

English version

Optical and electrical observations of synaptic transmission on asymmetric suspended membranes

1. Presentation and description of the project

During synaptic transmission, the incoming signal from a neuron is transmitted at a sub-millisecond speed to the next cell at the synapse. A key step in this process is the fusion of synaptic vesicles with the plasma membrane of the neuron. The neurotransmitters they contain are then released into the synaptic cleft to bind to receptors in the target cell. The aim of this course is to reproduce and observe on a model membrane the vesicle fusion and to study the influence of the membrane composition and the number of fusogenic molecules on the kinetics of fusion.

2. Techniques / methods used

Mimicking synaptic transmission quasi-physiologically was until recently technically impossible because the model membranes used did not satisfy all the criteria required to be similar to the plasma membrane and for a complete observation, that is to say optical and electrical, of the fusion process. Our laboratory has developed a membrane that meets all these criteria. This 100 μ m diameter circular membrane is formed on a microfluidic chip that we build with molds obtained by 3D printing in the laboratory. It has the property of being suspended between two microfluidic channels and composed of two layers of compositions independently adjustable mimicking the plasma membrane. It can be observed by confocal microscopy and, simultaneously, its electrical properties can be measured, which makes it possible to follow the fusion of vesicles with great spatial and temporal precision. This membrane will be the support on which the research work will be carried out.

3. Expected results

Two key parameters of synaptic fusion will be considered: the composition of the membrane and the number of fusogenic proteins in the vesicle. Their influence on the rate of attachment of the vesicle to the membrane, the waiting time before fusion, and the opening dynamics of the fusion pore will be studied. The results will shed light on how the membranes and the fusogenic proteins involved interact to make fusion, and thus synaptic transmission, so fast. Models on vesicle binding and pore opening will also be developed.

4. References

1. P. Heo, S. Ramakrishnan, J. Coleman, J.E. Rothman, J.-B. Fleury, and F. Pincet, "Highly Reproducible Physiological Asymmetric Membrane with Freely Diffusing Embedded Proteins in a 3D-Printed Microfluidic Setup", *Small*, 2019: 1900725 (2019).
2. S. Ramakrishnan, A. Gohlke, F. Li, J. Coleman, W. Xu, J.E. Rothman, F. Pincet, "High-Throughput Monitoring of Single Vesicle Fusion Using Freestanding Membranes and Automated Analysis", *Langmuir*, 34 : 5849-5859 (2018).
3. C. François-Martin, J.E. Rothman, F. Pincet, "Low energy cost for optimal speed and control of membrane fusion", *PNAS*, 114: 1238-1241 (2017).
4. W. Xu, B. Nathwani, C. Lin, J. Wang, E. Karatekin, F. Pincet, W. Shih, J.E. Rothman, "A Programmable DNA Origami Platform to Organize SNAREs for Membrane Fusion", *J. Am. Chem. Soc.*, 138: 4439-4447 (2016).
5. W. Xu, J. Wang, J.E. Rothman, F. Pincet, "Accelerating SNARE-mediated Membrane Fusion by DNA-lipid Tethers", *Angewandte Chemie*, 54, 14388-14392 (2015).
6. L. Shi, Q.-T. Shen, A. Kiel, J. Wang, H.-W. Wang, T. J. Melia, J.E. Rothman, F. Pincet, "SNARE Proteins: One to Fuse and Three to Keep the Nascent Fusion Pore Open", *Science*; 335:1355-1359 (2012).

Other unpublished manuscripts will be given to the potentially interested students.

Observations optiques et électriques de la transmission synaptique sur des membranes asymétriques suspendues

1. Présentation et description du sujet

Durant la transmission synaptique, le signal arrivant d'un neurone est transmis à une vitesse sub-milliseconde à la cellule suivante au niveau de la synapse. Une étape clé de ce processus est la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique du neurone. Les neurotransmetteurs qu'elles contiennent sont alors libérés dans la fente synaptique pour se fixer sur des récepteurs de la cellule cible. Le but de ce stage est de reproduire et observer sur une membrane modèle la fusion de vésicule et d'étudier l'influence de la composition membranaire et du nombre de molécules fusogènes sur la cinétique de fusion.

2. Techniques/méthodes utilisées

Mimer de façon quasi-physiologique la transmission synaptique était jusqu'à récemment techniquement impossible car les membranes modèles utilisées ne vérifiaient pas tous les critères requis pour s'apparenter à la membrane plasmique et pour une observation complète, c'est-à-dire optique et électrique, du processus de fusion. Notre laboratoire a développé une membrane vérifiant tous ces critères. Cette membrane circulaire de diamètre 100µm est formée sur une puce microfluidique que nous construisons avec des moules obtenus par impression 3D au laboratoire. Elle possède la propriété d'être suspendue entre deux canaux et composée de deux feuillettes de compositions ajustables indépendamment pour mimer la membrane plasmique. Elle peut être observée par microscopie confocale et, simultanément, ses propriétés électriques peuvent être mesurées ce qui permet de suivre avec une grande précision spatiale et temporelle la fusion de vésicules. Cette membrane sera le support sur lequel le travail de recherche sera effectué.

3. Résultats attendus

Deux paramètres clés de la fusion synaptique seront considérés : la composition de la membrane et le nombre de protéines fusogènes dans la vésicule. Leur influence sur la vitesse d'accrochage de la vésicule à la membrane, le temps d'attente avant la fusion, et la dynamique d'ouverture du pore de fusion sera étudiée. Les résultats permettront de mieux comprendre comment les membranes et les protéines fusogènes impliquées interagissent pour rendre la fusion, et donc la transmission synaptique, aussi rapide.

4. Références

1. P. Heo, S. Ramakrishnan, J. Coleman, J.E. Rothman, J.-B. Fleury, and F. Pincet, "Highly Reproducible Physiological Asymmetric Membrane with Freely Diffusing Embedded Proteins in a 3D-Printed Microfluidic Setup", *Small*, 2019: 1900725 (2019).
2. S. Ramakrishnan, A. Gohlke, F. Li, J. Coleman, W. Xu, J.E. Rothman, F. Pincet, "High-Throughput Monitoring of Single Vesicle Fusion Using Freestanding Membranes and Automated Analysis", *Langmuir*, 34 : 5849-5859 (2018).
3. C. François-Martin, J.E. Rothman, F. Pincet, "Low energy cost for optimal speed and control of membrane fusion", *PNAS*, 114: 1238-1241 (2017).
4. W. Xu, B. Nathwani, C. Lin, J. Wang, E. Karatekin, F. Pincet, W. Shih, J.E. Rothman, "A Programmable DNA Origami Platform to Organize SNAREs for Membrane Fusion", *J. Am. Chem. Soc.*, 138: 4439-4447 (2016).
5. W. Xu, J. Wang, J.E. Rothman, F. Pincet, "Accelerating SNARE-mediated Membrane Fusion by DNA-lipid Tethers", *Angewandte Chemie*, 54,14388-14392 (2015).
6. L. Shi, Q.-T. Shen, A. Kiel, J. Wang, H.-W. Wang, T. J. Melia, J.E. Rothman, F. Pincet, "SNARE Proteins: One to Fuse and Three to Keep the Nascent Fusion Pore Open", *Science*; 335:1355-1359 (2012).

D'autres références non publiées seront fournies aux étudiants intéressés.

Contact : Frédéric Pincet

Laboratoire de Physique de l'ENS, Paris E-mail : pincet@lps.ens.fr