

Imagerie biologique

Etude d'articles scientifiques

CARDINET Rémy
LARRAUFIE Pierre
MASSUÉ Cyriac

24/09/2009

Imagerie biologique

- Quelques éléments de biologie cellulaire

- Etude d'article :

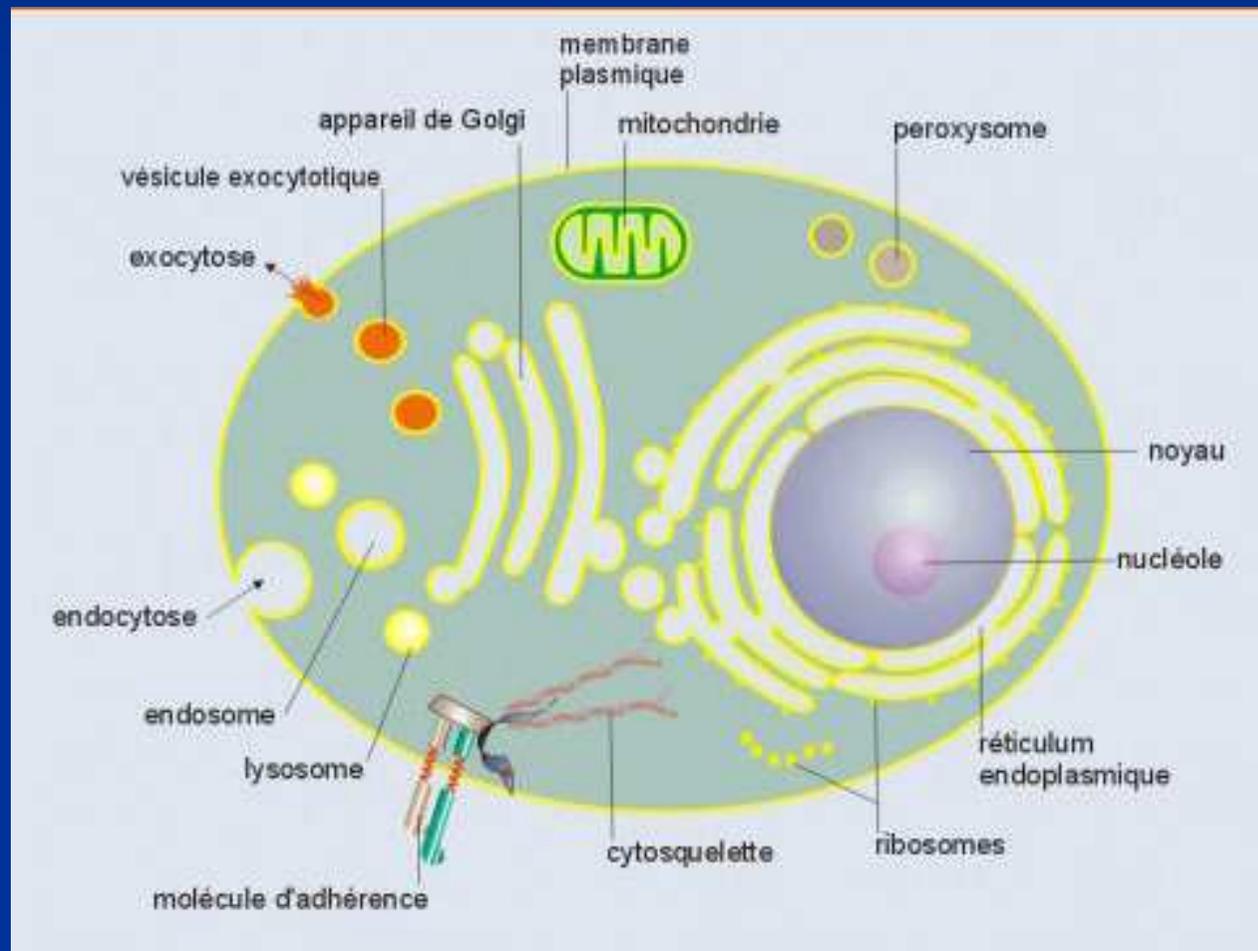
Limitation de la diffusion des récepteurs AMPA GluR1 lors de l'activité synaptique
(M. D. Ehlers, M. Heine, L. Groc, M.-C. Lee, D. Choquet (Neuron – Mars 2007)

- Etude d'article :

Répartition asymétrique des récepteurs à GABA suivant un gradient de GABA
Cédric Bouzigues, Mathieu Morel, Antoine Triller, Maxime Dahan Mars 2007

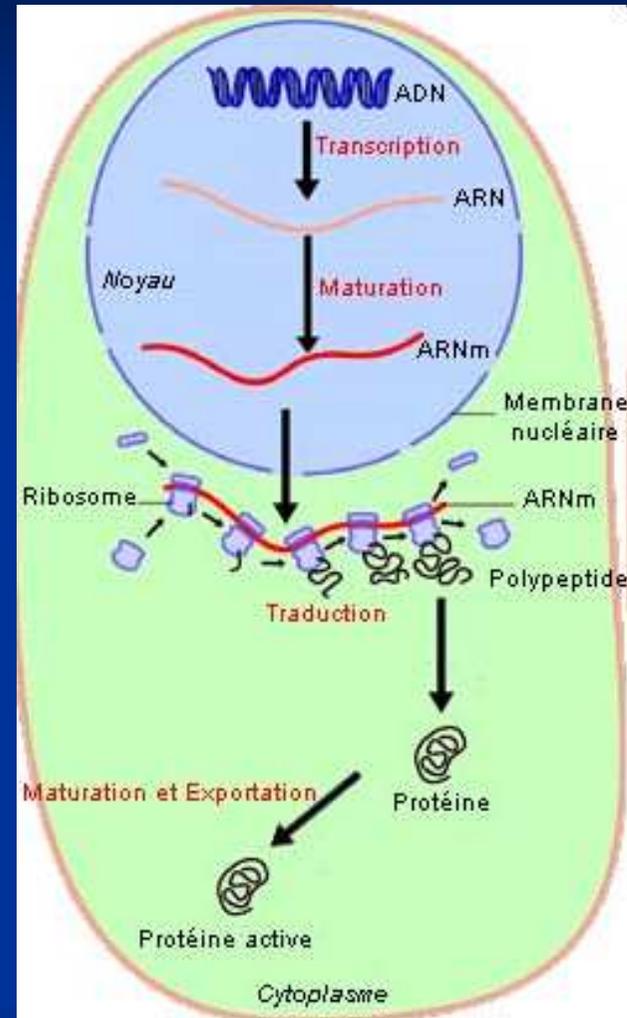
La cellule

- Une structure compartimentée et organisée



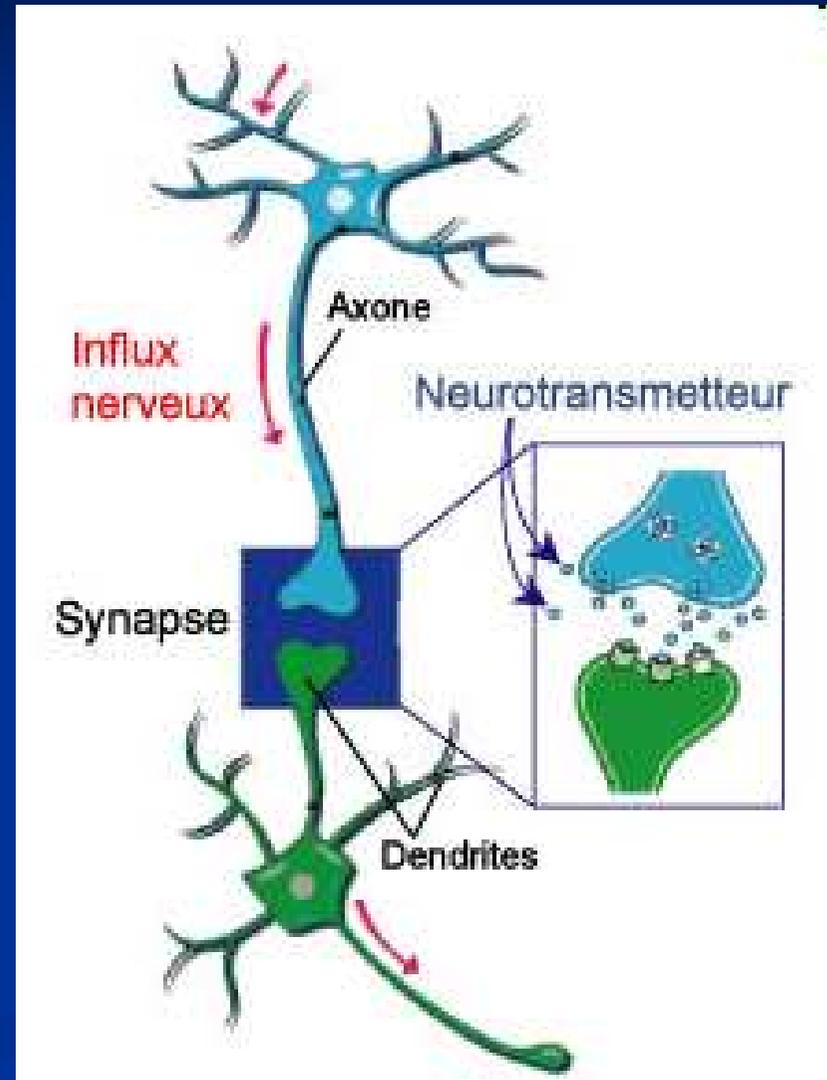
La cellule

- ADN, ARN et protéines
- Et de nombreuses autres molécules : lipides, métabolites, ions...
- Le cytosquelette, structure de la cellule



Le neurone

- Une structure particulière
- La synapse, zone de communication entre les neurones



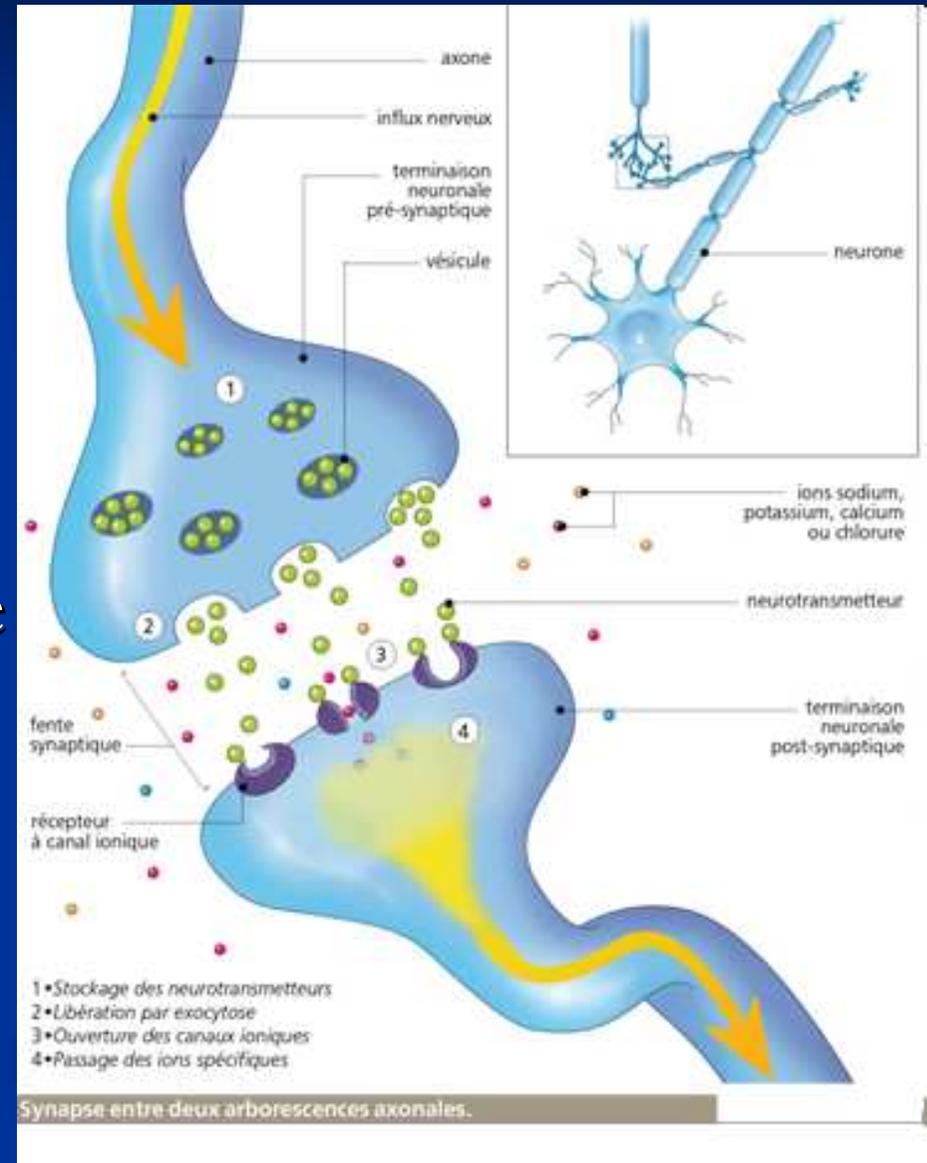
Transmission de l'influx

- Le long de l'axone

Le potentiel d'action

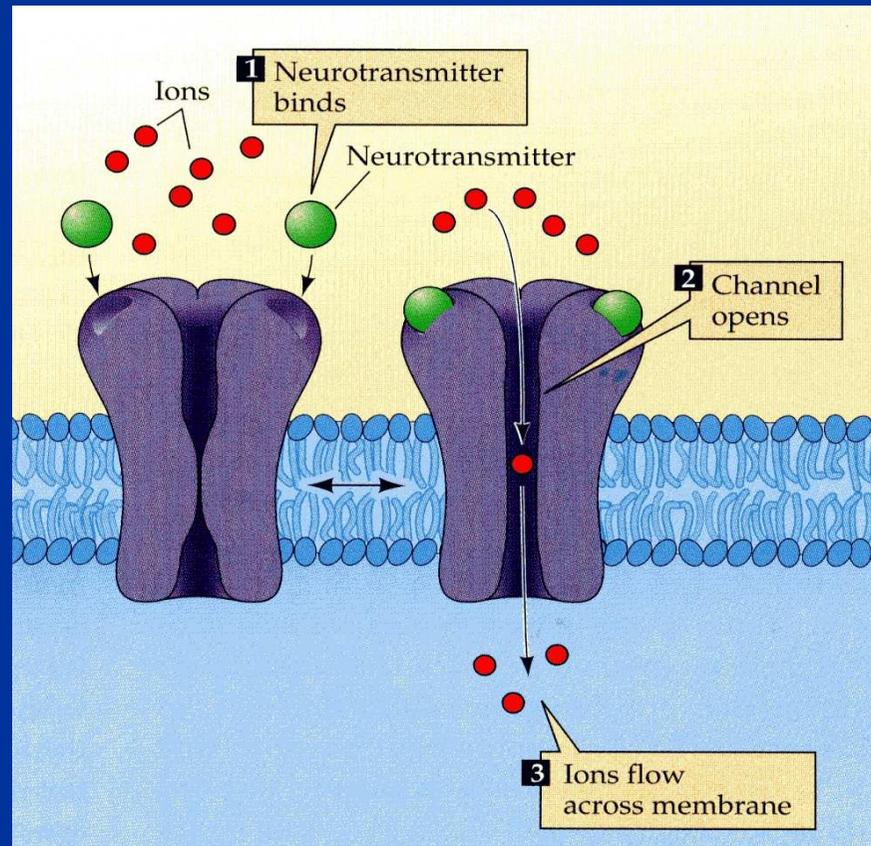
- Au niveau de la synapse

Les neurotransmetteurs



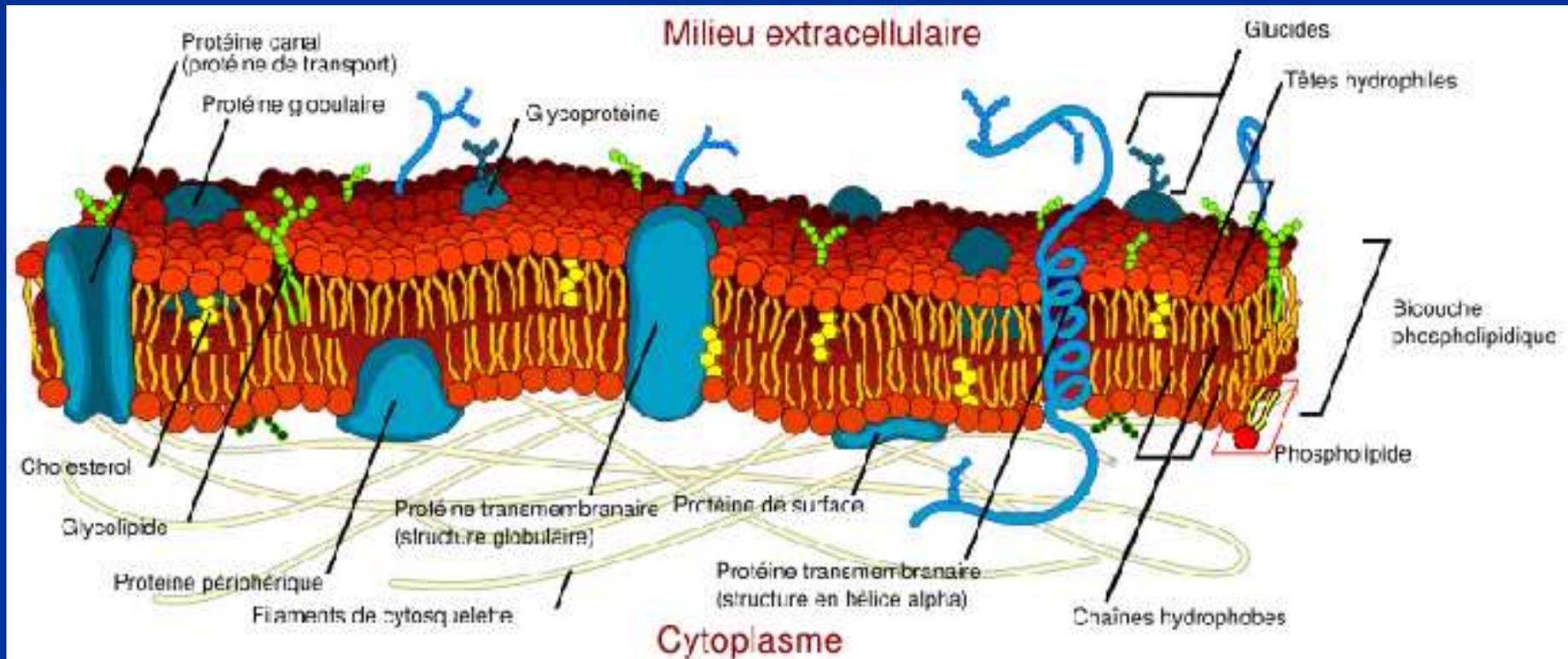
Les récepteurs synaptiques

Des protéines transmembranaires sont capables de former des pores perméables à certains ions



Les membranes cellulaires

- Une structure complexe, mobile et active

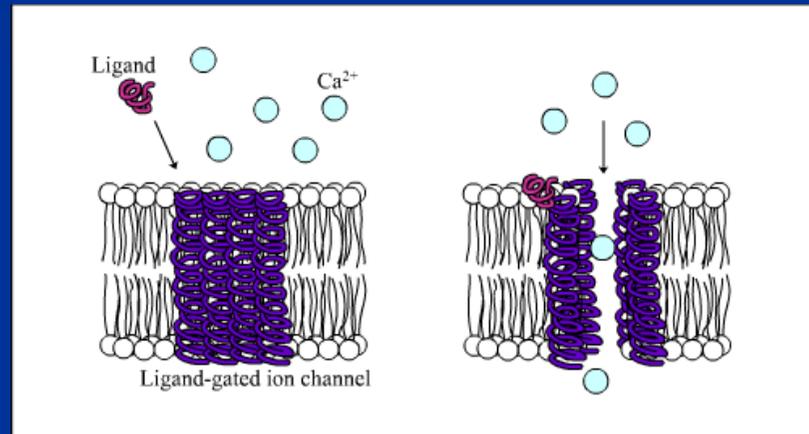


Diffusional trapping of GluR1 AMPA Receptors by Input- Specific Synaptic Activity

M. D. Ehlers, M. Heine, L. Groc, M.-C. Lee, D.
Choquet
(Neuron – Mars 2007)

Récepteurs ionotropiques AMPA et NMDA

- Récepteurs régulant l'activité de canaux ioniques au niveau de la membrane post-synaptique.



- Activés par glutamate (a.a.); spécifiquement activés par AMPA et NMDA respectivement.
- Tétramériques(ex: GluR1 sous-unité d'AMPA)

Plasticité synaptique

= Variabilité de la transmission du signal

Long-Term Potentiation

vs. Long-Term Depression

Facteur essentiel: nombre de récepteurs stabilisés et activés dans les densités post-synaptiques (PSD)

Stabilisation des récepteurs

Modèle principal (années 90):

protéines d'échafaudages = protéines sous-membranaire, en lien avec le cytosquelette

Au cœur des interactions : PSD-95

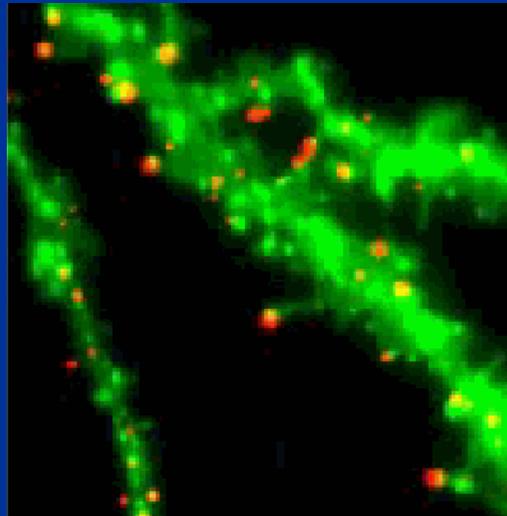
NMDA: OK.

AMPA: mécanisme plus obscur que cela.

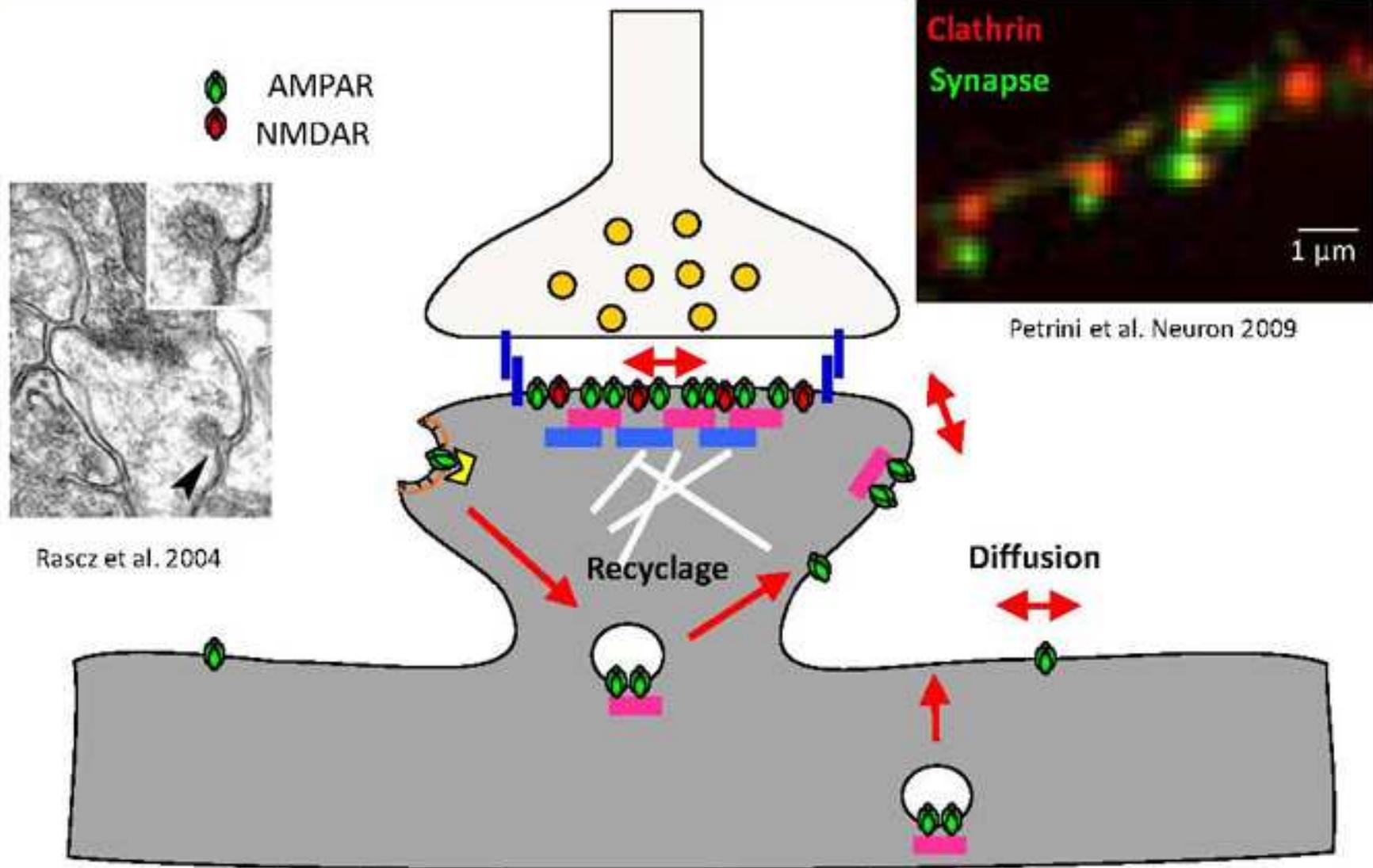
Récepteurs AMPA très mobiles

Observation du laboratoire de Daniel Choquet:

Récepteurs AMPA non stables dans les synapses:
diffusion latérale permettant un transport
vésiculaire intense et un cycle de vie rapide.



Un équilibre complexe entre recyclage et diffusion des récepteurs AMPA



Observation complexe

- Récepteur AMPA: 8 par 10 nm
- PSD: 300 nm

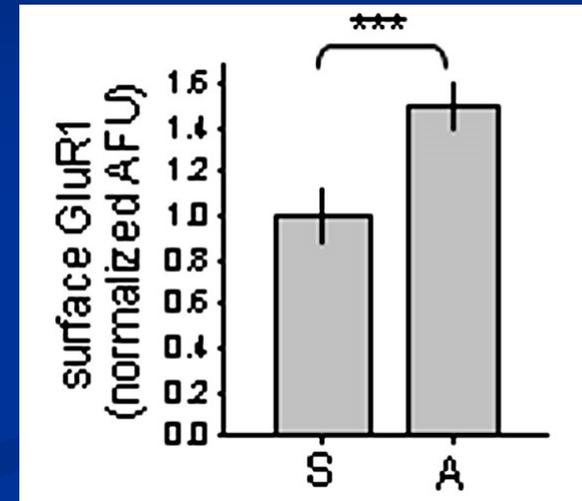
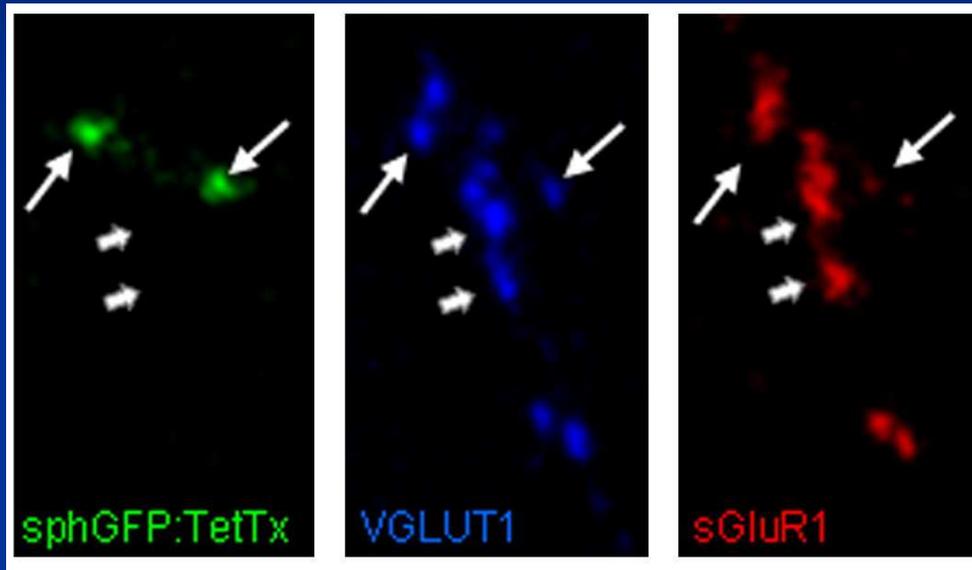
Multiples contraintes biologiques -> plusieurs techniques d'observation simultanées.

- Protéine GFP: temps caractéristique de fluorescence 2ns
- Quantum dots: 5nm

Green Fluorescent-Protein

- Origine: méduse
- Fluorescente sous lumière bleue.
- Synaptophysin-GFP : vésicules synaptiques fluorescents
- Co-exprimée avec la toxine TetTx
 - > Boutons synaptiques: fluo = endormi

Localisation de GluR1



- PSD-95, VGLUT1 etc. indépendants de l'activité
- GluR1 se concentre sur les synapses actives

Suivi de GluR1 par des Quantum Dots

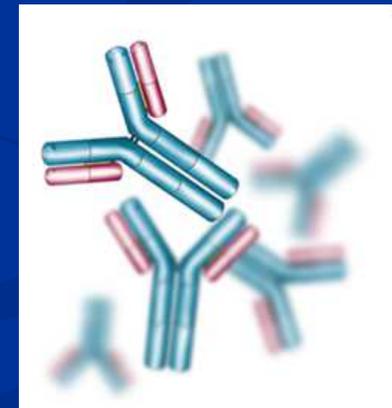
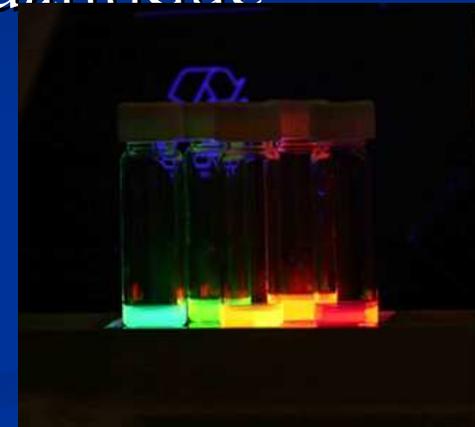
Electrons enfermés dans une boîte quantique

Fluorescence sous U.V.



Avantages de la méthode:

- Acceptable biologiquement
- Visible en continu



Mobilité réduite au niveau des synapses actives

Quantum-Dots marquant GluR1

Légende:

- Rouge: GluR1 (QD)
- Vert: synapse inactive
- Bleu: synapse active



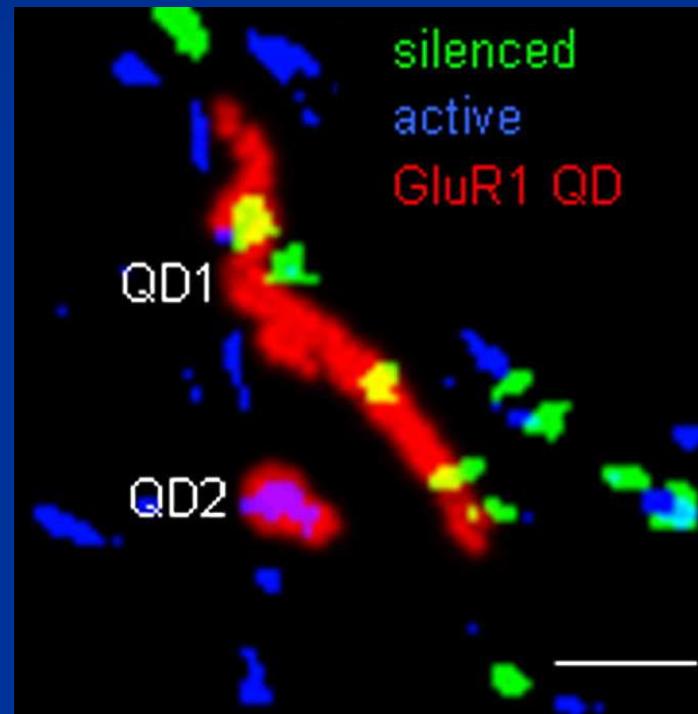
PIIS0896627307002899.mmc2.avi

Mobilité réduite au niveau des synapses actives

Quantum-Dots marquant GluR1

Légende:

- Rouge: GluR1 (QD)
- Vert: synapse inactive
- Bleu: synapse active

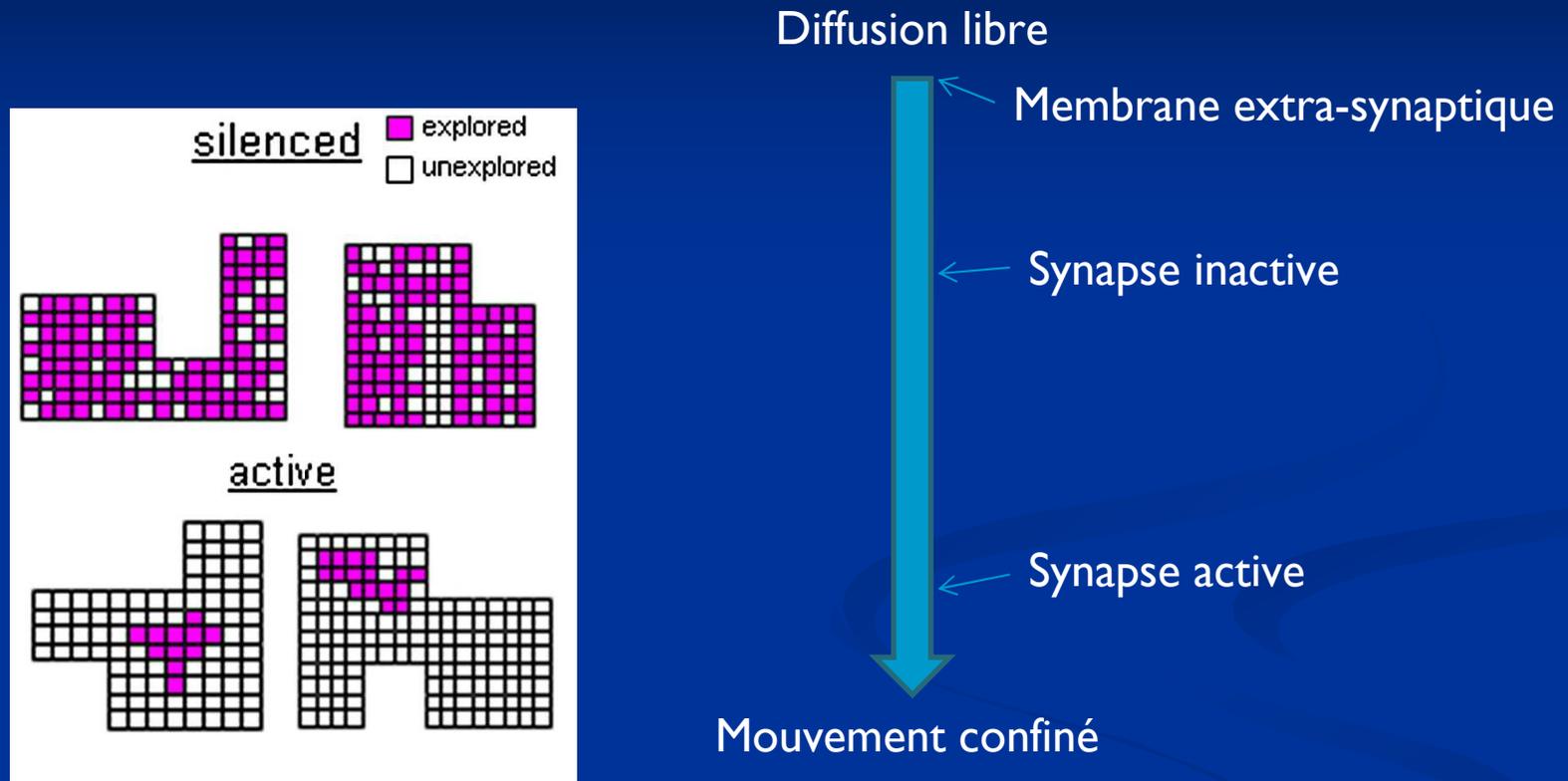


Piégeage de GluR1



PIIS0896627307002899.mmc3.avi

Analyse haute résolution



Mécanismes de réduction de la diffusion latérale de GluRI

- dépendant de l'activité synaptique spontanée
- indépendants de l'activité synaptique spontanée

Modèle de recrutement de GluR1

Mesures antérieures:

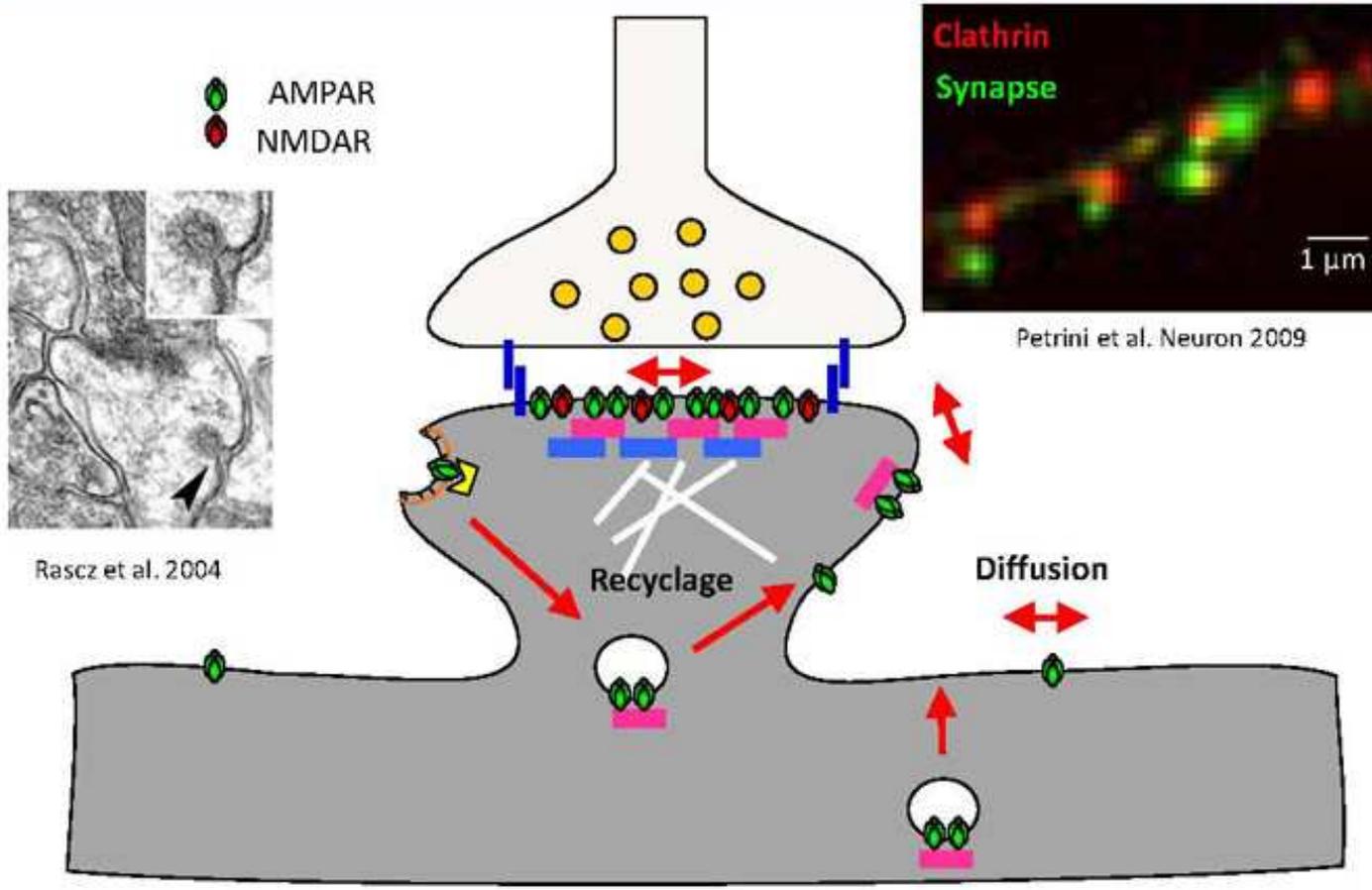
Apport rapide de GluR1 en réponse à un signal

Résultats des études de D. Choquet et al.:

- Stabilisation de GluR1 avec une activité synaptique basale.
- Pas de réactivité immédiate à chute d'activité.
- Domaine extra-synaptique = réservoir de AMPAR

Cycle des récepteurs AMPA

Un équilibre complexe entre recyclage et diffusion des récepteurs AMPA



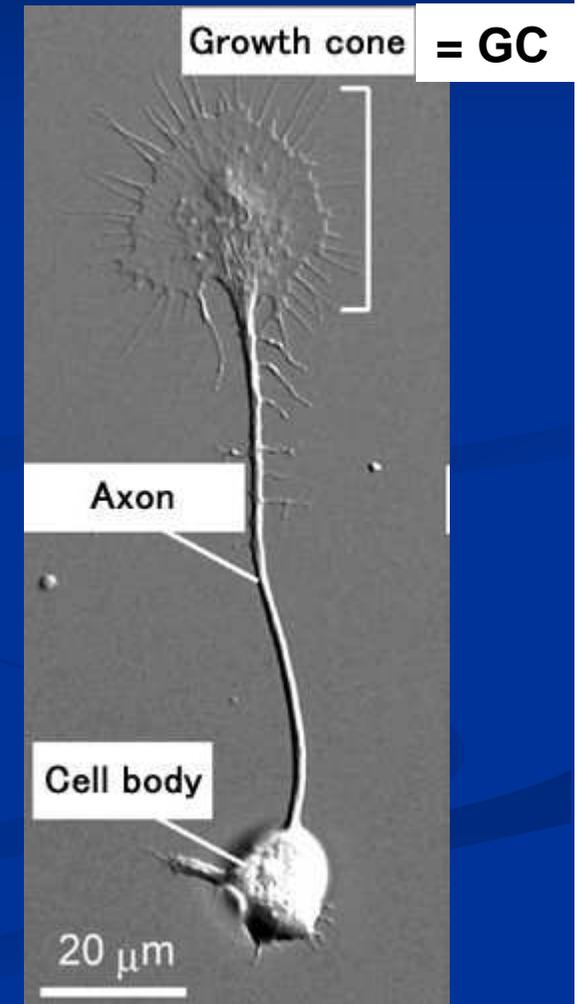
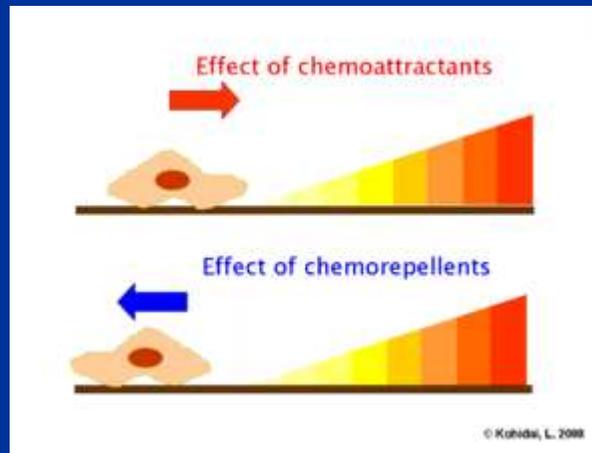
**Asymmetric distribution of GABA
receptors during GABA gradient
sensing by nerve GC analyzed by
single QD imaging**

Cédric Bouzigues, Mathieu Morel, Antoine
Triller, Maxime Dahan

MARS 2007

I. CONTEXTE : développement du SN

- **Croissance axonale**
 - Implique signaux de direction (guidance cues) : CHIMIOTAXIE
 - Cascades de signalisation bien connues (rôle Ca^{2+})

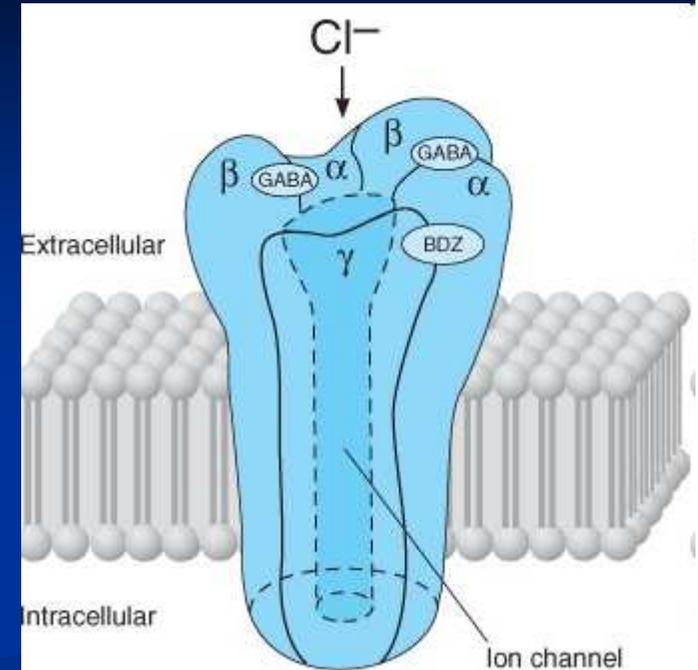
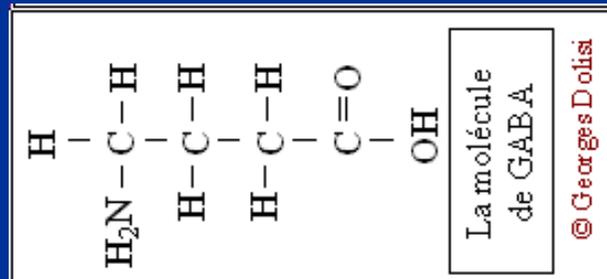


Méconnaissance des mécanismes de transduction

- Redirection du GC
 - asymétries nombreuses ($[Ca^{2+}]$), vésicules de transport, lipid rafts, ...)
- Lipid rafts = plateformes de signalisation
- Hypothèse d'un **lien entre réponse chimiotactique** (dépendante de l'actine et des MT) **et relocalisation des chimiorécepteurs**
 - suivi d'un récepteur en particulier

GABA_ARs

- GABA : une des principales molécules inhibitrices



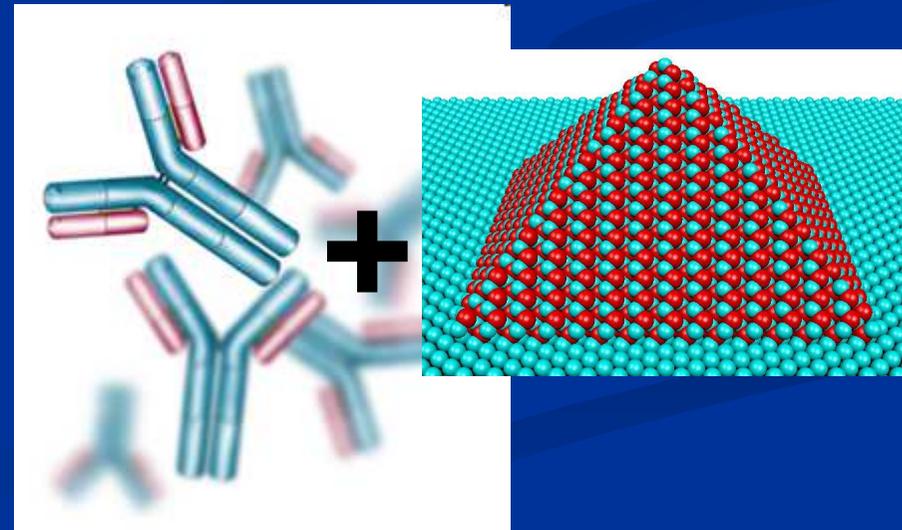
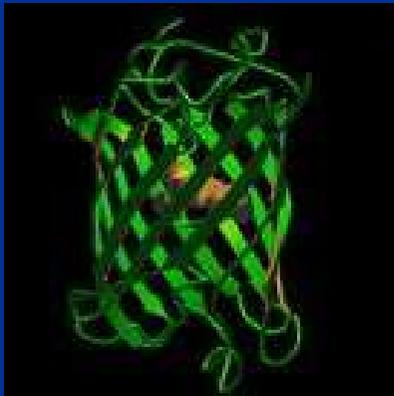
<http://edpharmacologystuff.blogspot.com/>

- Rôle de chimioattractant
- Étude des récepteurs GABA_A (canaux ioniques)

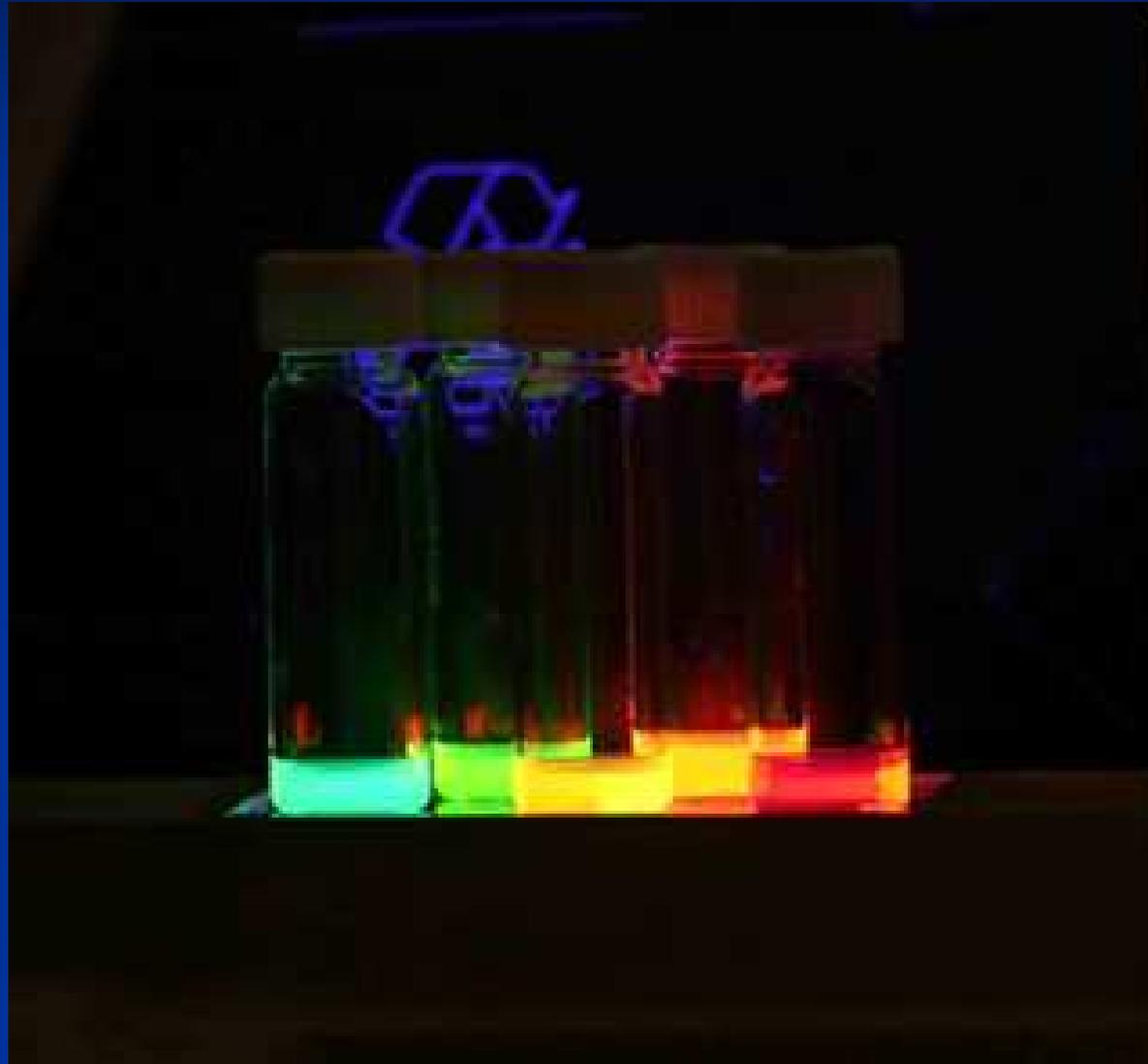
Methode de suivi : QD vs. GFP

- On veut suivi INDIVIDUEL des récepteurs
- Création d'un AC (contre sous-unité $\gamma 2$)
- Comment visualiser ?
- Fluorophores type GFP
- QD = quantum dots

PB : photobleaching



QD (quantum dots)



http://en.wikipedia.org/wiki/File:QD_mini_rainbow.jpg

II. DEMARCHE EXPERIMENTALE

- Redistribution de GABA_ARs en fonction d'un gradient de GABA

→ Observation par imagerie QD

- Neurones embryonnaires de rats
- Lampe à Hg, acquisition par caméra CCD

→ 2/3 des GABA_ARs dans la région proximale au bout de 10 min.

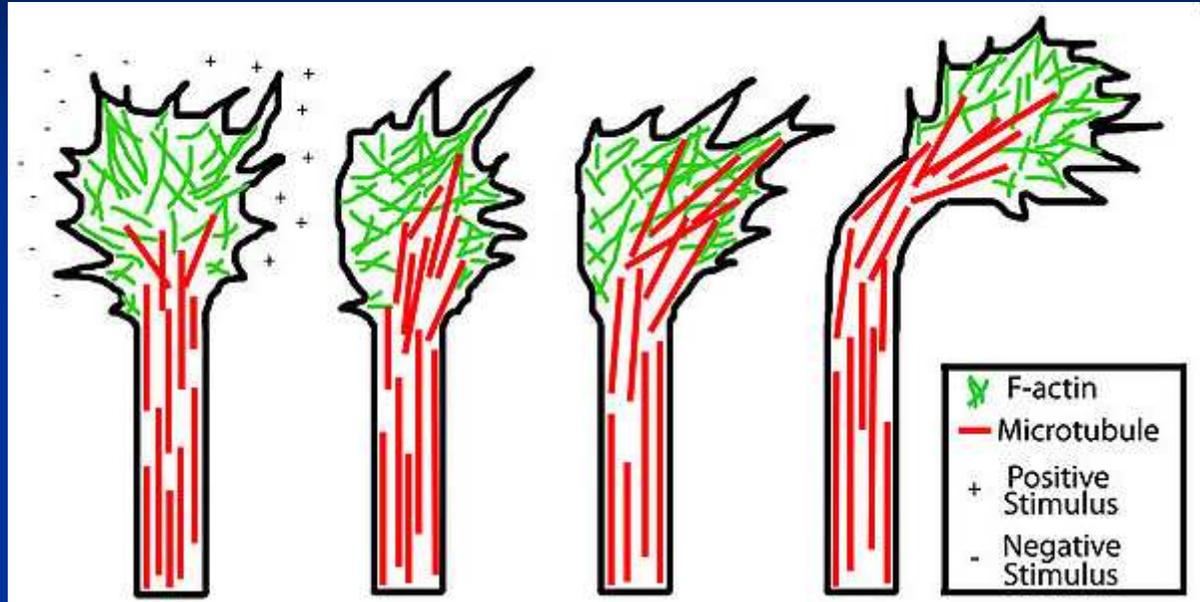
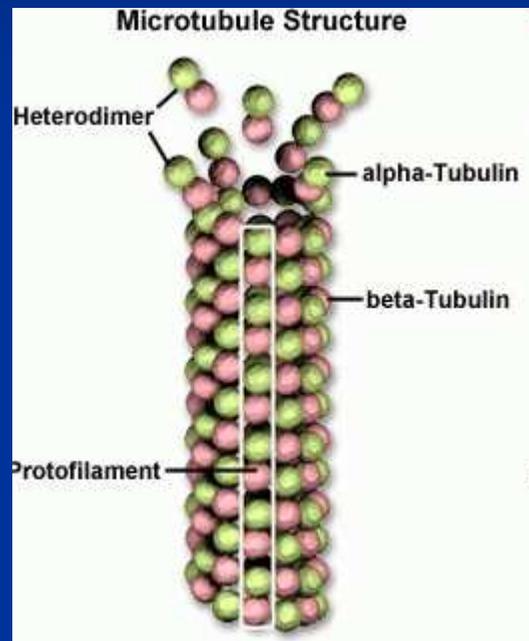
GC inchangés pdt. ~ 20 min.

Spécificité ?

- Redistribution spécifique de GABA_ARs ?
 - Molécules N-CAM restent délocalisées
 - Autre chimioattractant (Ach) : pas de réponse
 - MAIS : gradient Ach + GABA uniforme
 - ASYMETRIE
 - implication du cytosquelette ?
(commun à plusieurs voies de signalisation)

Approche mécanistique

■ Rôle des MT ?

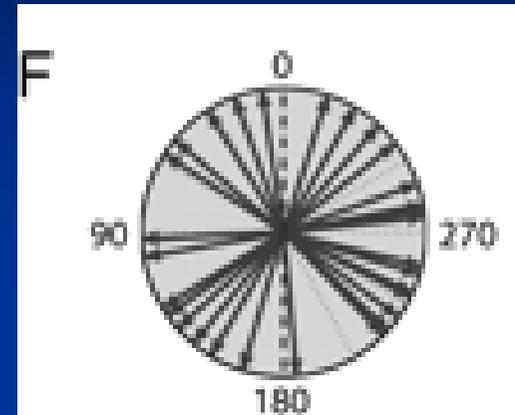


<http://www.answers.com/topic/growth-cone>

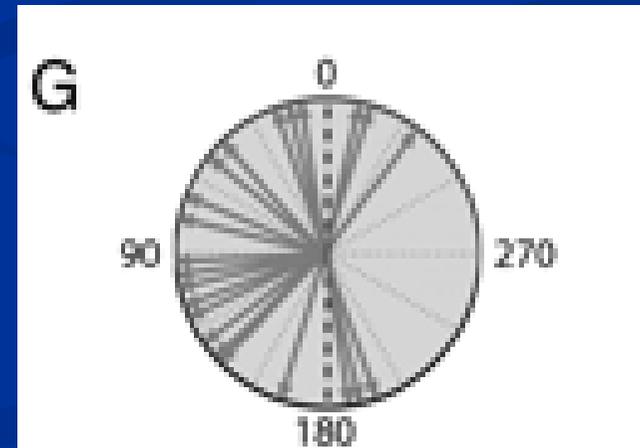
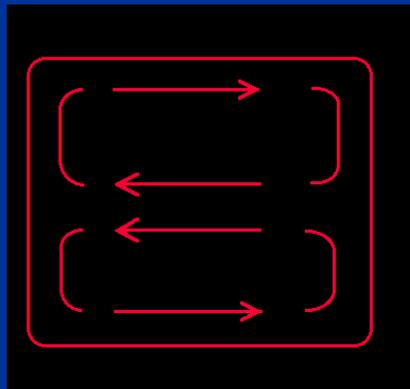
- Nocodazole : dépolymérisation
→ SYMETRIE des GABA_ARs

Etude du mouvement individuel

- En absence de gradient :
Mouvement Brownien



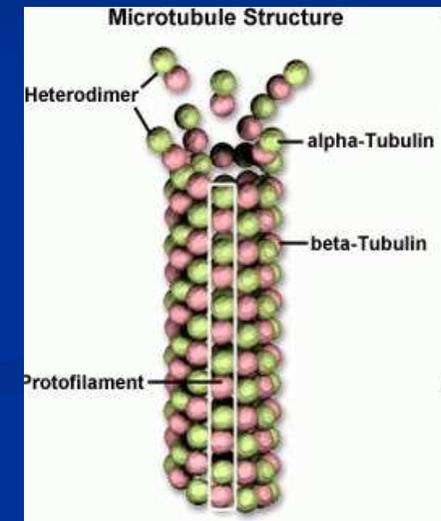
- Avec gradient GABA :
Mouvement de convection



Angles de trajectoires individuelles

MT – dépendance du mouvement de convection

- Nocodazole : reprise du mvt. Brownien même en présence de gradient GABA
- Taxol : stabilise les MT :
mvt. de convection s'arrête !!

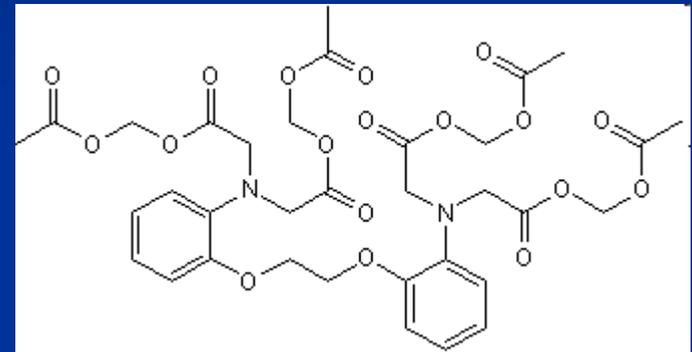


- CCL : probablement interaction des récepteurs avec MT via. molécules intermédiaires.

MT participent activement à la relocalisation.

Rôle de Ca^{2+} ?

- Utilisation d'un chélateur



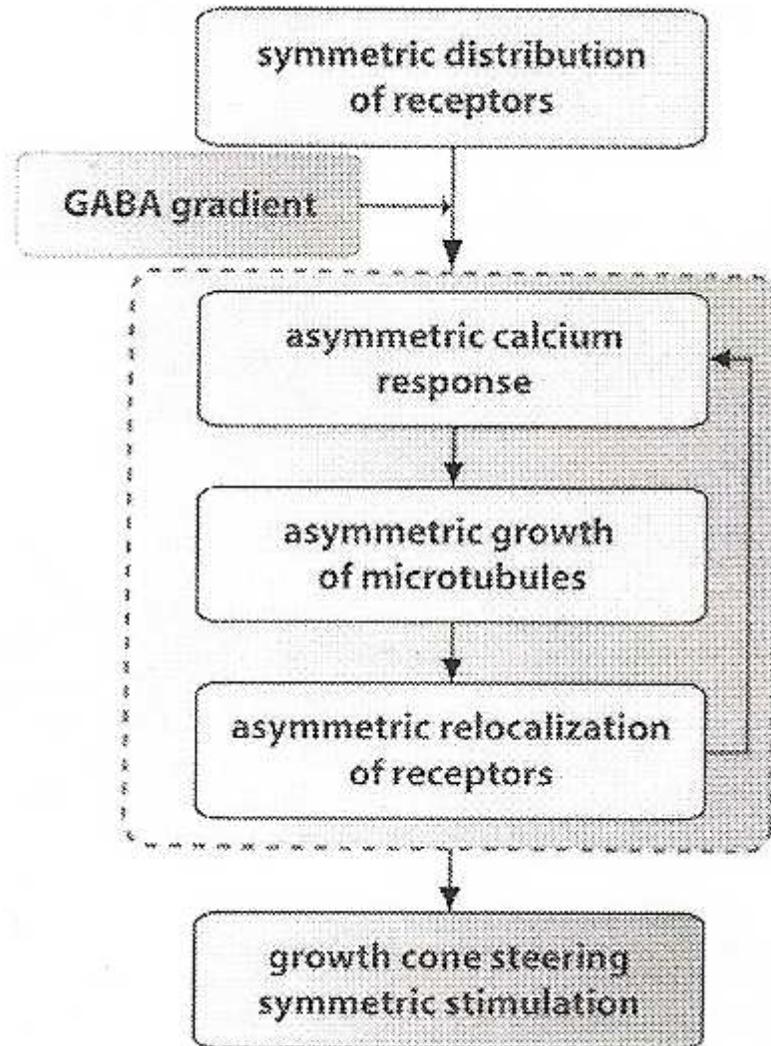
<http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=5296>

→ pas de réponse à gradient GABA

[Ca(2+)]

- Acquisition de la fluorescence d'un colorant sensible à la présence de calcium
- Max. de [Ca(2+)] après $t \sim 10$ min.
- Lien probable avec la redistribution des récepteurs :
 - dépolarisation fait entrer Ca(2+)
 - même temps caractéristique que relocalisation

Résultats obtenus



- Activation des GABA_ARs
- Dépolarisation membranaire
- Ouverture des canaux Ca²⁺
- Effet sur les MT
- Relocalisation des récepteurs
- BOUCLE de rétroaction
- AMPLIFICATION

III. BILAN

- Pb. des 10 min : limite l'expérience, indique le rôle d'étape amplificatrice
- Cas des amibes : relocalisation des molécules intracellulaire en ~ 1 s.
- Reflète les différences de rôle physiologique des gradients entre organismes. (stabilité et fiabilité vs. rapidité du processus)

IV. OUVERTURE

- Approche applicable à d'autres systèmes
- Reste de multiples domaines d'investigation (attraction par contact, répulsion par contact, chimiorépulsion,...)

Conclusion

- Mesures adaptées aux ordres de grandeur en jeu
- Recherche des fonctions dynamiques