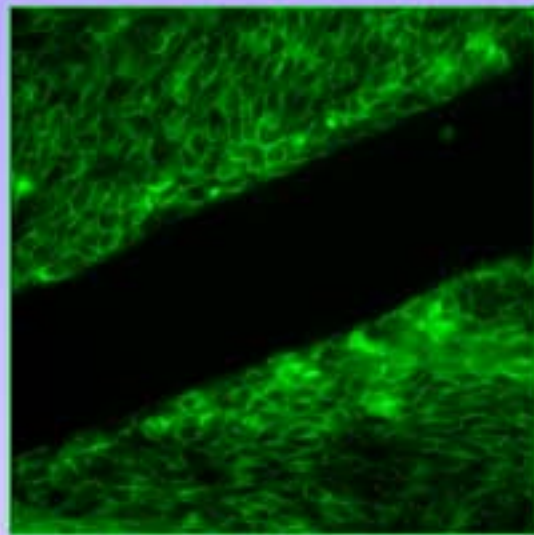
Réparation membranaire



(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

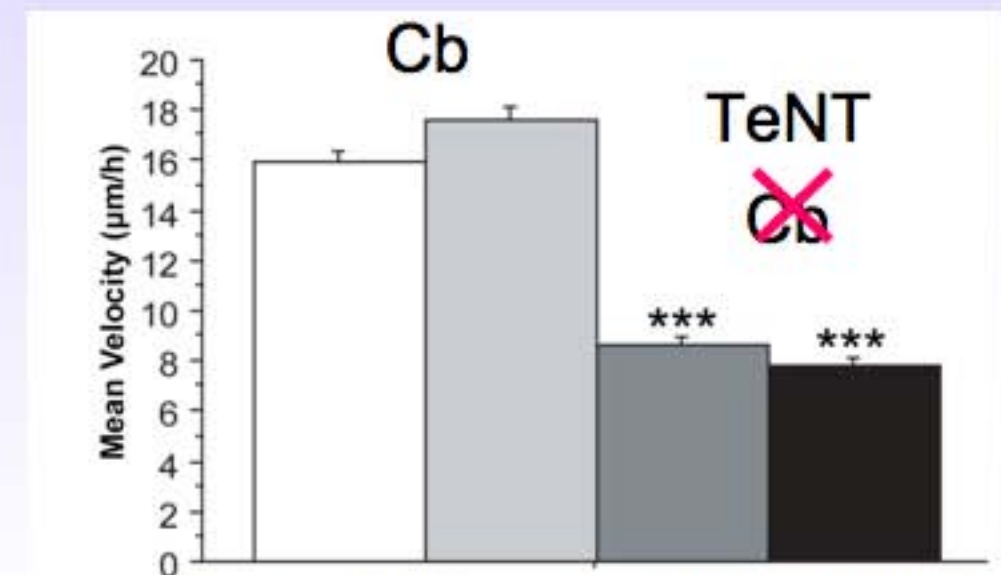


Migration de cellules épithéliales de type MDCK
Après clivage de la Célubrévine Sans clivage



GFP-Cb

Toxine Tétanique

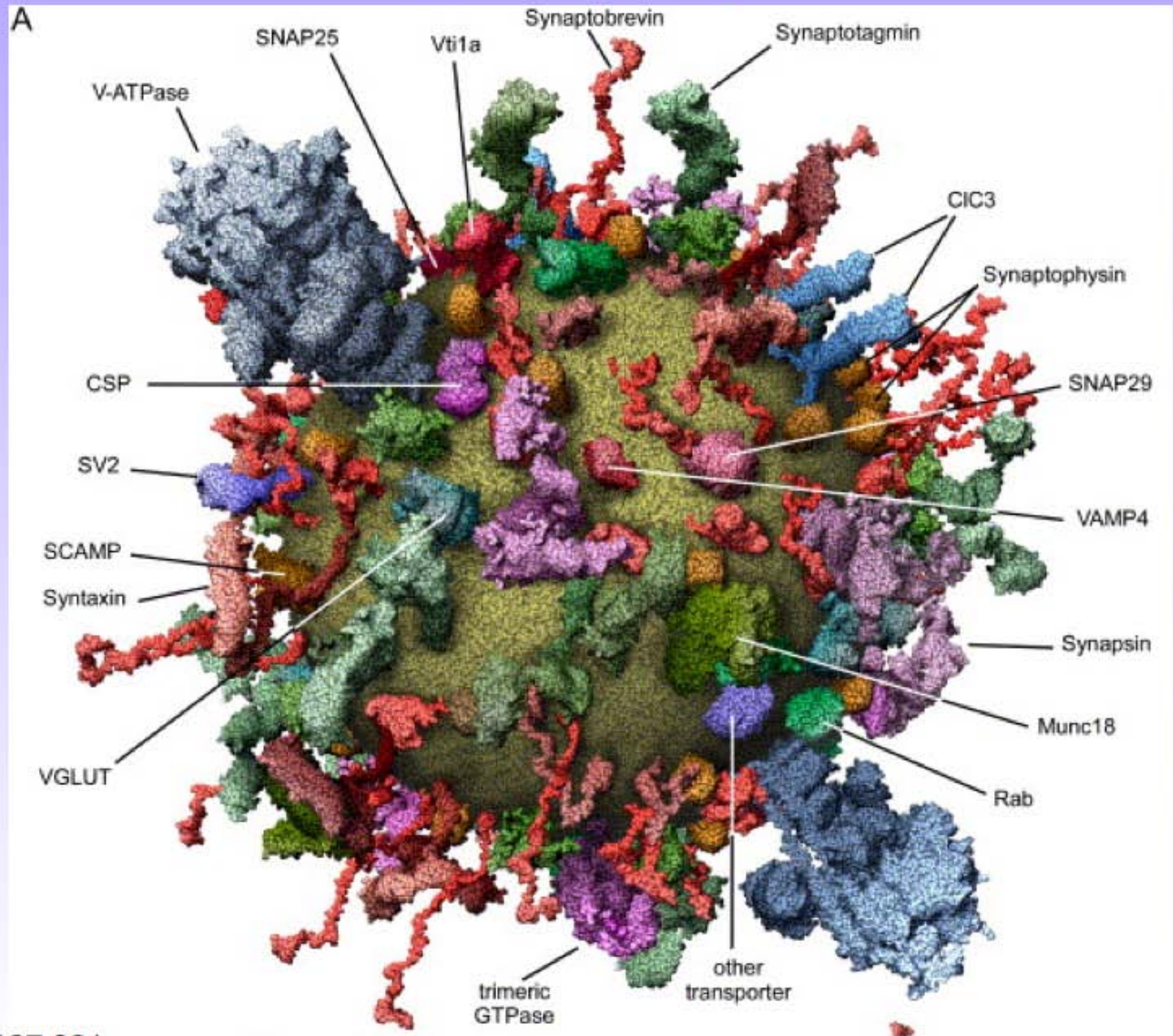


Proux-Gillardeaux & al, PNAS 2005, BoC 2007

Vésicules Synaptiques

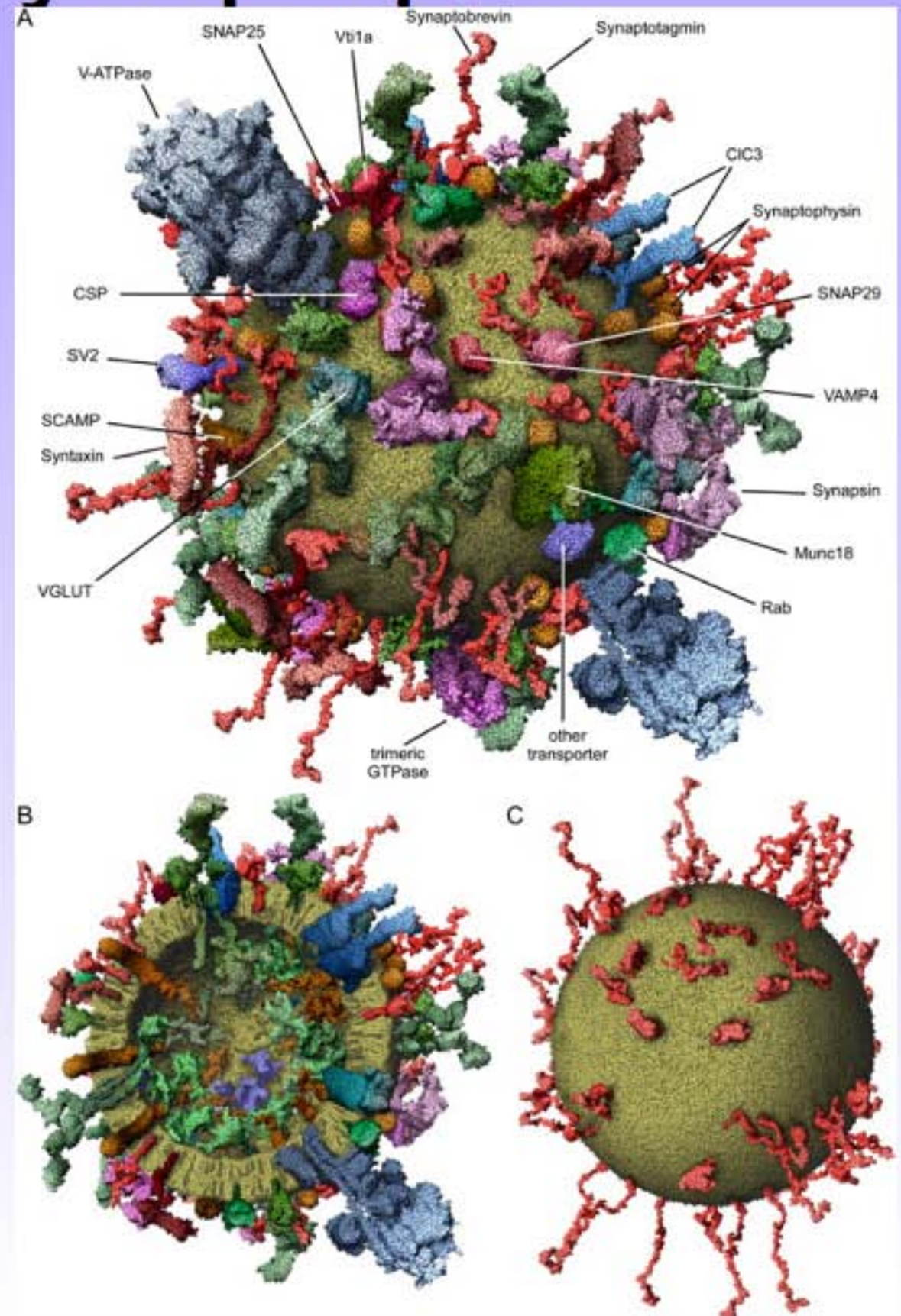


R. Jahn

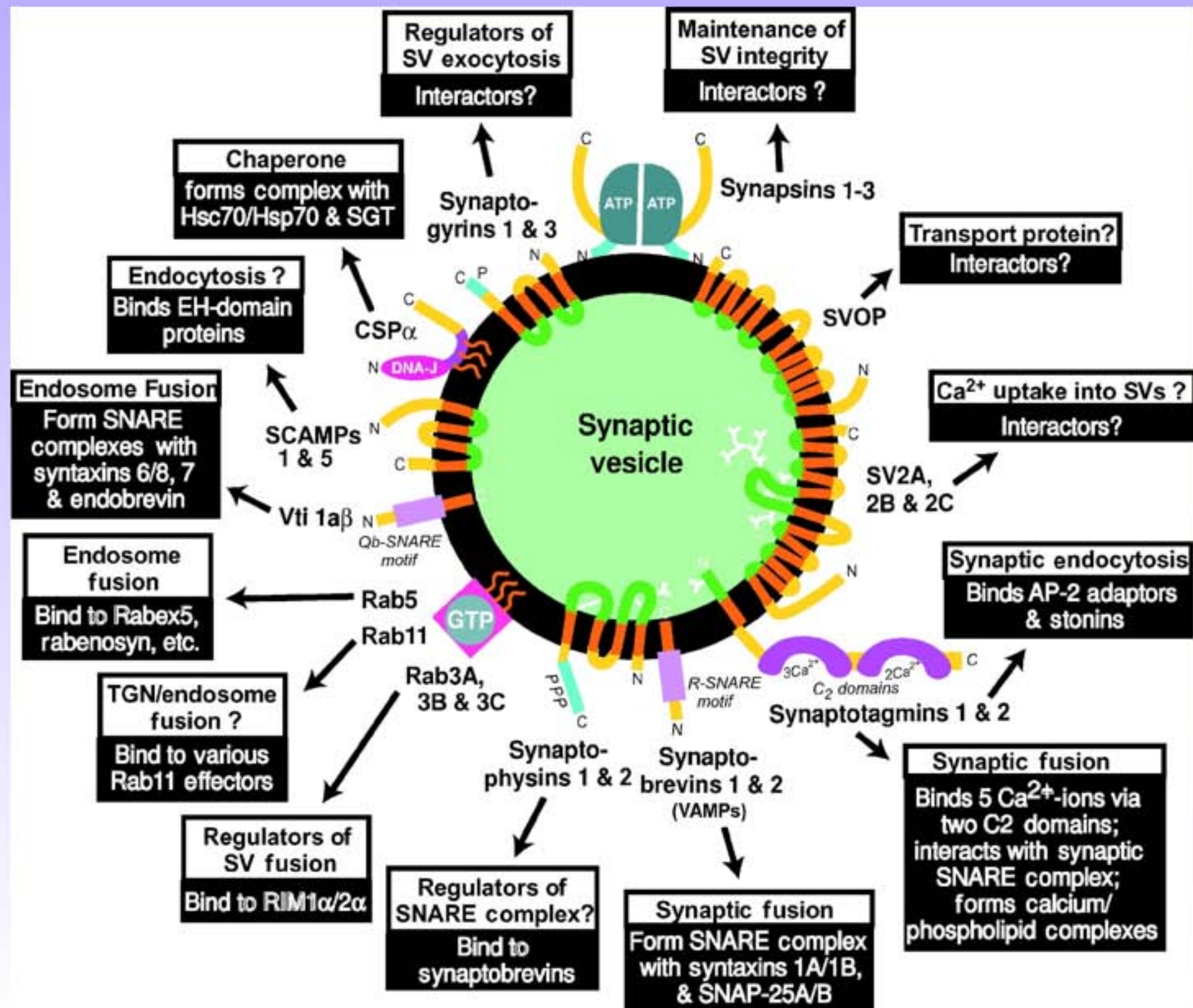


Vésicules Synaptiques

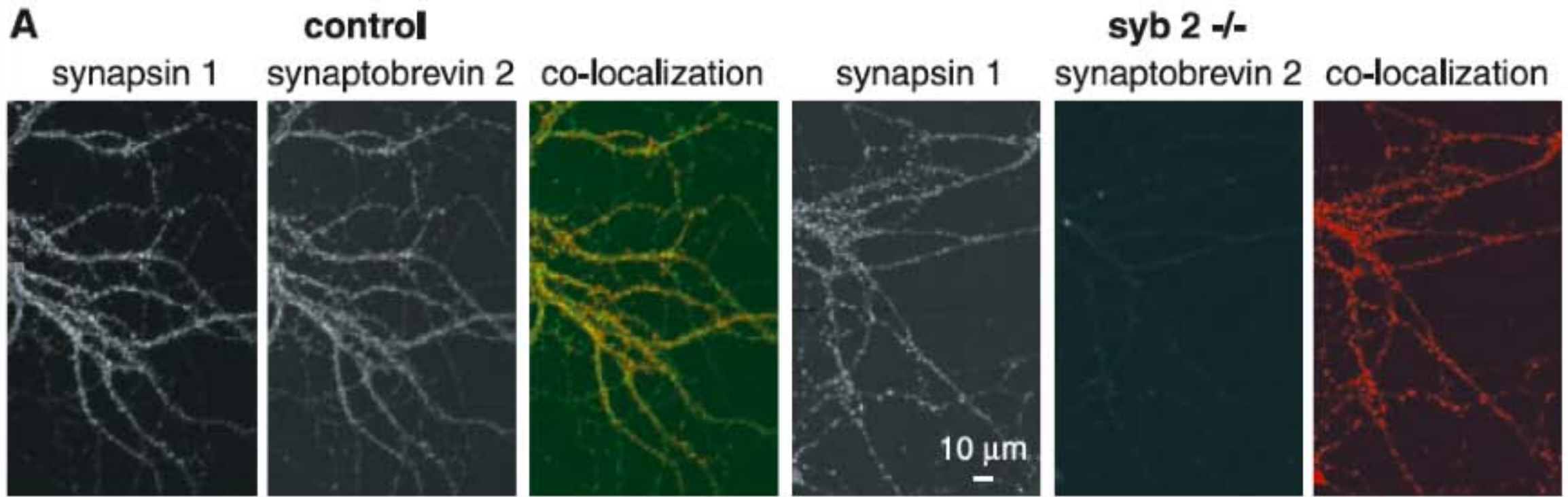
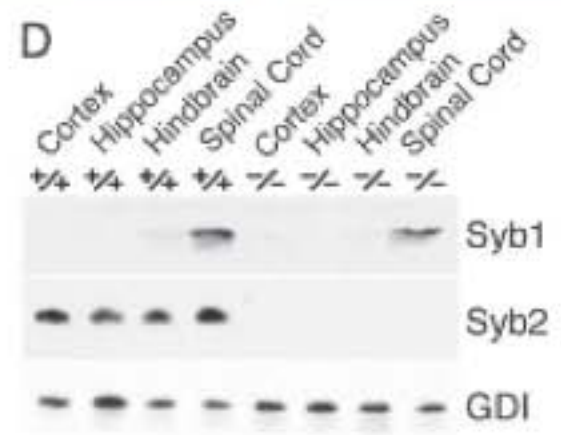
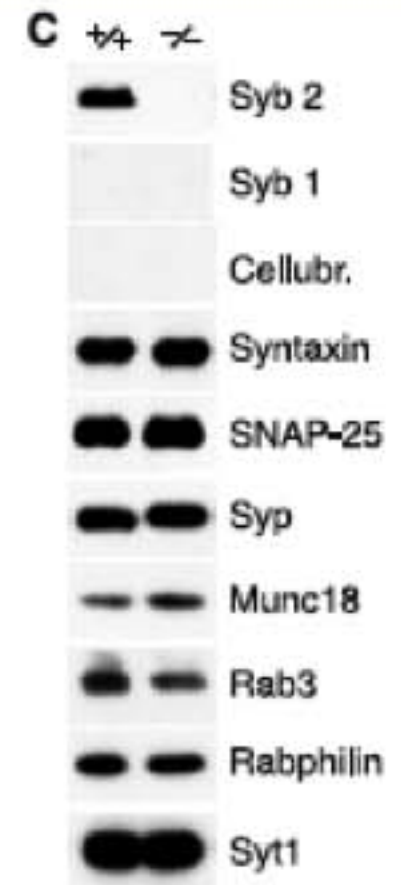
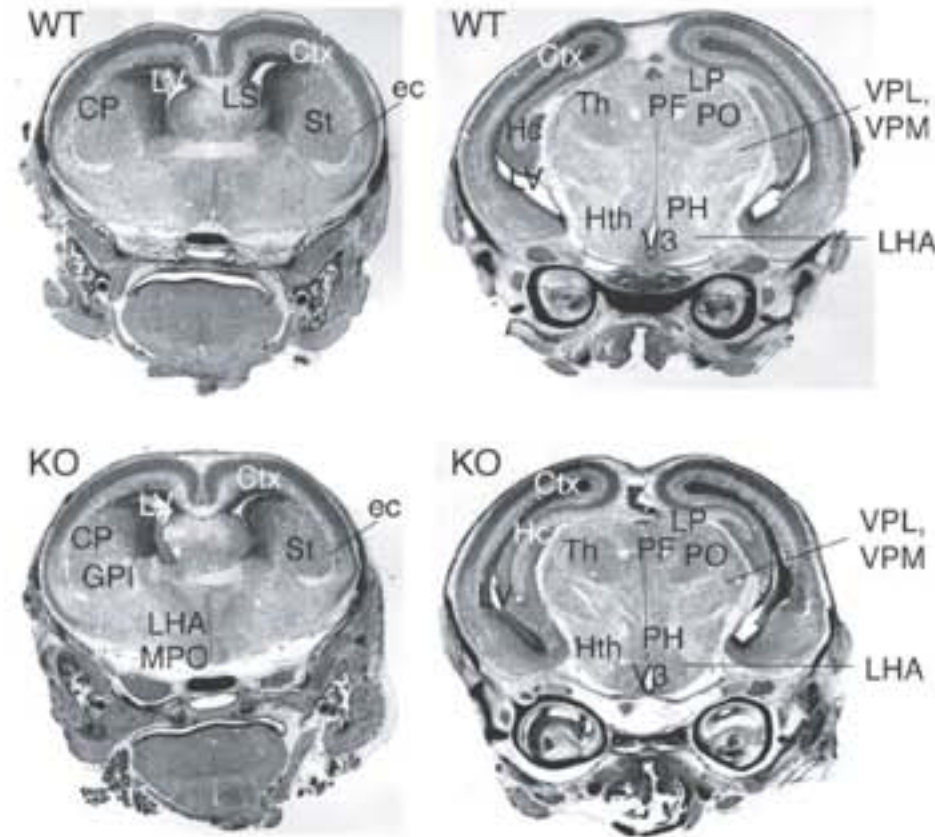
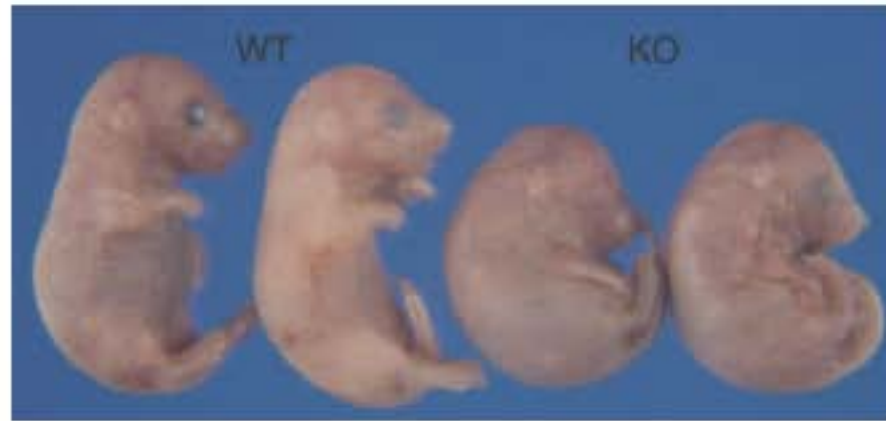
Protein	% of total SV proteins
Synaptophysin	$10.20 \pm 1.54^{(1,4)}$
Synaptobrevin 2	$8.60 \pm 1.55^{(1)}$
Syntaxin 1	$2.00 \pm 0.27^{(1,5)}$
SNAP25	$0.40 \pm 0.06^{(1,6)}$
Synapsins	6 ^(2,3)
Rab3A	2.5 ⁽²⁾
Synaptotagmin 1	7 ⁽³⁾
Synaptogyrin 1	0.5 ⁽²⁾
SV2	1.4 ⁽²⁾
SCAMP	0.3 ⁽²⁾
CSP	0.6 ⁽²⁾
VGLUT1	$5.36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



Fonction des protéines des VS

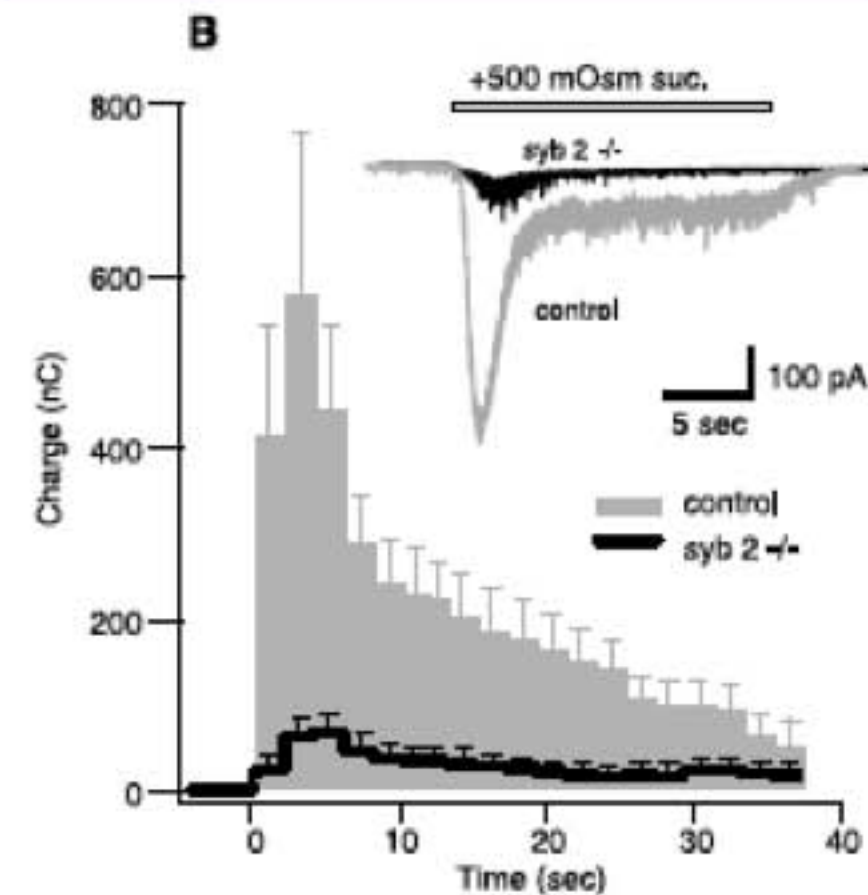
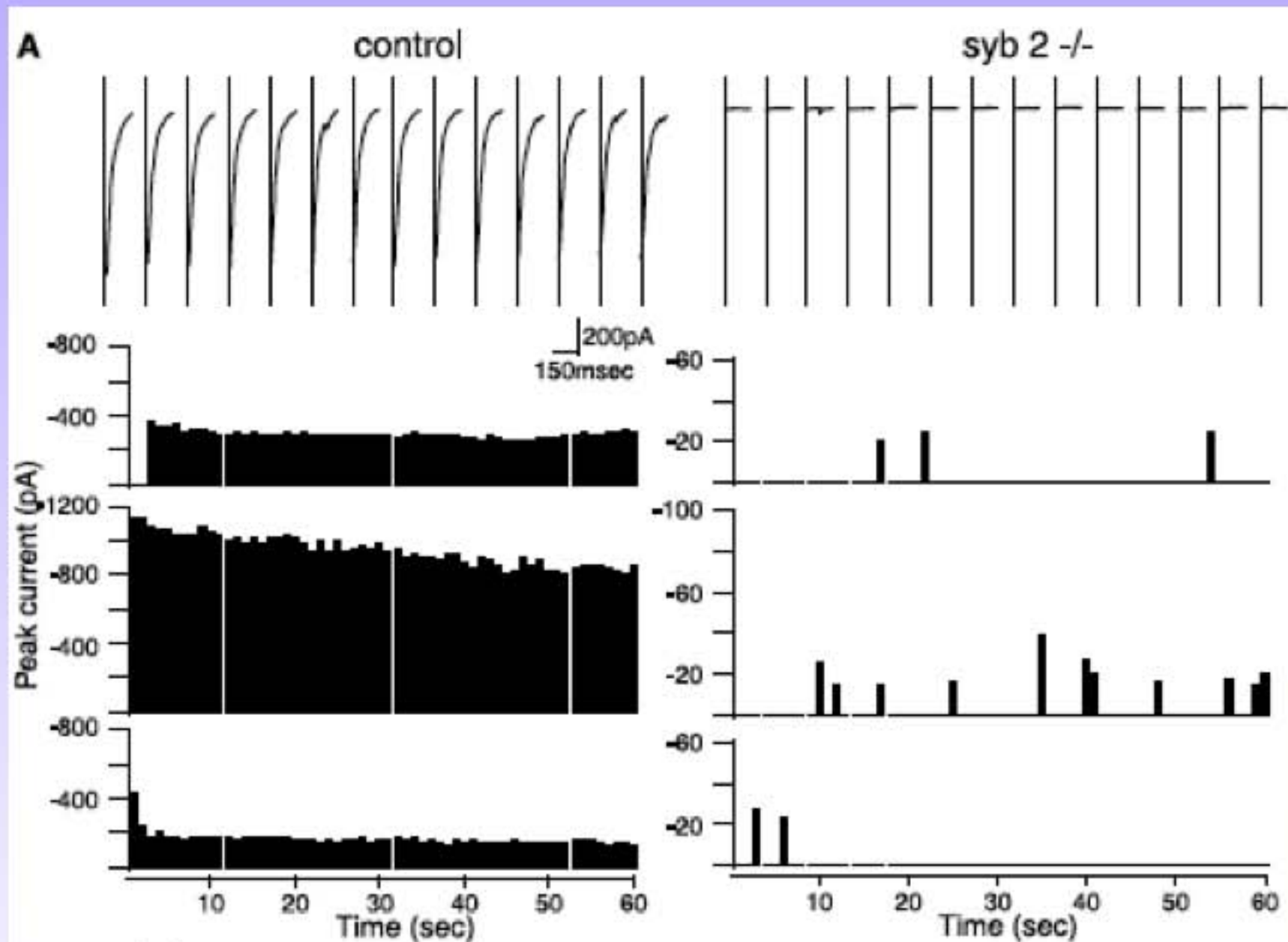


Synaptobrevin2 (Syb2) KO



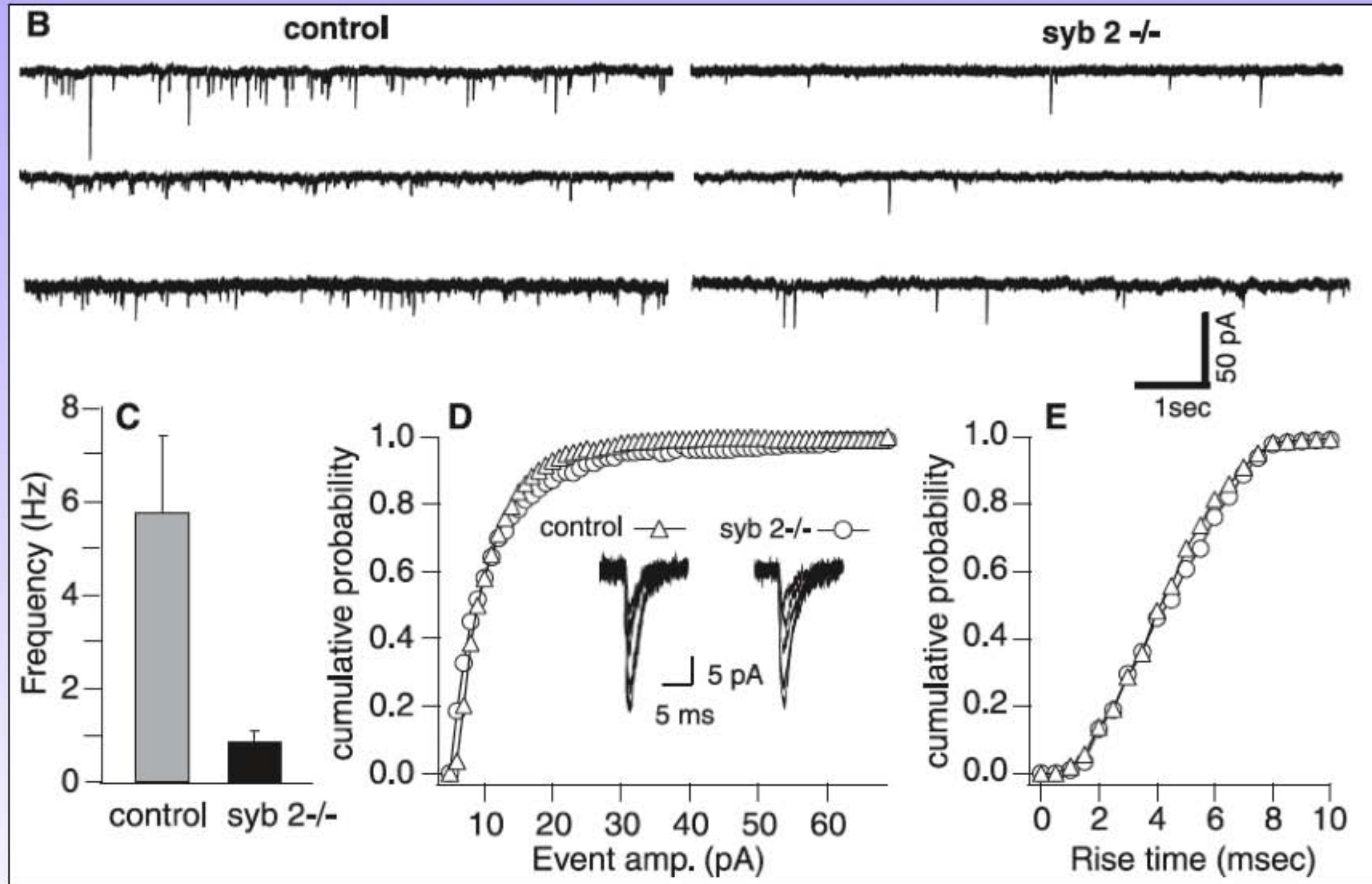
En l'absence de Syb2, les synapses sont toujours présentes, le cerveau se forme normalement mais les animaux meurent à la naissance.

Synaptobrevin2 (Syb2) KO



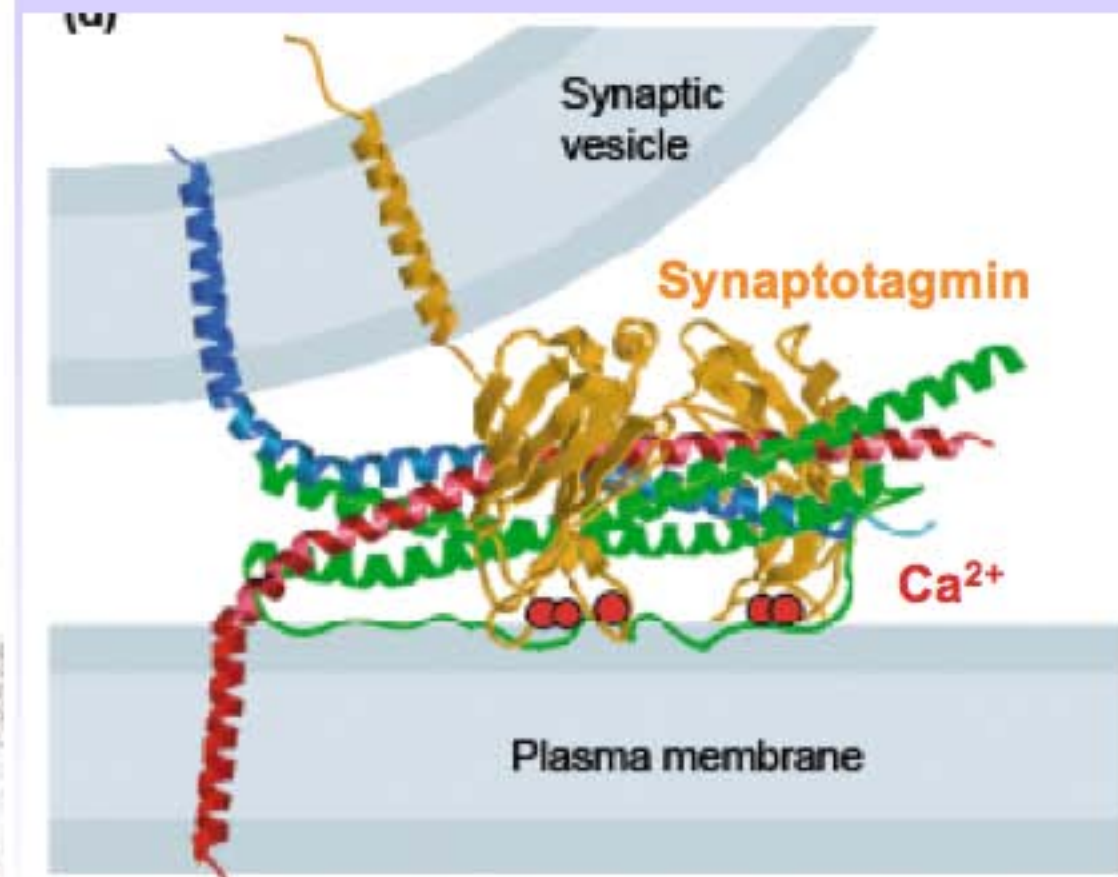
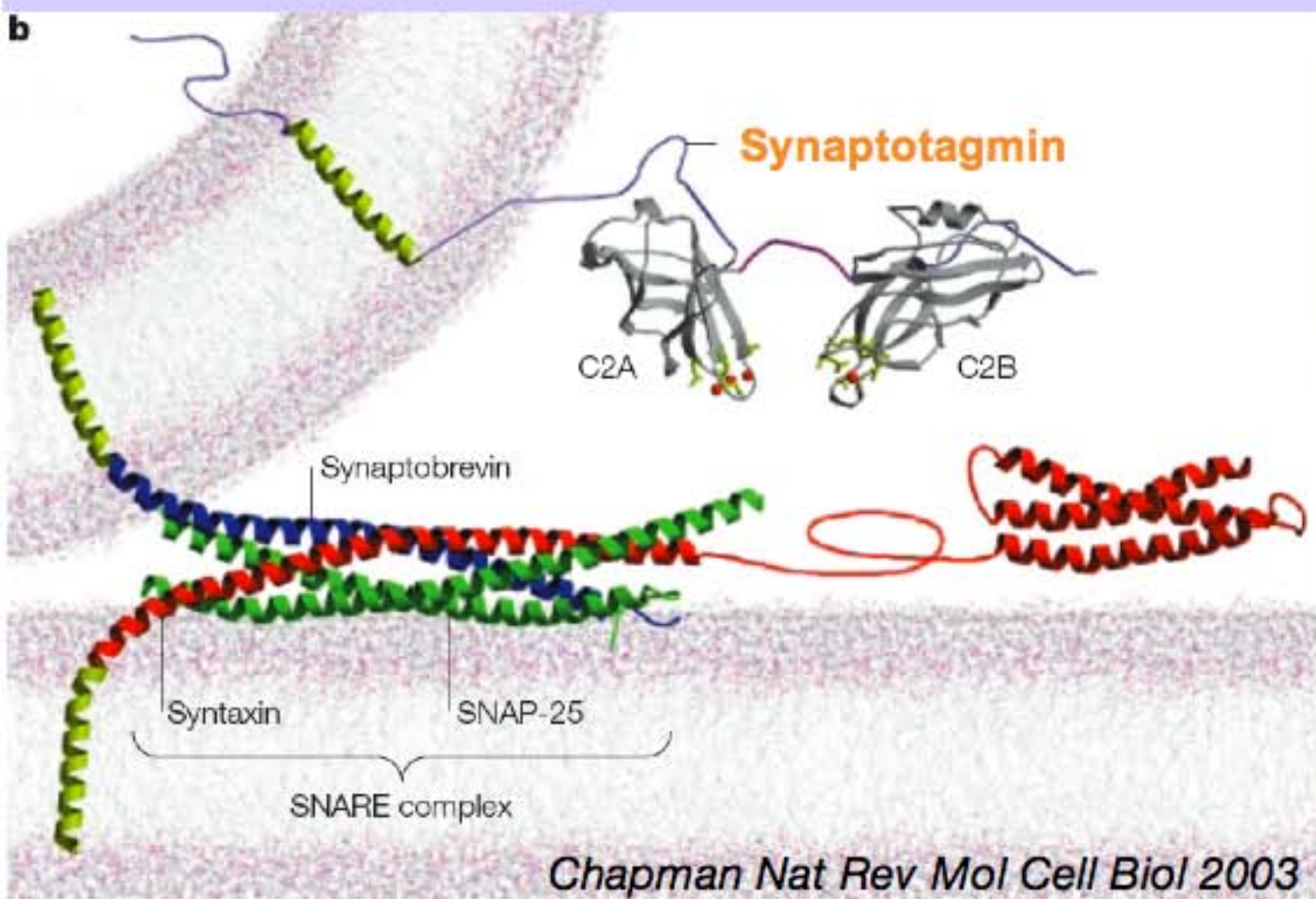
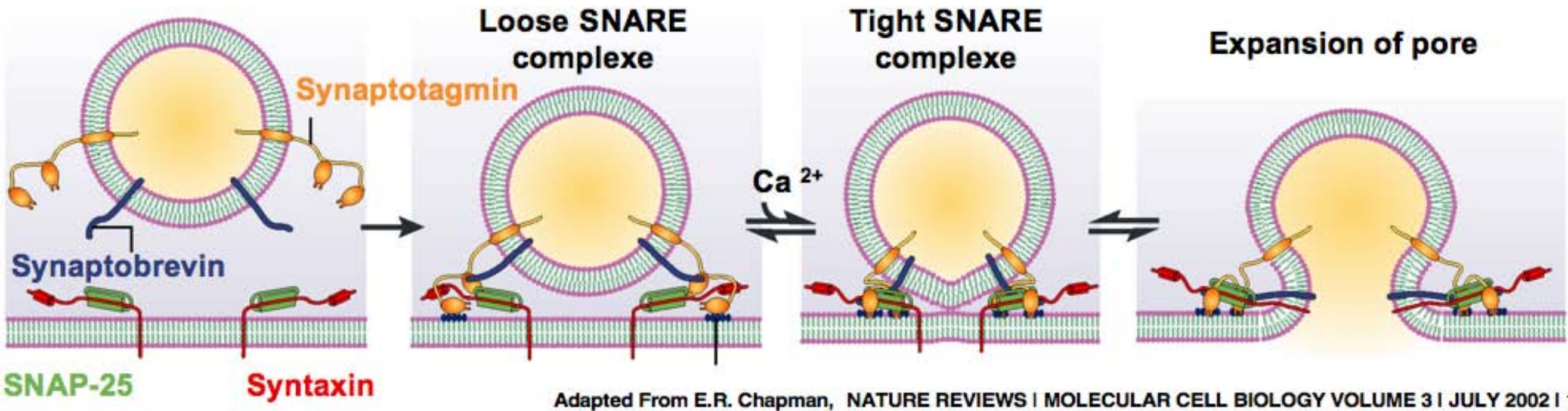
En l'absence de Syb2, la réponse évoquée est réduite d'un facteur 100.

Synaptobrevin2 (Syb2) KO

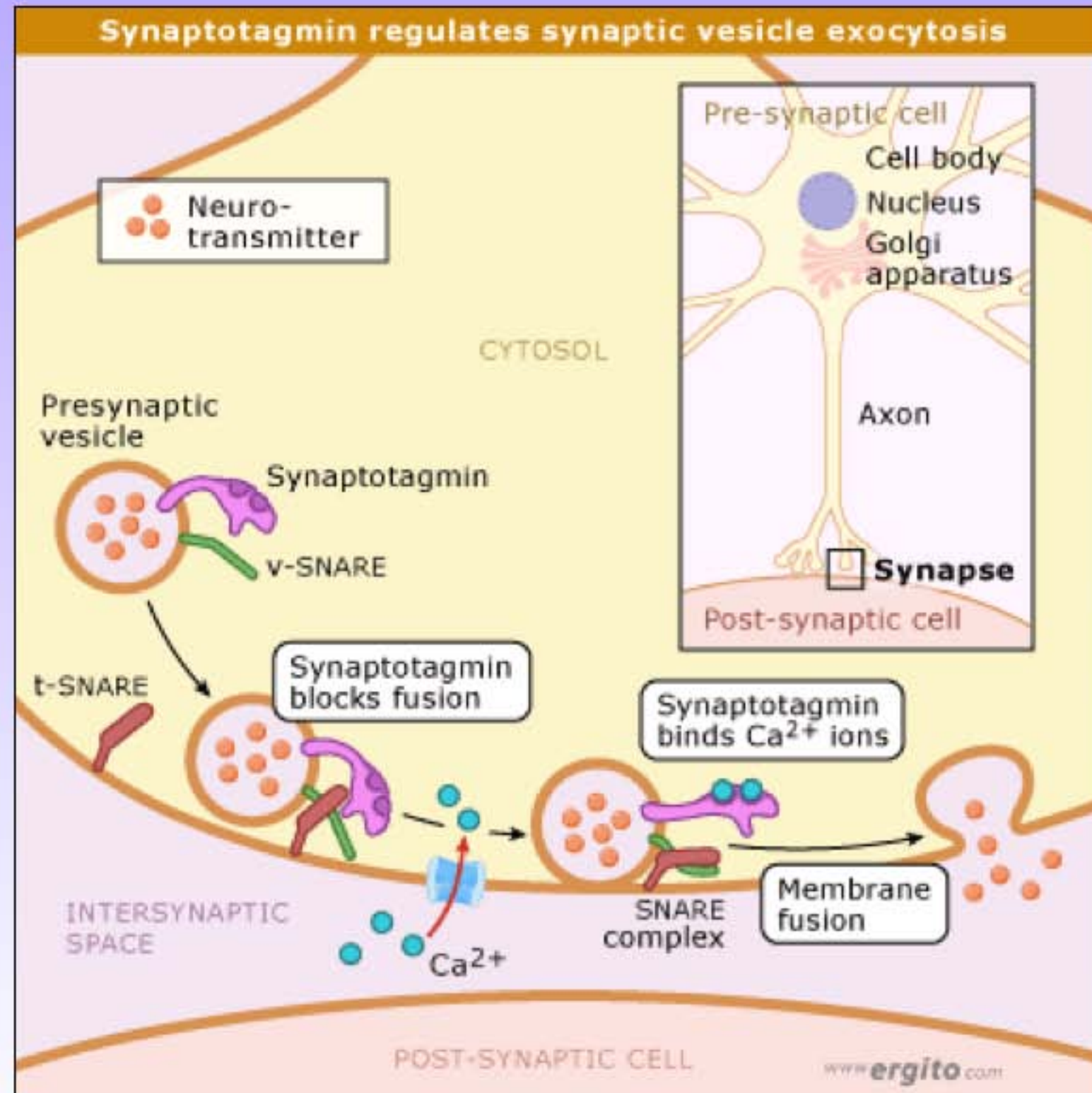
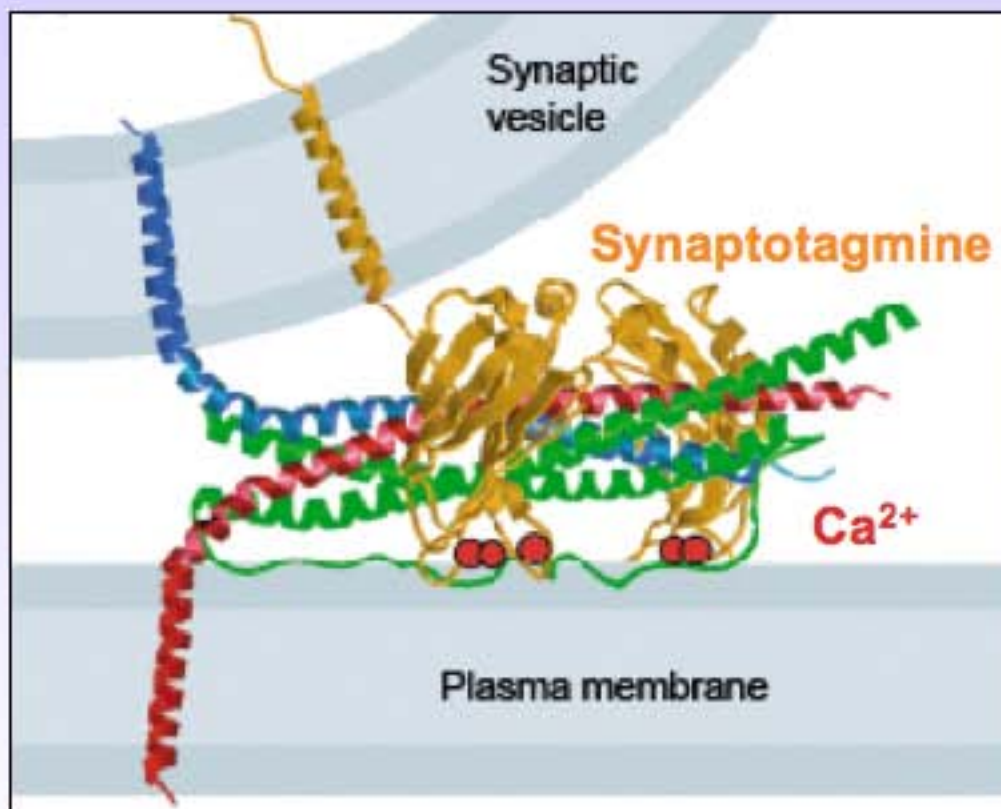
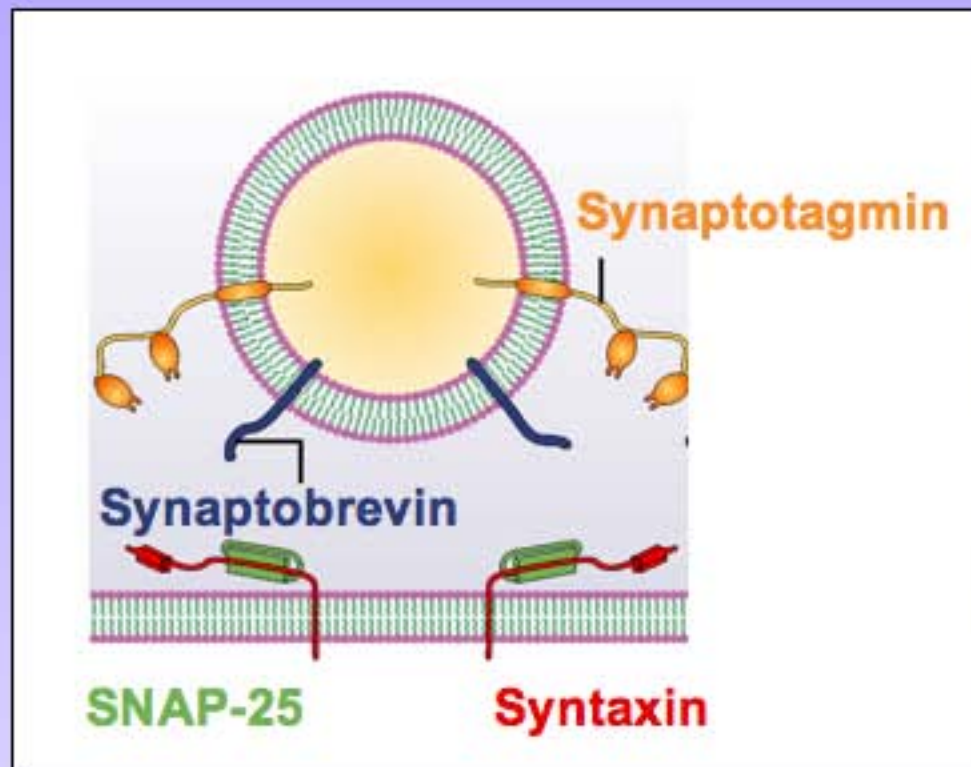


En l'absence de Syb2, la réponse spontanée est réduite d'un facteur 10.

Régulation de l'exocytose par la synaptotagmine



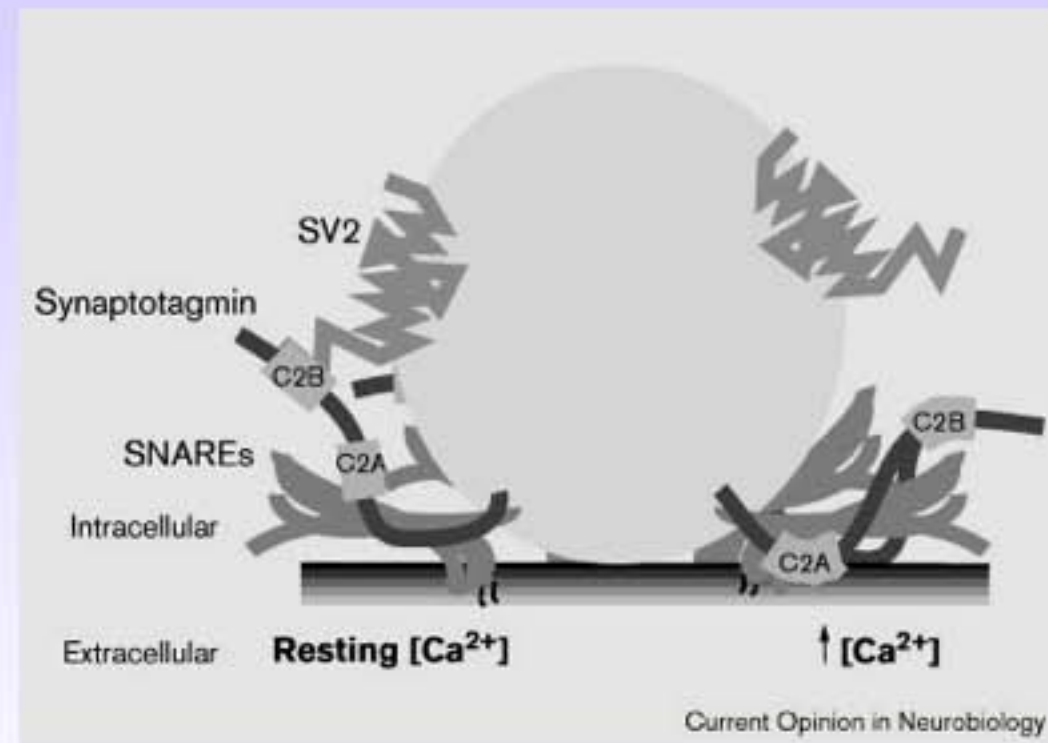
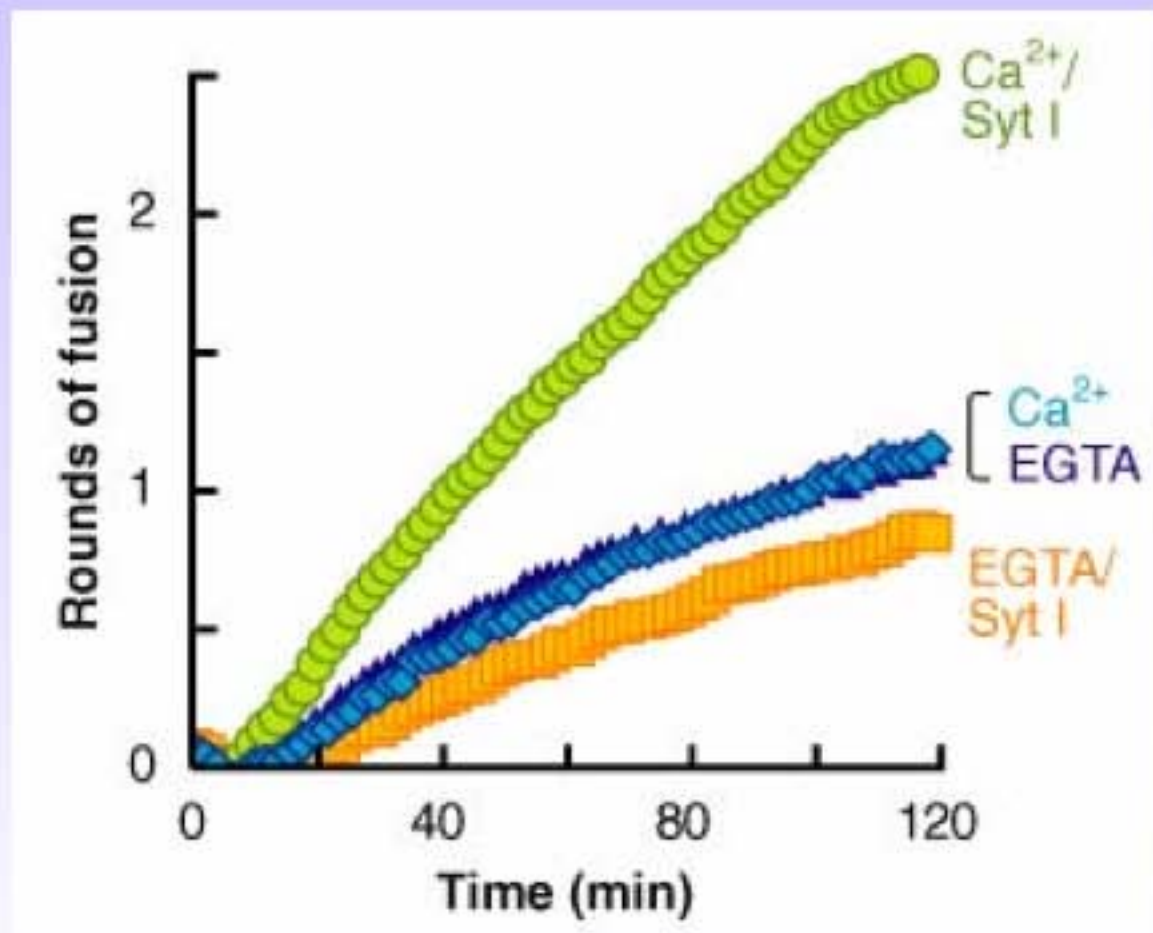
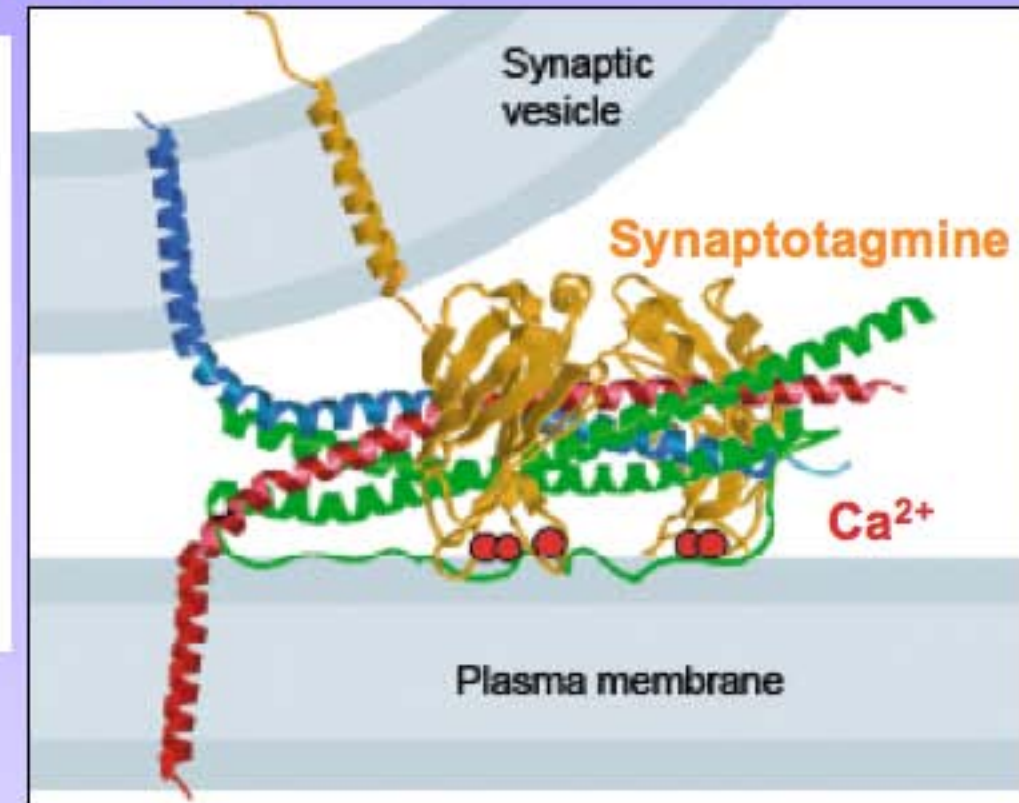
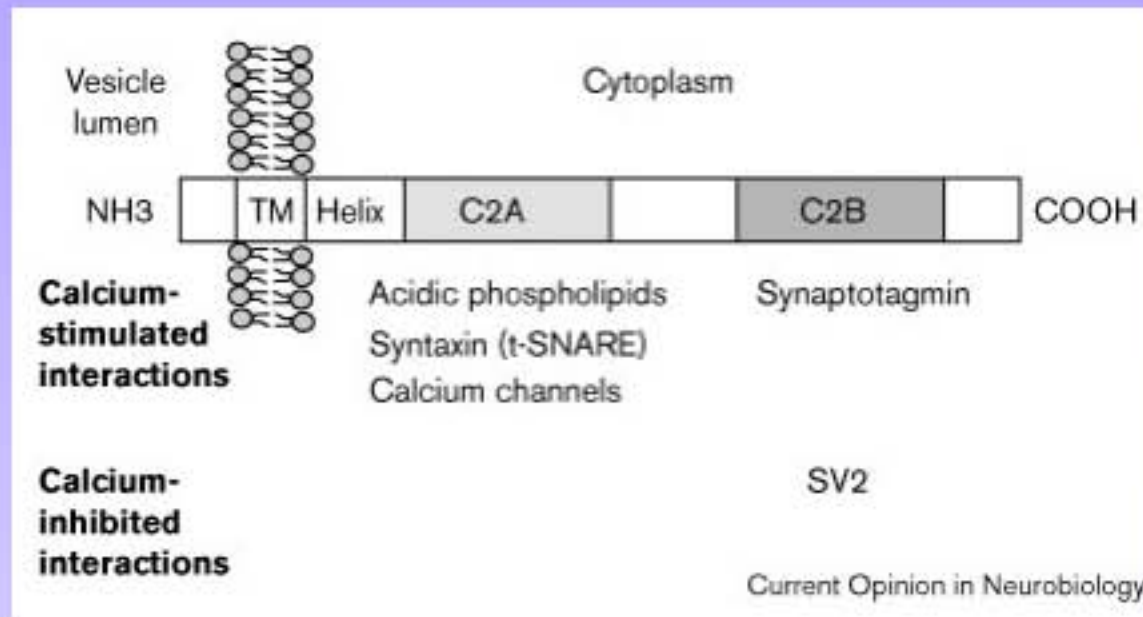
Régulation de l'exocytose par la synaptotagmine



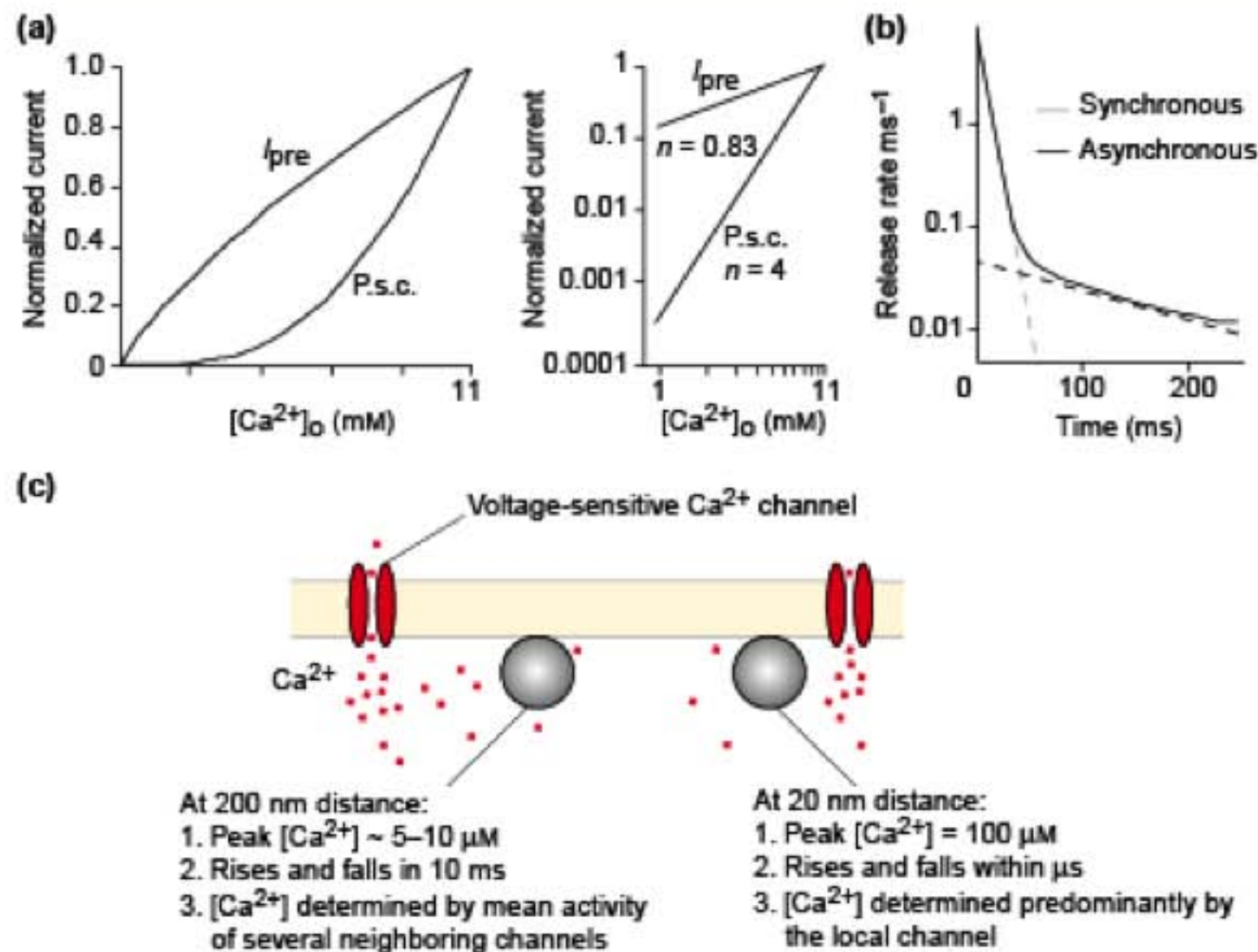
Régulation de l'exocytose par le calcium



Edwin Chapman



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].

Régulation de l'exocytose par différentes protéines

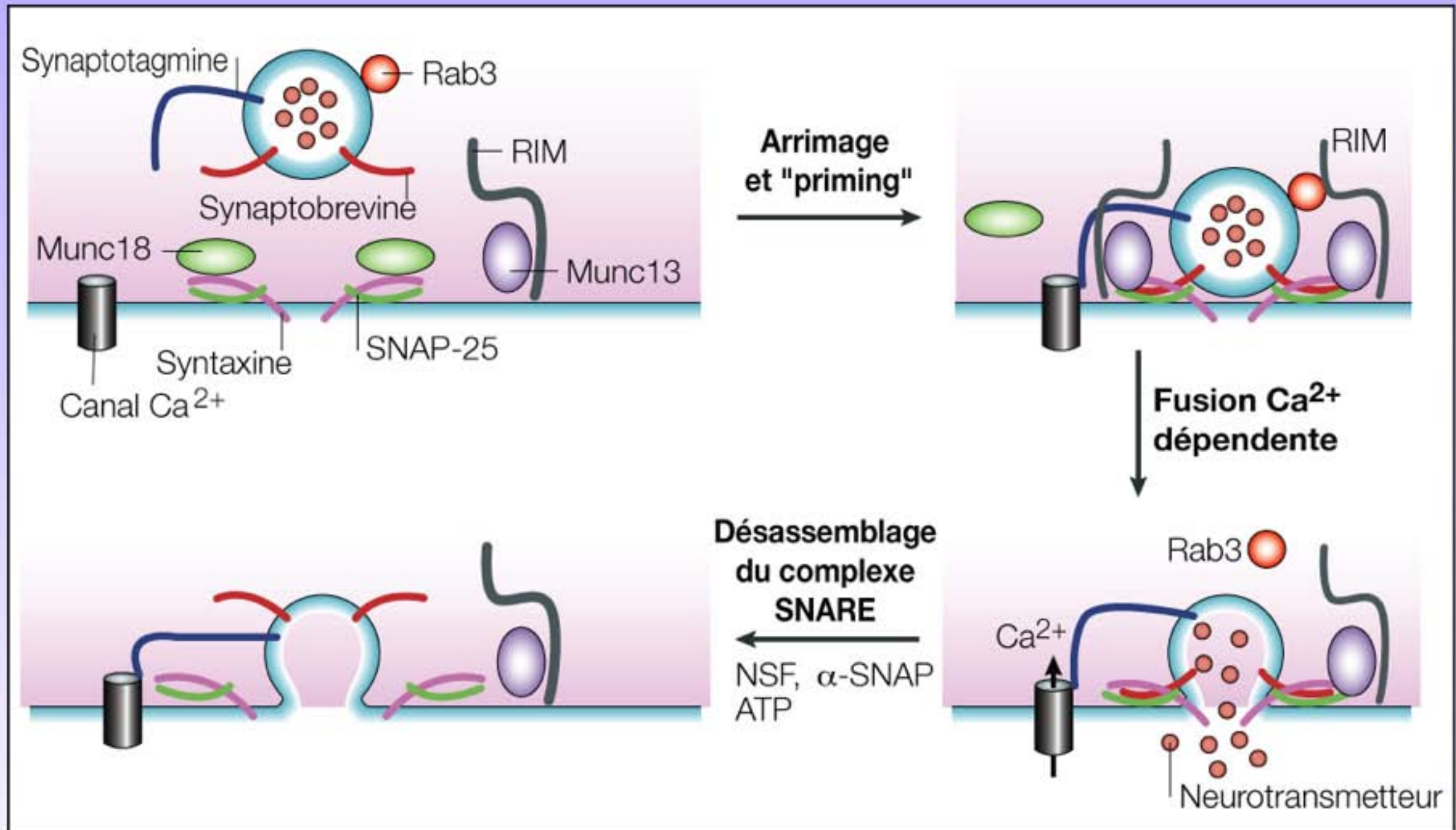


Diagram illustrating the formation of a SNARE complex during vesicle fusion.

Protein Domains and Residues:

- Synaptobrevin:** SNARE (red), TM (black), 116
- Munc18-1:** 1 (purple), 2 (purple), 3 (purple), 2 (purple), 592
- Syntaxin-1:** NTS (orange), Habc (orange), SNARE (yellow), TM (black), 288
- SNAP-25:** SNARE (green), SNARE (green), 206

3D Models:

- Syntaxin Syb2:** Orange and red ribbon model.
- SNAP-25:** Green ribbon model.
- Munc18:** Purple ribbon model.

SNARE Complex Assembly:

The diagram shows the sequential assembly of the SNARE complex on a vesicle membrane:

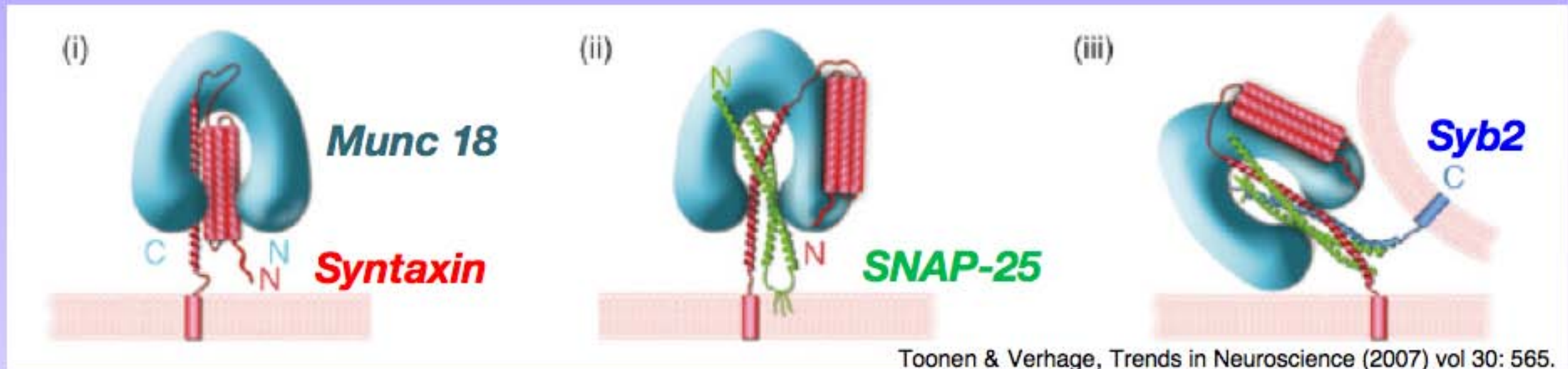
- Syntaxin and Syb2:** Initial state with Syntaxin and Syb2 on the vesicle membrane.
- SNAP-25 and Munc18 Join:** SNAP-25 and Munc18 join the complex.
- Complex Tightening:** The complex tightens, bringing the vesicle and target membranes closer.
- Vesicle Fusion:** The membranes fuse, releasing the vesicle contents.

Labels: Munc18, SNAP-25, Syntaxin, Syb2.

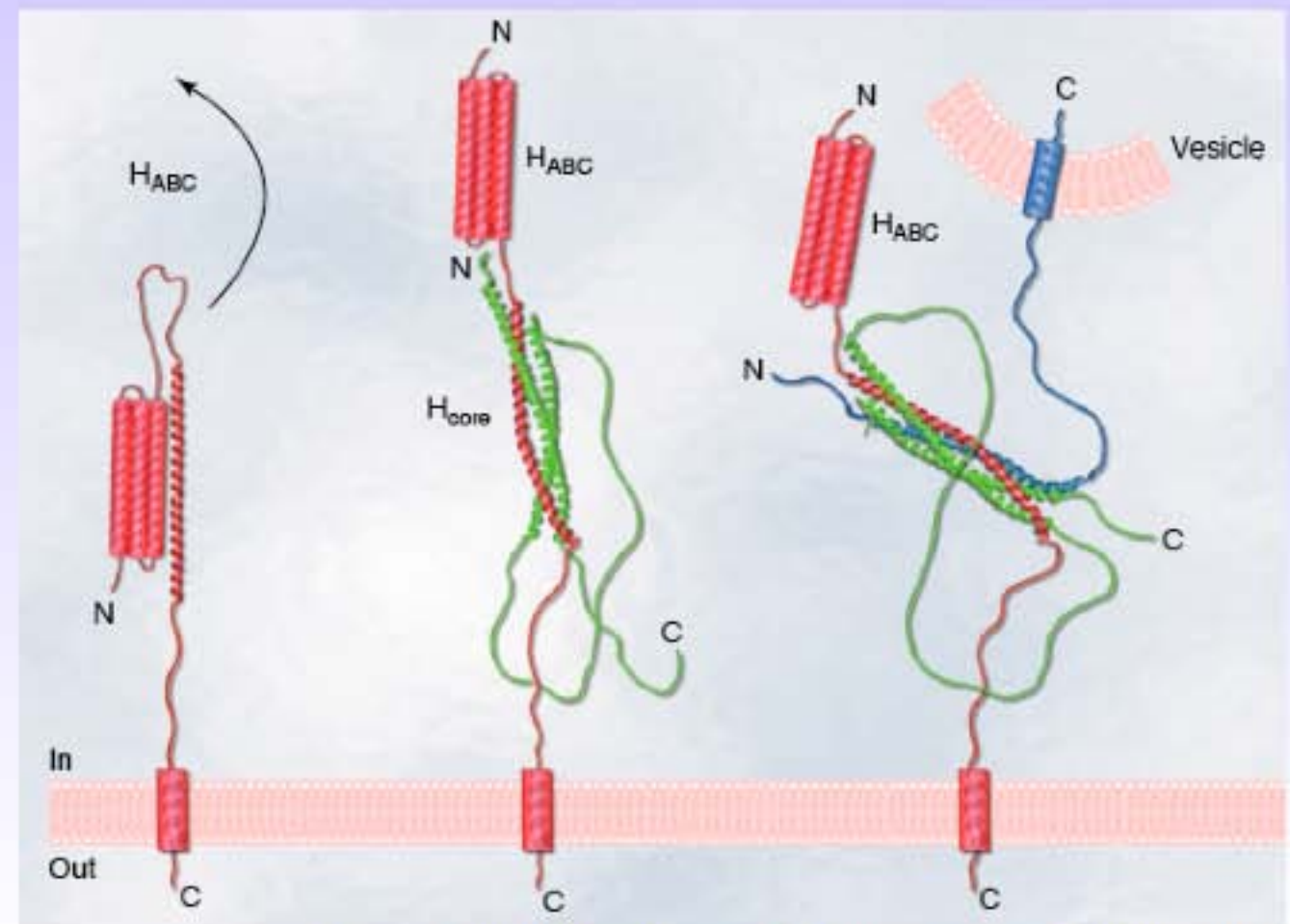
Munc 18 lie la syntaxine 1 ainsi que le complexe SNARE et promeut son assemblage en introduisant une vérification des couples de SNAREs (Peng & Gallwitz 2002).

Regulation par Munc18

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

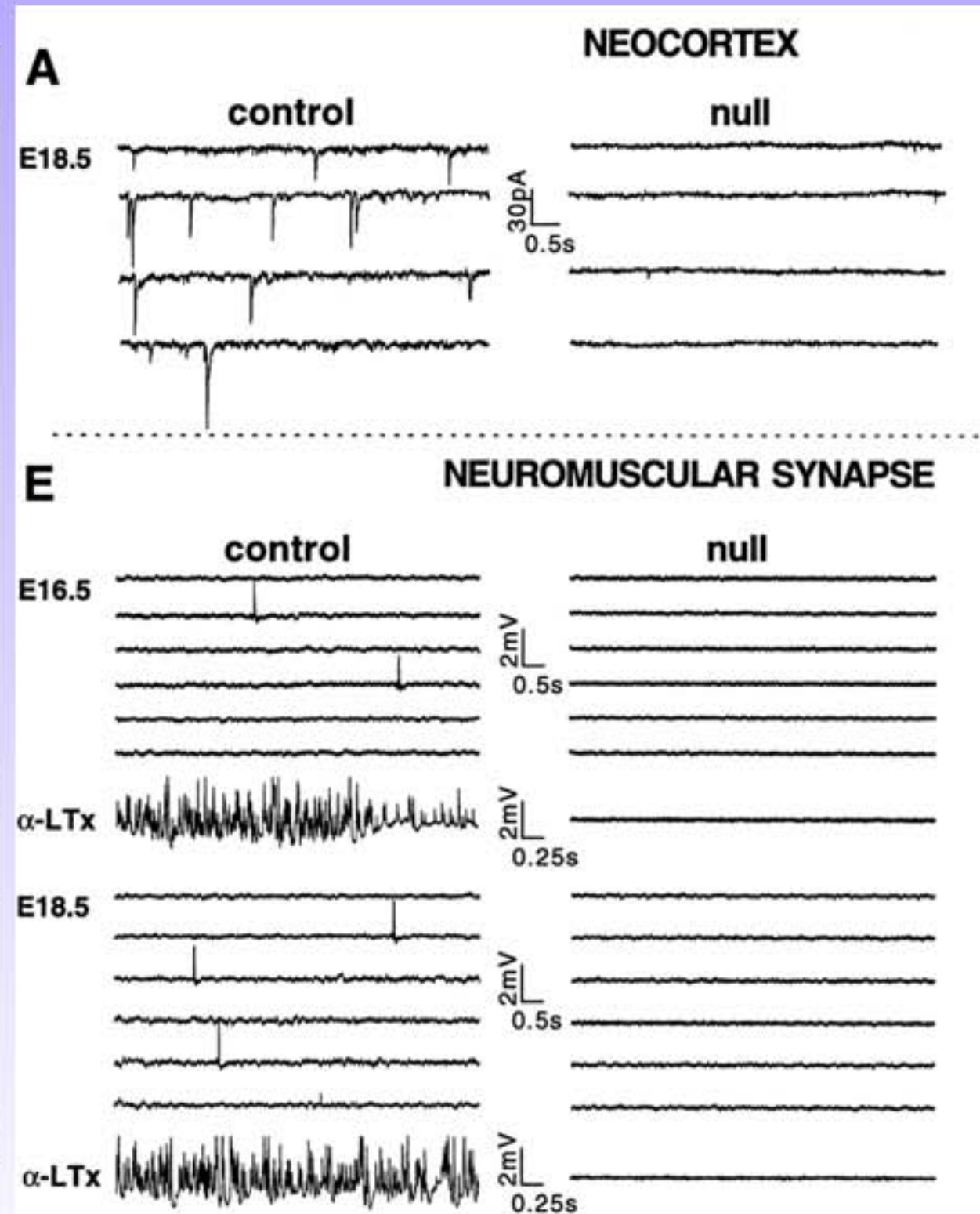
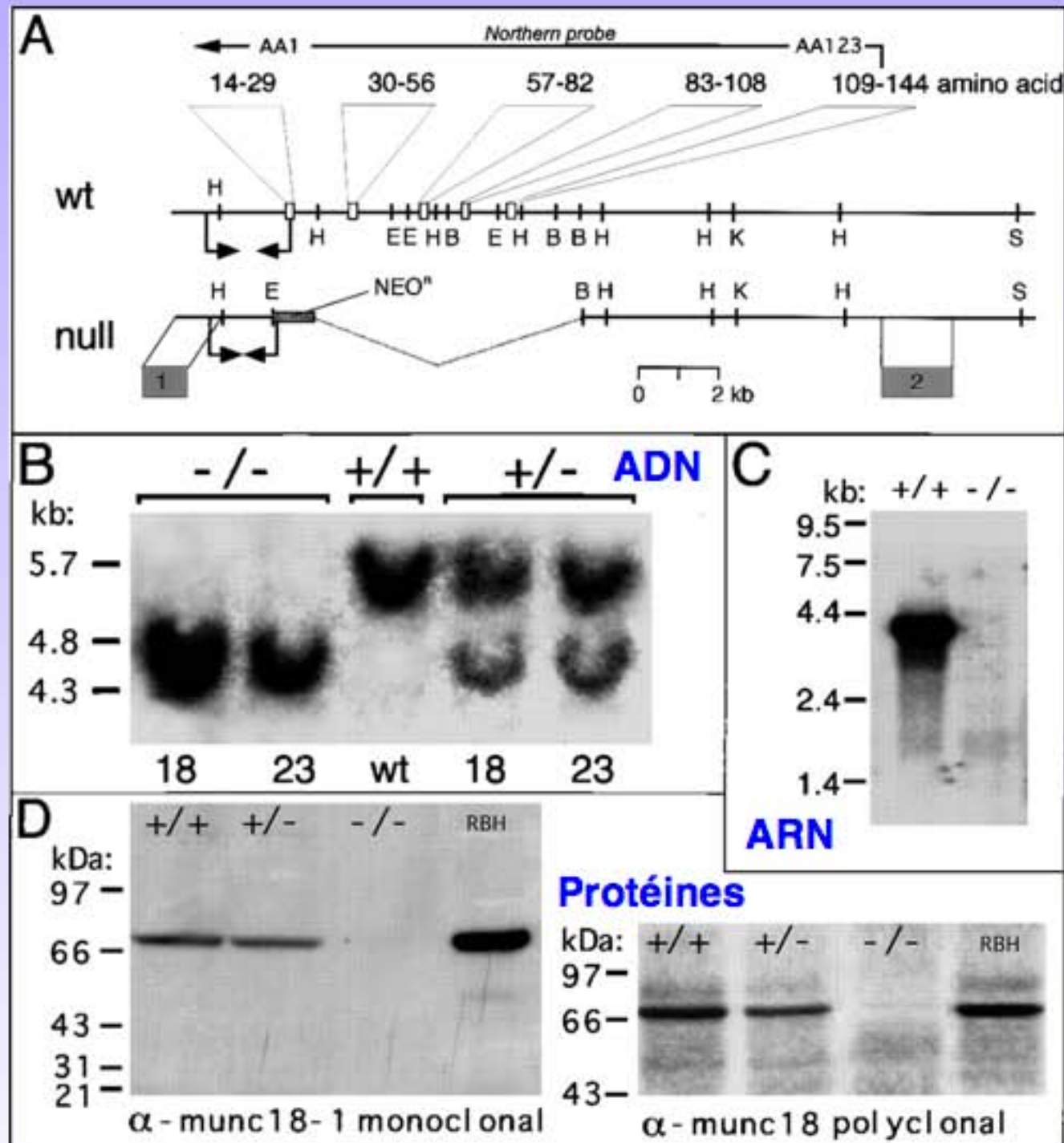


Ouverture de la syntaxine



Toonen & Verhage, Trends in Neuroscience (2003) vol 13: 177.

Munc18 KO

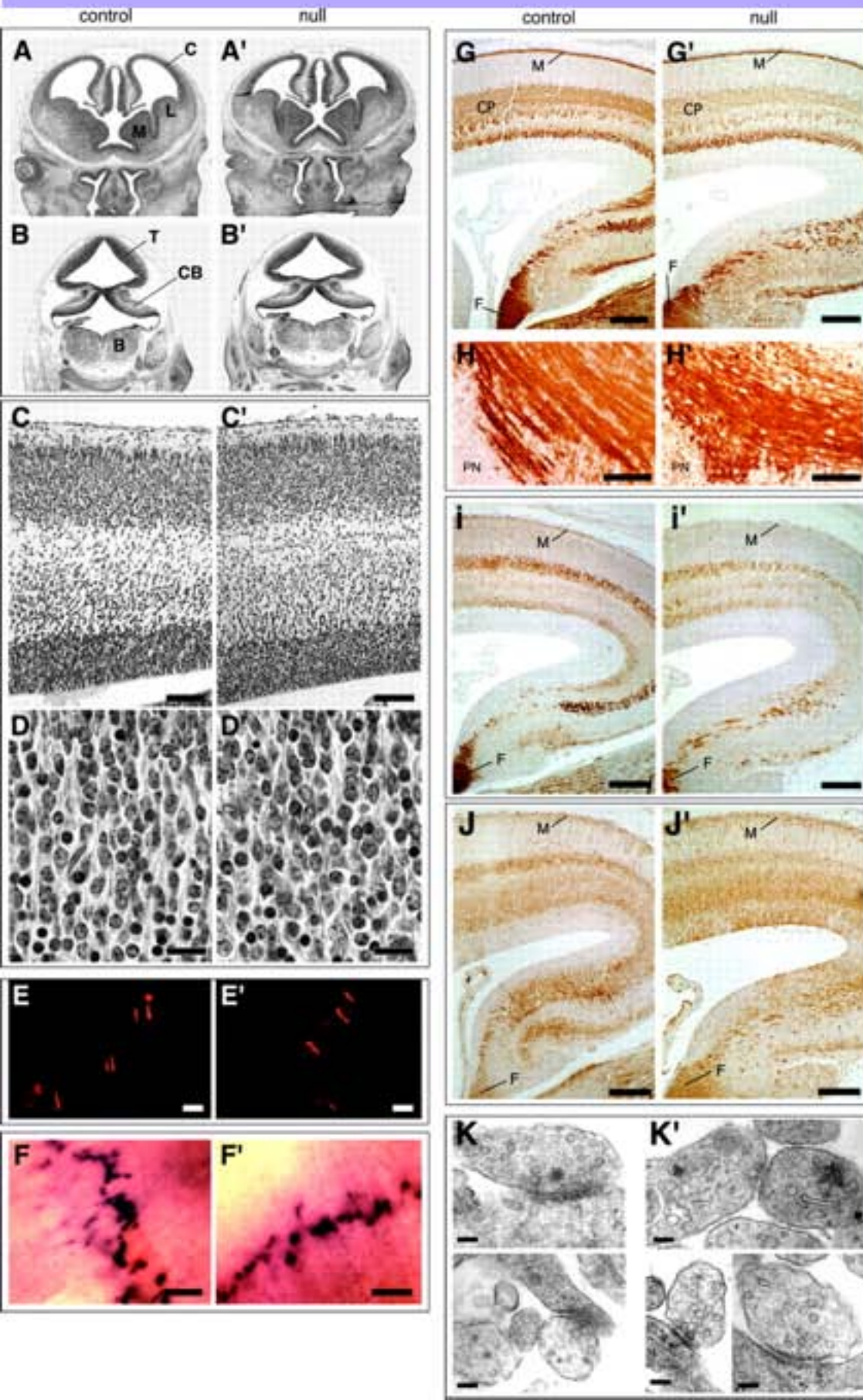


Les synapses sont totalement silencieuses:
pas de libération de neurotransmetteur.

Munc18 KO

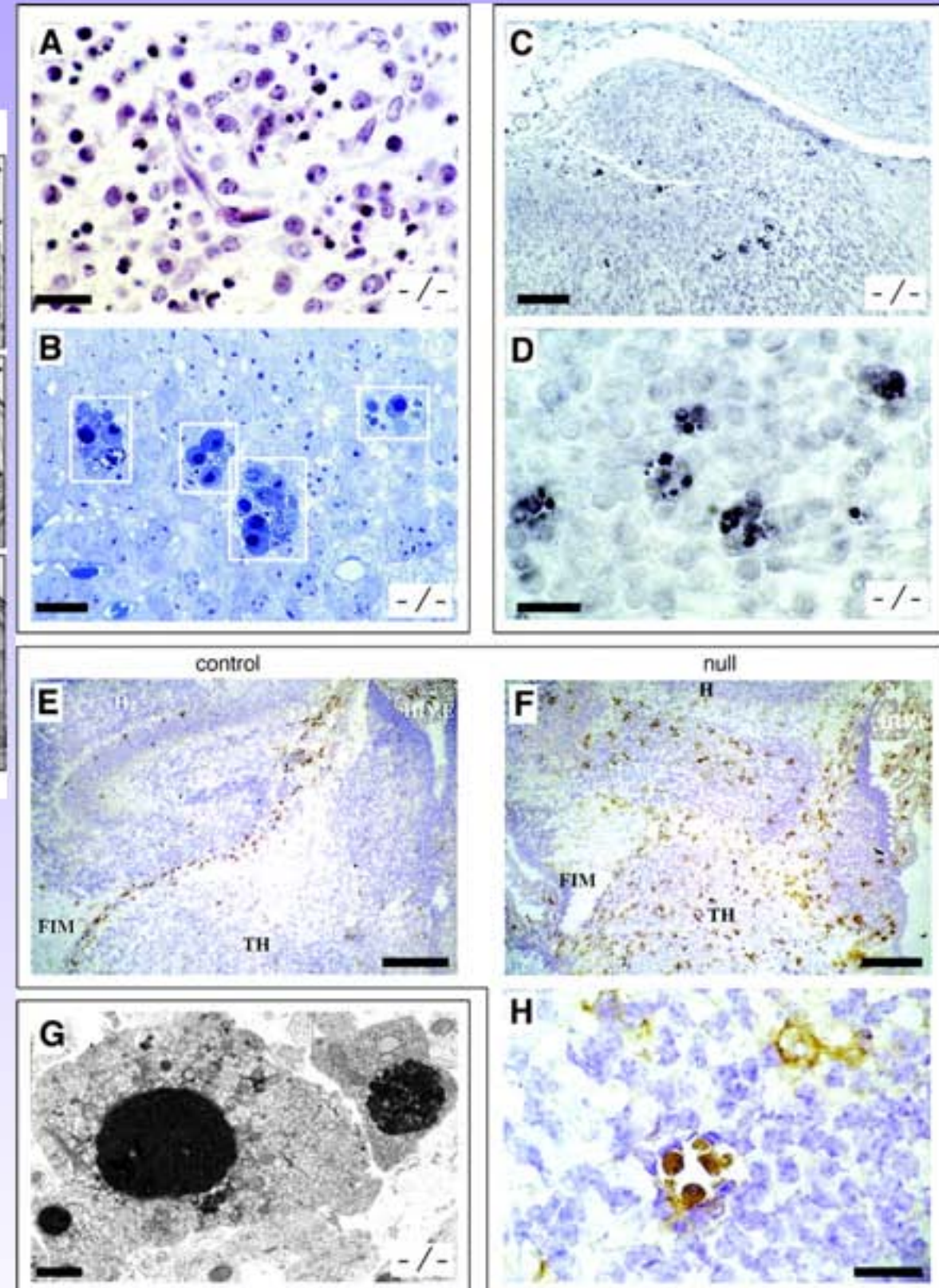
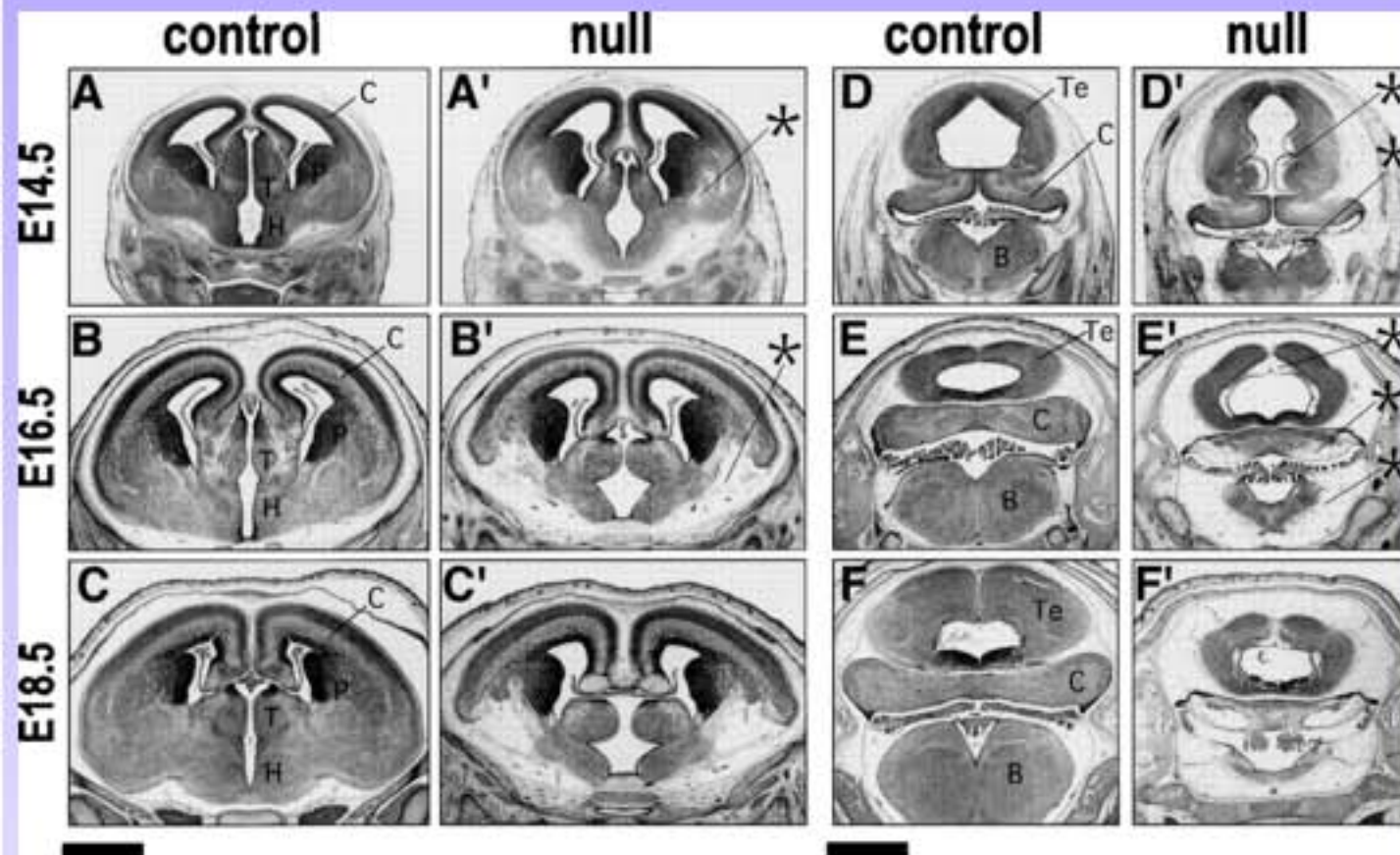


Matthijs Verhage



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

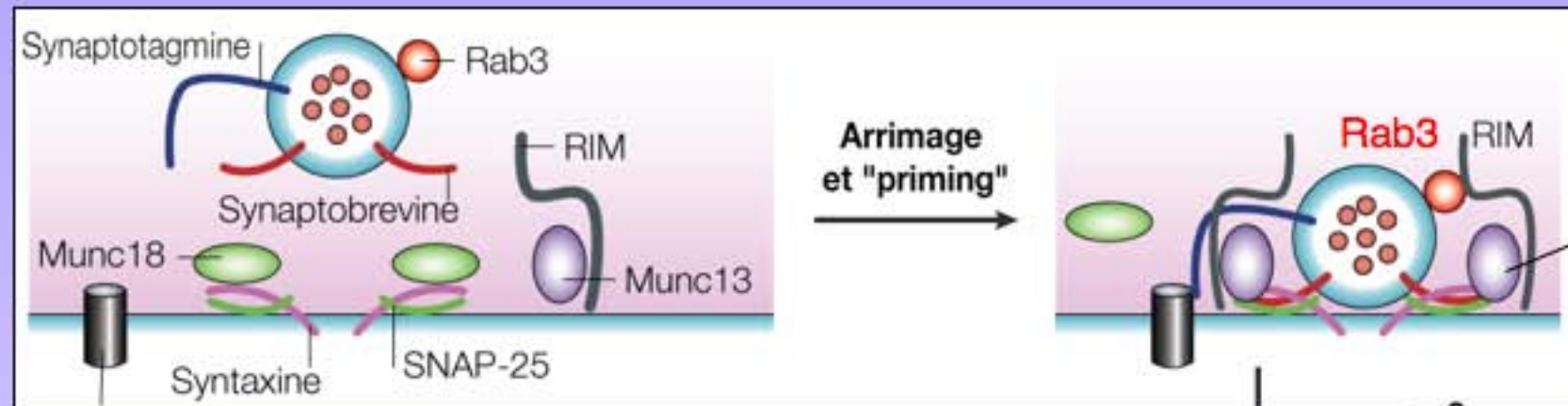


Par contre, après formation du système, les neurones subissent une apoptose massive suivi d'une dégénérescence massive (marquée d'une *).

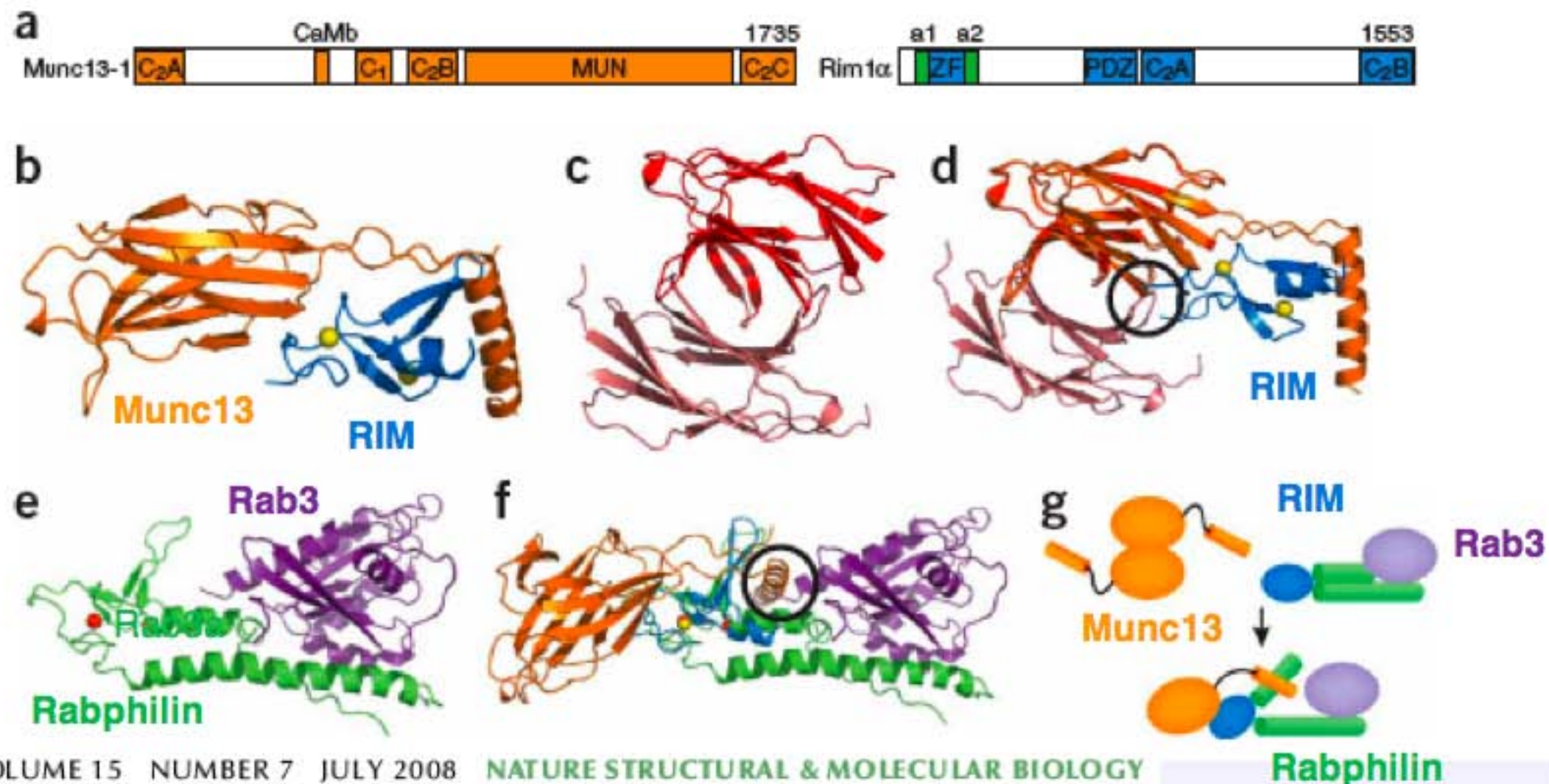
Conclusion: La connectivité synaptique ne dépend pas de la sécrétion de NT, mais la maintenance du système nécessite la sécrétion de neurotransmetteurs.

Apoptose massive après la synaptogenèse.

Régulation par Munc13



Munc13



VOLUME 15 NUMBER 7 JULY 2008 NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY

Munc 13 est essentiel pour le priming. Le double KO Munc 13/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

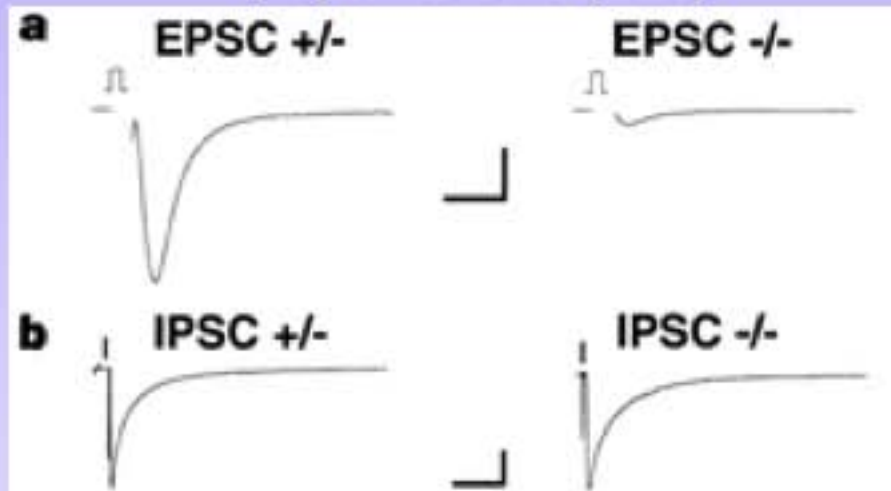
Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles.

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

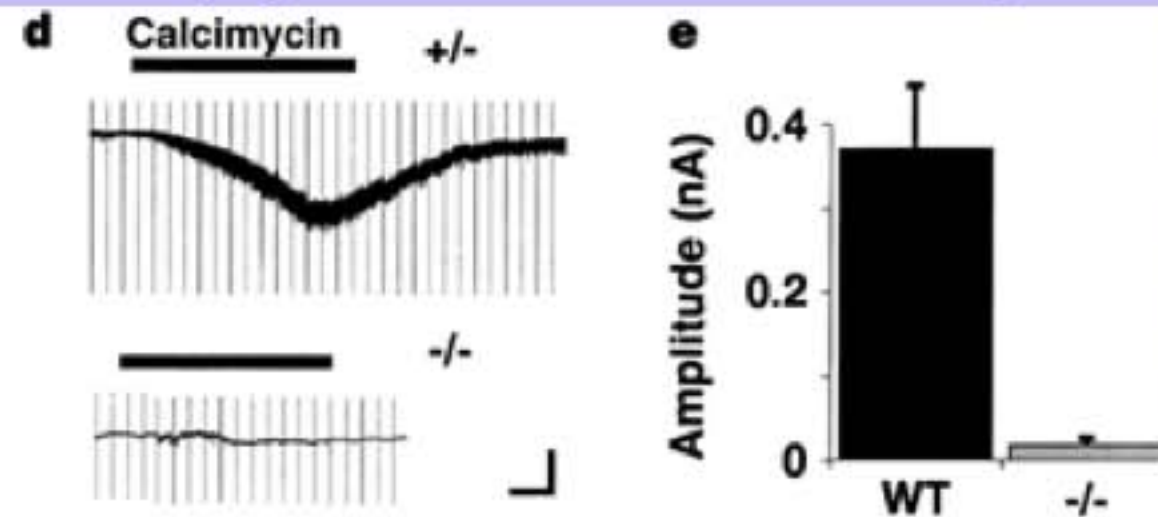


Nils Brose

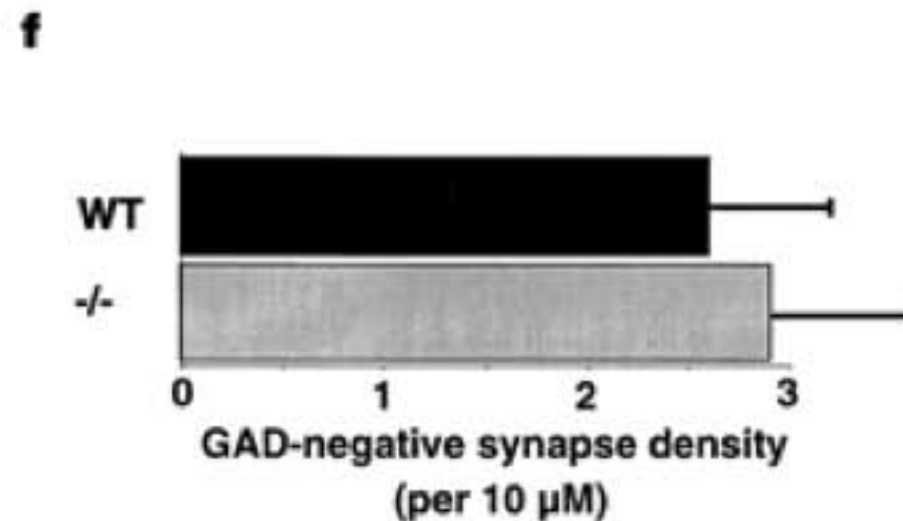
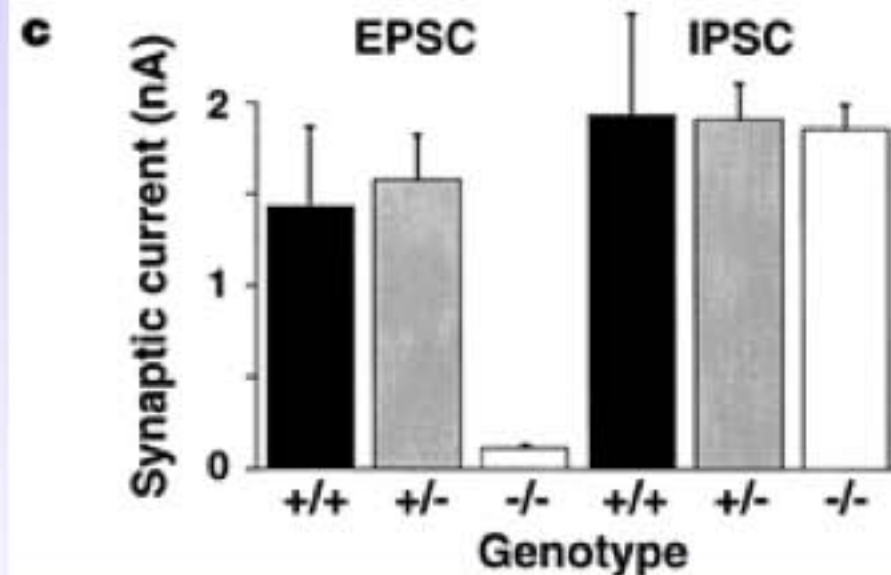
**Stimulation par potentiel d'action
(réponse évoquée)**



**Stimulation par ionophore calcique
(augmente le calcium intracellulaire)**

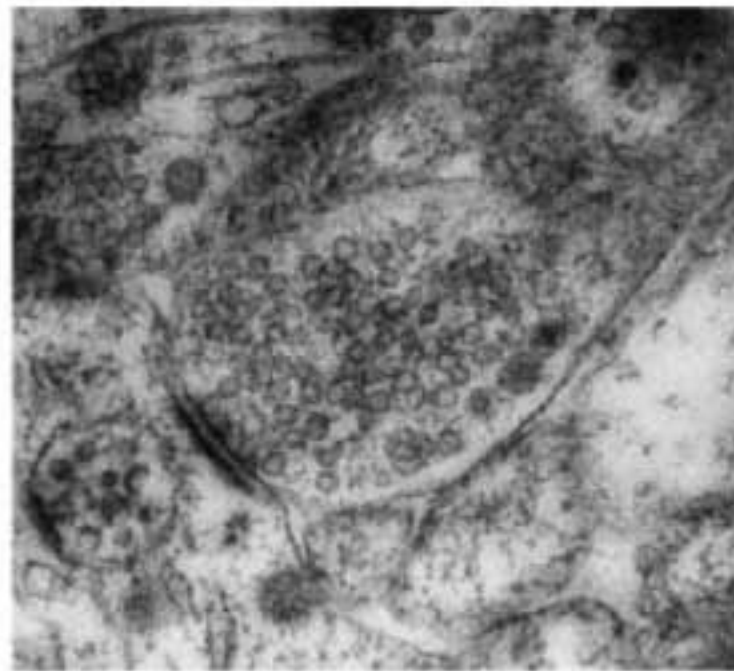


Calcimycin:
Ionophore calcique
qui déclenche la
libération des NT.

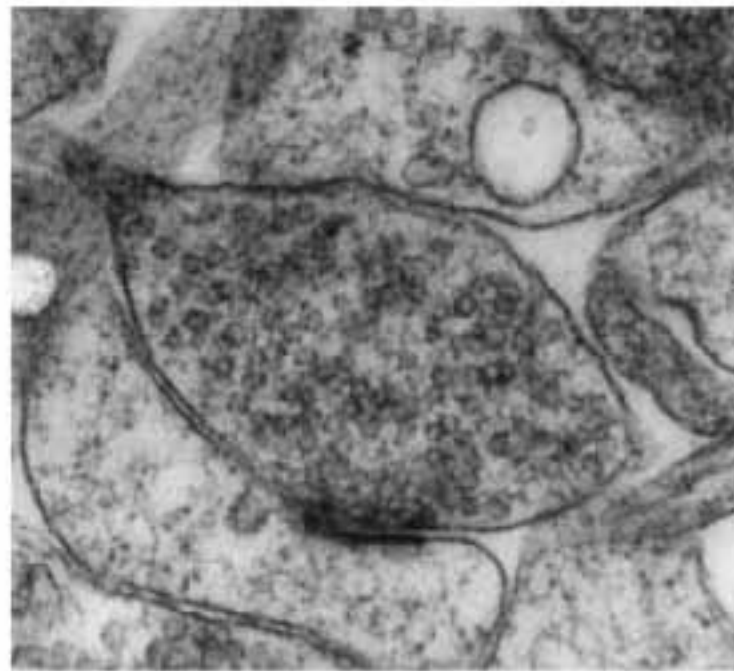


La libération des NT est bloquée dans les synapses glutamatergiques: on ne peut ni la déclencher par des potentiels d'action, ni par des ionophores calciques. Les synapses inhibitrices ne sont pas atteintes.

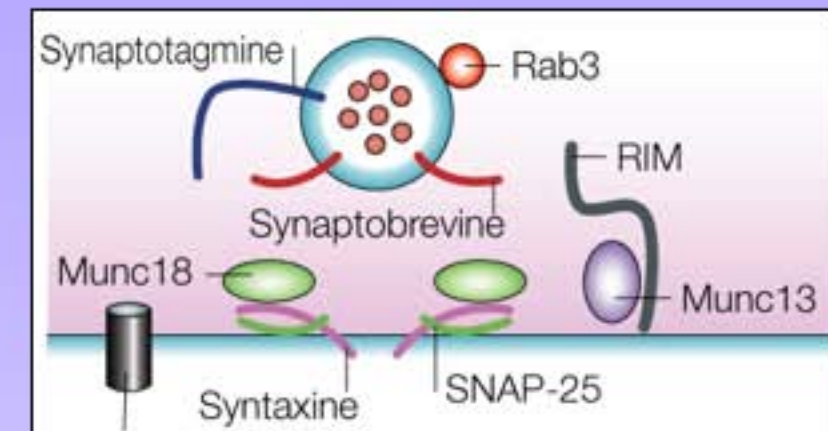
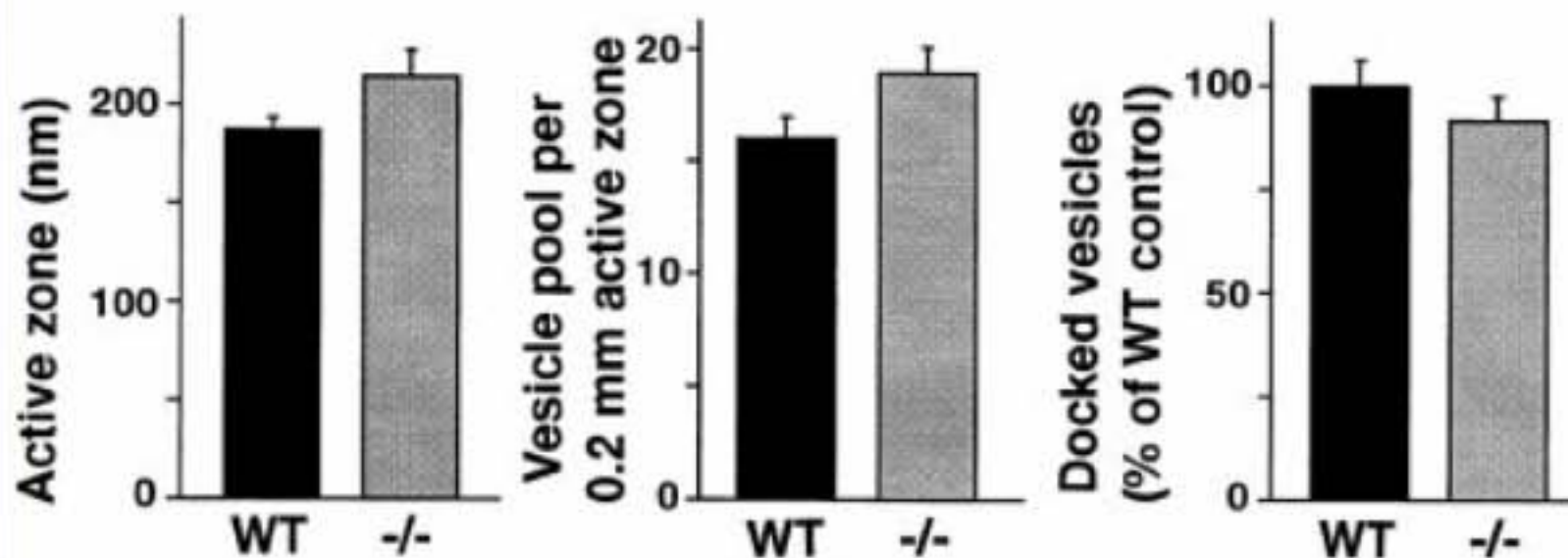
Munc13 KO



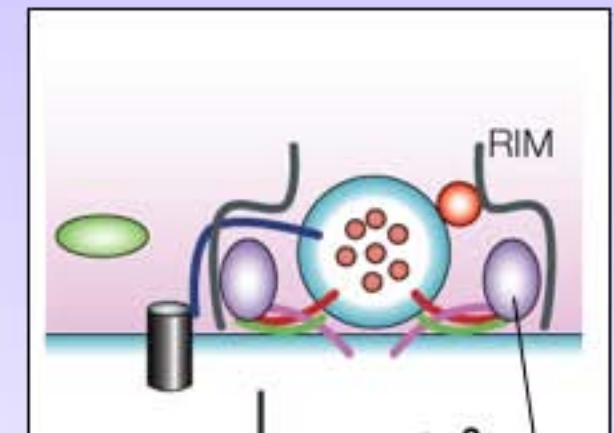
+/+



-/-



**Docking
& priming**

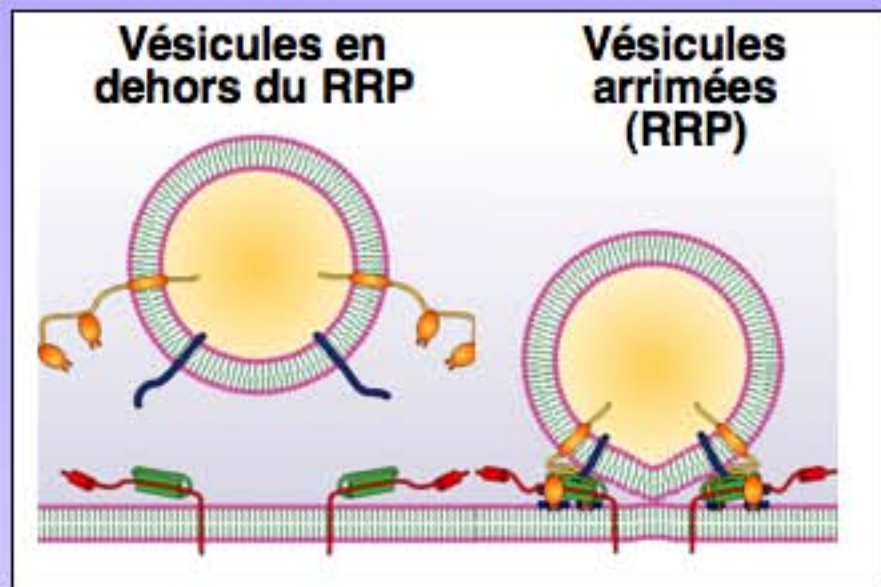


Munc13

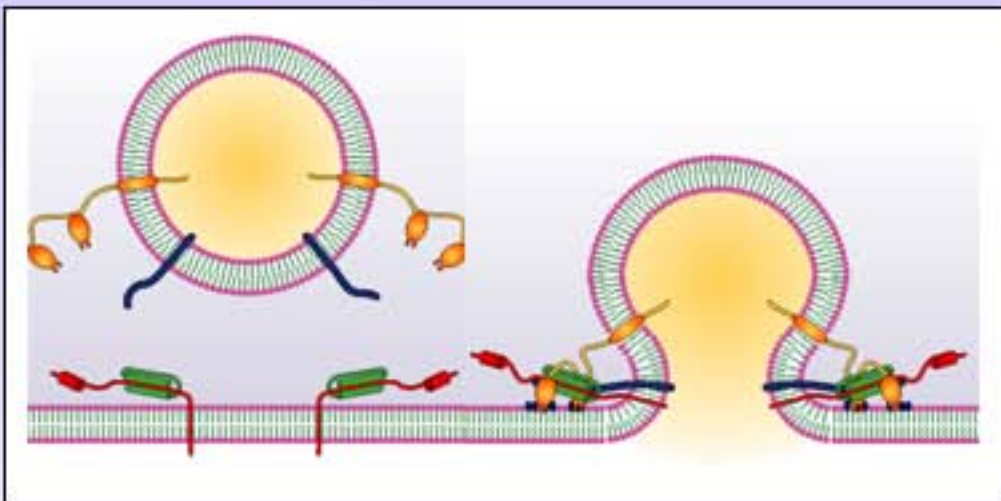
Les neurones d'hippocampe de souris KO Munc13-1 forment des synapses normales au niveau ultra structurales. En l'absence de munc13, la formation du RRP est compromise, le priming est donc altéré dans les synapses excitatrices. Les synapses inhibitrices ne sont pas atteintes.

Munc13 KO

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

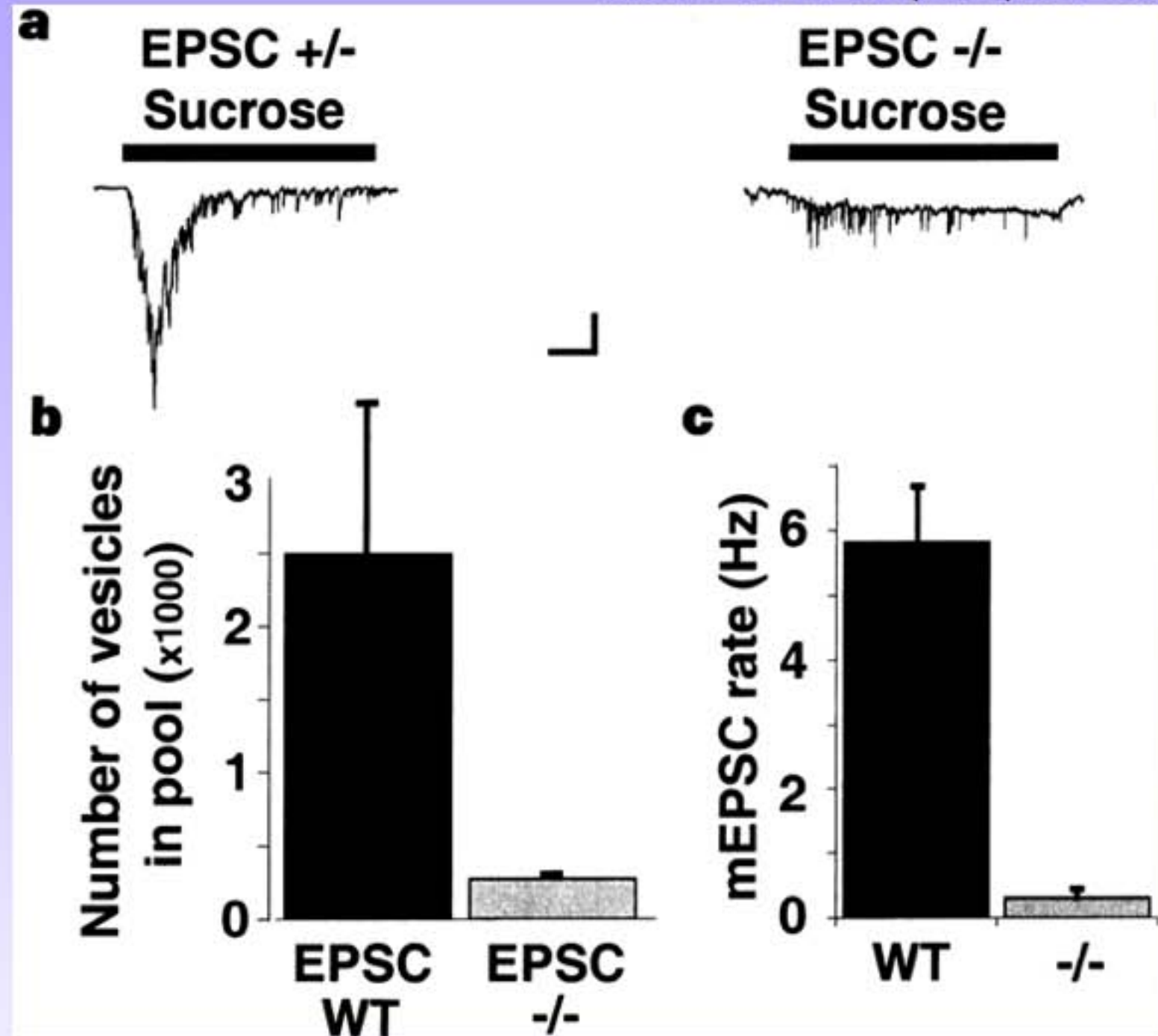


+ sucrose



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.

Régulation de l'exocytose

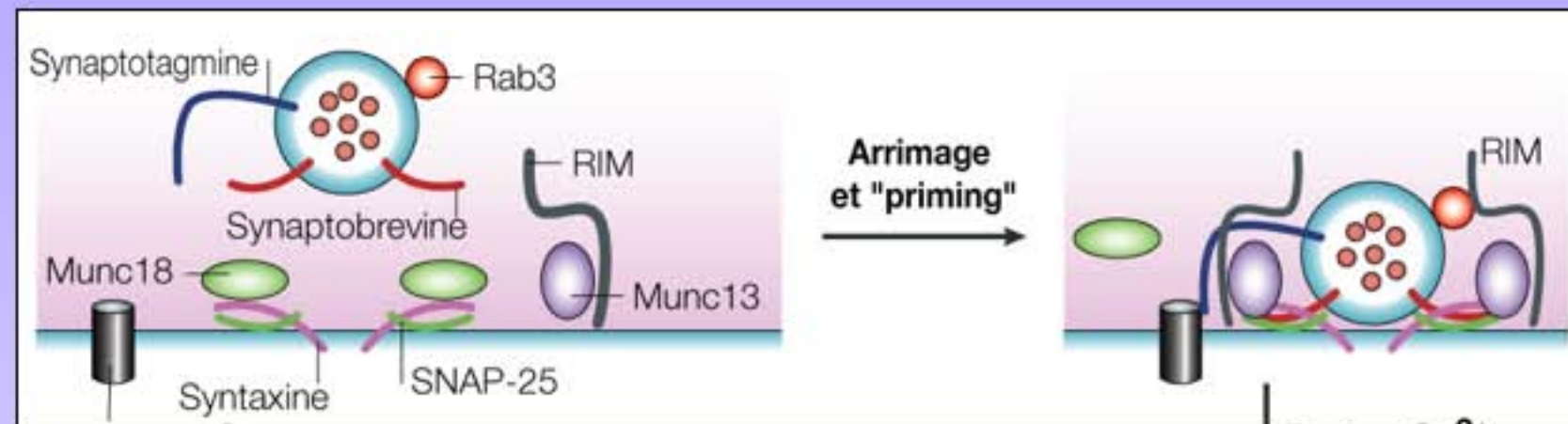
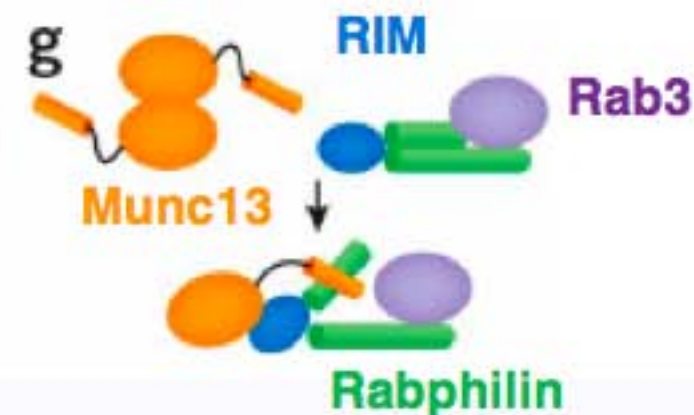
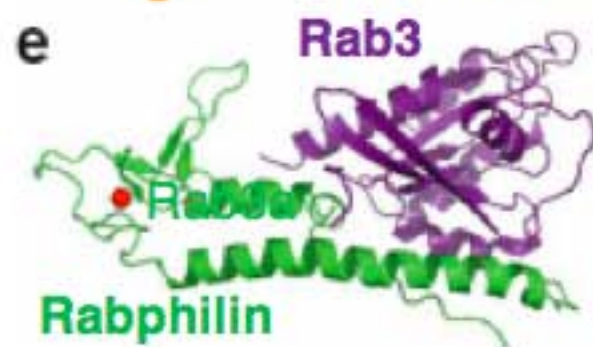
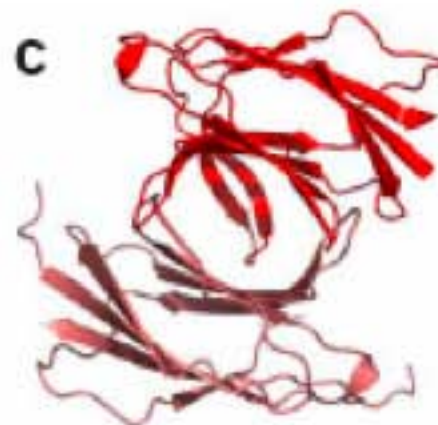
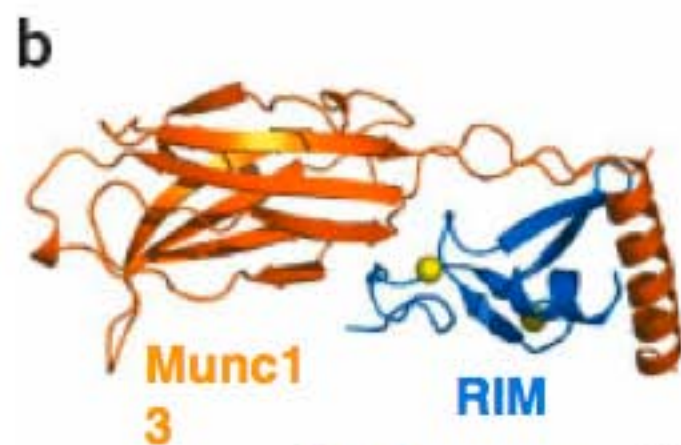
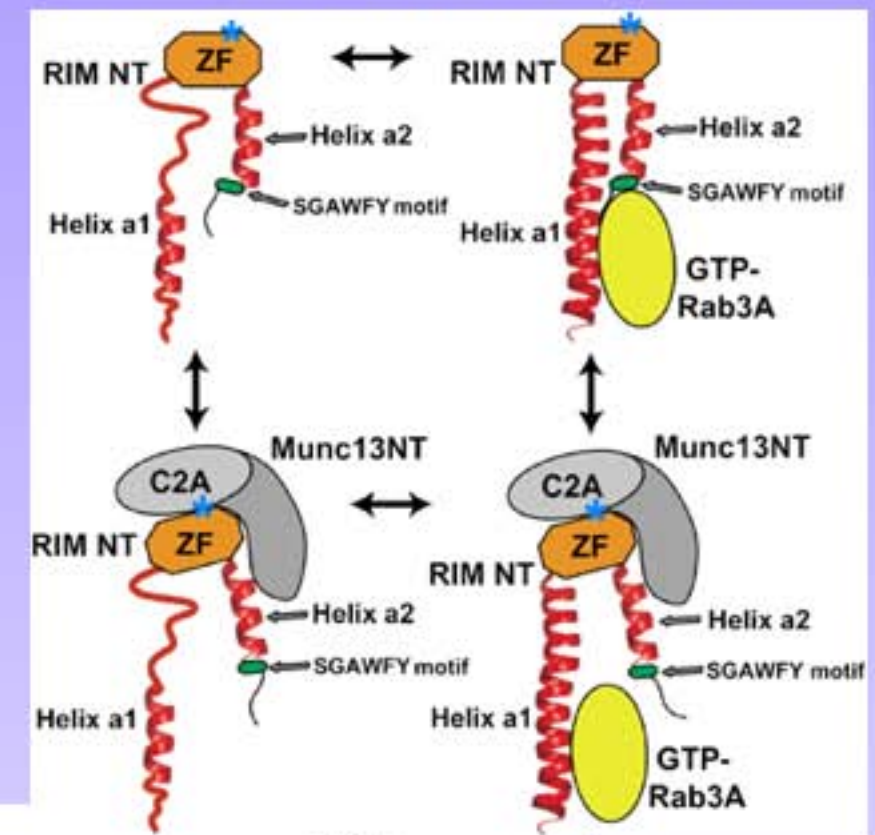
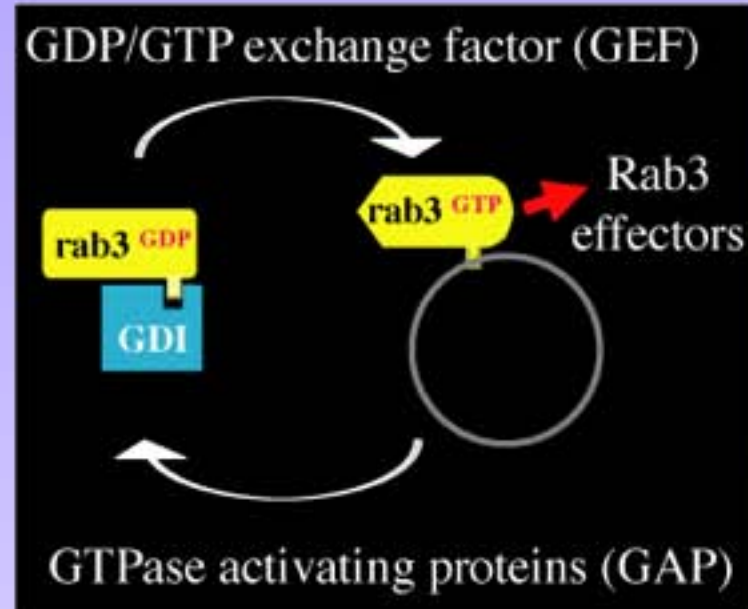
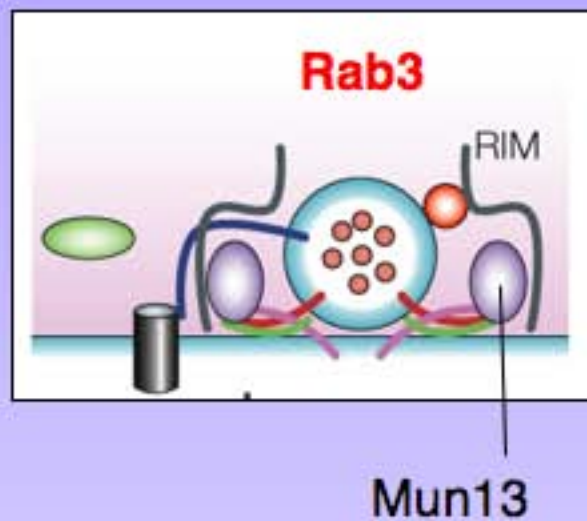


Figure 2. Overview of the steps in the secretory vesicle cycle that are affected by deletion of the respective genes. Deletion of *munc18-1* affects all steps in the cascade. Deletion of the SNARE genes (reviewed in [1]) results in priming defects with syntaxin-1 sharing a more upstream (docking) phenotype 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.

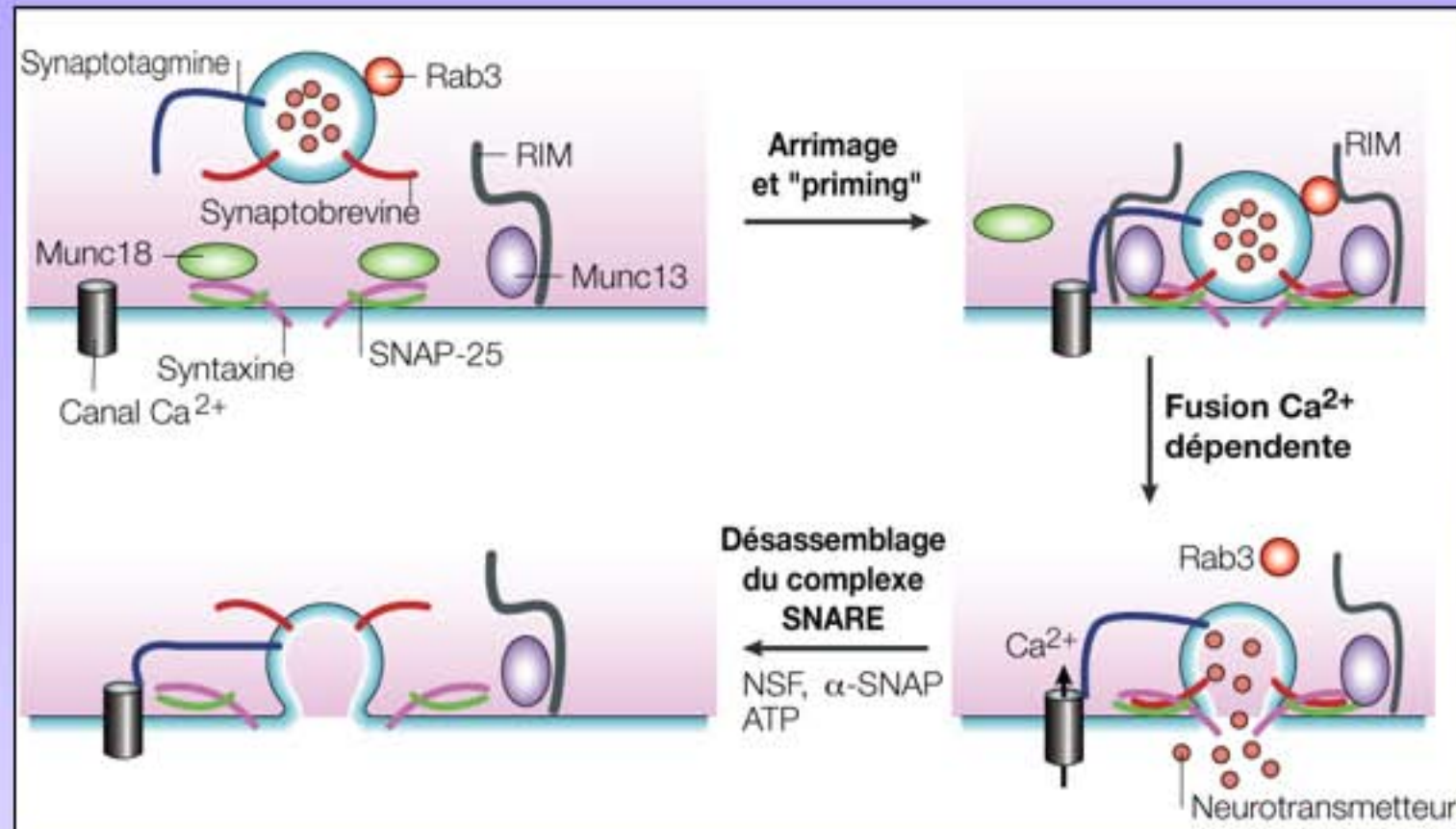
Régulation par la GTPase Rab3



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

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

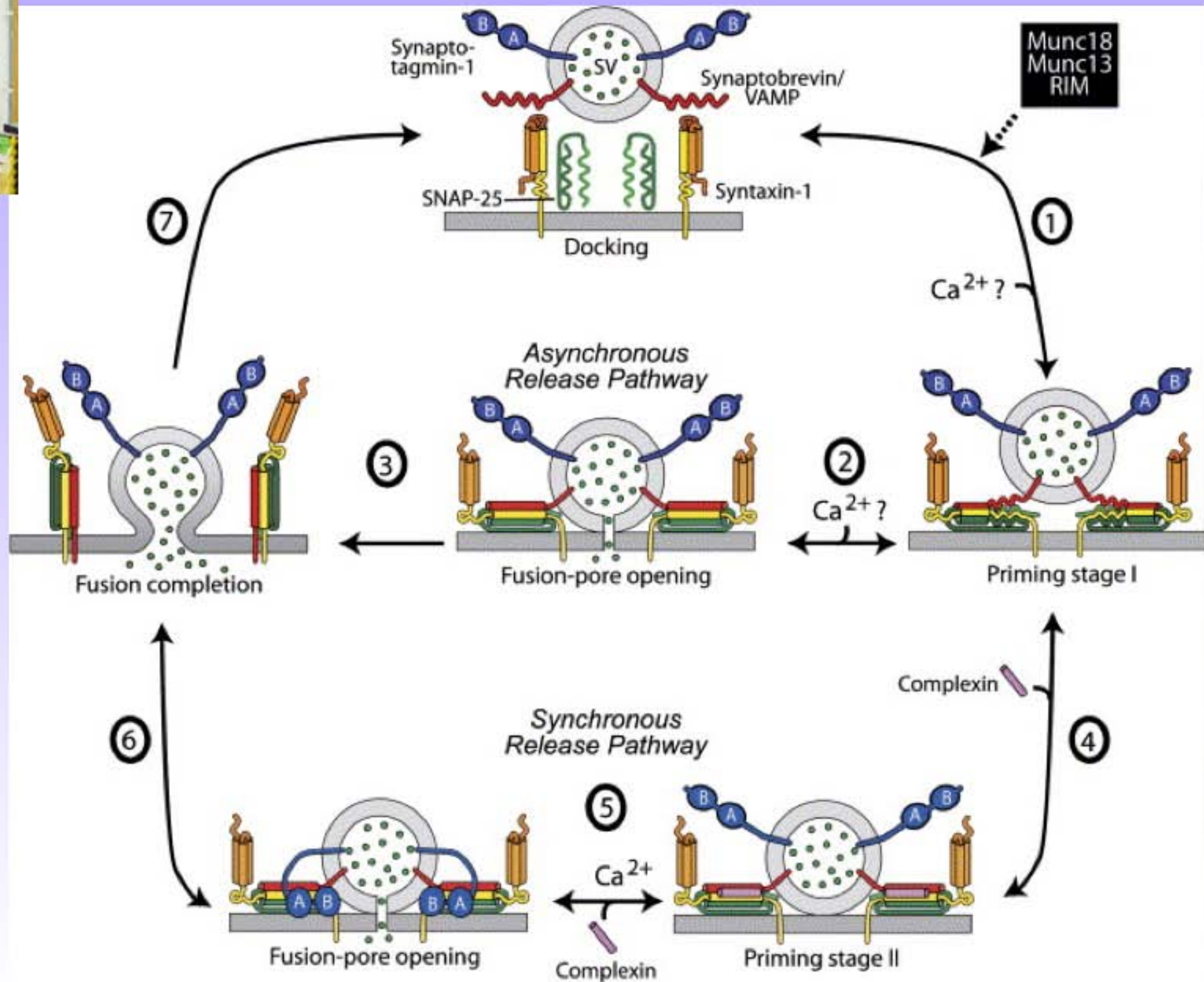
Régulation de l'exocytose



Régulation par la complexine



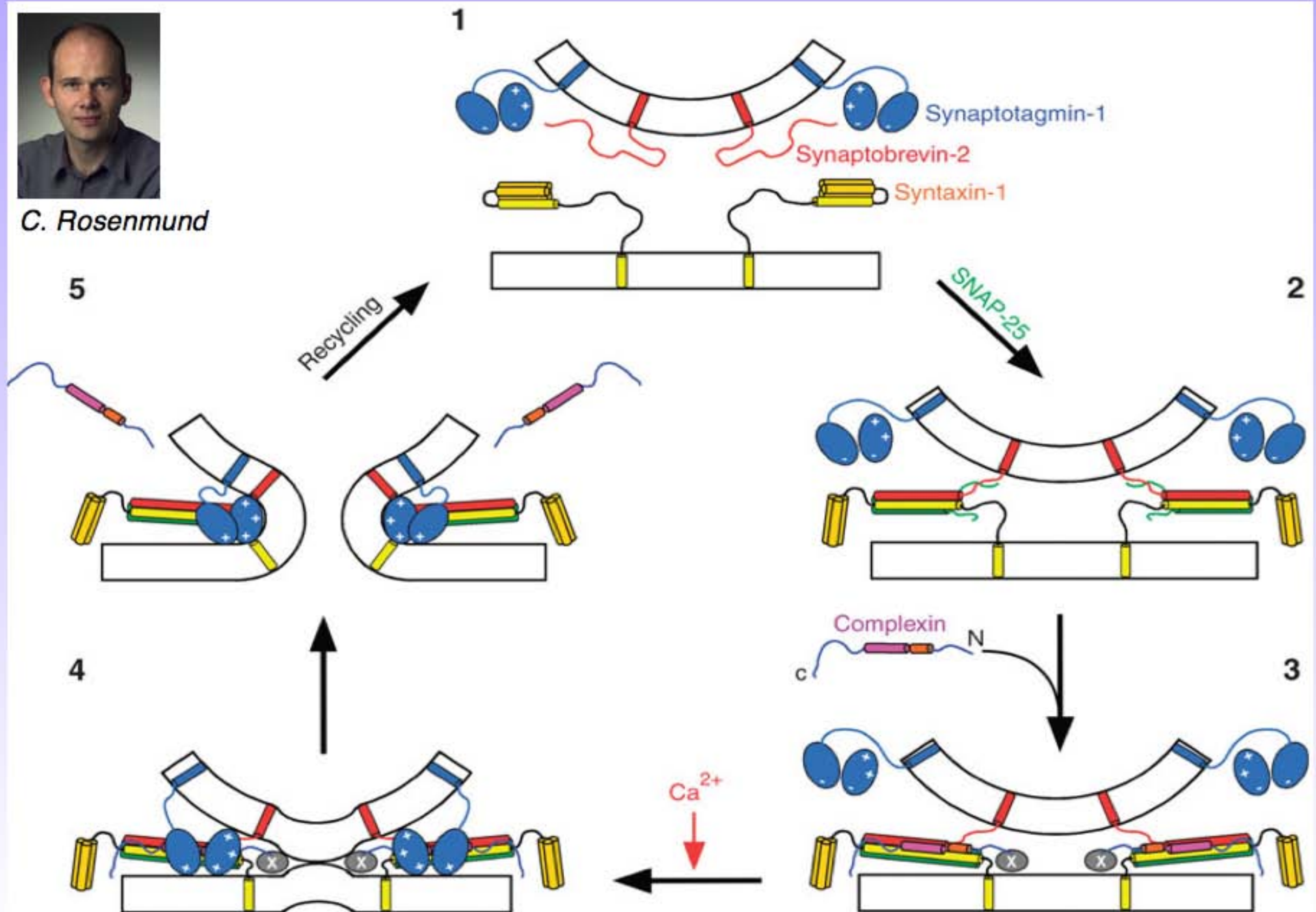
T. Sudhof



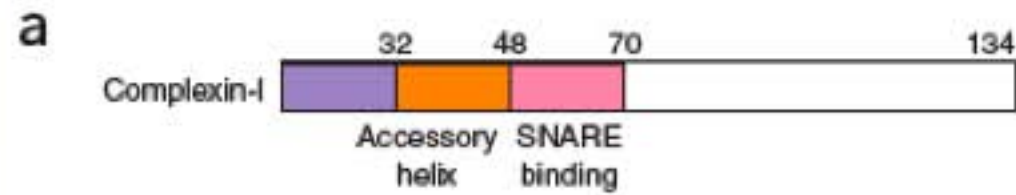
Régulation par la complexine



C. Rosenmund



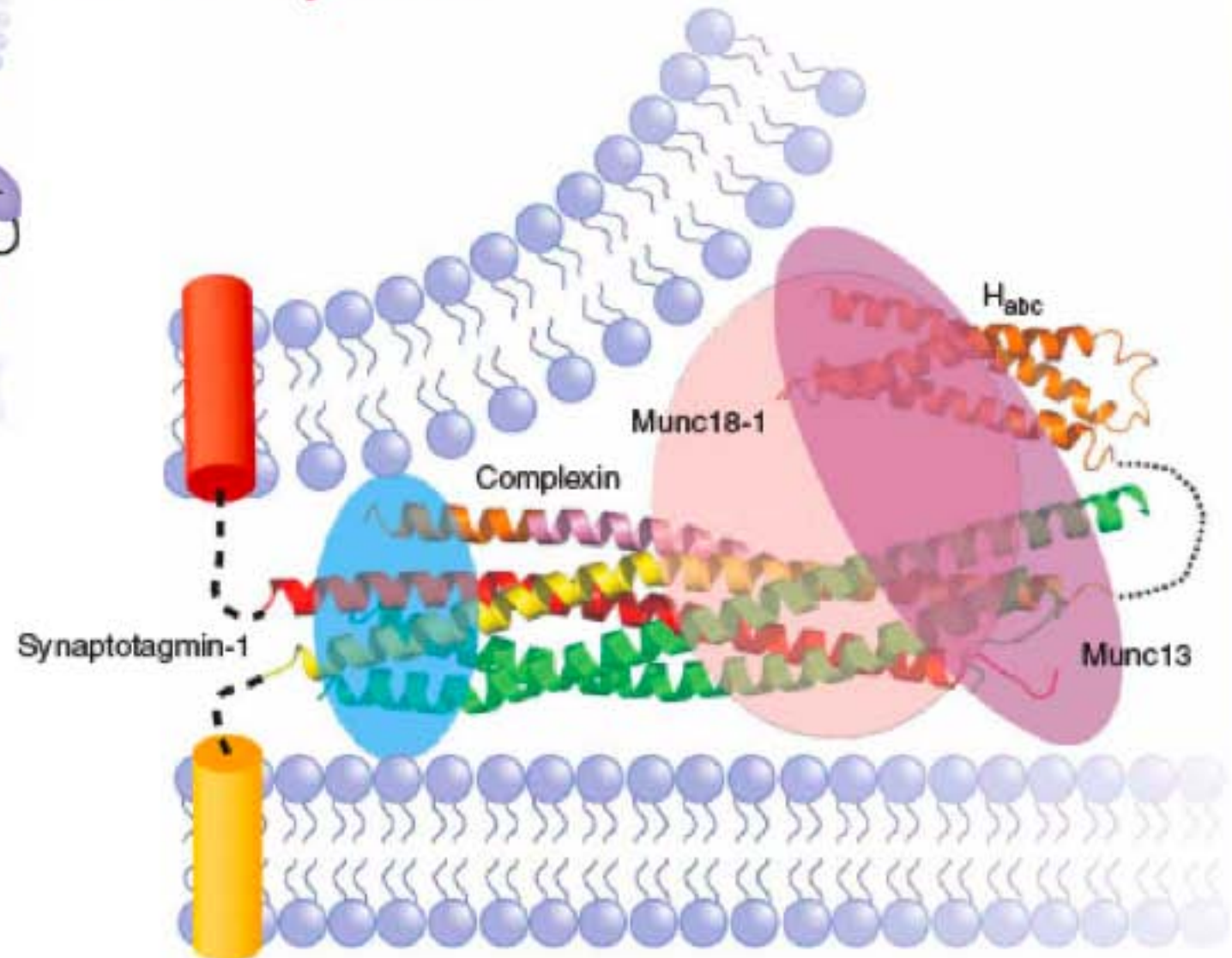
Régulation par la complexine



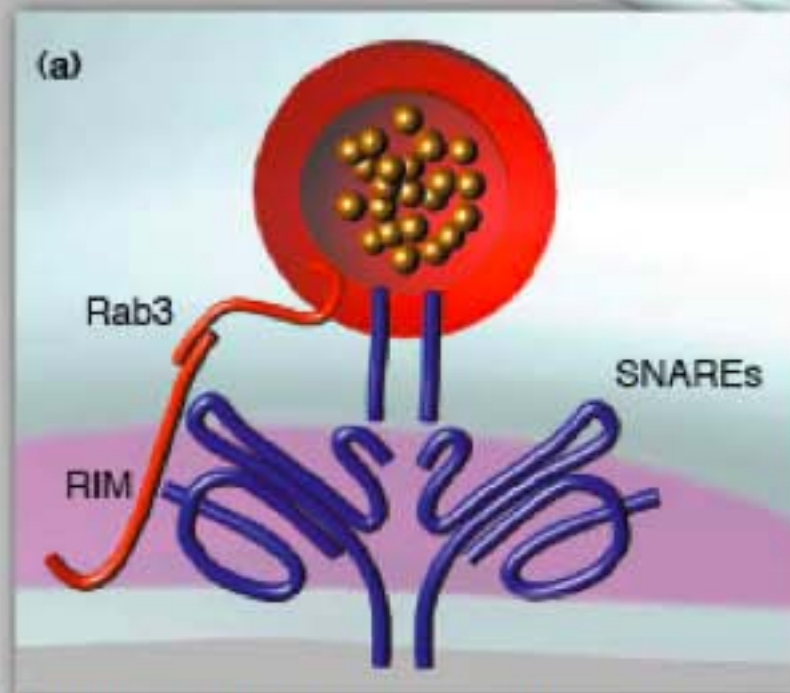
SNAP-25
Synaptobrevine

Complexin

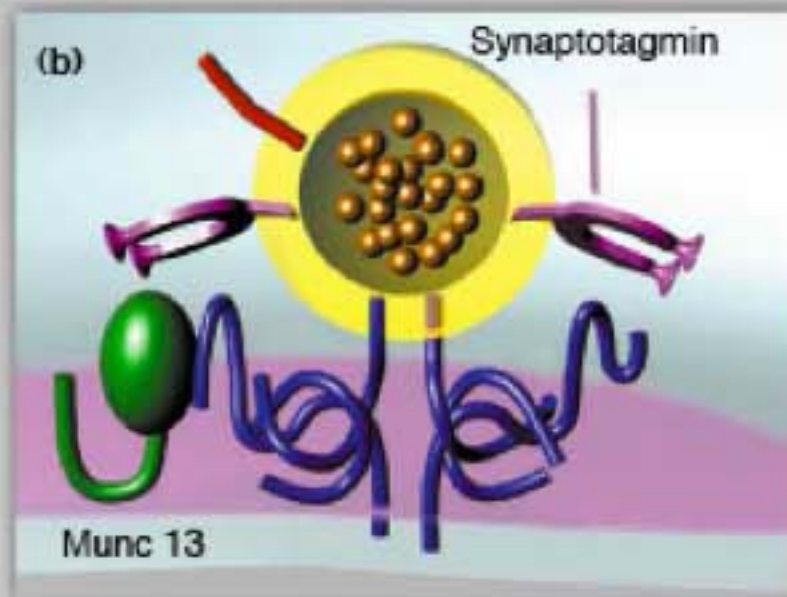
Syntaxine



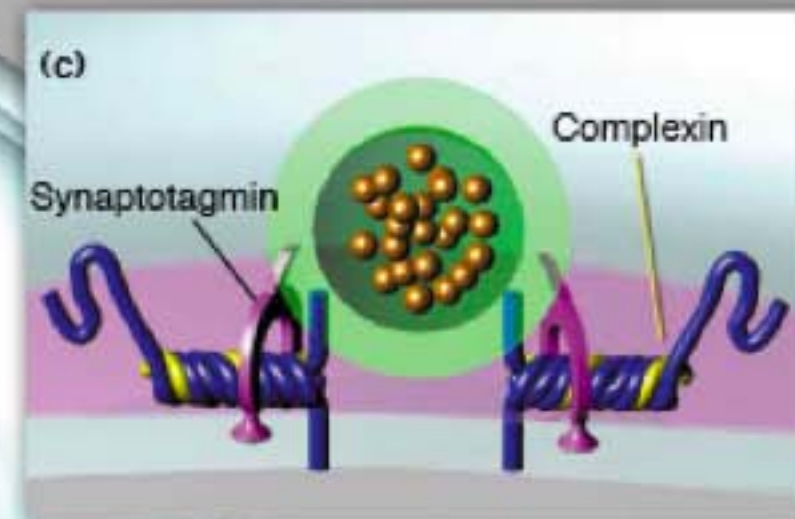
Régulation de l'exocytose



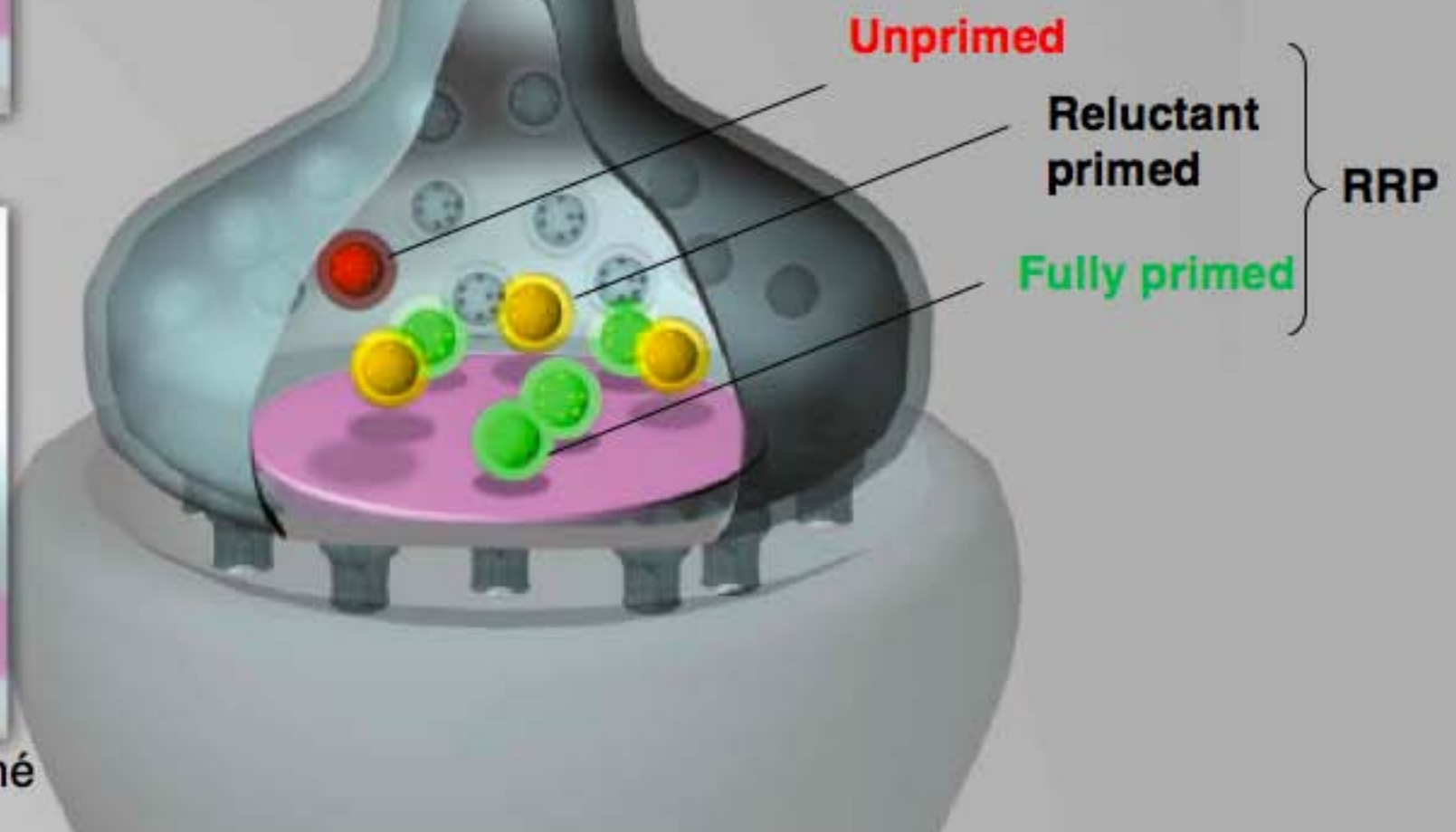
Docking-Initiation du priming



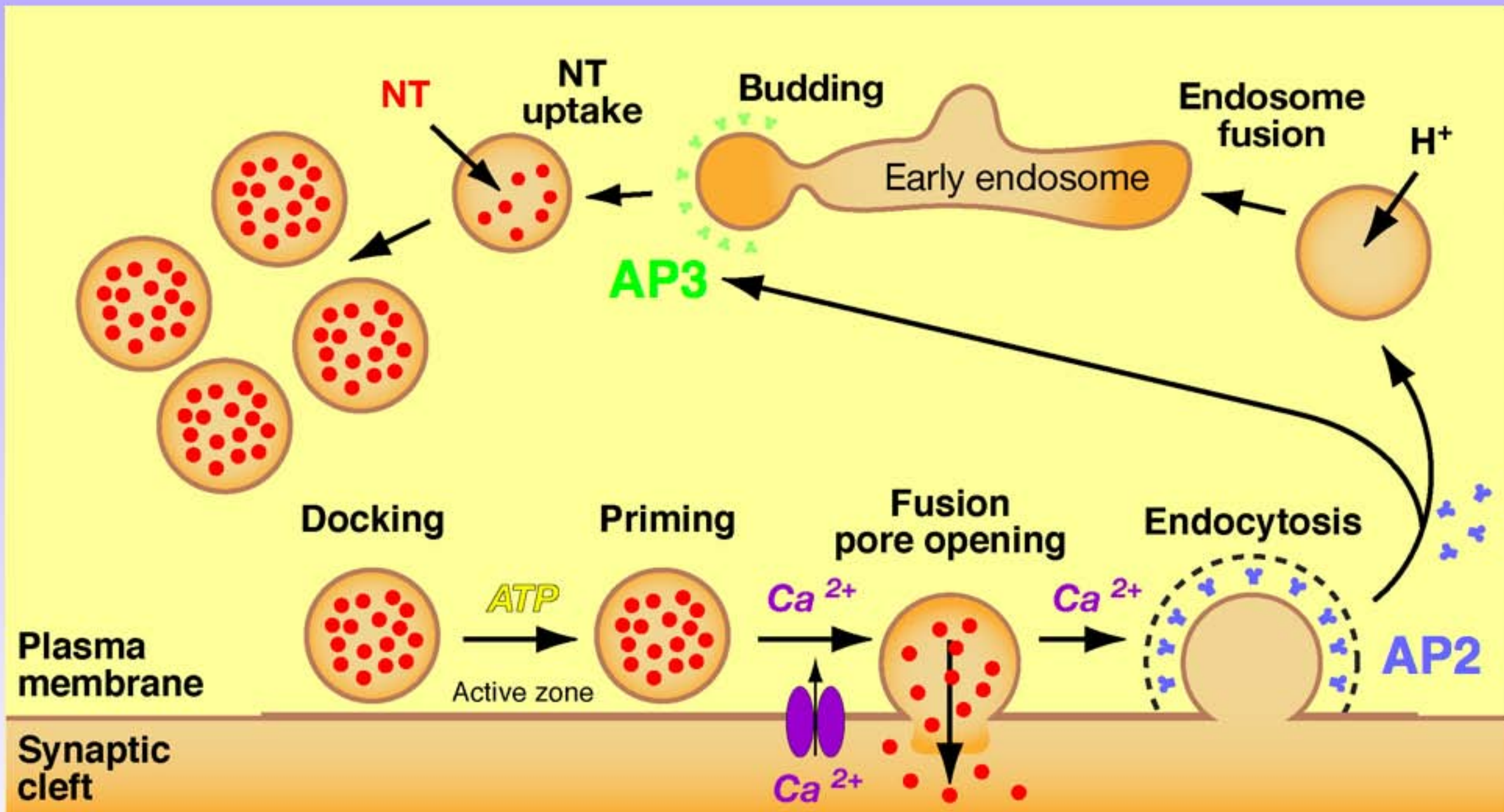
Priming- complexe SNARE relaché
Proba de libération: 1-2%
Libération asynchrone : 20 ms



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



SV recycling



AP3 est un complexe adaptateur heterotetramérique



Functions d' AP3:

Ciblage de certaines protéines vers les:

- melanosomes,
- granules contenant les plaquettes,
- vésicules synaptiques

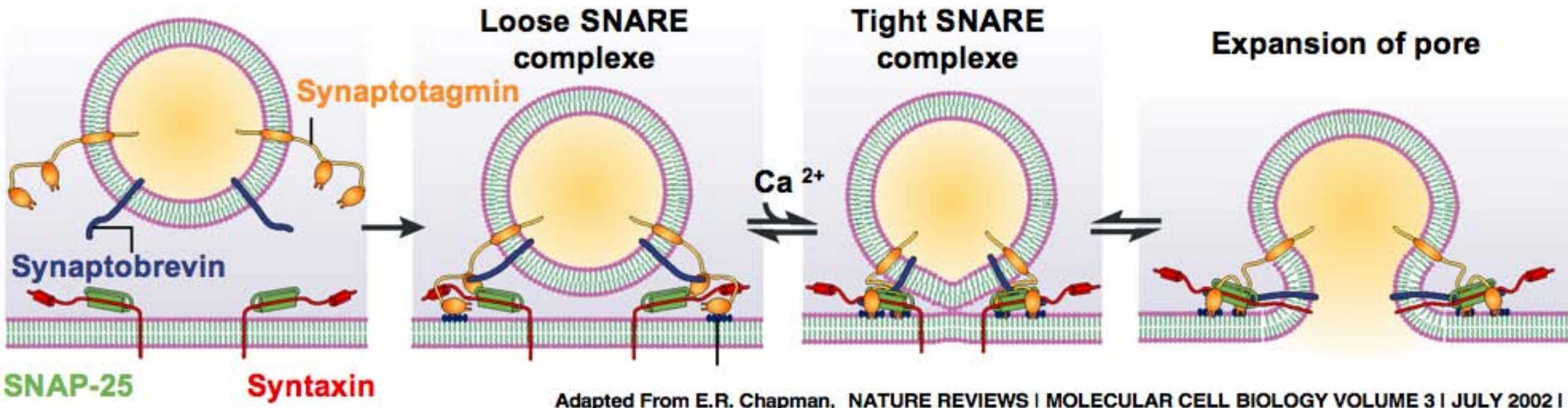
Sont des mutant nuls pour AP3 δ :
suppression du complexe AP3

Les souris MOCHA (mh)

- décoloration des yeux et des poils
- coagulation retardée (déficiency du pool des granules (plaquettes)).
- hyperactives
- rythme theta altéré dans l'electrocortigramme (hypersynchronisation).
- crises épileptiques



SNARE proteins AND Exocytosis



TI-VAMP : Tetanus Neurotoxin-Insensitive Vesicle Associated Membrane Protein

- gène lié au X
- v-SNARE de 25kDa
- ubiquitaire
- Ciblé via AP3
- Insensible aux Neurotoxines
- Presente dans les terminaisons des fibres moussues.

Synaptobrevin

SNARE TM

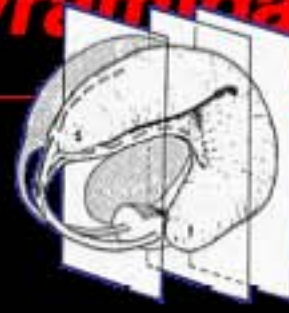
⚡ Tetanus toxin

TI-VAMP

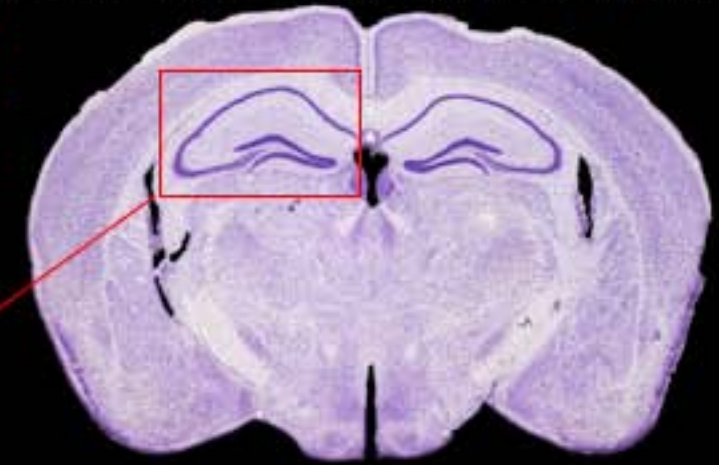
Longin SNARE TM Cter
1 120 180 220

δ AP-3

The messy fiber-pyramidal cell synapse



Transversal
slice



hippocampus

CA1

Pyramidal cell

CA3

s.luc

lrl

Alveus

so

sr

slm

sm

Fimbria

Mossy fiber

Dentate gyrus

Granule cell

Perforant path
(subiculum
entorhinal cortex)

Septum

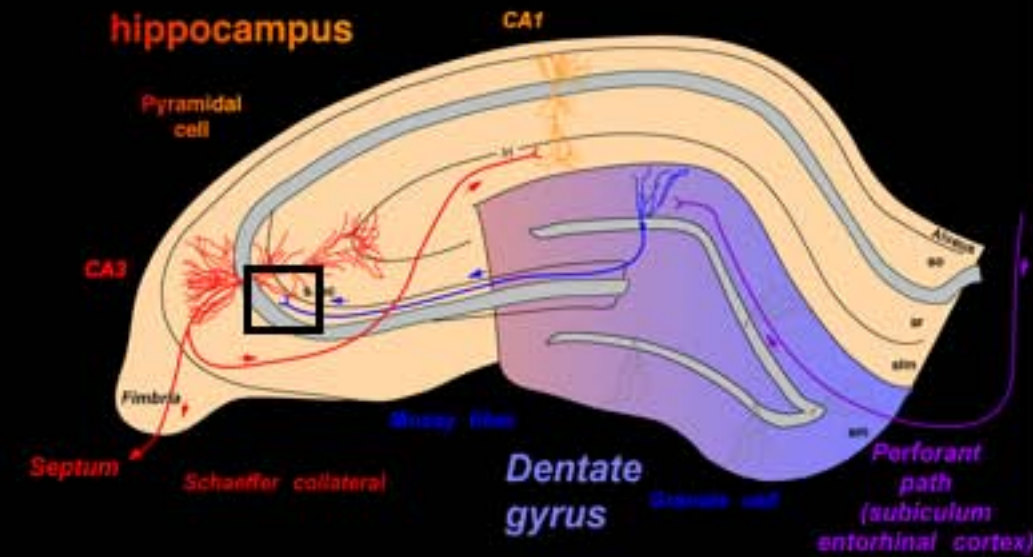
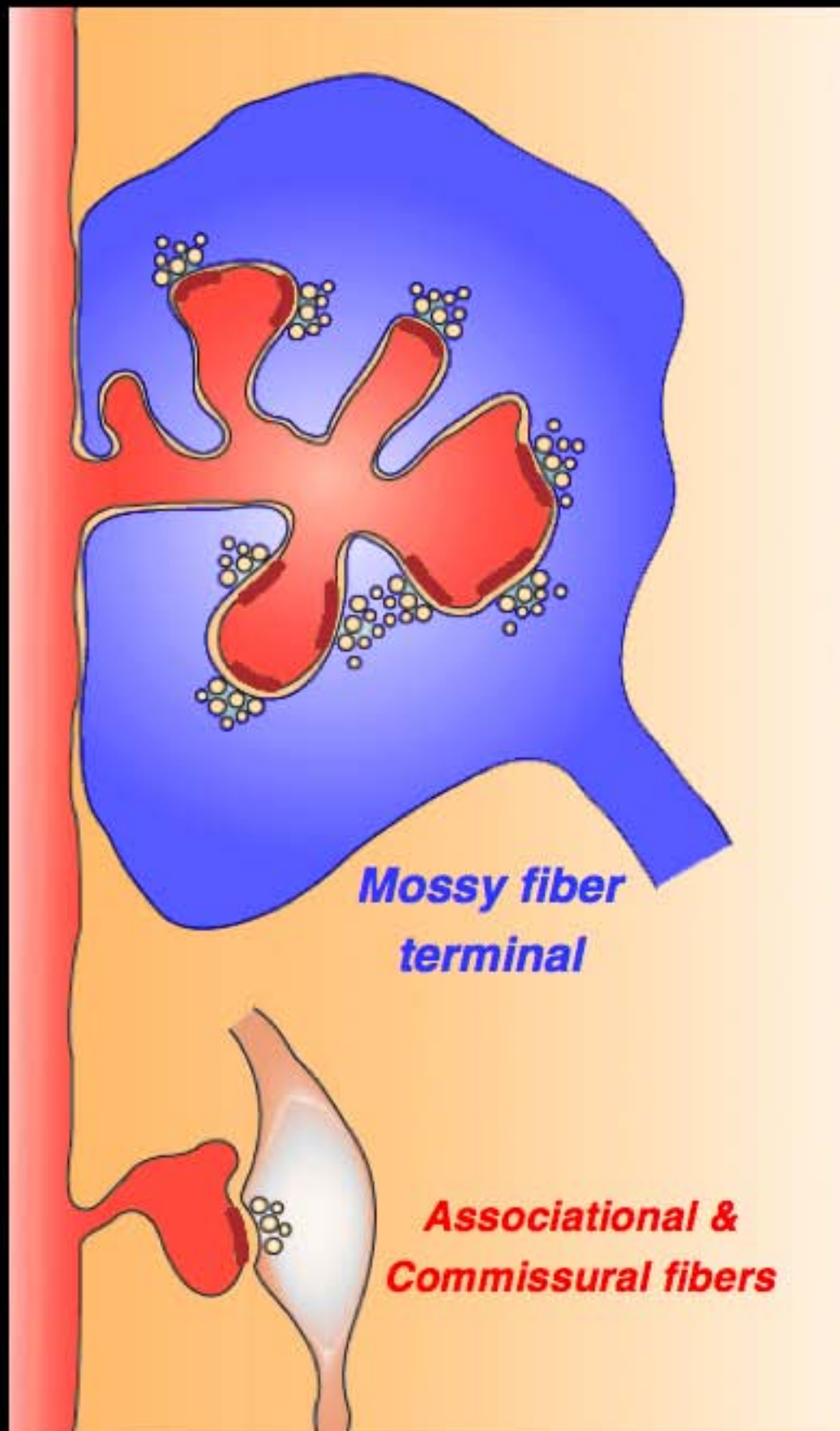
Schaeffer collateral

The mossy fiber-pyramidal cell synapse

**Thorny
excrescence**

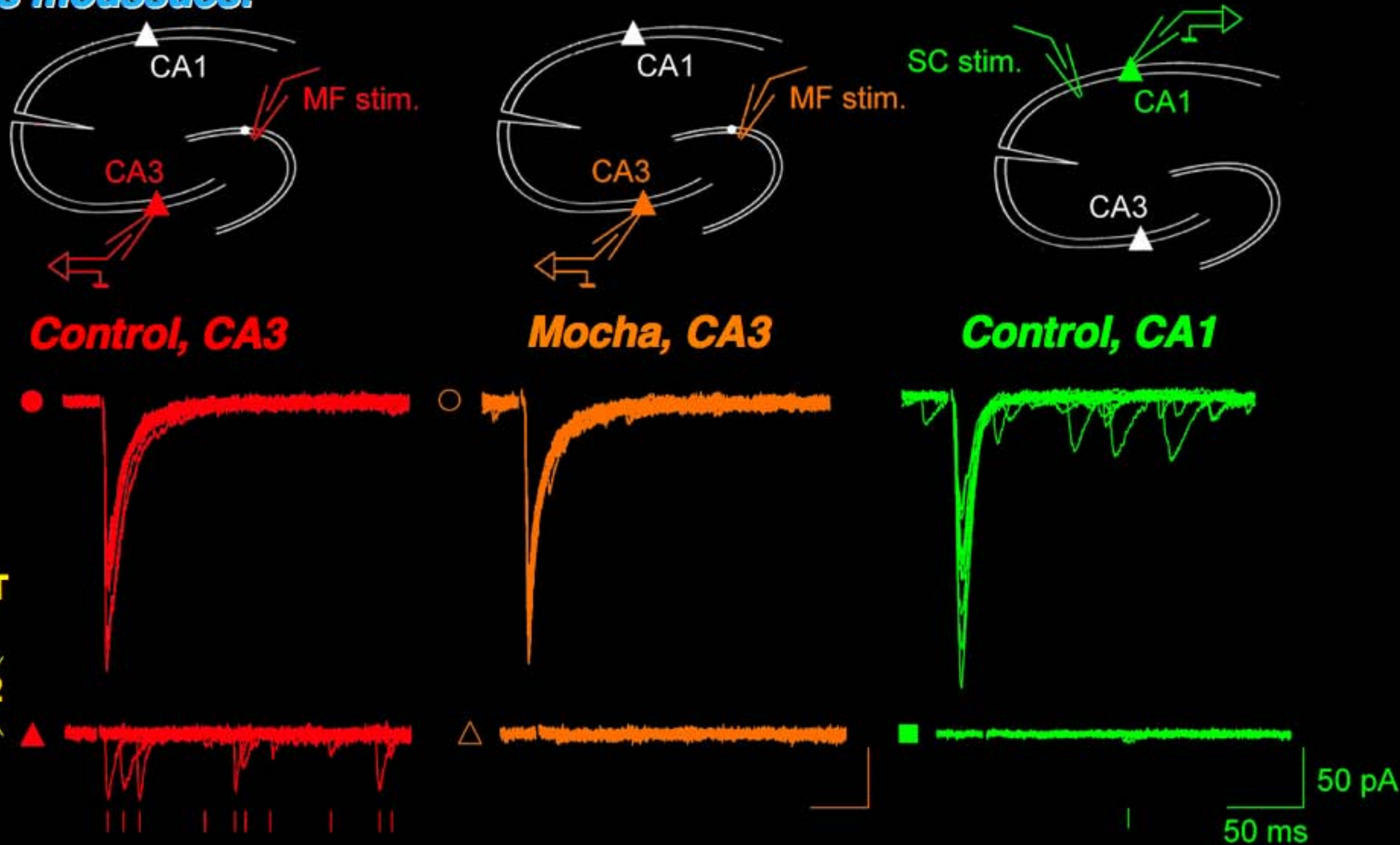
**PYRAMIDAL
CELL**

**Classical
spine**



**GRANULE
CELL**

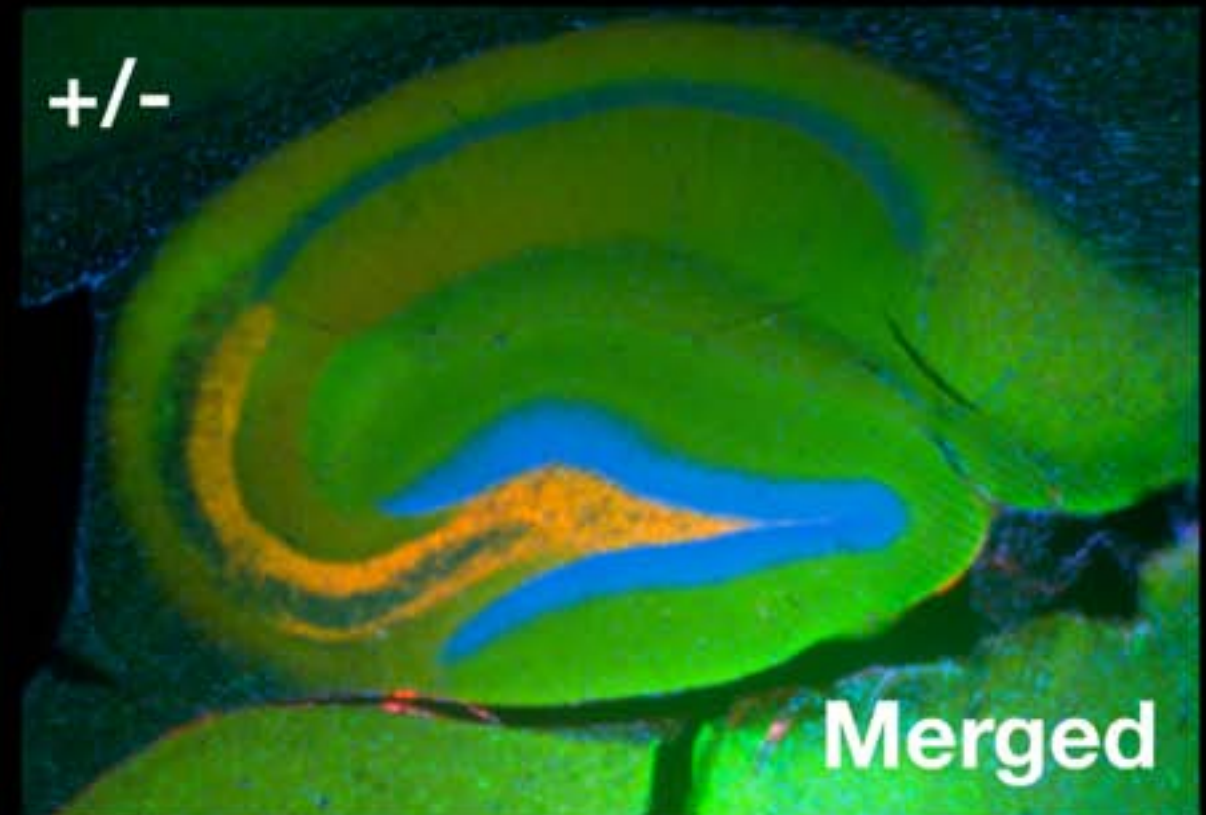
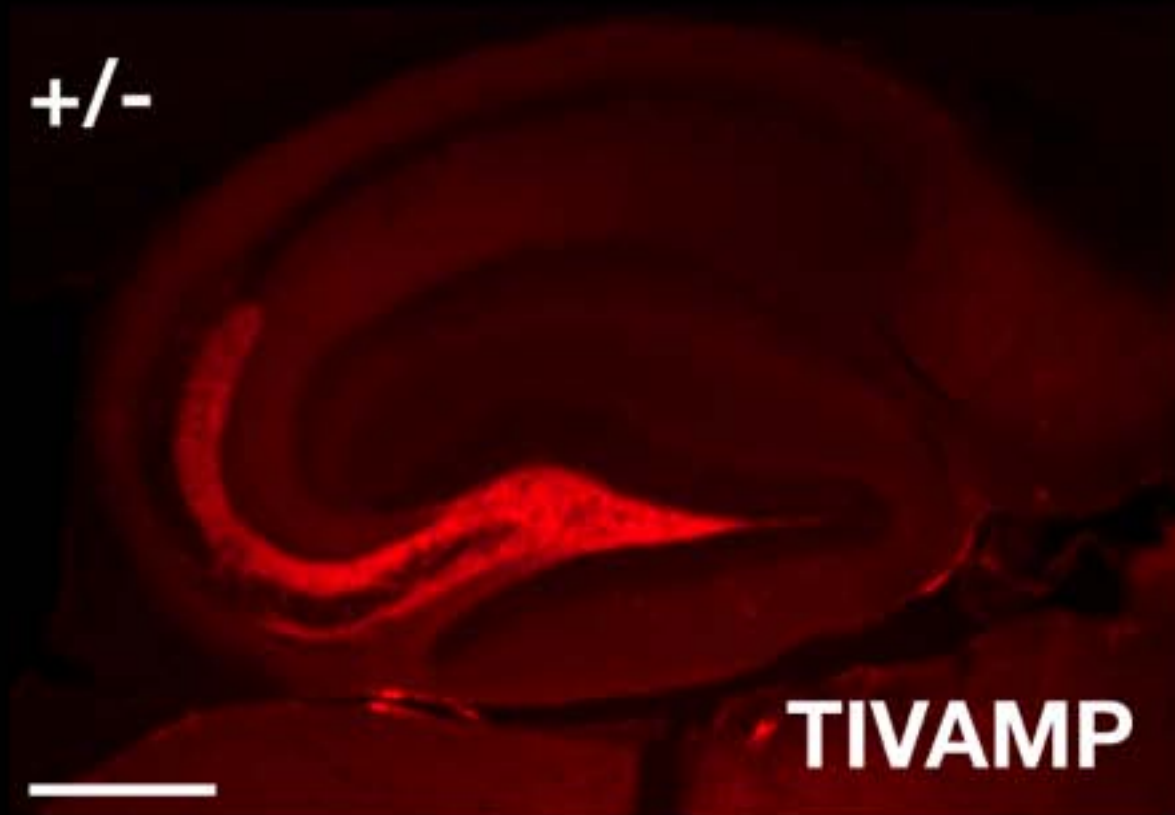
Libération Ca^{2+} -dépendente évoquée par la stimulation des fibres moussues.



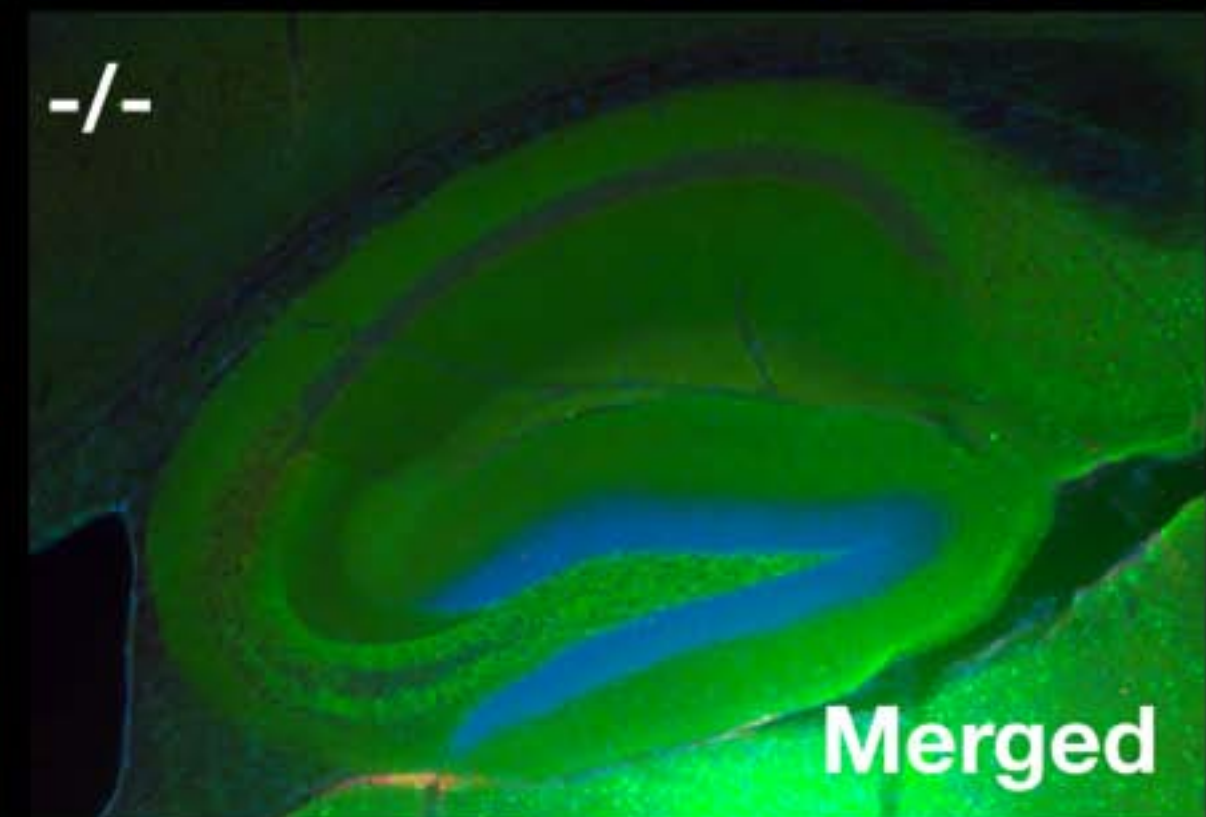
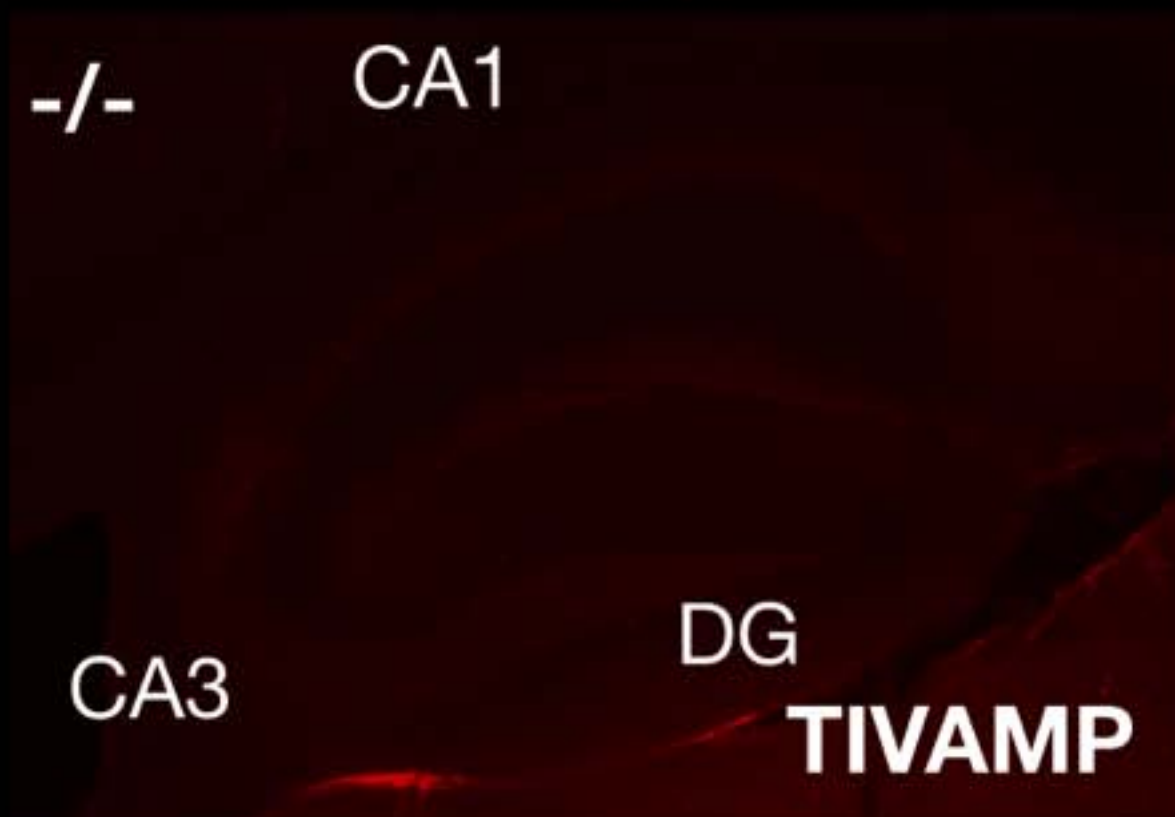
- La TeNT causes une réduction drammatique de la libération des NT stimulée par PA.
- La libération est asynchrone, dépendante d'AP-3 et spécifique de CA3.

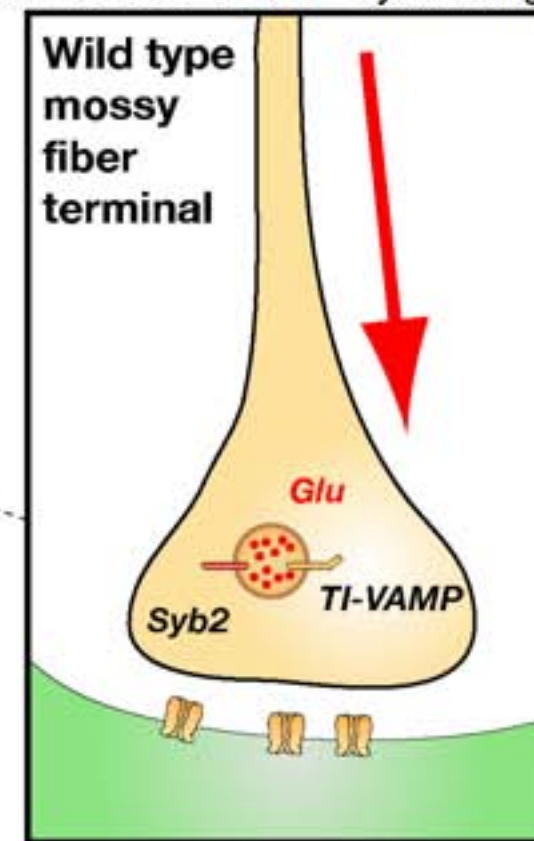
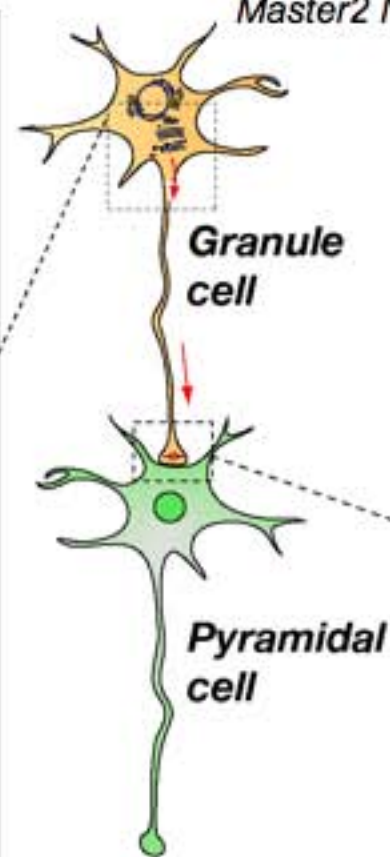
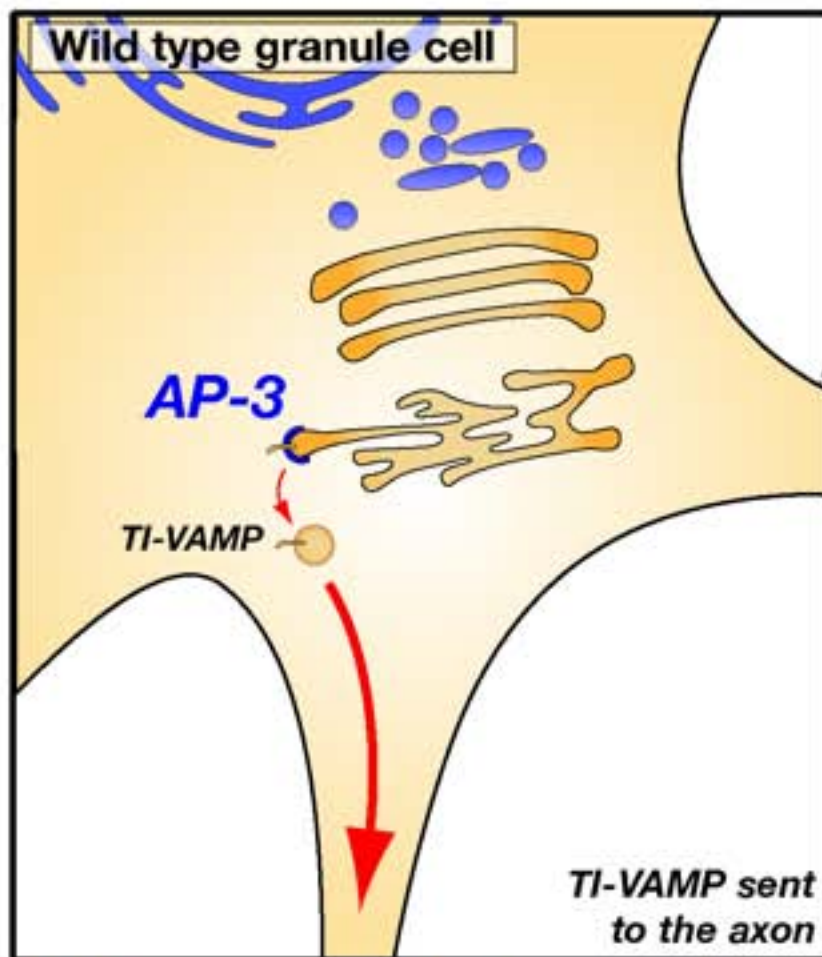
TI-VAMP est dans le Golgi des grains des mocha.

Control mice

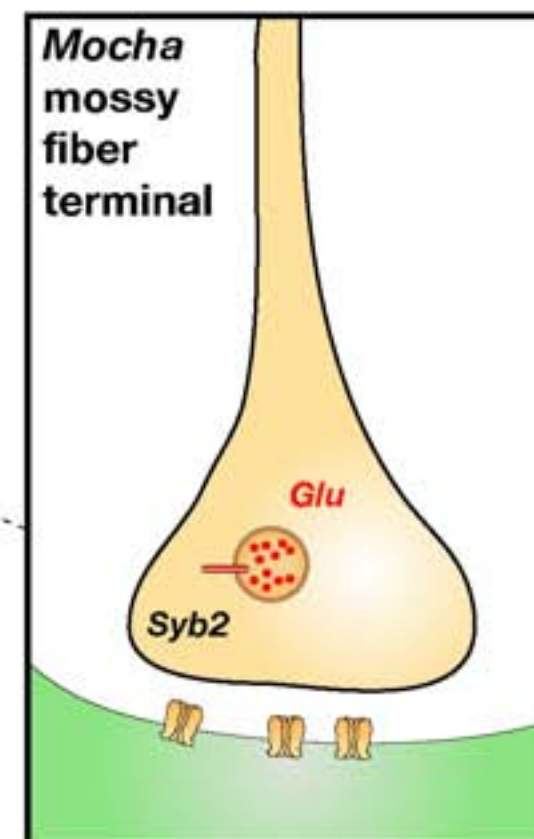
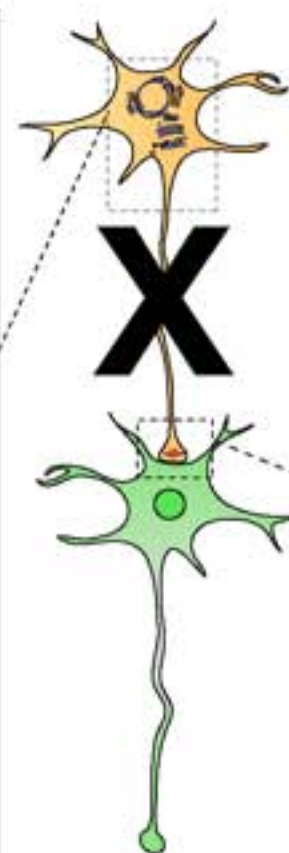
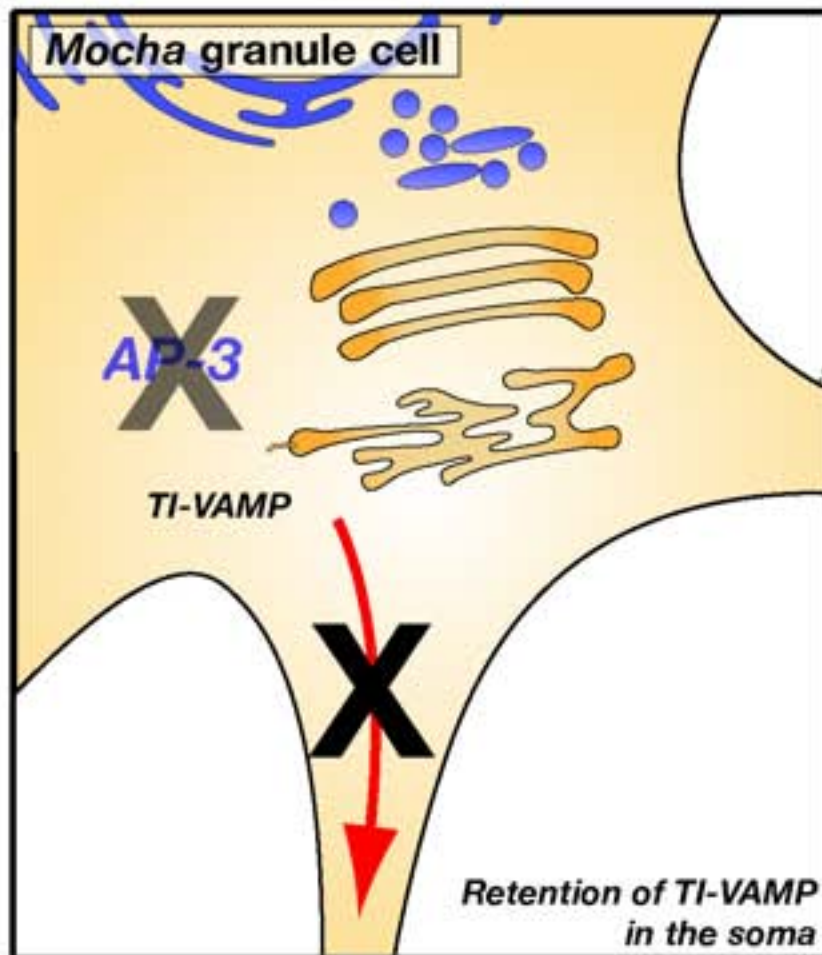


Mocha mice



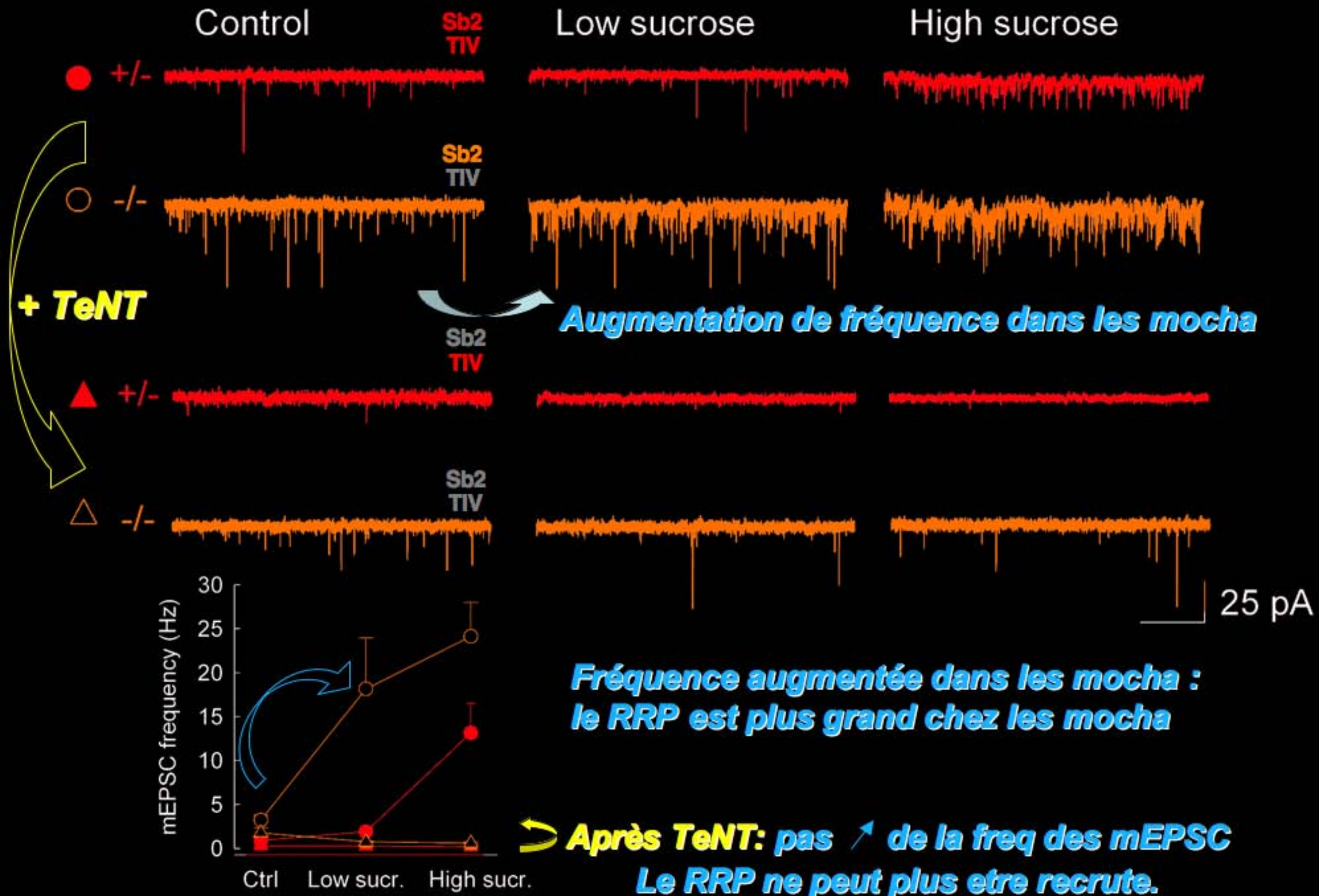


Two v-SNAREs in SVs: synaptobrevin 2 & TI-VAMP

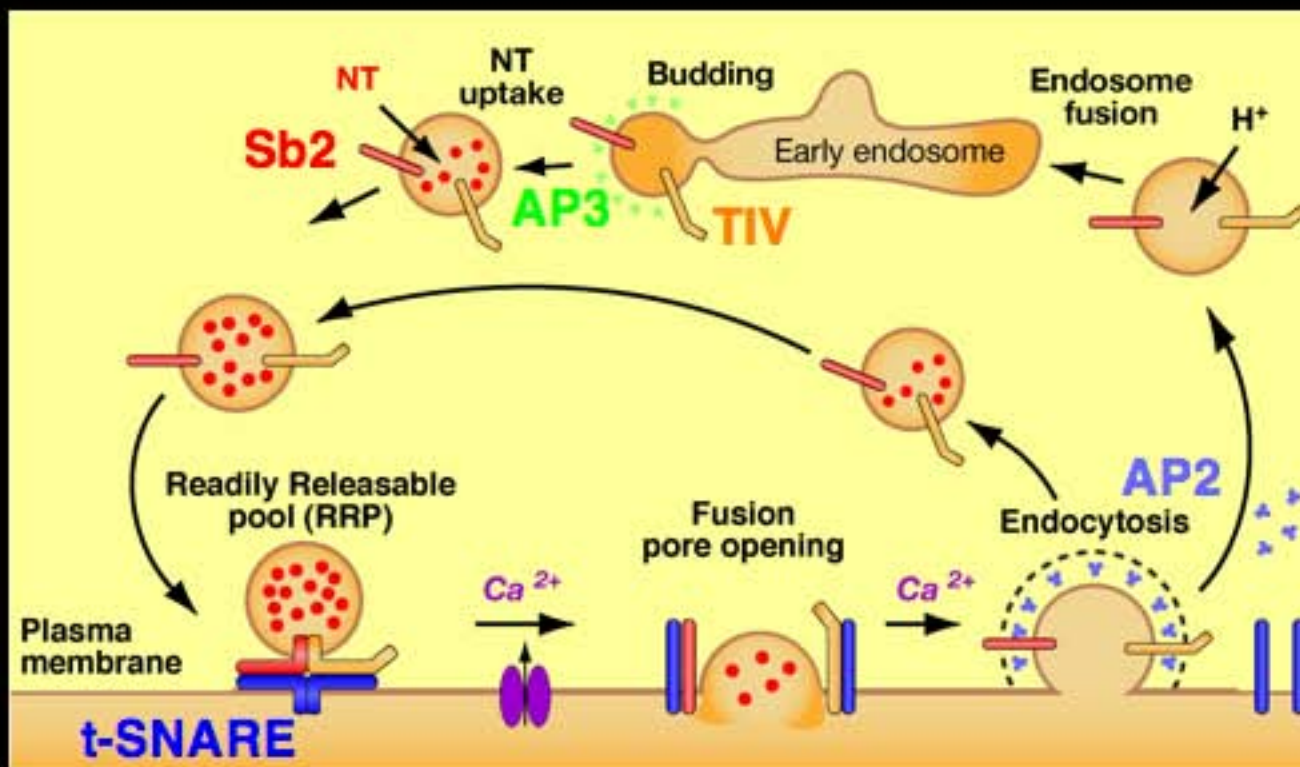


Only one v-SNAREs in SVs: synaptobrevin 2

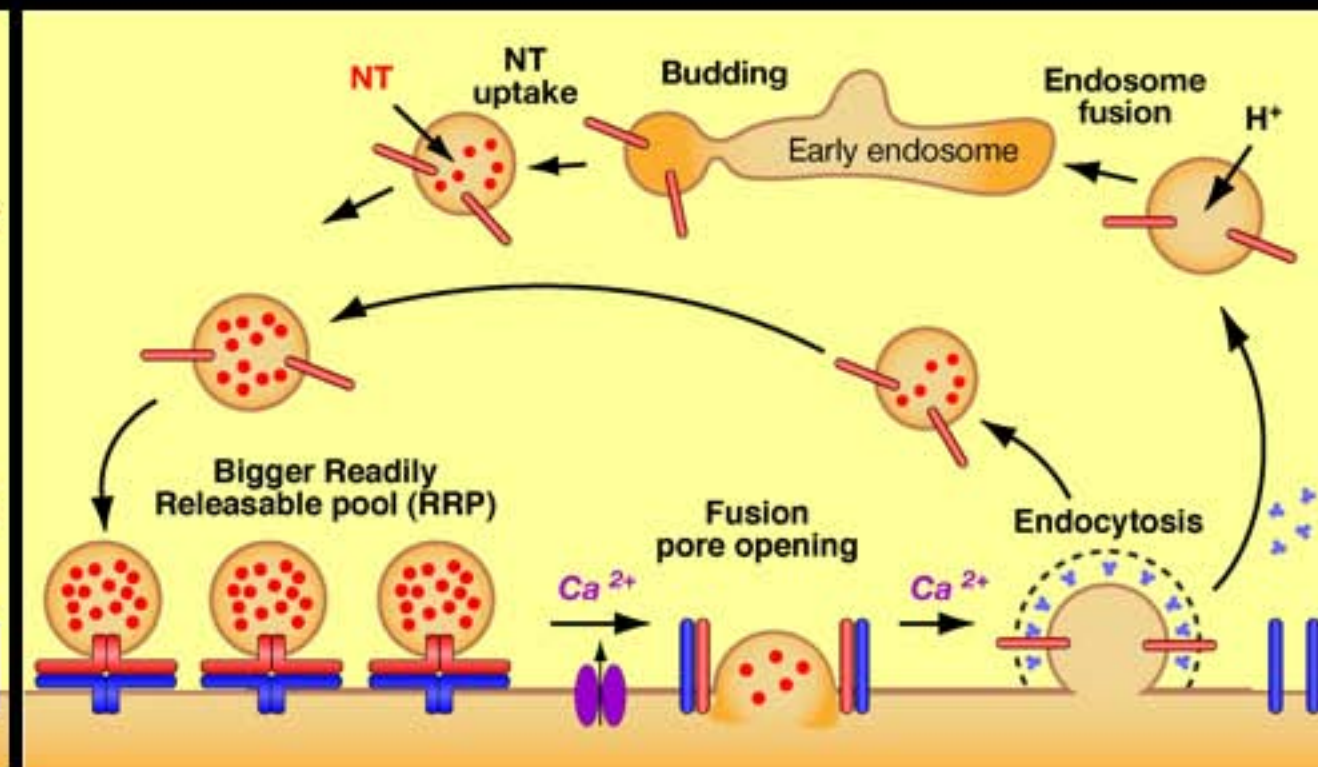
Augmentation du RRP dans les souris mocha



A la fois TI-VAMP & Sb2 medient la libération basale & évoquée aux terminaisons des fibres moussues



Souris control



Souris mocha

En l'absence de TI-VAMP dans les terminaisons des fibres moussues (souris mocha) :

- le RRP devient plus important. La probabilité de libération basale augmente.
- La libération évoquée asynchrone, résistante à la TeNT, est perdue.

Si vous avez des questions ...

Contact

http://lydia.danglot.free.fr


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

Contact

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
ou lydia.danglot@inserm.fr

  
Inserm

Terminé

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>

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 Neuritogenèse et polarité neuronale.](#)
- Master2 de Neurosciences - UE Communication Cellulaire (code UE : MBIP5033) - Université Pierre et Marie Curie (Paris 6):
[Les protéines SNARE et l'exocytose](#) : classification des SNAREs, voie de recyclage des VEs, 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, analyses.](#)
[2. Modèles en psychiatrie: addiction, schizophrénie, hyperactivité et trouble de l'attention, et anxiété.](#)
- Master1 de Biologie - Ecole Normale Supérieure, UE Du 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
Neuritogenèse 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](#)