

2M 11.2700.1

Université de Montréal

**Activation et inactivation abrupte de sites synaptiques aux
synapses sensori-motrices de l'Aplysie**

par

Sébastien Royer

Département de physiologie

Faculté de médecine

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade
de Maître ès science (M.Sc.) en sciences neurologiques**

Janvier, 1999

©Sébastien Royer, 1999



W

4

U58

1999

V.049

Université de Montréal

Activation et inactivation abrupte de sites synaptiques aux synapses sensori-motrices de l'Aplisie

par
Sébastien Royer

Département de physiologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade
de Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences neurologiques



Juillet, 1999
Sébastien Royer, 1999

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce Mémoire intitulé:

**Activation et inactivation abrupte de sites synaptiques
aux synapses sensori-motrices de l'Aplysie**

présenté par:

Sébastien Royer

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Jean-Claude Lacaille
Marc Klein
Pierre Drejean

Mémoire accepté le : 99.04.19

Sommaire

Chez l'Aplysie, les neurones mécano-récepteurs sensoriels du siphon contactent les neurones moteurs du siphon avec des synapses très plastiques. L'augmentation et la diminution de la transmission à ces synapses contribuent aux phénomènes d'habituation et de sensibilisation de l'animal aux stimulations tactiles. Nous avons étudié deux formes de plasticité à court terme qui modulent ces synapses sensori-motrices: la dépression homosynaptique qui suit une stimulation répétée de basse fréquence, et la facilitation hétérosynaptique induite par un neurotransmetteur facilitateur endogène (sérotonine).

Pour élucider les mécanismes de ces formes de plasticité, nous avons modifié certaines techniques de l'analyse quantique classique et examiné la cinétique de la dépression sous différents protocoles de stimulation. En particulier, l'analyse quantique permet de déterminer si l'expression de la plasticité résulte d'un changement uniforme de la probabilité de relâche de neurotransmetteurs à tous les sites synaptiques, ou bien de l'activation ou l'inactivation abrupte de sites synaptiques. Dans le premier cas un changement du paramètre binomial p (probabilité de relâche) serait observé, tandis que le second cas donnerait un changement du paramètre binomial n (nombre de sites synaptiques actifs). Pour contourner le problème que pose pour l'analyse quantique la non-stationnarité des EPSPs pendant la dépression synaptique, une méthode d'estimation glissante des paramètres n et p a été développée, qui permet de suivre l'évolution de ces paramètres dans le temps. Le résultat de cette première analyse

indique que la facilitation hétérosynaptique et la dépression synaptique sont accompagnées respectivement d'une augmentation et d'une diminution de n , et résultent alors de l'activation et l'inactivation de sites synaptiques.

La cinétique de la dépression synaptique a été modélisée en assumant que chaque site synaptique relâche un quantum de neurotransmetteur avec une probabilité p et récupère ensuite sa capacité de sécréter avec une constante de temps τ . De là, différentes options ont été essayées pour reproduire la forme de double exponentiel de la dépression, i.e. diminuer p avec le temps, augmenter τ avec le temps, et introduire un taux d'inactivation des sites par stimulus. Tous ces modèles prédisent adéquatement la cinétique pour une stimulation de fréquence homogène, mais seul le modèle qui incorpore un taux d'inactivation des sites réussit à reproduire les courbes expérimentales générées avec des protocoles comportant des pauses et des changements de fréquence de la stimulation. De plus, il est possible de prédire à partir de la valeurs des paramètres du modèle les valeurs des paramètres binômiaux n et p , à chaque instant de la dépression. Une bonne concordance a été observée entre cette prédiction obtenue avec le modèle incorporant un taux d'inactivation des sites et la mesure de n et p par l'analyse quantique.

Mon mémoire est organisé de la façon suivante: Une introduction précède l'article et présente le sujet en partant de thèmes plus généraux, tels la transmission synaptique et la plasticité synaptique, vers les aspects plus spécifiques à ma recherche, tels l'analyse quantique, la facilitation hétérosynaptique et la dépression homosynaptique chez l'aplysie. Une discussion suit l'article et s'intéresse en particulier aux questions sur la nature d'un site synaptique et de l'inactivation d'un site synaptique. J'y présente aussi une

nouvelle technique d'analyse que j'aimerais exploiter dans le futur. Enfin, certaines méthodes développées pour l'analyse quantique sont exposées en annexe.

Table des matières

Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xi
Introduction	1-21
<i>Perspective historique de la synapse</i>	1
<i>Transmission synaptique</i>	4
<i>Perspective historique de la plasticité synaptique</i>	6
<i>Plasticité synaptique</i>	7
<i>L'analyse quantique</i>	10
<i>Plasticité synaptique chez l'aplysie</i>	14
<i>La facilitation par 5HT des synapses sensori-motrices de l'aplysie</i>	15
<i>La dépression des synapses sensori-motrices de l'aplysie</i>	16
<i>Notre étude</i>	20
Article	22-64
Abstract	23
Introduction	24
Materials and methods	26-34
<i>Preparation</i>	26
<i>Electrophysiological recording</i>	27
<i>Data acquisition and analysis</i>	29
<i>Quantal analysis</i>	29
<i>Analysis of recovery from synaptic depression</i>	32
<i>Modeling of kinetics of synaptic depression and recovery</i>	32
Results	35-56

<i>The amplitude distribution of responses at Aplysia sensorimotor synapses is consistent with a binomial model of transmitter release</i>	37
<i>Estimation of p and n in stationary experiments with small numbers of responses: Synaptic depression and facilitation cannot be accounted for by changes in a uniform p</i>	41
<i>Estimation of p and n in non-stationary experiments with larger numbers of responses: Synaptic depression and facilitation can be accounted for by changes in n alone</i>	46
<i>Kinetics of homosynaptic depression and recovery from depression: Synaptic sites switch between on and off states in an all-or-none manner</i>	50
Discussion	57-64
<i>The question of non-uniformity of p</i>	59
<i>Other studies of depression and facilitation at Aplysia sensory-motor neuron synapses</i>	61
<i>Distinct pools of synaptic sites</i>	63
Discussion	65-78
<i>Le modèle proposé</i>	65
<i>Récupération et description morphologique d'un site synaptique</i>	66
<i>Inactivation des sites synaptiques</i>	67
Expériences projetées	70
<i>Construction des histogrammes prédits par les paramètres du fit de la cinétique</i>	72
<i>Utilisation possible de cette méthode</i>	74
Conclusion	77
Références	79-89

Annexe	i-x
<i>Méthode pour trouver la taille du quantum q</i>	i
<i>Évaluation glissante de p</i>	v
<i>Distribution des p à travers les sites synaptiques</i>	vii

Liste des figures

Figure 1: Image EM (microscope électronique) d'une synapse formée entre les somata d'un neurone sensoriel et d'un neurone moteur de l'aplysie.....	2
Figure 2: Histogramme de fréquence.....	11
Figure 3: Action de la sérotonine sur la relâche de neurotransmetteurs des neurones sensoriels.....	15
Figure 4: Modèle de synapse.....	17
Figure 5: Courbes de dépression des synapses sensori-motrices.....	19
Figure 6: Small variability of depressed EPSPs and large facilitation by 5HT.....	38
Figure 7: Binomial fits of amplitude distributions of sensorimotor EPSPs.....	40
Figure 8: Comparison of calculated p with “maximal” p predicted from uniform decline in p during homosynaptic depression.....	43
Figure 9: Absence of change in p with synaptic depression or 5HT-induced facilitation.....	44
Figure 10: Absence of change in sliding estimate of p during homosynaptic depression.....	48
Figure 11: Decline in recovery from depression with progressive stimulation.....	51
Figure 12: Fits of homosynaptic depression and recovery with a model incorporating switching off of release sites.....	53
Figure 13: A. Fits of depression and recovery after varying periods of rest with the switching model. B. Fits of experiments with changing interstimulus intervals.....	55
Figure 14: Dépressions synaptiques dans des milieux d'enregistrement au niveau de $[Ca^{2+}]$ modulé.....	69
Figure 15: Fit de la cinétique et prédiction de la distribution quantique	73
Figure 16: Fit de la cinétique et prédiction de la distribution quantique avec un modèle qui comporte 2 constantes de temps de recharge τ	76

En annexe

Figure 17: Méthode pour trouver la taille du quantum q	ii
Figure 18: Premier test du programme.....	iii
Figure 19: Deuxième test pour le programme.....	iv
Figure 20: Moyennes de q estimés par le programme, sur 20 distributions simulées avec chaque valeurs de CVq	iv
Figure 21: Évaluation glissante de la probabilité apparente de relâche.....	v
Figure 22: Sensibilité de la méthode pour détecter un changement de p	vii
Figure 23: Distributions possibles des probabilités de relâche parmi les sites synaptiques pour $m=10$, $n_{tot}=30$, et A: $p_{app}=0.4$, B: $p_{app}=0.8$	viii
Figure 24: Évolution de p_{app} lors d'une même dépression de m obtenue par deux différentes façons de modifier les probabilités de relâche des sites synaptiques.....	ix

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
ASW	Eau de mer artificielle
CV	coefficient de variation
CV _q	coefficient de variation du quantum
EPSP	Potentiel post-synaptique excitateur
Fit	Action de modifier les paramètres libres d'une formule pour que la courbe de celle-ci concorde avec la courbe de données expérimentales
5HT	Sérotonine
LFS neuron	Neurone moteur du siphon
LTP	Potentialisation à long terme
LTD	Dépression à long terme
m	Contenu quantique moyen
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
No	Numéro
p	Probabilité de relâche
P _{app}	Mesure de la probabilité de relâche donnée par l'analyse quantique
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PSP	Potentiel post-synaptique
q	Taille du quantum
SD	Écart-type

Introduction

Perspective historique de la synapse

Le terme synapse fut introduit pour la première fois par Sherrington dans *A text book of physiologie* (1897). Depuis, l'avancement des connaissances sur la synapse évolua au fil de nombreuses controverses.

Sherrington postula que la synapse était un contact essentiellement sans continuité de substance entre deux cellules nerveuses, ce qui permettrait d'après lui un changement de la nature de "l'influence nerveuse" alors qu'elle passe d'une cellule à l'autre. Cette idée, plutôt motivée d'arguments fonctionnels que de preuves morphologiques, était en contradiction avec les observations de Held (1897) qui, avec une méthode de marquage au nitrate d'argent, voyait une continuité protoplasmique au contact entre deux neurones. La morphologie des synapses ne pouvait en fait être observée adéquatement à l'échelle du microscope optique, et il fallut attendre l'invention du microscope électronique pour observer un espace de quelques centaines d'Ångströms entre les membranes pré et post-synaptiques au niveau du contact synaptique (fig.1, "Fente synaptique"), et donner ainsi raison à Sherrington (De Robertis et Bennett 1955; Palay 1956).

Lorsqu'en 1935, Dale proposa l'acétylcholine comme transmetteur chimique opérant à la jonction neuromusculaire et aux synapses ganglionnaires (Dale 1935), celui-ci réanima la controverse sur la nature chimique ou électrique de la transmission synaptique. Ce fut le développement des techniques d'enregistrement intracellulaire qui mit un terme au débat en faveur de l'hypothèse chimique pour la jonction

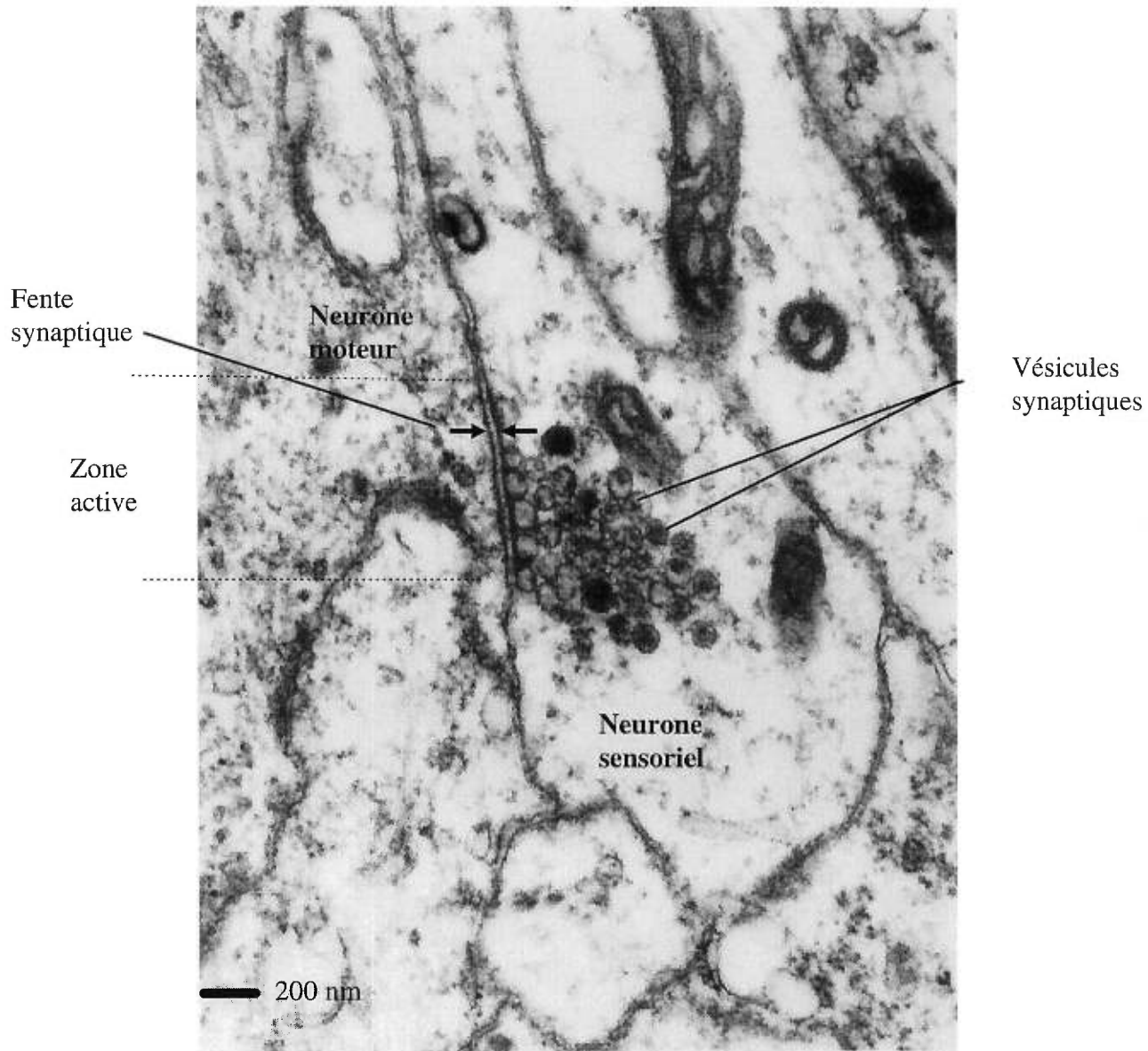


Figure1: Image EM (microscope électronique) d'une synapse formée entre les soma d'un neurone sensoriel et d'un neurone moteur de l'aplysie.

neuromusculaire (Fatt et Katz 1951), pour la transmission ganglionnaire (Blackman et al. 1963), et pour les synapses excitatrices et inhibitrices centrales (Brock et al. 1952; Eccles et al. 1954). Cependant, la transmission électrique était découverte peu après chez une minorité de synapses (Furshpan et Potter 1959; Bennett et al. 1963). Il fut établi par la suite que la "gap junction" était le substrat morphologique de cette forme de transmission synaptique (Brightman et Reese 1969; Payton et al. 1969).

Peu après l'introduction du microscope électronique, différents groupes reportèrent la présence d'un grand nombre de vésicules au niveau des terminaisons pré-synaptiques (fig.1, "Vésicules synaptiques") (De Robertis et Bennett 1954; Palade 1954; Palay 1954). De Robertis et Bennett (1955) suggérèrent que les vésicules synaptiques perforaient la membrane pré-synaptique pour décharger leur contenu dans la fente synaptique. Chaque vésicule serait alors un réservoir de neurotransmetteurs. La même année, Del Castillo et Katz (1954) proposèrent l'hypothèse de la relâche quantique de neurotransmetteurs pour la jonction neuromusculaire, se basant sur une étude statistique des fluctuations des potentiels post-synaptiques évoqués. L'hypothèse vésiculaire (Del Castillo et Katz 1956; Katz 1962) découla alors de l'idée que les vésicules synaptiques pourraient être la contrepartie morphologique des quanta de neurotransmetteurs. Celle-ci prédisait que la relâche de neurotransmetteurs serait accompagnée des deux altérations morphologiques suivantes: Les terminaisons pré-synaptiques contiendraient moins de vésicules synaptiques après une relâche abondante de neurotransmetteurs, et la surface de la membrane pré-synaptique augmenterait au niveau du contact synaptique lorsque la membrane des vésicules fusionne avec celle de la terminaison pour relâcher les neurotransmetteurs. Ces prédictions ont été vérifiées par la suite (Ceccarelli et al. 1972;

Heuser et Reese 1973). Toutefois, l'hypothèse vésiculaire n'est toujours pas universellement acceptée (Israel et al. 1979; Tauc 1982).

Transmission synaptique

Aujourd'hui, il est généralement accepté que la transmission à la synapse chimique s'effectue dans l'ordre des séquences suivantes: Le potentiel d'action pré-synaptique se propage jusqu'aux terminaisons synaptiques qu'il dépolarise, causant l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendant. L'influx de calcium provoque l'exocytose des vésicules synaptiques et la relâche des neurotransmetteurs, qui diffusent alors dans la fente synaptique jusqu'aux récepteurs membranaires post-synaptiques. La liaison des neurotransmetteurs avec ces récepteurs entraîne l'ouverture de canaux ioniques, et dans le cas où l'influx d'ions sodium dépolarise suffisamment la membrane post-synaptique pour activer les canaux voltage-dépendant, le potentiel d'action est alors régénéré dans la cellule post-synaptique.

Lors d'un potentiel d'action, la concentration locale de calcium à un site synaptique peut s'élever jusqu'à 75 mM ou plus, comparativement à 0.1-0.2 mM au repos (Landò et Zucker 1994). Le taux de sécrétion de neurotransmetteurs a une relation hautement nonlinéaire avec la concentration de calcium dans les terminaisons présynaptiques, et une hypothèse est qu'au moins trois à quatre ions Ca^{2+} doivent se lier en coopération positive à un complexe cible pour provoquer la sécrétion (Dodge et Rahamimoff 1967). L'identité du complexe cible du calcium pour l'exocytose des vésicules synaptiques est toujours débattu, mais la courte durée du délai synaptique, 0.2 ms de l'ouverture des canaux calciques au début de la relâche de neurotransmetteurs (Llinàs et al. 1981), pose

certaines contraintes sur les propriétés de celui-ci. Le complexe doit être étroitement associé aux canaux calciques, vu qu'il n'y a pas le temps pour que le calcium diffuse et s'équilibre dans le cytoplasme. D'autre part, seules les vésicules qui sont déjà ancrées aux sites de relâche peuvent sécréter, car il n'y a de même pas le temps pour que celles-ci diffusent jusqu'à la membrane plasmique. Aussi, il est probable que la fusion des vésicules synaptiques soit initiée directement par un changement de conformation et/ou de potentiel électrostatique de la protéine-senseur au Ca^{2+} , plutôt que par une cascade moléculaire impliquant des liaisons covalentes, plus lente (Geppert et Südhof 1998).

Plusieurs nouvelles méthodes pour explorer l'exocytose aux terminaisons pré-synaptiques ont été développées ces dernières années (Neher 1998), telles la mesure de la capacitance membranaire (Gillis 1995), l'utilisation de marqueurs fluorescents capturés lors de l'endocytose des vésicules (Betz et Bewick 1992) et de la photolyse de Ca^{2+} encagés par un flash de lumière (Heidelberger et al. 1994). Grâce à celles-ci et aux techniques modernes de manipulation génétique et de biologie moléculaire, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires de l'exocytose et la connaissance des protéines vésiculaires. Le répertoire connu des protéines vésiculaires comprend des protéines impliquées dans la recharge des vésicules (une pompe à proton et un transporteur de neurotransmetteurs (Maycox et al. 1990, Stern-Bach et al. 1990), des protéines interagissant avec le cytosquelette (la CaMKII est associée aux vésicules en périphérie et sert de point d'attache à la synapsin qui lie les vésicules aux filaments d'actine (Greengard et al. 1993)), et les protéines utilisées pour l'ancrage des vésicules aux sites de relâche et l'exocytose. L'ancrage des vésicules consiste en la formation d'un complexe protéique, dans lequel interagissent des

protéines vésiculaires (synaptotagmines, synaptobrevines, rab3, synaptophysines, etc...), des protéines de la membrane pré-synaptique (syntaxines, SNAP-25, neurexines, canaux Ca^{2+} , ...), et des protéines cytoplasmiques (NSF, SNAPs,...) (Rothman and Orci 1992, Greengard et al. 1993). En particulier, la synaptobrevine forme avec la syntaxine et SNAP-25 le complexe noyau qui lie les vésicules à la membrane pré-synaptique (Rothman and Orci 1992, Söllner et al. 1993, Hayashi et al. 1994, McMahon and Südhof 1995, Sutton et al. 1998). L'exocytose est précédée par un stade intermédiaire d'amorçage ("priming" en anglais) des vésicules, où a lieu une fusion partielle (hémifusion) des membranes vésiculaire et présynaptique (Südhof 1995). La fusion des membranes n'est alors complétée que lors de l'influx de Ca^{2+} , par des mécanismes moléculaires encore obscurs. La synaptotagmine et rab3 sont deux protéines d'intérêt particulier impliquées dans l'exocytose: la synaptotagmine est considérée comme le senseur au Ca^{2+} qui initie l'exocytose, tandis que rab3 aurait la capacité de réguler le nombre de vésicules relâchées par zone active pour chaque stimulus (Geppert et Südhof 1998).

Perspective historique de la plasticité synaptique

Le terme plasticité fut introduit par James (1890), qui établit dans son livre *The principles of psychology*, "qu'une habitude acquise n'est autre qu'un nouveau circuit de décharge formé dans le cerveau ... Le tissu nerveux semble comporter un degré extraordinaire de plasticité.". Konorski (1948) postula qu'un stimulus provoquant un réflexe conditionné induisait dans le système nerveux un changement transitoire d'excitabilité, et une transformation prolongée qu'il appela de même "plasticité".

L'acquisition d'un réflexe conditionné amènerait la formation et la multiplication de contacts synaptiques, tandis que l'absence d'usage ou de renforcement du circuit entraînerait l'atrophie progressive des contacts synaptiques. À la même époque, Hebb (1949) proposait que la synapse était renforcée lorsque les activités des neurones pré et post-synaptiques étaient concomitantes. Cette hypothèse fut d'abord confirmée par les travaux de Wiesel et Hubel (1965) sur le développement de la vision binoculaire chez les chattons, puis de façon plus influente par les découvertes de la potentialisation à long terme (LTP) (Bliss et Lomo 1973) et de la dépression à long terme (LTD) (Ito et al. 1982). Aujourd'hui, le terme "synapse hebbienne" réfère aux formes de plasticité qui nécessitent la coactivation des éléments pré et post-synaptiques, et les LTP-LTD sont parmi les plus étudiés des mécanismes cellulaires de plasticité synaptique reliés à l'apprentissage et la mémoire.

Plasticité synaptique

Le système nerveux centrale est le système qui présente la plus grande diversité de cellules, chez l'animal. Les neurones sont interconnectés par des synapses sujets à plusieurs formes de plasticité, initiées par des mécanismes spécifiques pour chaque type de neurone. L'expression de la plasticité synaptique consiste essentiellement soit en l'augmentation de la transmission synaptique, soit en sa diminution. On peut toutefois catégoriser les formes de plasticité synaptique suivant plusieurs autres critères:

_Tout d'abord, la plasticité peut s'exprimer pendant un temps variable, selon qu'il s'agisse d'une forme de plasticité à court terme ou à long terme. Il est suggéré que la plasticité à court terme implique uniquement des changements covalents de molécules

pré-existantes dans le complexe synaptique, et modifie la transmission synaptique pendant une relativement courte durée (quelques secondes à quelques heures), tandis que la plasticité à long terme nécessiterait la synthèse nucléaire et aurait un effet plus durable (quelques heures à quelques jours, années...) (Kandel and Schwartz 1982, Squire 1982). La plasticité à long terme peut être accompagnée de changements morphologiques telles l'altération du nombre et de la taille des zones actives (Bailey and Chen 1983). Le phénomène de consolidation de la mémoire résulterait du passage d'une forme de plasticité à court terme à une forme de plasticité à long terme, au niveau synaptique (Bailey et Chen 1983).

Les formes de plasticité se distinguent aussi par leur mécanisme d'induction. L'accumulation de Ca^{2+} dans le compartiment pré et/ou post-synaptique semble être un facteur important dans l'induction de nombreuses formes de plasticité, à court terme tel la potentialisation post-tétanique (Rosenthal 1969), et à long terme tels la LTP (Lynch et al. 1983, Malenka et al. 1988) et la LTD (Sakurai 1990). Alors que dans le cas de la potentialisation post-tétanique le Ca^{2+} s'accumule dans le compartiment pré-synaptique lors d'une stimulation tétranique (50-500 Hz pendant 10 secondes) (Larrabee and Bronk 1947, Lloyd 1949, Eccles and Rall 1951), les formes hebbiennes de LTP et LTD nécessitent la coactivation des cellules pré-synaptique et post-synaptique. La dépolarisation de la cellule post-synaptique déloge le Mg^{2+} qui bloque en temps normal les canaux récepteurs NMDA perméables au Ca^{2+} , et l'influx important de Ca^{2+} qui en résulte agit par l'intermédiaire de messagers seconds sur les récepteurs non-NMDA post-synaptiques (Malenka et al. 1989). Un niveau plus élevé de $[\text{Ca}^{2+}]$ dans le compartiment post-synaptique induirait la LTP plutôt que la LTD (Lisman 1989). Un

neurotransmetteur sécrété par une tierce cellule peut aussi moduler les synapses entre deux autres cellules, par exemple la sérotonine (5HT) induit la facilitation à court et long terme des synapses sensori-motrices des réflexes de retrait du siphon et de la branchie chez l'aplysie (Castellucci and Kandel 1976). Enfin, plusieurs dépressions synaptiques à court terme peuvent être expliquées par des mécanismes de déplétion de réserves de vésicules synaptiques (Zucker 1989).

La plasticité peut impliquer des changements à différents niveaux de la transmission synaptique. Tout d'abord, la plasticité peut résulter de changements pré-synaptiques qui modifieraient la relâche des neurotransmetteurs, comme dans le cas de la dépression homosynaptique (Castellucci and Kandel 1974) et de la facilitation hétérosynaptique par 5HT (Castellucci and Kandel 1976) des synapses sensori-motrices chez l'aplysie, et/ou elle peut venir de changements post-synaptiques: Par exemple, la LTD des synapses entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje du cervelet résulte d'une diminution de la sensibilité des récepteurs synaptiques au glutamate (Ito et al. 1982), tandis que des changements pré et post-synaptiques coexisteraient pour certaines formes de LTP (Kullmann and Nicoll 1992, Larkman et al. 1992). De plus, la plasticité peut s'exprimer spécifiquement à certains sites (boutons synaptiques, zones actives, ...) de la connexion synaptique, i.e. résulter d'un changement du nombre de sites de relâche actifs, et/ou bien uniformément par un changement de la probabilité de relâche sur tous les sites synaptiques (Zucker 1989).

Le site de la plasticité peut être étudié à l'aide d'une méthode statistique, l'analyse quantique, qui se base sur l'hypothèse quantique de la relâche de neurotransmetteurs à la jonction neuromusculaire (Del Castillo et Katz 1954).

L'analyse quantique

L'analyse quantique assume que la connection synaptique se compose d'un nombre n de sites de relâche qui ont une certaine probabilité p de relâcher dans la fente synaptique le contenu d'une vésicule, un quantum, par potentiel d'action. Un site de relâche pourrait être par exemple une zone active, un bouton synaptique ou un site d'ancrage, et son activité est indépendante de l'activité des autres sites. Un tel modèle prédit un procédé binomial de la relâche de neurotransmetteurs (McLachlan 1978), i.e. pour des valeurs spécifiques de n et p , la chance $P(x)$ que x quanta soient relâchés lors d'un potentiel d'action est décrite par la loi binomiale:

$$P(x) = \frac{n!}{(n-x)!x!} p^x (1-p)^{n-x} \quad (1)$$

Le cas limite de la loi de Poisson pour $p \ll 1$ et $n \gg m$ (m étant le contenu quantal moyen) décrit adéquatement la statistique de la relâche de neurotransmetteur à la jonction neuromusculaire (Del Castillo et Katz 1954) et à certaines synapses centrales (Bekkers et Stevens 1995).

L'amplitude des PSPs ne fluctue pas aussi simplement que suivant la relation (1), du fait qu'il y a aussi une variabilité au niveau du quantum: Les réponses post-synaptiques engendrées par l'exocytose spontanée d'une vésicule (minis = quantum) montrent suivant les préparations différents coefficients de variation d'amplitude (CV_q) (0.3 à la jonction neuromusculaire (Martin 1965), moins de 0.05 dans les neurones moteurs spinaux (Jack et al. 1981, Redman 1990, Walmsley 1991), 0.42 dans les tranches d'hippocampe (Edwards et al. 1990, Bekkers et al. 1990)). Différents facteurs contribuent à la variabilité des minis, entre autres la variabilité de la taille des vésicules

synaptiques (Bekkers et al. 1990) et/ou la variabilité du nombre de récepteurs post-synaptiques entre différents sites (Redman 1990). L'amplitude des minis suivent alors une distribution gaussienne ou gamma (Bekkers et al. 1990) dont la largeur est fonction de CVq , du bruit intrinsèque de la cellule post-synaptique et de celui de l'enregistrement. Par conséquent, les données expérimentales sont représentées par une

somme de gaussiennes $e^{-\frac{(x'-x)^2}{2\sigma^2}}$ (ou de fonctions gamma) centrées aux différentes valeurs des multiples de la taille du quantum q , de

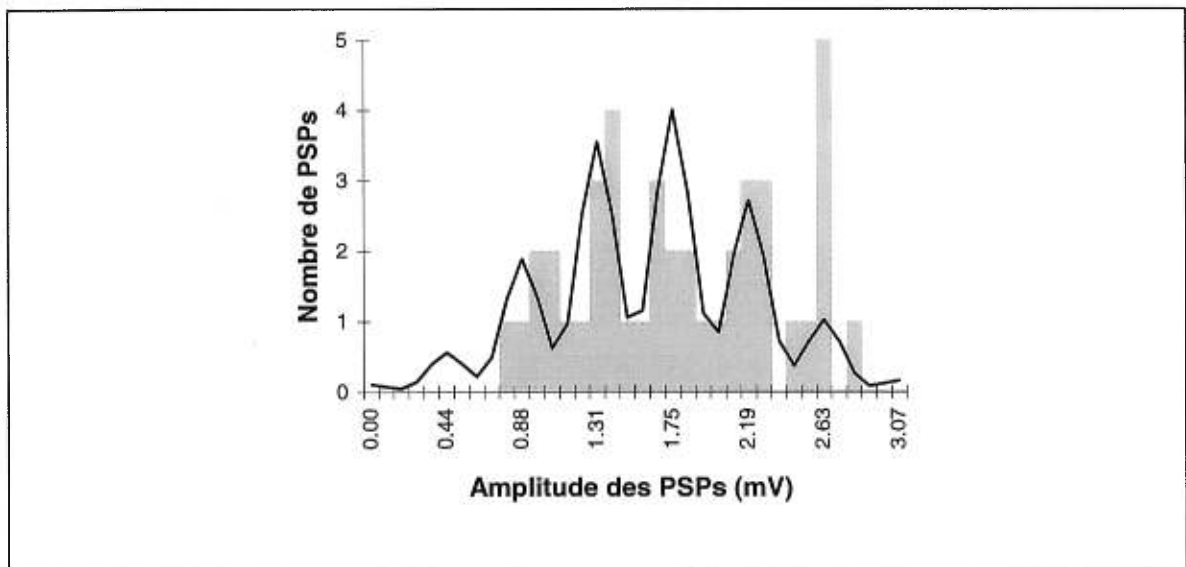


Figure2: Histogramme de fréquence. Barres: distribution expérimentale. Courbe pleine: distribution binômiale avec $n = 7$, $p = 0.53$, $q = 0.438$, coefficient de variation quantique $CVq = 0$ et écart-type du bruit = 0.105.

variances σ^2 qui est la somme des formes de variabilité du quantum, et d'aires égalent aux $P(x)$ de la relation (1). La figure 2 (courbe pleine) montre la représentation d'une telle fonction sous forme d'histogramme de fréquence, pour 42 potentiels d'action. La fonction prédit alors pour chaque amplitude en abscisse le nombre moyen de PSPs qui atteignent cette amplitude. Un bon choix de la taille du quantum q permet d'aligner les

gaussiennes avec les pics de la distribution expérimentale tandis que l'optimisation des paramètres n et p donne la meilleure superposition des courbes expérimentales et théoriques. Cette méthode permet de trouver les paramètres q , n et p , et ainsi de définir certains aspects de la plasticité synaptique. Un changement de la taille du quantum q après l'induction de la plasticité indiquerait une location post-synaptique de la plasticité et/ou un changement de la quantité de neurotransmetteurs par vésicules (Sulzer et al. 1995), tandis qu'aucun changement de q indiquerait que la plasticité agit sur les processus de relâche et/ou de recharge des sites synaptiques. Aussi, une modification homogène de la sécrétion à tous les sites synaptiques se traduirait par un changement de la probabilité de relâche p , tandis que l'activation ou l'inactivation d'uniquement certains sites spécifiques paraîtraient comme un changement du paramètre n .

L'estimation des paramètres n et p nécessite toutefois certaines précautions, en raison des assumptions que pose la méthode. En particulier, p est présumée uniforme à travers tous les sites de relâche, ce qui est peu probable et contredit par les preuves expérimentales (Zucker 1989). Toute variance de p à travers les sites de relâche cause la surestimation de la valeur moyenne de p et la sous-estimation de n , et les véritables changements en p risquent d'être mesurés comme des changements apparents de n (Zucker 1989). En effet, le p mesuré (p apparent) avec l'analyse quantique correspond à la moyenne pondérée suivante:

$$p_{\text{apparent}} = \frac{\sum_i m_i \cdot p_i}{\sum_i m_i} \quad \text{où } m = np \text{ est appelé le contenu quantal moyen.} \quad (2)$$

Si par exemple une connection comptait 10 sites avec une probabilité de relâche de 0.9 et 10 autres sites avec une probabilité de 0.5, $m = \sum m_i = 14$, $p_{\text{apparent}} = 0.76$ et $n_{\text{apparent}} = m/p_{\text{apparent}} = 14/0.76 = 18.4$, donc p_{apparent} est plus grand que la moyenne des p ($= 0.7$) et n_{apparent} est plus petit que le n véritable ($= 20$). Si un changement en p agit de sorte que les sites avec la probabilité de relâche de 0.5 relâchent avec une probabilité de 0.2, alors $m = 11$, $p_{\text{apparent}} = 0.77$ et $n_{\text{apparent}} = 14.3$, et donc le changement observé semble uniquement en n . Intuitivement, comme p_{apparent} est une moyenne pondérée des p , de sorte que plus un site a un p élevé plus il a un poids important dans l'équation (2), la diminution du p de sites qui sont déjà de faible p diminue aussi le poids de ces sites dans l'équation (2) et augmente alors à l'inverse le p_{apparent} .

Une autre difficulté pour l'estimation des paramètres p et n vient de la non-stationnarité des PSPs pendant certaines formes de plasticité. Le fit de la distribution binômiale nécessite un nombre suffisamment élevé de mesures de PSPs pour être significatif (McLachlan 1978), ce qui implique d'obtenir de longues séries de PSPs stables dans lesquelles n et p ne changent pas. Durant la dépression synaptique par exemple, ceci est improbable vu que la taille des PSPs diminue constamment.

D'autres méthodes sont aussi utilisées pour estimer la probabilité de relâche; par exemple, certaines études utilise le bloqueur irréversible de récepteurs-canaux NMDA MK-801 (Rosenmund et al 1993; Hessler et al 1993). MK-801 bloque le canal NMDA lorsque celui-ci est activé, de sorte que dans le cas d'une connection avec des sites de forte probabilité de relâche, un grand nombre de canaux sont bloqués par stimulus, et la transmission diminue plus rapidement que dans le cas de faibles probabilités de relâche. D'autres études tentent d'observer la transmission synaptique au niveau d'un seul

bouton synaptique (Liu et Tsien 1995) ou d'un nombre restreint de synapses (Bekkers et Stevens 1995) pour effectuer une analyse quantique plus aisée, en utilisant un système de microperfusion de la solution d'enregistrement.

Plasticité synaptique chez l'aplysie

Les invertébrés présentent plusieurs avantages pour l'étude expérimentale de la plasticité synaptique et de la mémoire. Tout d'abord, ceux-ci ont un relativement petit système nerveux, de seulement quelques milliers de neurones, ce qui permet le catalogage de plusieurs neurones basé sur leur taille, leur location et leur propriétés électrophysiologiques, de même que l'identification de circuits impliqués dans la génération de certains comportements. De plus, plusieurs cellules d'invertébrés sont très grosses, ce qui facilite leur étude électrophysiologique. Le mollusque marin *Aplysia californica* est utilisé en particulier pour étudier la neurobiologie de l'apprentissage.

Les synapses du SNC de l'aplysie sont sujets à plusieurs formes de plasticité, tels la potentialisation post-tétanique (Gingrich et Byrne 1985), la LTP (Lin et Glanzman 1994), la LTD (Lin et Glanzman 1996), la facilitation hétérosynaptique par 5HT (Castellucci et Kandel 1976), et la dépression synaptique (Castellucci et al 1970). Les synapses sensorimotrices, situées dans le ganglion abdominal et connectant les neurones sensoriels et moteurs qui innervent le siphon et la branchie, sont très étudiées en raison de leur rôle possible dans le réflexe de retrait du siphon et de la branchie. Jusqu'à récemment, il était acquis que le phénomène d'habituation du réflexe résultait de la dépression homosynaptique de ces connections (Castellucci et al 1970), tandis que la sensibilisation et le conditionnement classique du réflexe seraient associés à leur

facilitation par 5HT (Castellucci et Kandel 1976). Toutefois, des études récentes semblent montrer que la circuitrie polysynaptique détient le rôle majeur pour l'action du réflexe de retrait du siphon et de la branchie (Trudeau et Castellucci 1992), et certains groupes ont même observé paradoxalement une augmentation aux synapses entre les neurones sensoriels de la queue et les neurones moteurs du siphon à la suite de protocoles initiant l'habituation du réflexe de retrait du siphon aux stimulations de la queue (Stopfer et Carew 1996). Aussi, un mécanisme hebbien de conditionnement classique a été observé, qui ne nécessiterait pas la facilitation par 5HT (Murphy et Glanzman 1997).

La facilitation par 5HT des synapses sensorimotrices de l'aplysie

La facilitation par 5HT est contrôlée par une cascade moléculaire qui est relativement bien établie, jusqu'à un certain point (fig.3) (Byrne et Kandel 1996).

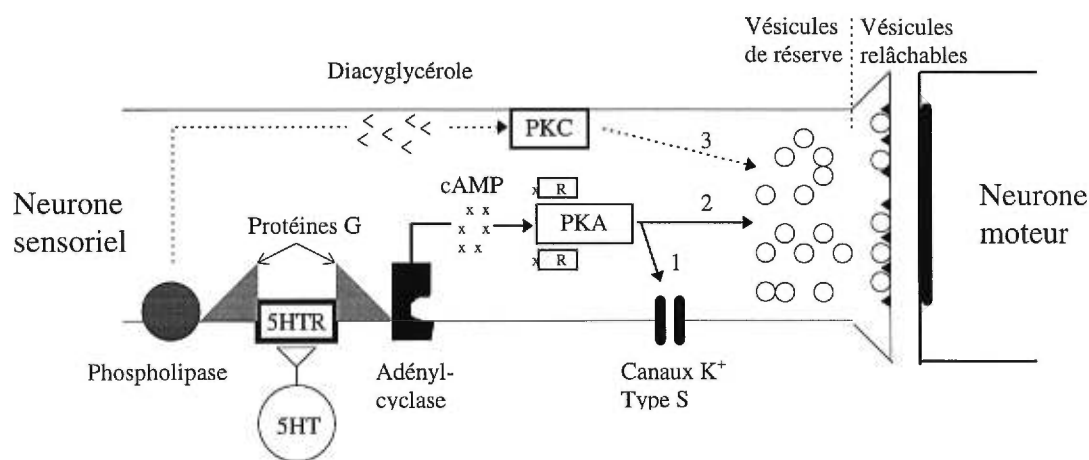


Figure3: Action de la sérotonine sur la relâche de neurotransmetteurs des neurones sensoriels.

La sérotonine agit sur un récepteur transmembranaire, couplé à une protéine G, pour stimuler l'adényl-cyclase qui convertit l'ATP en AMP cyclique (cAMP). L'augmentation du niveau d'AMP cyclique dans les neurones sensoriels active à son tour la protéine kinase cAMP-dépendante (PKA), qui augmente la relâche de neurotransmetteurs possiblement de deux façons: (1) par la fermeture de canaux d'ions K^+ , entraînant la prolongation du potentiel d'action et ainsi de l'influx de Ca^{2+} nécessaire pour l'exocytose des vésicules (Klein et al. 1980, Hochner et al. 1980, Gingrich and Byrne 1985, La contribution de ce premier mécanisme est toutefois remis en cause par Marc Klein (1994)), et (2) en agissant directement sur certaines étapes de la mobilisation des vésicules et de l'exocytose, par des mécanismes encore incompris (Hochner et al. 1980, Gingrich and Byrne 1985). La sérotonine active aussi via une autre cascade moléculaire la protéine kinase C (PKC) qui pourrait jouer un rôle dans la mobilisation des vésicules de réserve (3) (Braha et al. 1990, Byrne et Kandel 1996).

La dépression des synapses sensorimotrices de l'aplysie

La dépression des synapses sensorimotrices de l'aplysie est particulière. Elle est observée même pour une décharge de relativement petite fréquence du neurone sensoriel (30 secondes à 20 minutes d'intervalle entre chaque stimulus) (Lin et Glanzman 1994; Trudeau et Castellucci 1992; Nakanishi et al 1997), comparativement à d'autres systèmes tels les synapses des cellules pyramidales de l'hippocampe (Goda et Stevens 1994) et des neurones bipolaires de la rétine (Gersdorff et Matthews 1997) où une stimulation tétanique est nécessaire pour observer la dépression. Des études statistiques

et des modèles cinétiques ont déjà été tentés pour caractériser la dépression homosynaptique des synapses sensorimotrices de l'aplysie.

Castellucci et Kandel (1974) ont montré à l'aide de l'analyse quantique que cette forme de plasticité résultait d'altérations pré-synaptiques plutôt que de changements post-synaptiques. La question d'un changement de la probabilité de relâche p ou bien du nombre de sites actifs n pour expliquer la dépression à court terme a été étudiée dans d'autres préparations et paraît controversée, les études ayant rapporté des résultats contraires (Zucker 1989). Un changement en n est toutefois observé plus fréquemment. Le modèle de relâche généralement utilisé prévoit pourtant plutôt une altération de p (explications plus loin), et il est considéré que le changement observé de n est un artéfact résultant de l'hétérogénéité de p à travers les sites de relâche.

La relâche de neurotransmetteurs est généralement modélisée comme le montre la figure4 (Liley et North 1953):

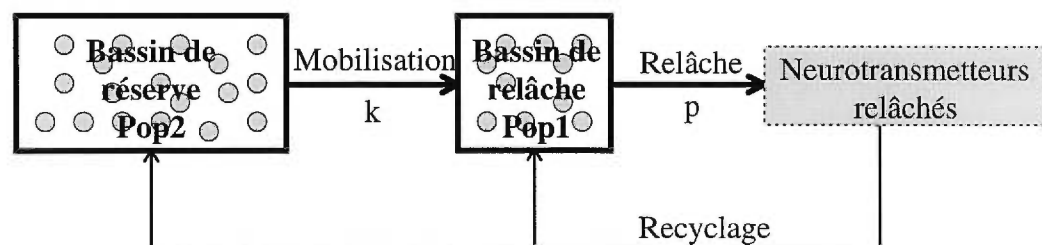


Figure4: Modèle de synapse. La relâche des neurotransmetteurs est régulée par trois mécanismes présynaptiques, la mobilisation, la relâche et le recyclage.

Un bassin de vésicules de réserve alimente le bassin de vésicules disponibles pour l'exocytose. Les vésicules de ce deuxième bassin sont probablement celles déjà ancrées à la membrane pré-synaptique, tandis que le bassin de réserve regroupe les vésicules en

retrait liées au cytosquelette. La recharge augmente avec la différence des concentrations des bassins de relâche et de réserve. L'hypothèse vésiculaire prédit que pour une stimulation de fréquence suffisamment élevée, le bassin de vésicules disponibles pour la relâche se vide plus vite qu'il ne se recharge, et la synapse devient déprimée par déplétion.

Le modèle de déplétion le plus simple, utilisé pour modéliser la dépression homosynaptique chez l'écrevisse (Zucker et Bruner 1977), suppose que le bassin de réserve est suffisamment grand pour ne jamais se vider, de sorte que $[pop1]$ reste toujours constant, tandis que $[pop2]$ diminue exponentiellement jusqu'à ce que le taux de recharge égale le taux de relâche. La cinétique prédite par ce modèle pour une stimulation répétée est une dépression exponentielle des PSPs suivie d'un plateau où la recharge équilibre la sécrétion (fig.5, courbe pointillé). Le p quantique apparent est ici la probabilité que les sites soient chargés multipliée par la probabilité qu'ils soient activés par le potentiel d'action (Zucker 1989). Comme au premier stimulus tous les sites actifs sont chargés, la probabilité que les sites soient chargés égale un, tandis qu'après quelques stimuli les sites qui ont déchargés ont une probabilité d'être de nouveau chargés inférieur à un vu qu'ils n'ont pas tous le temps de se recharger. La dépression serait alors attribuée à une baisse de la probabilité de relâche des sites synaptiques. Gingrich et Byrne (1985) proposent pour les synapses sensori-motrices de l'aplysie un modèle de dépression qui tient compte de la déplétion du bassin de réserve, et réussit à reproduire la cinétique de double exponentielle de la depression observée à ces synapses (fig.5, courbe pleine).

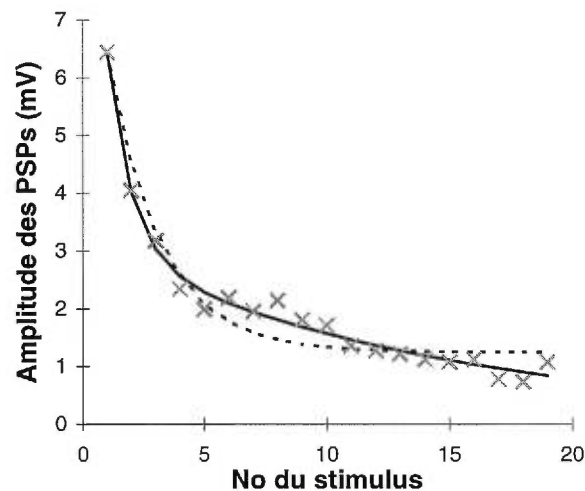


Figure 5: Courbes de dépression des synapses sensorimotrices. Croix: valeurs expérimentales générées par une stimulation de période de 30 secondes. Courbe pointillée: modèle de simple déplétion du bassin de relâche. Courbe pleine: modèle de double déplétion des bassins de relâche et de réserve.

La première exponentielle est rapide, et résulte comme pour le modèle de Zucker de la déplétion du bassin de relâche, tandis que la deuxième exponentielle est plus lente et provient de la déplétion du bassin de réserve. Comme la recharge diminue avec la déplétion du bassin de réserve, la probabilité d'occupation des sites diminue de même et ce modèle prévoit donc que la seconde phase de la dépression (exponentielle lente) est aussi accompagnée d'une altération de p_{apparent} .

Un élément en faveur de l'hypothèse de la déplétion pour expliquer la dépression synaptique vient de l'étude morphologique de synapses sensorimotrices non-déprimées et déprimées réalisée par Bailey et Chen (1988). Les images de microscopie électronique montrent que les zones actives des synapses déprimées comptent moins de vésicules ancrées comparativement aux zones actives des synapses non-déprimées.

D'autres études tendent à privilégier une action inhibitrice plutôt que la déplétion pour expliquer cette forme de dépression synaptique. Elliot et al (1994) ont montré que la

fréquence des minis, émission spontanée en l'absence de potentiel d'action pré-synaptique, n'est pas altérée pour les synapses déprimées. Ce résultat est incompatible avec l'idée qu'il y aurait moins de vésicules aux zones actives chez les synapses déprimées (si les minis sont relâchés aux zones actives), et le vide aux zones actives observé par Bailey et Chen (1988) pourrait n'être qu'un effet transitoire de courte durée vu qu'ils ont fixé les synapses immédiatement après une stimulation. Aussi, les données de Bailey et Chen (1988) n'indiquent aucune diminution du réservoir de vésicules en retrait des zones actives, pour les synapses déprimées, ce qui va à l'encontre du modèle de dépression impliquant la déplétion du bassin de réserve.

Notre étude

Notre étude utilise l'analyse quantique et la modélisation de la cinétique pour caractériser la dépression homosynaptique et la facilitation par 5HT des synapses sensori-motrices chez l'aplysie.

L'analyse quantique permet de déterminer si ces formes de plasticité résultent de changements en p ou en n . Pour contourner le problème de non-stationnarité des EPSPs lors de la dépression synaptique, une méthode d'estimation glissante des paramètres n et p a été développée, qui permet de suivre l'évolution de ces paramètres dans le temps. Le problème de la non-uniformité de p à travers les différents sites de relâche a aussi été étudié, à l'aide de simulations à l'ordinateur. Cette première analyse statistique semble favoriser un changement du nombre n de sites synaptiques actifs plutôt qu'une modulation de p dans l'expression de ces formes de plasticité.

La cinétique de la dépression homosynaptique a été modélisée de façon relativement simple: chaque site synaptique a une probabilité p de sécréter, puis se recharge avec une constante de temps τ . Ensuite, chacun des paramètres n , p et τ est modulé exponentiellement pour concorder les courbes expérimentales de dépressions synaptiques. Le nombre restreint de paramètres libres utilisés et la complexité des protocoles de stimulation des expériences (comportant des temps d'arrêt ou des changements de fréquence) assurent que les paramètres libres convergent vers des valeurs optimales uniques lorsque la différence entre les courbes expérimentales et théoriques est minimisée. Cette fois encore, la dépression synaptique est mieux représentée par un modèle où seul le nombre n de sites synaptiques actifs change.

Cette forme de modélisation de la cinétique permet de prédire à partir des paramètres obtenus après concordance la probabilité apparente de la relâche. Ces prédictions et les valeurs de la probabilité apparente mesurées avec l'analyse quantique sont deux résultats obtenus indépendamment, et une bonne concordance était observée entre ceux-ci, ce qui donne du crédit à notre modèle.

**Switching off and on of synaptic sites at aplysia
sensorimotor synapses**

Sebastien Royer, Rosalind L. Coulson and Marc Klein

Clinical Research Institute of Montreal and University of Montreal,
Centre de recherches en sciences neurologiques
110 Pine Avenue West
Montreal, Quebec H2W 1R7
Canada

Abbreviated Title: Switching of synaptic sites in plasticity

Text pages: 41; Figures: 8.

Word count: Abstract: 194; Introduction: 735; Discussion: 2332.

Corresponding Author: Marc Klein

Clinical Research Institute of Montreal

110 Pine Avenue West

Montreal, Quebec H2W 1R7

Canada

Telephone: (514) 987-5654; Fax: (514) 987-5675

Email: kleinm@ircm.umontreal.ca

Acknowledgments: We thank Harold Atwood, Vincent Castellucci, Wayne Sossin and Robert Zucker for their helpful comments on earlier versions of the manuscript, and Elisha Klein for useful discussions. This work was supported in part by grants OGP0138426 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and 1R01 MH 45397 from the National Institutes of Health.

ABSTRACT

Using the highly plastic synapses between mechanoreceptor sensory neurons and siphon motor neurons of *Aplysia* as a model, we have investigated whether switching off and on of individual synaptic release sites is a strategy that is used by neurons in forms of short-term synaptic modulation with a time course of minutes to hours. We have modified some of the techniques of classical quantal analysis and have examined the kinetics of synaptic depression under different stimulation protocols in order to answer this question. Our analysis shows that both synaptic depression caused by homosynaptic activity and synaptic facilitation induced by an endogenous facilitatory transmitter occur by means of the shutting off and turning on, respectively, of synaptic sites, without intermediate changes in the probability of release. Our findings imply that other forms of plasticity at these synapses, such as posttetanic potentiation, long-term facilitation and long-term potentiation, are also expressed by all-or-none changes in activity at individual sites. We thus show that, in addition to the mechanisms of synaptic integration that are known to operate in single cells and in networks, neurons can exercise a further layer of fine control, at the level of individual release sites.

Introduction

Synaptic phenomena such as long-term potentiation and depression in both vertebrates and invertebrates are thought to represent cellular mechanisms that contribute to learning (Bliss and Collingridge,1993; Silva et al.,1992; Grant et al.,1992; Murphy and Glanzman, 1997; McKernan and Shinnick-Gallagher,1997; Rogan et al.,1997), as are short term processes such as homosynaptic depression and heterosynaptic facilitation (Byrne et al.,1993; Cohen et al., 1997; Zucker,1972). Although detailed mechanistic explanations for these forms of synaptic plasticity have not yet been worked out, evidence has been marshalled for such general possibilities as changes in the probability of neurotransmitter release at individual synapses (Stevens and Wang, 1994; Bolshakov and Siegelbaum, 1994) or the insertion or activation of postsynaptic receptors by appropriate stimulation (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995). Other studies have demonstrated that populations of synapses include some synapses with high probabilities of release and others with low probabilities of release (Rosenmund et al., 1993; Hessler et al., 1993), and, in the extreme case, that a portion of the synaptic population releases no neurotransmitter under some circumstances, but can be recruited by nerve stimulation or other treatments (Charpier et al., 1995; Wang et al., 1996; Wojtowicz et al., 1991). We have taken advantage of the favorable properties of sensory neuron-motor neuron synapses of *Aplysia* for synaptic analysis in order to examine the question of whether shifting of individual synapses into and out of the active pool is a strategy employed in short-term synaptic plasticity.

Up and down-regulation of transmission at sensorimotor synapses of *Aplysia* contribute to changes in the responsiveness of the animal to tactile stimulation in habituation,

dishabituation, behavioral sensitization and classical conditioning (Byrne et al., 1993; Cohen et al., 1997; Walters and Byrne, 1983; Carew et al., 1983; Lin and Glanzman, 1994; see also Stopfer and Carew, 1996). Homosynaptic depression is the progressive decline in transmitter release that occurs even at low stimulation frequency in *Aplysia* (Castellucci and Kandel, 1974). Heterosynaptic facilitation is the increase in transmitter release, mediated by serotonin and other endogenous facilitatory transmitters, that follows a noxious stimulus and that accompanies dishabituation and behavioral sensitization (Brunelli et al., 1976; Castellucci and Kandel, 1976; Abrams et al., 1984). These, as well as other, forms of synaptic modulation that occur in the intact nervous system of *Aplysia* can be reconstituted in cultures with only a single presynaptic sensory neuron contacting a single postsynaptic motor neuron (Schacher et al., 1990; Klein, 1993; 1994; Lin and Glanzman, 1994). Reconstitution in culture circumvents experimental problems associated with the identification of sources of evoked and spontaneous synaptic input, and thus allows quantal analysis of the changes during synapse modulation to be performed with greater confidence (Dale and Kandel, 1990; Eliot et al., 1994). Furthermore, the dependence of the synaptic changes on heterosynaptic or homosynaptic interactions can be determined unequivocally. We present here an analysis of homosynaptic depression and serotonin-induced synaptic facilitation beginning with synapses in a modified cell-culture configuration and then extending the analysis to synaptic plasticity in intact ganglia of *Aplysia*.

Our analysis consists of two parts. In the first part, we use modifications of some of the techniques of classical quantal analysis to distinguish between uniform, graded changes at all synaptic sites between a pair of neurons and selective, all-or-none switching of

subpopulations of synapses between different release states. In the second part of our analysis we support our conclusion of all-or-none switching in an independent manner by examining the kinetics of synaptic depression and the recovery from depression with various stimulation protocols.

Our results show that the synaptic connection between a single sensory neuron and a single motor neuron comprises more than one subpopulation of synaptic sites. One group of sites undergoes rapid depression and facilitation and is the major locus of synaptic plasticity. Synaptic sites of this subpopulation respond once or a few times to a presynaptic impulse, and fully recover their ability to transmit only after being rested for several hours; they can, however, be rapidly reactivated by facilitating stimuli such as tetanization or the introduction of facilitatory neurotransmitters. A second subpopulation transmits in a stable manner and is less affected by modulatory treatments. A third subpopulation comprises sites that are effectively silent until they are recruited by facilitatory treatments. We conclude from these studies that short-term plasticity in this system is achieved by means of the all-or-none switching off and on of individual sites of synaptic transmission in response to different kinds of stimulation.

MATERIALS AND METHODS

Preparation

Adult *Aplysia californica* (75–150 g; Marine Specimens Unlimited, Pacific Palisades, CA) were anesthetized by injection of 50–100 ml of 385 mM (isotonic) MgCl_2 . For recordings in ganglia, abdominal ganglia were extracted, pinned to the bottom of dishes coated with Sylgard, and desheathed in a high magnesium solution (1:1

isotonic MgCl₂ to artificial sea water, ASW, composition given below). For cultures, tail sensory neurons (Walters et al., 1983) and siphon motor neurons (LFS neurons; Frost and Kandel, 1995) were isolated and maintained as previously described (Klein, 1994; Coulson and Klein, 1997). Sensory and motor neurons were maintained in separate petri dishes at room temperature (21–24°C) in 10% *Aplysia* hemolymph in Leibovitz L15 culture medium (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with salts. Under these conditions, the neurons retract their processes and become spherical in shape after 1–3 days. A single sensory neuron was then manipulated into contact with each motor neuron and the pairs were left to incubate at least one day, by which time the EPSP amplitude has reached a plateau (Coulson and Klein, 1997).

Electrophysiological recording

An Axoclamp 2A amplifier (Axon Instruments) and borosilicate glass micropipettes (tip resistance 10–20 MΩ) filled with 2 M potassium acetate (pH 7.5) were used for intracellular recordings. In some experiments on cultured synapses, the presynaptic electrode was filled with 2 M potassium chloride. Recordings were carried out in ASW (composition, in mM: 460 NaCl, 10 KCl, 11 CaCl₂, 55 MgCl₂, and 10 HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), pH 7.5) or in high calcium solution (composition, in mM: 368 NaCl, 8 KCl, 80 CaCl₂, 48 MgCl₂, and 10 HEPES, pH 7.5) in experiments on cultured synapses, and in high divalent cation solution (composition, in mM: 368 NaCl, 8 KCl, 14 CaCl₂, 114 MgCl₂, and 10 HEPES, pH 7.5) (Trudeau and Castellucci, 1992) in most of the experiments on intact ganglia.

Postsynaptic neurons were LFS siphon motor neurons in all experiments in both ganglia and in cultures.

In experiments examining the kinetics of synaptic depression and recovery, impalements were done in zero calcium solution (identical to ASW except for substitution of $MgCl_2$ for $CaCl_2$) to avoid transmitter release on impalement of the presynaptic neuron, and then ASW or high calcium solution was perfused into the experimental chamber. In some of the experiments examining the kinetics of depression and recovery from depression, CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) 6–20 μM was added to reduce the EPSP amplitudes and thereby avoid activation of voltage-dependent currents. CNQX was used in the kinetic experiments because the complete time course of depression had to include the very first EPSPs in the experiment, and these could be as large as 50 or 60 mV without the blocker. In the quantal analysis experiments, in contrast, the analysis was begun only after the initial rapid phase of synaptic depression had already taken place, and CNQX was therefore not necessary.

Neuron type was confirmed by the response to release of hyperpolarizing current (Eliot et al., 1994). Throughout the experiments, the sensory neuron was held at -50 mV and the LFS motor neuron was hyperpolarized to -80 mV in current clamp mode. Slow perfusion (approximately 1 ml/min) was maintained during the whole experiment for recordings in ganglia and was turned on during rests in experiments on cultures. Serotonin (creatinine sulfate, 5HT; Sigma) 10 μM was perfused into the chamber during rests from stimulation.

Data acquisition and analysis

Experiments were recorded on a MacIntosh IIVX computer using the Axodata program (Axon Instruments), and EPSP amplitudes were measured with the Axograph program (Axon Instruments). EPSP amplitudes were measured by subtracting the average of a 3 ms period at the base of the EPSP from the average of a 3 ms period centered on the peak of the EPSP (Redman, 1990). The variance of the noise was determined by taking the difference between the averages of two 3 ms periods separated by the same interval as that between the baseline and the peak EPSP periods; noise was measured at a fixed interval either before or after each EPSP. An electrical component (less than 0.5 mV), which persisted in the presence of cadmium, was subtracted from the postsynaptic potential in two experiments.

Data files were transferred to Microsoft Excel (version 7) and GraphPad Prism (version 2) for analysis and plotting.

Quantal analysis

Quantal size q was determined from the position and spacing of peaks in amplitude histograms. In order to facilitate the search for the quantal amplitude, we used a program that detects peaks in amplitude histograms with small bin sizes (0.005-0.02 mV). In this method, a series of evenly spaced Gaussians of uniform height is superimposed on the experimental distribution, and the product of the values of the two distributions in each bin is computed. The sum of this product over all the bins should be at a maximum when the space x between the peaks of successive Gaussians is equal to q , the quantal amplitude. Another series of negative Gaussians, shifted by a factor of

$x/2$ with respect to the positive series, was added as a penalty for EPSP amplitudes that fall between the positive peaks.

The accuracy of this method was checked in three ways, with no significant difference between the estimates from the histograms and from the other methods: First, we compared the quantal amplitudes estimated from evoked responses with the amplitudes of minis from the same pair of neurons (11 experiments); there was no difference between the two values (minis: 1.086 ± 0.842 (SD) mV; histograms: 1.101 ± 0.863 mV; $p = 0.79$, paired t-test (two-tailed)). Second, in experiments with failures of transmission, we compared our estimates of q with the quantal size obtained from the quantal content derived on the basis of the Poisson distribution (i.e., $m = \ln(N_{\text{total}}/N_{\text{failures}})$). Q estimated from failures was 0.505 ± 0.386 mV, while q from the histograms was 0.426 ± 0.328 mV (17 experiments, $p = 0.19$). Third, in experiments with large variability in the EPSP, quantal size was estimated from the Poisson relation $m = 1/(cv^2)$ (35 experiments; these experiments included experiments with failures). Q from the coefficient of variation was 0.481 ± 0.423 mV, and that from the histograms was 0.416 ± 0.274 ($p = 0.27$).

The coefficient of variation (cv) of the quantal amplitude was estimated from the standard deviation of the best-fitting Gaussians superimposed on the amplitude histograms, with a correction for the measured variance of the noise (using the curve-fitting utility in GraphPad Prism, version 2). The average corrected quantal cv for evoked responses in cultures was 0.094 ± 0.13 ($n=5$) and in ganglia was 0.090 ± 0.11 ($n=6$). In some experiments the quantal variance was less than or equal to the variance contributed by the background noise, resulting in a quantal cv of zero. The average of

the non-zero quantal cv was 0.235 in cultures (n=2) and 0.179 ± 0.064 in ganglia (n=3). The average cv of spontaneous minis was 0.20 ± 0.078 (n=6). We used 0.2 in calculations, although we found that the influence of the quantal cv on the derived parameters was generally less than that of the noise.

The binomial parameters n and p were estimated in two ways: The first method involves calculating the parameters from the equations $p = 1 - (\text{var}/m)$ and $m = np$, where m and var are the mean and variance of the quantal content; in these calculations the measured variance of the EPSP was corrected by subtracting the contributions of the noise and the quantal variability to the variance. We tested this technique by generating sets of simulated responses in which there was a linear decline in m caused by monotonic declines in either n, p or combinations of n and p. This method of estimating p is very sensitive to changes in p, so that an overall change in p in a simulation could be detected even when as little as 25% of the change in the simulated response was due to a change in p. When n was the only free parameter, the sliding p method showed no change in p at all.

The second method involves finding the best binomial fits to amplitude histograms with bins of one-half or one quantal size (McLachlan, 1978). Theoretical binomial curves were constructed as sums of Gaussians whose means and variances were multiples of the quantal amplitude and variance, respectively, with the variance of the noise subtracted. The difference between the experimental and the theoretical values for each bin was computed and that combination of n and p that gave the lowest chi-square value over all the bins was taken as the best fit.

The quantal analysis programs were computed and run in Microsoft Excel.

Analysis of recovery from synaptic depression

Recovery from depression was measured after 1, 3 or 10 stimuli. Ratios of the EPSPs after rest to the first EPSPs of the experiments were plotted against their respective rest interval (0.5, 10, 30, 60, 120 and 300 sec), and then fitted with a single exponential using Prism software (Figure 11). Cells were impaled in calcium-free medium in order to avoid transmitter release during impalement. After introducing normal ASW medium, the sensory neuron was stimulated 1, 3, or 10 times with an interstimulus interval of 30 seconds, and the test measurement to a single stimulus was made after one of the rest intervals listed above. Each pair of cells was used for only one measurement.

Modeling of kinetics of synaptic depression and recovery

A given pair of neurons was used for only one experiment; averages therefore represent data taken from several pairs of neurons.

Homosynaptic depression was modeled assuming that each site releases one quantum of neurotransmitter with a constant probability p , and then recovers the ability to transmit with a time constant t . An expression for the EPSP amplitude was derived that takes into account sites that have released and have not yet recovered, sites that have released and recovered, and sites that have not released at all to previous stimuli. The expression was derived as follows:

The quantal content of the first EPSP of an experiment, A_1 , is equal to the product of the probability of release, p , and the total number of sites initially available for release, n_{total} :

$$A_1 = p (n_{\text{total}}).$$

At the time of the second stimulus, the population of sites available for release consists of two components: 1) sites that had not released with the first stimulus, equal to

$$(1-p) (n_{\text{total}}) \quad \text{or} \quad (A_1/p) (1-p)$$

and 2) sites that had released with the first stimulus and that have recovered the ability to release by the time of the second stimulus,

$$A_1 (1 - e^{-\Delta t/\tau})$$

where Δt is the interstimulus interval and τ is the time constant of recovery.

The quantal content of the second EPSP will then be

$$A_2 = p [(A_1/p) (1-p) + A_1 (1 - e^{-\Delta t/\tau})]$$

At the third stimulus, the number of available sites that had not released with the second stimulus is

$$(A_2/p) (1-p)$$

The sites that have recovered the ability to release by time of the third stimulus will include some sites that had released with the second stimulus as well as some that had released with the first stimulus but had not recovered by the time of the second stimulus:

$$(1 - e^{-\Delta t/\tau}) [(A_2 + A_1 (e^{-\Delta t/\tau}))]$$

The quantal content of the third EPSP will then be:

$$A_3 = p [(A_2/p) (1-p) + (1 - e^{-\Delta t/\tau}) [(A_2 + A_1 (e^{-\Delta t/\tau}))]]$$

The general expression for the EPSP is:

$$A_{m+1} = p [(A_m/p) (1-p) + (1-e^{-\Delta t/\tau}) (\sum_{i=1}^m A_i e^{-(m-i) \Delta t/\tau})] \quad (3)$$

where A_m is the quantal content of the EPSP at the m th stimulus and Δt is the interstimulus interval.

We modified this expression to take into account the fact that each stimulus also results in the shutting off of a fraction of the sites that have released, as we demonstrate in the Results. The fraction of sites that drops out with each stimulus declines exponentially with a time constant W (expressed in terms of the number of stimuli), until a steady state is reached in which a portion of the total number of sites continues to release according to equation 3.

Thus, the expression for the EPSP when switching off of sites is taken into consideration is:

$$A_{m+1} = p [(A_m/p) (1-p) + (1-e^{-\Delta t/\tau}) (\sum_{i=1}^m A_i e^{-(m-i) \Delta t/\tau} (1-\alpha e^{-i/W}))] \quad (4)$$

Starting with this expression, different models were implemented by varying some of the parameters, as described in the text.

A least mean squares method was used to fit the different models to experimental data using Microsoft Excel.

RESULTS

We have modified the techniques of cell culture in *Aplysia* to enable us to form soma-to-soma synapses (Klein, 1994; see Materials and Methods), which have two further important advantages for quantal analysis: First, the electrical distance from the recording site to the site of synaptic action is short, thus reducing problems associated with electrotonic distortion of the shapes of synaptic potentials, as well as the likelihood of conduction block at branch points of presynaptic neurites. Second, such cultures form physiological synapses progressively during the 12-15 hours after pairing, and therefore permit the examination of the properties of small numbers of synaptic sites in early cultures. We have shown (Coulson and Klein, 1997) that short-term synaptic modulation is present at the earliest times after synapse formation and that, with the exception of the amplitude of the synaptic potentials, the early synapses do not differ significantly in their properties from later synapses or from synapses formed using the conventional culture configuration. Finally, further facilitating quantal analysis, we use as the postsynaptic elements at these synapses small siphon motor neurons (LFS neurons; Frost and Kandel, 1995) in which the quantal synaptic potential is often large relative to the recording noise, sometimes reaching an amplitude of 2 or 3 mV or more.

In a series of experiments aimed at examining the time course of the development of synaptic transmission and the potential for synaptic regulation at *Aplysia* sensorimotor synapses in cell culture (Coulson and Klein, 1997), we observed a number of synaptic pairs that showed extremely little variation in the evoked EPSP after the initial homosynaptic depression (Figure 6). In 14 out of the 50 experiments, the coefficient of variation of the depressed EPSP (quantal content 2.37 ± 1.49 (SD)) was less than 0.35,

and in 5 of these the cv was less than 0.25. The small variability of the EPSP relative to the quantal amplitude suggests that release in the steady state reflected the activity of a small number of sites transmitting with a high probability. This observation is not consistent with the idea that homosynaptic depression proceeds by a gradual decrease in the probability of release at all release sites equally--which would be accompanied by increasing variability--but suggests rather that individual sites are turned off while other sites remain active.

The possibility that release at individual sites is controlled in an all-or-none manner is supported by the facilitation of transmission. In the same study, we reported some pairs that showed no evoked release prior to addition of 5HT, with clearly detectable responses afterwards, indicating the presence of inactive synapses that were recruited in synaptic facilitation. In addition, in experiments like that of Figure 6, the EPSP increased greatly in amplitude upon application of the endogenous facilitatory transmitter 5-HT (Figure 6), in spite of the small amount of variability in the EPSP prior to facilitation. This observation too suggests the presence of a population of synaptic release sites which contributes little or nothing to the depressed EPSP, and which is then recruited upon application of 5-HT. The results collectively suggest that homosynaptic depression as well as 5HT-induced facilitation proceed by means of a switching off and on of individual release sites rather than by a graded change in their release properties. The purpose of the following analysis is to test this hypothesis in a quantitative manner.

The amplitude distribution of responses at Aplysia sensorimotor synapses is consistent with a binomial model of transmitter release.

If switching between release states occurs, and if release behaves as a binomial process, then quantal analysis should reveal that both synaptic depression and facilitation are accompanied by changes in the apparent number of release sites, or the binomial parameter n , rather than by a change in the apparent probability of release, or binomial p . Quantal analysis requires that a sufficient number of synaptic responses be recorded under steady state conditions. The synaptic processes that we were interested in analyzing, however, involve changes in the average amplitude of the synaptic response over time. It is possible to find periods during which the response remains fairly stationary, but such stretches are the exception rather than the rule. We show some examples of experiments with stationary stretches in which amplitude histograms could be fit using binomial parameters, indicating that activity at these synapses can be described with binomial statistics (Figure 7A). We have also reanalyzed previously published amplitude histograms which were originally fit using Poisson statistics (Castellucci and Kandel, 1974), and found that some of them were fit significantly better by binomial statistics (not shown). However, even though a best fit could be determined on the basis of the chi-square test, other values of p and n could generally not be excluded because of the small number of events. In order to circumvent the problem of the small number of responses that could be used in the analysis, we took advantage of the fact that the binomial parameters p and n can be calculated on the basis of the mean and the variance of stretches of responses. Specifically, p can be calculated from the

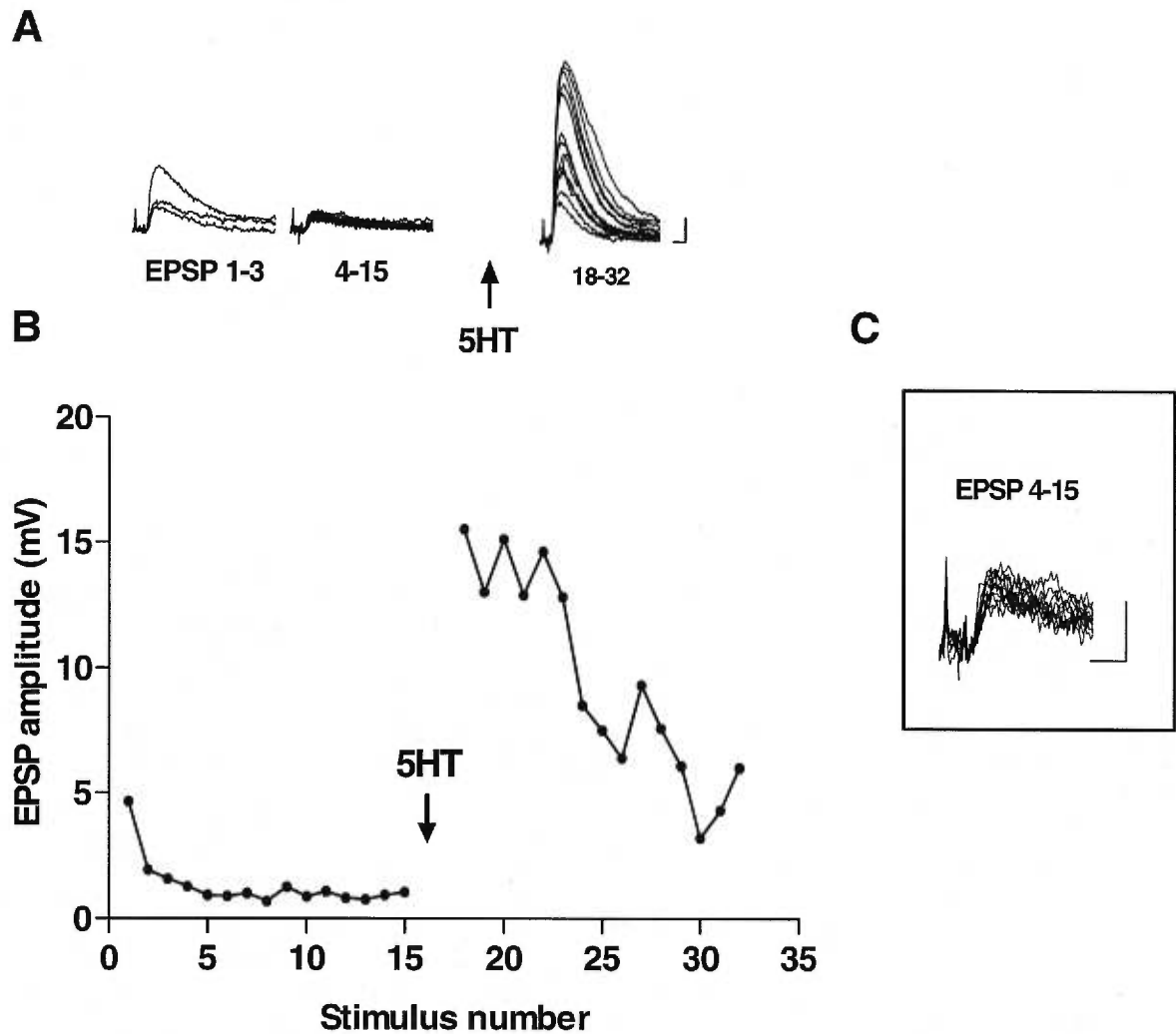


Figure 6. Small variability of depressed EPSPs and large facilitation by 5HT. Records of successive groups of monosynaptic potentials from a sensorimotor pair in culture (A), and plot of the whole experiment (B). C is a magnified view of EPSPs 4-15 showing the small variation in amplitude. Stimulation was interrupted for 5 minutes after EPSP 15 and two more EPSPs (not shown) were elicited before addition of 5HT. In this and all other experiments the interstimulus interval was 30 s, unless otherwise indicated. Calibration bars represent 2 mV and 10 ms in A and 1 mV and 10 ms in C.

mean, m , and the variance of the quantal content:

$$p = 1 - \text{var}/m \quad (5)$$

Since $m = np$, n can also be computed on the basis of the same measurements. It is important first, however, to ensure that the derived parameters are consistent with the amplitude distribution of the synaptic responses. We therefore calculated p from equation 5 for small groups of 10 to 30 stationary responses in many experiments, and compared the calculated value with the p that gave the best fit--i.e., the lowest chi square--to the amplitude histogram in each case. Although the histogram fits were usually not unique, we presumed that if the responses were distributed according to a binomial distribution, the parameters derived from the equation and from the best fits should generally match. As shown in Figure 7B, the two ways of arriving at estimates of p are in good agreement, whether synaptic responses are measured in intact ganglia or in cell culture. The agreement between the two ways of estimating p indicates that transmission at these synapses behaves according to a binomial model and justifies the use of parameters derived from the calculations in examining the underlying mechanisms of depression and facilitation.

It is generally not possible to determine from this kind of analysis whether the parameter p represents a probability of release that is the same for all release sites or a weighted average of different probabilities at different sites, with the higher probability sites predominating. In the interests of simplicity, we will begin the analysis assuming uniform p ; nonetheless, as we will discuss below and at greater length in the Discussion, our conclusions do not depend on the assumption of uniformity in p across sites.

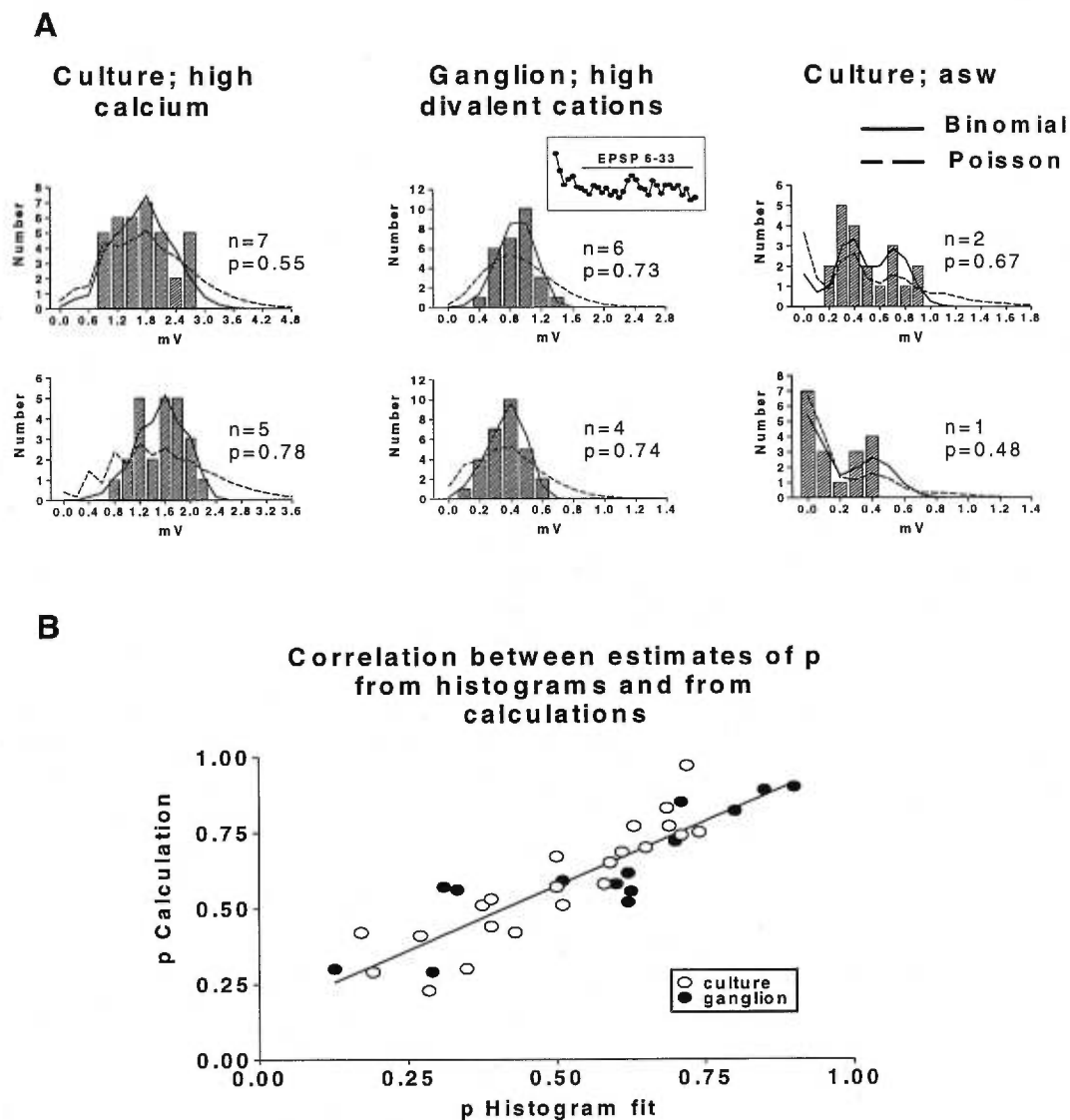


Figure 7. Binomial fits of amplitude distributions of sensorimotor EPSPs. A. Amplitude histograms and fits of data from 6 experiments under different conditions, as indicated. In most of these examples, the amplitude histograms are better fit by a binomial than by a Poisson distribution. Binomial parameters n and p for the best fit are given for each histogram. A plot of EPSP amplitudes for one experiment is shown in the inset, with the interval used for quantal analysis indicated by the line. B. Correlation between estimates of p from histogram fits and from calculations. Estimates of p derived from the equation $p = 1 - (\text{var}/m)$ are plotted against estimates of p from the best fits to histograms for 36 experiments. The slope of the least-squares regression line is 0.851 with correlation coefficient 0.886 ($p < 0.0001$).

We analyzed experimental data in two different ways, depending on the number of responses in the experiment, as described below.

Estimation of p and n in stationary experiments with small numbers of responses: Synaptic depression and facilitation cannot be accounted for by changes in a uniform p .

For the analysis of earlier experiments that included only 15 to 20 synaptic potentials before addition of 5HT (such as the example shown in Figure 6), we estimated p from equation 3 and compared these estimates to the p that would be predicted if synaptic depression or facilitation depended on a change in p alone. For example, if the steady-state depressed response was 20% of the undepressed response (or of the facilitated response), and if all the synapses contributed equally (uniform p), then the p in the steady state would have to be less than or equal to 0.2. We will call this value the "maximal p ". If the p estimated from the binomial model was significantly higher, this would indicate that the probability of release was non-uniform, i.e., that a few high probability synapses were contributing disproportionately to the overall response while other synapses were releasing with a low probability. Depending on the calculated value for p , it is possible to estimate how many of the synapses are contributing significantly to the overall release and whether others are effectively silent. In this way it is possible to determine whether or not a uniform change in the probability of release can account for synaptic depression and facilitation.

As an example of this method, we make these calculations based on the responses shown in Figure 6. The mean of responses 4-15 is 1.067 mV, with a standard deviation

of 0.203 mV. The estimated quantal amplitude is 1.105 mV (coefficient of variation 0.15), giving a mean quantal content of 0.965. After subtracting the contributions of the noise and the quantal variance to the total variance, the calculated probability of release is 0.996, with n equal to 1. The p estimated from the best fit is also 1. However, if all the release sites whose activity is apparent in the largest of the facilitated synaptic potentials (approximately 15 mV; Figure 6) were contributing uniformly to responses 4-15, the maximal p would be 0.067 (ignoring the effects of non-linear summation, which would make the maximal p even smaller), and the variance should have been more than 5 times as great as the variance actually measured. This means that at least 14 out of 15, or 93%, of the release sites are effectively inactive in the depressed state, and that treatment with 5HT has then switched them on.

A summary of the estimated and the maximal p for all experiments, including both those of Coulson and Klein (1997) and those done for the present study, is shown in Figure 8. The values of p obtained by calculation from the mean and variance are much greater than the predicted maximal p in the large majority of cases, both in culture and in intact ganglia. This result implies that a change in a uniform probability of release cannot account for synaptic depression or facilitation.

In the next part of the analysis, we determined n and p from equation 3 in cases where there were stationary periods before and after synaptic depression and facilitation. As expected, we observed no change in p on average either with synaptic depression or with facilitation by 5HT (Figure 9). In 23 experiments, m declined from 5.56 ± 2.88 (SD) to 2.91 ± 1.42 with depression, while the corresponding values for p were 0.44 ± 0.37 and 0.40 ± 0.40 , respectively ($t = 0.827$, $p = 0.417$, paired t-test (two-tailed)). Upon

application of 5HT in 9 experiments, m increased from 2.37 ± 0.98 to 5.39 ± 3.52 , with corresponding values for p of 0.54 ± 0.42 and 0.52 ± 0.33 , respectively ($t = 0.268$, $p = 0.795$).

Relation between p from quantal analysis and maximal p from largest EPSP

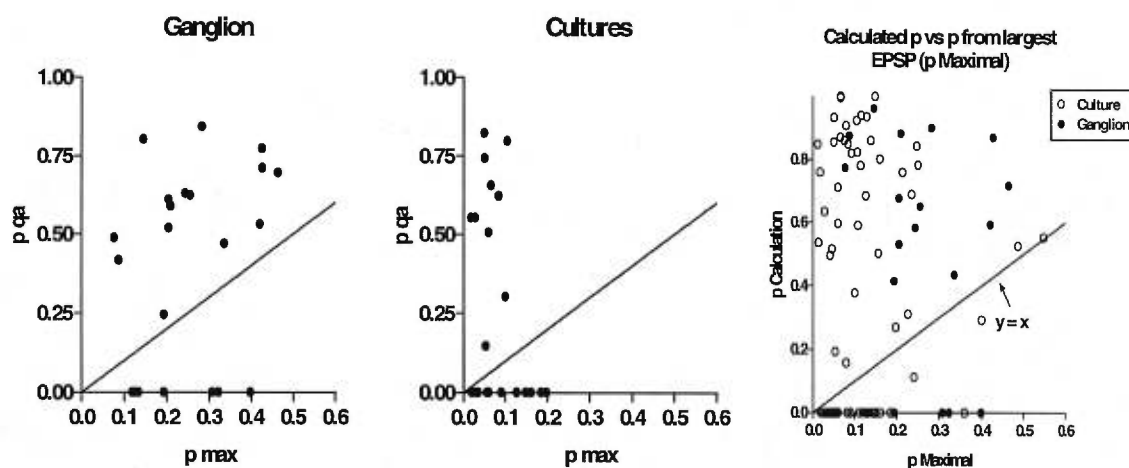


Figure 8. Comparison of calculated p with "maximal" p predicted from uniform decline in p during homosynaptic depression. P calculated from the binomial equation is generally much greater than that predicted if homosynaptic depression were due to a uniform decrease in p at all release sites ("maximal p "). Calculated p was assigned the value 0 for amplitude distributions that were best fit by a Poisson distribution. Each point represents one measurement (total 85) from 62 different synaptically connected pairs of neurons; only stationary periods with at least 10 responses were used. See text for definition of "maximal p ".

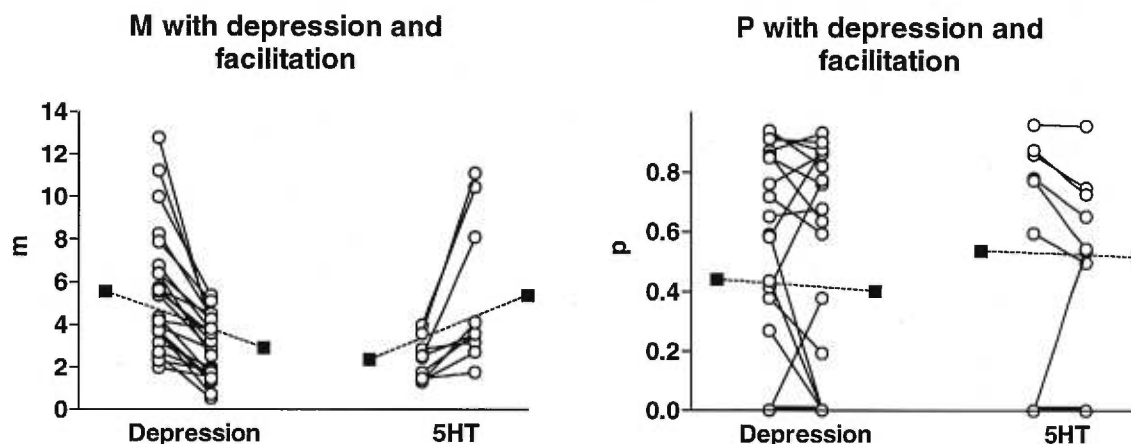


Figure 9. Absence of change in p with synaptic depression or 5HT-induced facilitation. Quantal content and calculated p for stationary periods in individual experiments (open circles) at earlier and later times during progressive synaptic depression (23 experiments) and before and after application of 5HT (9 experiments); filled squares are means. Experiments on depression included 8 in intact ganglia, 7 in cultures in normal ASW medium and 8 in cultures with high calcium medium. Since there was no difference in the average p among the three groups (either early or late in synaptic depression; $p > 0.5$), the results were pooled. Experiments with 5HT included 5 in intact ganglia, and 2 each with normal ASW and high calcium in culture. P was assigned a value of 0 in experiments that were best fit by a Poisson distribution. In 7 of the depression experiments and in 2 of the experiments with 5HT, measurements both before and after the experimental manipulation were consistent with a Poisson distribution (thick segments connecting open circles lying on the x axis).

These data include 11 depression experiments and 3 facilitation experiments in which at least one of the groups of data could be fit by the Poisson distribution, and which were assigned values for p of 0. Omitting these experiments from the comparisons made no difference: Average p in the remaining 12 depression experiments was 0.74 ± 0.20 before and 0.74 ± 0.20 afterwards ($t = 0.068$, $p = 0.947$; m declined from 4.38 ± 1.88 to 2.67 ± 1.39), and average p in the remaining 6 5HT experiments was 0.81 ± 0.13 before 5HT and 0.69 ± 0.17 after 5HT (a significant decline in p ; $t = 3.967$, $p = 0.011$; m increased from 2.36 ± 1.18 to 6.37 ± 4.05).

As discussed earlier, the apparent p obtained from calculations and histogram fits could represent the combined contributions of different probabilities at different release sites, with the distribution of individual probabilities unknown. The apparent p in any one measurement, therefore, may be a poor indication of the individual probabilities. However, the only obvious way for the apparent p consistently to remain unchanged in two measurements at the same synapses in the face of a change in the quantal content is for the contributions of the individual sites to increase or decrease to the same extent at all sites, while the overall distribution of the individual probabilities remains the same. It is possible in some cases to find ad hoc combinations of p values for individual sites that yield the same apparent overall p for different m , but there is no reason to suppose that these ad hoc combinations of values for individual sites would be able to account for a general and consistent finding of constant p despite changing m . (This issue will be elaborated in the Discussion). There are two possibilities: either apparent p reflects a uniform probability of release at all contributing sites, and the number of these sites changes, or else apparent p is the result of a non-uniform distribution of individual probabilities that does not change. The latter possibility implies that the number of contributing sites goes up or down to the same extent for all sites, independently of their respective individual probabilities. Both possibilities necessitate the dropping out or recruitment of release sites in order to account for synaptic depression and facilitation, respectively.

*Estimates of p and n in non-stationary experiments with larger numbers of responses:
Synaptic depression and facilitation can be accounted for by changes in n alone.*

Our observations in experiments with small numbers of responses in culture led us to perform experiments with larger numbers of responses both in cultures and in intact ganglia to see whether switching between release states accounts for synaptic depression and facilitation generally. In most experiments on intact ganglia we used an extracellular solution containing elevated concentrations of calcium and magnesium ions in order to raise spike thresholds and thus to reduce or eliminate any polysynaptic contribution to the the EPSP. (We were also able to obtain apparent monosynaptic responses using normal seawater medium in 2 cases.) This high divalent cation solution changes neither the amplitude of the monosynaptic EPSPs from the sensory neurons nor the kinetics of homosynaptic depression at the sensorimotor synapses (Trudeau and Castellucci, 1992). For synapses in culture, we used artificial seawater with a high concentration of calcium in some of the experiments (in order to increase the overall probability of release), and normal seawater in the others.

Although we could find best fits in experiments with stretches of stationary EPSPs, as pointed out earlier, other pairs of parameters could also give adequate fits. In order to take advantage of the larger number of non-stationary responses we circumvented the problem of non-stationarity by using equation 5, with the following modification: We computed m and p from the mean and variance of groups of 5 responses, moving one response at a time, for the whole experiment, thus obtaining a sliding estimate of m and p . We then compared the overall change in sliding p with the change in sliding m to see

whether the decrease in m with synaptic depression was mirrored by an appropriate change in p .

After the initial rapid decline during the first few stimuli, further synaptic depression is approximately linear (Figure 10A). We compared the normalized slopes of sliding m and sliding p for the linear portion of synaptic depression (ranging from 15-80 stimuli in different experiments; Figure 10B) in experiments where the average p was greater than 0.4, since the standard error of p is very large for low p (McLachlan, 1978). Since there was no clear difference in the rates of synaptic depression or in the slopes of sliding p between synapses in intact ganglia and in soma-to-soma cultures, all the results are presented together in Figure 10C. There was no obvious relation between the slopes of sliding m and of sliding p in individual experiments (Figure 10C). The normalized slopes of sliding p and of sliding m were significantly different from each other ($t = 5.41$, $n = 16$, $p < 0.0001$, paired t-test (two-tailed)). Moreover, the average slope of sliding p taken across all the experiments was not significantly different from 0, while sliding m showed a consistent decline (Figure 10D). Finally, when we examined the slopes of sliding m and p in individual experiments, the slope of sliding p was either positive or not significantly different from 0 in 17 out of 21 cases, while for the slope of sliding m the proportion was 3 out of 21.

Thus, since p does not change during synaptic depression, the decline in the synaptic response is due to a reduction in n . Once again, as noted in the previous section and in the Discussion, the possibility that the apparent p may reflect a non-uniform population of individual release probabilities does not affect our conclusion that sites must be dropping out during depression.

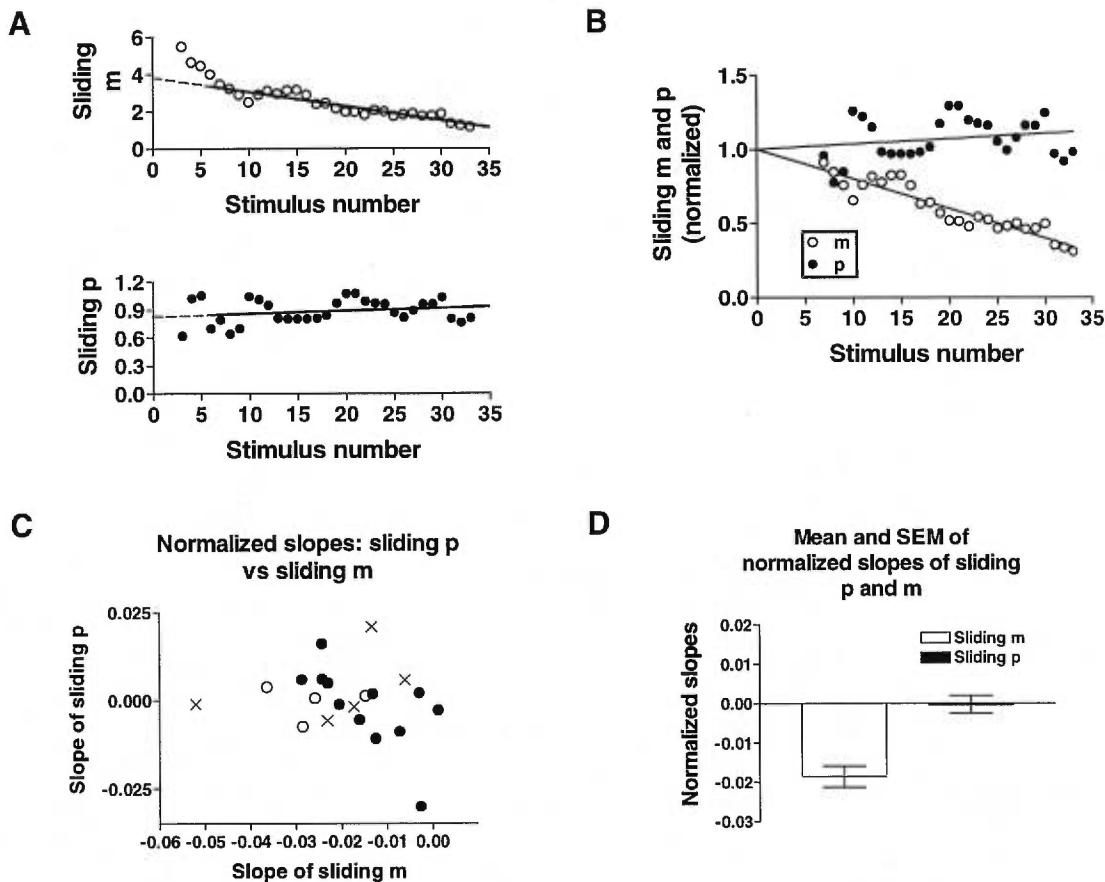


Figure 10. Absence of change in sliding estimate of p during homosynaptic depression. Plots in A and B are from one experiment and illustrate how the slopes of sliding m and p were derived and normalized. P (calculated from equation 5) and m were determined for groups of 5 responses, moving one response at a time. In A, the approximately linear portion of the plot of sliding m (beginning at stimulus number 5; solid line) was fit by linear regression, as was the corresponding portion of the plot of sliding p. B illustrates normalization of the slopes of sliding m and p in order to permit direct comparison of the slopes; the slopes were normalized by setting the respective y-intercepts equal to 1. Part C is a plot of the normalized slope of sliding p against the normalized slope of sliding m in 21 experiments (filled circles, intact ganglion; open circles, culture in ASW; crosses, culture in high calcium medium). There is no correlation between the two values (slope negative, $r = 0.252$, $p = 0.271$). D. The average normalized slope of sliding m is -0.01863 (95% confidence interval (CI) -0.0243 to -0.0130), while the average for sliding p is -0.000345 (95% CI -0.0050 to $+0.0043$; not different from 0).

We used the same technique to determine whether facilitation by 5HT is the result of an increase in n . In 11 experiments, the average values of sliding p before and after 5HT application were 0.57 ± 0.36 (SD) and 0.54 ± 0.28 ($t = 0.40$; $p = 0.70$; paired t-test, two-tailed), respectively, while the corresponding values for sliding m were 2.67 ± 1.07 and 5.48 ± 3.34 . Experiments consistent with Poisson distributions were assigned a p of 0. Excluding these two experiments did not change the result: average sliding m went from 2.66 ± 1.19 to 5.94 ± 3.55 , while average sliding p went from 0.70 ± 0.24 to 0.65 ± 0.17 . Thus, synaptic facilitation induced by 5HT, like synaptic depression, is not accompanied by a change in p , but can be accounted for by an increase in the number of active synaptic sites.

As described in Materials and Methods, we tested the accuracy of this method by applying it to simulated data sets with known n and p , and found that this technique could in fact detect changes in sliding p if they occurred. In addition, we applied the same method in experiments in culture where we changed the calcium from the normal level of 11 mM to either 55 or 80 mM. The mean p in normal ASW was 0.19 ± 0.33 (SD) and 0.42 ± 0.37 in high calcium. This increase in p with high calcium is significant ($p < 0.01$, $t = 2.228$, $n = 11$, paired t-test, two-tailed). The method of sliding p is thus capable of detecting both decreases and increases in p , whether in simulations or in real experiments.

A further conclusion from these experiments is that some release sites are effectively silent even before undergoing synaptic depression. If the probability of release remains constant during synaptic depression (see the next section for evidence that p does not

change even during the initial rapid phase of depression), we can estimate the initial number of release sites from the amplitude of the first response, since its quantal content is given by the total number of available release sites multiplied by p . Thus, in the example of Figure 6, the total number of sites detectable at the beginning of the experiment is approximately 5 (since $p = 1$). However, the facilitated EPSP reflects the release of at least 15 quanta, indicating that at least 10 sites were silent even at the very beginning of the stimulation. Similar results were obtained in >20 experiments on synapses in culture.

Although we did not perform experiments to examine directly other forms of plasticity, our observation that p was high in many of the experiments implies that other forms of synaptic facilitation at these synapses--including frequency facilitation, posttetanic potentiation*and long-term potentiation--must also result primarily from increases in the number of sites contributing to the overall synaptic response.

Kinetics of homosynaptic depression and recovery from depression: Synaptic sites switch between on and off states in an all-or-none manner.

A completely independent kind of analysis supports the idea that homosynaptic depression is an all-or-none switching process. This analysis involves examining the time course of recovery from depression. Recovery after a single stimulus takes place with a time course consisting of a relatively rapid and an extremely slow phase. The time constant of the rapid phase of recovery is on the order of 10-100 s, while the slow recovery process is so slow as to be unmeasurable out to at least 10 minutes. As the response depresses further with additional stimulation, a progressively smaller fraction

of the initial response recovers with the fast time constant and a progressively larger fraction fails to recover (Figure 11). This partial recovery is consistent with the idea that only a portion of the synaptic sites recovers after stimulation, with the rest remaining essentially inactive. In the steady state, the active synaptic sites recover rapidly between stimuli to the steady state level, while the rest of the sites remain in the inactive state. Although the proportion of rapidly recovering sites decreases with depression, the time

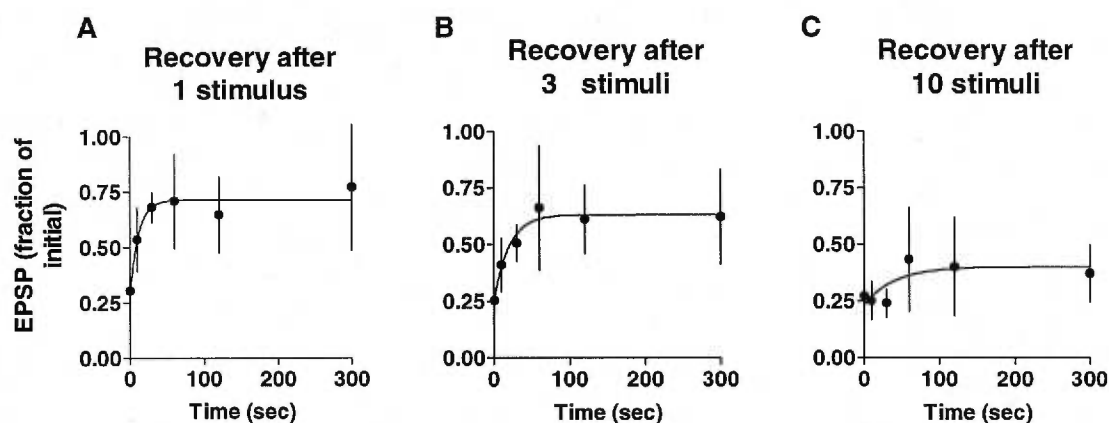


Figure 11. Decline in recovery from depression with progressive stimulation. Stimulation was stopped after 1, 3, or 10 stimuli in different experiments (each experiment was on a different pair of cells), and recovery was examined by presenting a single stimulus after 0.5, 10, 30, 60, 120, or 300 s. Recovery relative to the first EPSP of the experiment proceeds with an exponential time course to a plateau that is below the level of the initial EPSP. The plateau decreases with increasing number of stimuli, suggesting that an increasing proportion of the sites is progressively switched off. Each point is the average of 4 to 7 separate experiments (error bars indicate SD). The time constants of recovery based on the exponential fits are 11.63 s, 20.11 s and 40.03 s after 1, 3, and 10 stimuli, respectively. Each of these values is within the 99% confidence intervals of the other two.

constant of recovery does not change significantly. This suggests the presence of only two pools of synaptic sites--an "on" and an "off" pool--rather than a continuously varying population.

A further indication that this switching model can account for synaptic depression and facilitation comes from experiments in which the depression run was interrupted by rests of varying duration, after which stimulation was continued at either the same or a different stimulation frequency. In these experiments we found that virtually all aspects of the behavior of the responses were accurately predicted by a model in which synapses do not undergo a graded change in their properties, but are rather subject to all-or-none switching off with progressive stimulation (equations 3 and 4 in Materials and Methods).

The model was constructed as follows: The first stimulus of an experiment causes release from a fraction, equal to p , of the available release sites. Of the sites which have released transmitter, some recover the ability to release with a time constant τ , while some switch into the off state. The second stimulus then causes release from a fraction (equal to p) of the sites that had not released with the first stimulus, as well as from the same fraction of sites which had released to the first stimulus and which had recovered by the time of the second stimulus. The second stimulus also results in the switching off of an additional fraction of sites. Release to subsequent stimuli is treated analogously, with the provision that the fraction of sites that switches into the off state decreases exponentially to zero. We allowed both p and τ , as well as the switching parameters α and W (equations 3 and 4 in Materials and Methods), to vary freely, and, in addition, allowed p and τ to change their values during the course of a single experiment. The

best fit of the predicted values to the data was determined by minimizing the sum of the squared errors.

Using this model, we found that all of the responses of a given experiment were best fit with constant values for p and τ (Figure 12A), and that values of τ were in the same range as those measured in the recovery experiments (i.e., on the order of 10s of seconds).

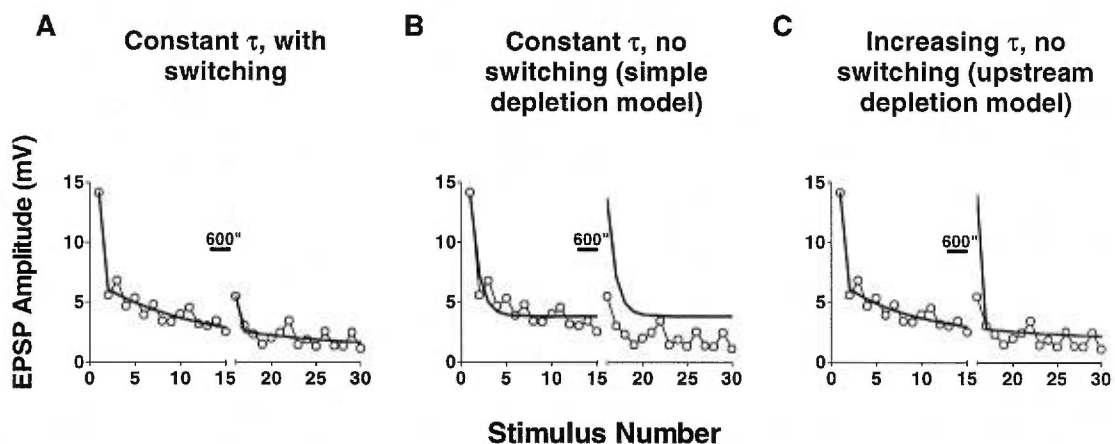


Figure 12. Fits of homosynaptic depression and recovery with a model incorporating switching off of release sites. Fits of a sample experiment with three different models of depression; only the switching model fits both the kinetics of depression and recovery after rest. Experiments were carried out with interstimulus intervals of 30 s, with rests indicated by bars. For the same experiment, EPSPs 1 to 15 were fit with 3 different models (see text for details). The solid curves for stimuli 16 to 30 are predictions based on the parameters obtained from best fits of stimuli 1 to 15. Only the model incorporating switching off of synaptic sites is able both to fit the initial depression and to predict the recovery and depression after rest.

Synaptic depression and recovery could not both be fit without introducing switching into the model, whether τ was kept constant, as would be the case for a simple depletion model (Zucker and Bruner, 1977; Liu and Tsien, 1995; Figure 12B), or allowed to

increase progressively, as might be the case if there were progressive depletion of an upstream feeding pool of transmitter (Von Gersdorff and Matthews, 1997; Figure 12C). Not only was the initial decline well fit with constant values for p and τ , but the recovery after rest and the time course of the subsequent decline were also accurately predicted, whether the stimulation frequency was kept constant (Figure 12A and Figure 13A) or changed (Figure 13B). The only failure of the model to closely fit the observed responses occurred when the rest was 10 s or less (Figure 13A), presumably because frequency facilitation was recruited at the short interstimulus intervals (Byrne, 1982; Eliot et al., 1994).

Of particular significance is the fact that both the initial rapid phase of depression and the subsequent slow phase were well fit using this model, indicating that the combination of recovery between stimuli at some sites and the putative switching process can account for all aspects of synaptic depression, i.e., that it is not necessary to invoke two separate depression processes in order to account for the dual time course of depression.

Another characteristic property of these synapses is that the response undergoes partial recovery with rest, but then declines back to the previous steady-state level after only 1 or 2 stimuli. This behavior too is accurately predicted by our model, simply as a consequence of the fact that the rapidly recovering sites have enough time to recover fully during the pause in the stimulation and then revert to the steady state level when

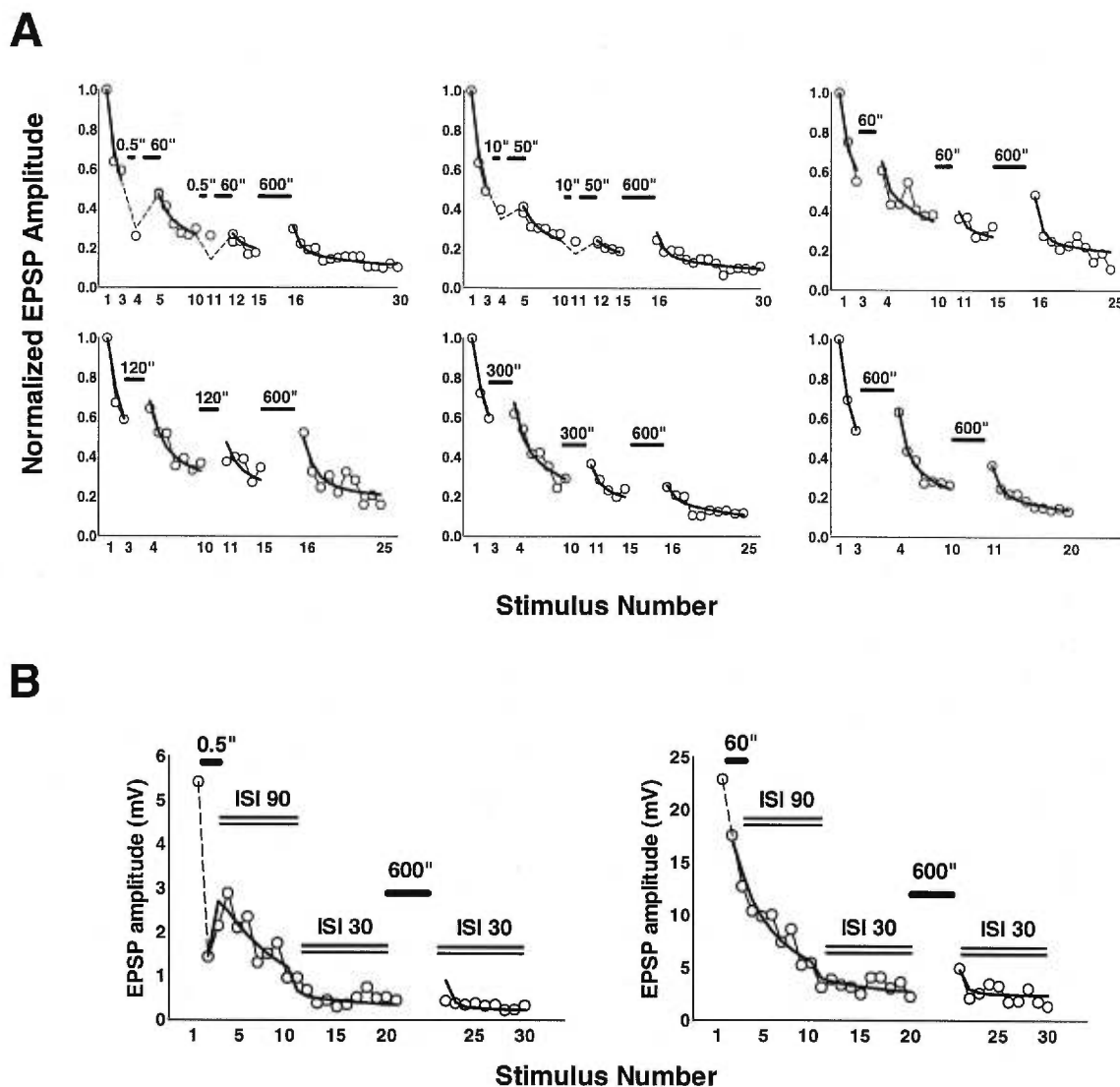


Figure 13. A. Fits of depression and of recovery after varying periods of rest with the switching model. Normalized averages of 4 to 6 experiments (circles) with 30 s interstimulus intervals and interspersed periods of rest of various durations were fit with the switching model (solid and dashed lines). Stimuli following 0.5 s and 10 s rests were followed by 60 s and 50 s rests, respectively, in order to keep the average interstimulus interval constant. B. Fits of experiments with changing interstimulus intervals. Each plot represents a single experiment. The interstimulus interval, initially 90 s, was changed to 30 s after 10 stimuli, as indicated by the double lines. Rests following the first EPSPs were 0.5 s and 60 s, respectively, and a second rest of 5 minutes was introduced after EPSP 20 or 21. Fits are solid and dashed lines.

stimulation is resumed at the initial frequency. The synapses that had been switched into the inactive state, on the other hand, do not recover appreciably if the rest from stimulation is brief compared to the slow time constant of recovery, which is on the order of hours.

Finally, the values of p , the apparent probability of release, that were calculated on the basis of the kinetics of depression using this switching model closely match the values that were estimated from quantal analysis of the same experiments. The p measured by quantal analysis is actually a compound probability, as pointed out by Zucker and Bruner (1977), consisting of the probability that a site is available for release together with the probability of release once the site is available. The availability of a site for release depends on the amount of time since the prior release relative to the time required for recovery of the ability to transmit. Thus, if the time constant of recovery is 30 s, for example, the probability of a site's being available for release after 30 s is $1 - 1/e = 0.63$. If the probability of release when the site is available is 0.8, for example, the apparent probability of release will be $0.8 \times 0.63 = 0.504$, and this is the probability that will emerge from quantal analysis. The values of the apparent p calculated on the basis of the fits to synaptic depression were not different from those obtained by quantal analysis (fits: 0.41 ± 0.15 (SD); quantal analysis: 0.38 ± 0.24 ; $t = 0.667$, $n = 14$; p (two-tailed) = 0.516; paired t -test). The fact that the two values are highly correlated (correlation coefficient 0.69; $p < 0.005$; slope of regression line 1.1) gives further support to this switching model.

DISCUSSION

Forms of synaptic depression and facilitation have been analyzed in several experimental systems, with varying conclusions (Zucker, 1989). Our results are incompatible with at least three models that have been proposed for synaptic depression in different systems. In one depletion model that has been proposed to account for depression in response to high-frequency stimulation at hippocampal synapses in culture (Dobrunz and Stevens, 1997), p decreases, which is contrary to our observations. In another simple depletion model, neither the probability of release nor the rate of recovery from depletion changes during stimulation, and the kinetics of depression is determined by the changing balance between these two factors until a steady state is reached (Zucker and Bruner, 1977). Attempting to fit this model to our data leads to a large overprediction of the amount of recovery after rest (Figure 12B). A third model accounts for a part of depression by supposing that an upstream feeding pool of transmitter is progressively depleted, resulting in a progressive slowing of the rate of recovery from depression (Von Gersdorff and Matthews, 1997). This model also overpredicts the recovery from depression after rest because the final slow recovery rate obtained from the fit of the initial decline is still much too fast to account for the small amount of recovery that we actually observe (Figure 12C). We should point out that these conclusions are based on our mathematical formulations of the respective models, and that it is conceivable that other formulations could be found that would fit the kinetics as well as our model does. However, it would still be necessary for the other models to take into account the findings of our quantal analysis, in which we find no change in p .

Our analysis of synaptic depression and facilitation at *Aplysia* sensorimotor synapses in culture and in intact ganglia indicates that both of these synaptic processes involve switching of release sites between active and inactive states. Entry into the inactive state is functionally equivalent to turning off synaptic transmission at those sites, although it is obviously difficult to distinguish between a release probability of zero and very low--but non-zero--release probabilities. We find that switching to the off state can occur with as little as a single stimulus, and that there appears to be a sub-population of release sites that is functionally silent even in the absence of any prior stimulation. Synaptic facilitation caused by sensitizing stimuli comprises the switching on of synapses that had been in the off state previously, whether they entered that state as a result of homosynaptic depression or not.

Synaptic facilitation by 5-HT is mediated through the actions of two second-messenger systems, those involving protein kinases A and C (Byrne et al., 1993; Ghirardi et al., 1992; Klein, 1993; Sacktor and Schwartz, 1990; Braha et al., 1990; Sugita et al., 1992). The biochemical cascades involving these two kinases act in different ways to induce facilitation: PKA facilitates only synapses that have not been severely depressed by prior stimulation, while PKC can enhance release even at depressed synapses (Braha et al., 1990; Klein, 1993; Ghirardi et al., 1992). Our analysis of synaptic depression suggests that the two kinases may differ in their ability to cause switching from the off to the on release state, with PKC capable of inducing switching and PKA able to increase release only at active release sites, but unable to cause switching on of synapses in the inactive state.

The question of non-uniformity of p

One problem in attempting to perform quantal analysis is the possibility that p differs at different release sites, resulting in estimates of p and n that reflect the weighted contributions of the different sites to the overall response. If the variance of p across sites is significant, the overall p estimated by standard techniques will be higher than the (unweighted) average probability of release, and the estimated n will be lower than the actual number of sites whose activity contributes to the synaptic response (Del Castillo and Katz, 1954). It is therefore possible that an apparent change in n with no change in the estimated overall p could be the result of changes in the probability of release at some of the sites, without sites dropping out completely or being recruited. Two considerations argue against our results being due to this possibility. First, our measurements show no overall change in the calculated values for p despite large decreases in m during homosynaptic depression (Figures 9 and 10). Although any single pair of values of m and p can be accounted for on the basis of a non-uniform p with the consequent underestimate of n, there is no obvious way of accounting for a constant p in the face of changing m by altering the distribution of p across different release sites. Since sliding p was computed from the equation $p = 1 - \text{var}/m$, a constant p necessitates that the variance divided by the mean of the synaptic response over all measurements remain generally constant. Another way of expressing this condition is:

$$\Sigma(p_i)^2/\Sigma p_i = \text{constant}$$

where p_i is the individual probability of release at the i th release site. The only general way this condition is fulfilled is if the relative distribution of p at all the release sites remains the same, i.e., if the same proportion of sites drops out for all p values. In the

case where the distribution of p is non-uniform, this result leads to the interesting conclusion that the shutting off of a site is independent of whether or not release had occurred at that site. This conclusion effectively excludes all depletion models. On the other hand, if the distribution of p is uniform across sites, the dropping out of sites may or may not depend on release. Although we constructed our model on the assumption that the switching off of a site occurs only if that site has released, it is not difficult to alter the model in such a way that switching is independent of release, with no change in the goodness of fit to the data (not shown).

A second, less general, argument against the possibility that changing n is actually the result of changes in non-uniform p applies in a subset of our experiments. In cases where the minimal number of release sites is much greater than the estimated n after synaptic depression, and, in addition, the estimated p is high, the probability of release at a large proportion of the sites must be close to zero. To illustrate with an example, let us take an experiment in which m is 1.8, the calculated p is 0.9, the calculated n is 2, and the minimal n from the largest EPSP is 20. Since 0.9 is a weighted average of p , at least one site must have p greater than or equal to 0.9, and this site is therefore responsible for at least half of the total quantal content. The remainder of the quantal content, which is less than or equal to 0.9, is contributed by the remaining 19 sites. If all of these sites contribute equally, their p would be $0.9/19 = 0.047$. However, if the overall p is calculated based on the variance and the mean, these values would give an overall p of about 0.47. In order for the calculated p to be 0.9, it would be necessary for p at the majority of the sites to be very close to zero. The assumption that p at the remaining 19 sites is not evenly distributed would not change this conclusion.

Other studies of depression and facilitation at Aplysia sensory neuron-motor neuron synapses

We find that the sensory neuron-motor neuron synapses undergo only partial recovery with rest after as little as a single stimulus (Figures 11-13). We compared the amount of recovery in our experiments to those reported by others both in intact ganglia and in conventional cultures where the interstimulus interval was from 5 to 20 minutes, and found that our data fall within the range of the values reported in the other studies. These other studies, from several different laboratories, used extracellular stimulation in conventional cultures (Bao et al. 1998; Lin and Glanzman 1994) or intracellular stimulation in intact ganglia (Nakanishi et al. 1997; Trudeau and Castellucci 1992; Walters and Byrne 1985). Five to 10 minutes after a single stimulus, the EPSP in the conventional cultures averaged 0.78 of the initial EPSP, after 3 stimuli it was 0.63 and after 8-10 stimuli it was 0.47. In intact ganglia, the corresponding numbers were 0.80 after 1 stimulus, 0.64 after 3 stimuli and 0.32 after 7-10 stimuli (only 2 of the 3 studies in intact ganglia included more than 6 stimuli). Our values, as shown in Figure 6, were 0.72, 0.63 and 0.40, respectively. Thus, there is no reason to suspect that the soma-to-soma preparation differs significantly from other preparations in this respect.

All the analyses of synaptic depression and facilitation at Aplysia sensorimotor synapses agree in finding that the quantal amplitude does not change (Castellucci and Kandel, 1974; 1976; Dale and Kandel, 1990; Eliot et al., 1994), a result that is commonly interpreted as indicating that the changes in transmission are a consequence of changes in the process of transmitter release. Although it is theoretically possible for all of the

postsynaptic receptors at individual synaptic sites to be switched off and on as a unit (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995), we believe that the rapidity and reversibility with which the switching of sites occurs favors a presynaptic locus of plasticity, as proposed in the earlier studies.

Several studies have examined the possible basis of homosynaptic depression at these *Aplysia* synapses. One report suggested that a progressive decrease in the amount of calcium entering the presynaptic terminals with each action potential might contribute to the depression of release (Klein et al., 1980). Since we find that changing external calcium changes the probability of release, while repeated stimulation does not change p , this mechanism appears unlikely, although not impossible.

A model proposed by Gingrich and Byrne (1985) attempted to account for homosynaptic depression as the depletion of a pool of transmitter whose refilling is dependent on intracellular calcium. This model could account for the kinetics of homosynaptic depression as well as the effect of tetanization in increasing transmission at these synapses. However, their model could simulate the recovery from a single depression run to only a limited extent (see figure 3 of Gingrich and Byrne, 1985), and they made no attempt to simulate subsequent bouts of homosynaptic depression.

In an ultrastructural study of short-term homosynaptic depression, Bailey and Chen (1988) reported a large depletion of synaptic vesicles (on the order of 50%) from the immediate vicinity of morphological active zones. This finding suggested very strongly that depletion of a releasable pool of vesicles contributes to homosynaptic depression.

The most recent study addressing homosynaptic depression (Eliot et al., 1994) examined the frequency of spontaneous miniature synaptic potentials during homosynaptic

depression of evoked responses. It was found that depression of evoked transmission was not accompanied by a decrease in the frequency of spontaneous release, suggesting to the authors that simple depletion of vesicles from the active zones was therefore not responsible for the depression of the evoked responses. In order to reconcile this idea with the ultrastructural findings, they suggested that the depletion seen by Bailey and Chen might be a short-lived phenomenon apparent only immediately after stimulation, while the longer-lasting synaptic depression characteristic of these synapses is due to an inhibitory process rather than to depletion.

We constructed our model on the assumption that switching off of synaptic sites occurs only after release at those sites has occurred, as would be the case for a depletion model. However, as we discussed earlier, our model can also be fit to the data without assuming that switching depends on release. In addition, the presence of inactive synapses even in the absence of prior stimulation entails a mechanism for the silencing of synapses that does not depend on release. Finally, as discussed earlier, if p is in fact distributed in a non-uniform manner across release sites, our failure to observe a decrease in the apparent overall p during synaptic depression implies that switching is independent of release.

Distinct pools of synaptic sites

Although our experiments show that individual synapses switch from an active to an inactive state with repeated stimulation, a residual pool of synapses remains in the active state even after many stimuli. Whether the different susceptibility of individual synapses to switching is a consequence of differential depletion of releasable pools of

different size, for example, or of differential inhibition of transmitter release, the existence of such differences suggests that a single sensory neuron could express preferentially one or another type of synapse with different targets. Synapses with different targets would then show intrinsic quantitative or even qualitative differences in synaptic transmission and plasticity, depending presumably on interactions with the postsynaptic neuron during synapse formation or at a subsequent stage (see Davis and Murphey, 1994).

Our findings indicate that the population of effectively transmitting synapses is subject to rapid change with the changing requirements of a particular neuronal pathway, and imply that these changes in the synaptic population are expressed in short-term learning processes. We can suggest some possible advantages in being able to control subpopulations of synapses in this manner: First, groups of synapses, together with the behaviors they control, could be kept virtually silent until the appropriate circumstances call for their recruitment. In addition, the switching of groups of release sites by a particular stimulus would allow the nervous system to shape complex responses into the most appropriate configurations for any given set of conditions without the need for the continued activation of dedicated modulatory pathways for small groups of release sites. Switching of individual release sites thus adds a layer of fine control to the mechanisms of integration known to operate at the level of the individual cell and of simple and complex circuits.

Discussion

Nous avons effectué une étude qui joint la modélisation de la cinétique synaptique et l'analyse quantique. Ainsi, un modèle qui suppose l'inactivation abrupte de sites synaptiques pendant la dépression prédit des paramètres binômiaux beaucoup plus proches des mesures de l'analyse quantique qu'un modèle supposant un changement progressif et homogène à tous les sites synaptiques.

Par exemple, l'hypothèse de la double déplétion des bassins de relâche et de réserve permet de reproduire adéquatement la cinétique de double exponentielle de la dépression, mais implique une diminution graduelle de la probabilité apparente de relâche: Le p_{app} résulte du produit de la probabilité de relâche des sites avec la probabilité d'occupation des sites. Comme la recharge diminue avec la déplétion du bassin de réserve, la probabilité d'occupation des sites diminue de même et ce modèle prévoit donc que la dépression est accompagnée d'une altération de p_{app} . Or notre analyse montre qu'aucun changement de p_{app} n'est détecté pendant la dépression synaptique et que la valeur de p_{app} après la dépression est plus élevée que celle prédite par un tel modèle.

Le modèle proposé

Notre modèle explique la cinétique de la dépression de la façon suivante: La décroissance exponentielle rapide du début de la dépression résulte de la déplétion partielle du bassin de relâche, en raison d'un taux de relâche plus élevé que le taux de

recharge initialement. Lorsque ces taux se sont équilibrés, les PSPs continuent à décroître suivant une lente exponentielle, à cause de l'inactivation de sites synaptiques. Notre forme de modélisation considère individuellement l'activité de chaque site synaptique, et sonde comment chaque paramètre régulant la relâche, la récupération (recovery) et l'inactivation des sites doit évoluer pour décrire le mieux la cinétique et la statistique de la dépression. Cette analyse permet de caractériser les connections synaptiques avec des paramètres phénoménologiques, sans toutefois proposer de modèle complet expliquant par exemple les mécanismes de la récupération et de l'inactivation, ce qui laisse libre cours à différentes interprétations.

Récupération et description morphologique d'un site synaptique

Dans le modèle de Gyngrich et Byrne (1985) de la sécrétion, la récupération d'un site synaptique est associée à sa recharge par la diffusion d'une vésicule du bassin de réserve vers le site. Cette hypothèse privilégie l'idée que chaque vésicule ancrée à la membrane pré-synaptique au niveau d'une zone active est un site synaptique. Chaque zone active relâche alors plusieurs quanta de neurotransmetteurs par potentiel d'action. Par contre certaines études indiquent que le n binômiale (nombre de sites actifs) est plutôt corréllé avec le nombre de boutons synaptiques (Korn et al. 1981). La protéine rab3 du complexe de fusion synaptique pourrait être impliquée dans le contrôle du nombre de vésicules relâchées par bouton (Geppert et Südhof 1998). Marc Klein et Annie Campbell ont produit des images EM des terminaisons synaptiques de paires de cellules en culture (fig.1, dans l'introduction), et ont compté le nombre de zones actives possédées par connection. Le nombre moyen de zones actives pour leurs synapses correspond assez

bien à la valeur moyenne de n estimée en comptant le nombre de quanta dans le premier PSP de mes expériences (de l'ordre de 100), tandis que le nombre total de vésicules collées aux zones actives est beaucoup plus grand (de l'ordre de 1000). Cette étude favoriserait le modèle de un site de relâche = une zone active.

Inactivation des sites synaptiques

L'inactivation des sites synaptiques peut provenir de différentes origines, entre autres soit (1) d'un phénomène de déplétion, soit (2) d'un mécanisme d'inhibition au niveau de l'exocytose ou des récepteurs post-synaptiques.

(1) L'inactivation d'un site pourrait originer de la déplétion du bassin de relâche (Bailey et Chen 1988). Dans le modèle où une zone active égale un site synaptique, on pourrait imaginer que celle-ci ne se recharge que très peu, et sécrète tant qu'elle contient des vésicules ancrées. Les sites les plus résistants à l'inactivation auraient les zones actives les plus grandes, donc les plus chargées initialement, et la cinétique de la deuxième phase de la dépression résulterait alors de la distribution des tailles des zones actives à travers la synapse. L'inhibition de la recharge peut aussi mener à la déplétion du bassin de relâche, et ainsi à l'inactivation d'un site synaptique.

(2) Il y a plusieurs éléments qui tendent à favoriser l'implication d'un mécanisme d'inhibition dans la dépression des synapses sensorimotrices de l'aplysie.

Tout d'abord, une étude de Elliot et Kandel (1994) a montré que la fréquence des minis n'est pas altérée par la dépression, ce qui suggère que le nombre de vésicules ancrées aux zones actives reste essentiellement inchangé, et donc exclut un mécanisme de déplétion. Leurs observations indiquent par contre que l'émission spontanée est

diminuée pendant une courte période transitoire (30 seconde) à la suite d'un train de stimuli, avant de retrouver sa fréquence initiale. Cette altération transitoire pourrait résulter en fait de la déplétion partielle proposée dans notre modèle, responsable de la phase rapide du début de la dépression: Pendant une stimulation, le bassin de relâche se vide jusqu'à ce que le taux de recharge balance le taux de relâche. Après la stimulation, un certain temps est nécessaire (30 secondes) pour que tous les sites se rechargent et récupèrent la capacité de sécréter, d'où la baisse temporaire d'émissions spontanées observée. Dans nos fits de la cinétique, la constante de temps de la recharge est aussi de 30 secondes, ce qui concorde avec cette explication. La déplétion partielle des sites synaptiques pourrait de même expliquer les changements morphologiques observés par Bailey et Chen (1988) aux zones actives des synapses déprimées, qui comptent moins de vésicules ancrées que pour les synapses non déprimées. Pour cette étude, les auteurs ont fixé les préparations immédiatement après la stimulation, ce qui ne laisse pas de temps aux sites synaptiques pour se recharger.

Un autre élément en faveur d'une action inhibitrice est d'ordre statistique: La manière la plus simple pour expliquer l'absence de changement dans la probabilité apparente est que tous les sites s'inactivent en proportions égales, indépendamment de leurs probabilités de relâche, de sorte que la distribution des p à travers les sites demeure identique pendant la dépression. Un site synaptique qui a une probabilité de relâche élevée sécrète plus souvent, et dans un modèle de déplétion, se vide et s'inactive plus rapidement qu'un site avec un faible p . Un modèle de déplétion verrait alors un changement de la distribution des p à travers les sites, et donc une baisse de la probabilité apparente de relâche. Cet argument, s'il est pertinent, précise aussi qu'une inhibition responsable de

l'inactivation des sites devrait être initiée par un processus indépendant de l'exocitose, par exemple l'influx de Ca^{2+} pendant le potentiel d'action.

Une forme de désensibilisation au Ca^{2+} de la machinerie impliquée dans l'exocitose pourrait être un mécanisme plausible, compatibles avec les résultats de la figure 22 qui montre l'effet de changer la concentration de Ca^{2+} dans le milieu d'enregistrement sur la transmission synaptique.

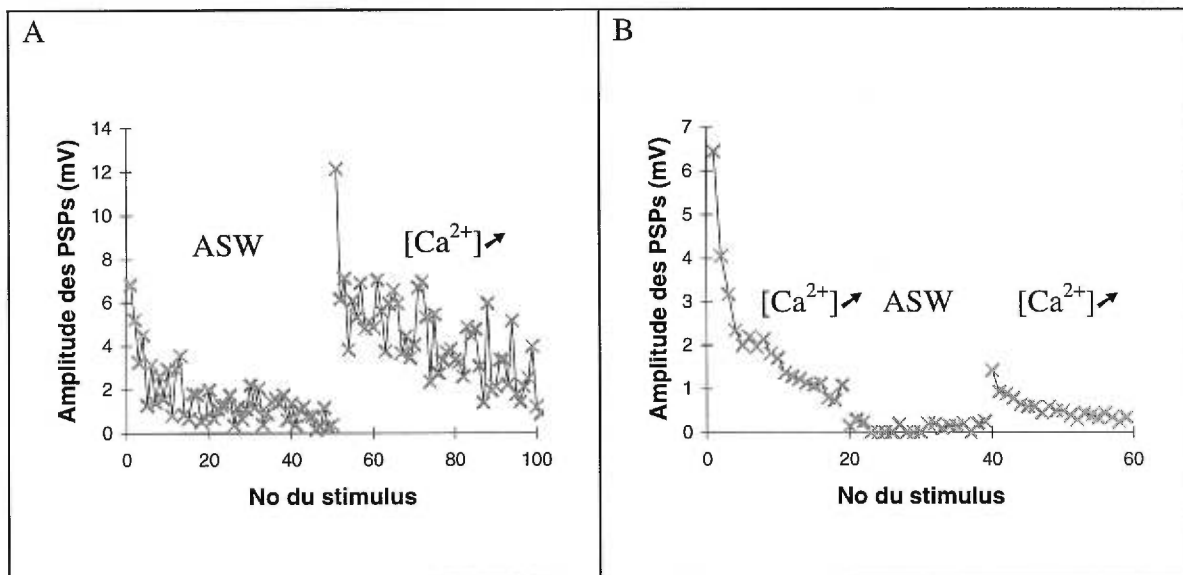


Figure 14: Dépressions synaptiques dans des milieux d'enregistrement au niveau de $[\text{Ca}^{2+}]$ modulé. Au cours de l'expérience, l'eau de mer (ASW, $[\text{Ca}^{2+}] = 11 \text{ mM}$) et une solution de $[\text{Ca}^{2+}]$ augmentée ($[\text{Ca}^{2+}] \nearrow$, $[\text{Ca}^{2+}] = 55 \text{ mM}$) sont alternés à l'aide de perfusions qui durent 10 minutes. Dépressions obtenues avec une stimulation de période de 30 secondes.

La synapse déprimée est augmentée dès le premier PSP dans la solution de $[\text{Ca}^{2+}]$ élevé (fig. 14, A: stimulus 51 et B: stimulus 40). Un modèle de déplétion où la recharge dépend de l'entrée de Ca^{2+} prédirait plutôt une augmentation au deuxième stimulus, car en assumant qu'il n'y a pas le temps pour qu'un site se recharge et sécrète au cours d'un

même potentiel d'action, le nombre de vésicules disponibles pour la relâche lors du premier stimulus est le même qu'avant la perfusion de la solution de $[Ca^{2+}]$ élevé. L'analyse quantique montre que l'augmentation de la probabilité de relâche avec la perfusion de $[Ca^{2+}]$ élevé n'est qu'une petite contribution à l'augmentation des PSPs, et il est peu probable que le niveau intracellulaire de $[Ca^{2+}]$ pendant la perfusion de la solution de $[Ca^{2+}]$ élevé soit comparable à celui qui est atteint lors d'un potentiel d'action avant la perfusion, ce qui rejette la possibilité d'une recharge des sites pendant la perfusion. Une explication possible est que toute l'augmentation vient de l'activité de synapses silencieuses avant la perfusion car le niveau de $[Ca^{2+}]$ était insuffisant pour la sécrétion de celles-ci. Dans le cas où la dépression n'est pas accompagnée de la déplétion des sites synaptiques, les sites synaptiques sont chargés autant qu'initialement (autant de vésicules sont ancrées aux zones actives mais une fraction de celles-ci ne peuvent pas excréter car elles sont inhibées), et un phénomène de désensibilisation au Ca^{2+} accompagnant la dépression pourrait alors expliquer l'augmentation des PSPs pour un niveau de $[Ca^{2+}]$ plus élevé (fig.22 A et B), et la diminution des PSPs pour un niveau de $[Ca^{2+}]$ plus bas (fig.14 B).

Expériences projetées

Pour obtenir la statistique prédite par les modèles de cinétique, il faut considérer individuellement l'état de chaque site synaptique avant chaque stimulus. On distingue alors deux populations de sites: des sites qui sont chargés et prêts à sécréter, et d'autres sites qui ont sécrété lors de stimuli antérieurs et qui sont actuellement dans le processus de recharge. Si la probabilité de relâche des sites déjà chargés égale p_1 , la probabilité de

relâche des autres sites p_2 égale $p_1 \cdot (1 - e^{-t/\tau})$, où $(1 - e^{-t/\tau})$ est la probabilité qu'un site qui a sécrété soit rechargé après le temps t . Il y a donc inévitablement au moins deux populations de sites avec deux probabilités de relâche pour tout modèle assumant qu'un site relâche avec une probabilité différente de 1 et se recharge (ou récupère) avec une constante de temps supérieure à 0. La statistique de la relâche ne consiste pas qu'en une simple loi binômiale mais devient plutôt une loi binômiale composée (McLachlan 1978).

La probabilité apparente est alors la moyenne des deux probabilités de relâche, pondérée par les contributions respectives m_1 et m_2 des sites chargés et en recharge:

$$p_{\text{apparent}} = \frac{m_1 \times p_1 + m_2 \times p_2}{m_1 + m_2} \quad (6)$$

(Ce calcul a été utilisé pour tester la validité de l'hypothèse de l'inactivation dans un modèle de dépression, en comparant cette valeur de p_{app} obtenue par le fit de la cinétique avec celle obtenue par la formule d'analyse quantique $p = 1 - mCV^2 + (CV_q)^2$. Cette comparaison ne permet pas toutefois de différencier significativement un modèle où l'inactivation dépend de la relâche, d'un modèle où ces événements sont indépendants, la différence des p_{app} calculés pour chacun des modèles étant trop subtile à côté de l'incertitude sur la mesure de p_{app} par l'analyse quantique).

Une nouvelle approche que nous avons développée consiste à construire la distribution d'amplitude des PSPs prédite par le fit du modèle et de l'inclure dans l'histogramme de fréquence de l'expérience (fig.23 et 24). Cette nouvelle méthode présente un intérêt particulier du fait qu'elle ignore le problème de non-stationnarité des PSPs pendant la dépression, qui empêche d'habitude l'analyse quantique sur des

intervalles suffisamment longs: Les paramètres du fit de la dépression permettent de dériver à chaque stimulus les valeurs des paramètres n_1 , p_1 , n_2 , p_2 des populations de sites en recharge et déjà chargés. Il est alors possible de calculer pour chaque stimulus la probabilité $P(x)$ que x quanta soient relâchés, puis sommer sur un intervalle de la dépression pour prédire le nombre moyen d'évènements de x quanta (fig.23, B).

Construction des histogrammes prédits par les paramètres du fit de la cinétique

Les modèles comportent deux probabilités de relâche, associées aux sites chargés et en recharge, de sorte que les distributions théoriques des amplitudes suivent une loi binômiale composée et se construisent de la façon suivante: On considère que les deux populations de sites relâchent leurs vésicules suivant des procédés binômiaux, i.e. il y a les chances $P_1(x)$ et $P_2(x)$ que ces populations relâchent x quanta ($P_1(x)$ et $P_2(x)$ sont donnés par l'équation de la loi binômiale (1) de l'introduction).

La probabilité $P(x)$ qu'au total x quanta soient relâchés est alors égale à:

$$\begin{aligned}
 P(x) &= P_1(x) \times P_2(0) + P_1(x-1) \times P_2(1) + \dots + P_1(1) \times P_2(x-1) + P_1(0) \times P_2(x) \\
 &= \sum_{i=0}^x P_1(x-i) \times P_2(i)
 \end{aligned}
 \tag{7}$$

Le fit des dépressions synaptiques permet de trouver le nombre initial de sites actifs n_0 , la probabilité de relâche p , le temps de recharge τ , et le taux d'inactivation, ce qui permet de dériver à chaque stimulus les valeurs des paramètres n_1 , p_1 , n_2 , p_2 des deux populations de sites, et ensuite $P_1(x)$, $P_2(x)$ par la relation (1), et $P(x)$ par la relation (7). La distribution $P(x)$ est calculée à chaque stimulus, et on obtient l'histogramme de

fréquence de la figure 23 en sommant celle-ci sur un intervalle choisi de PSPs (et en tenant compte comme auparavant de la variabilité du quantum).

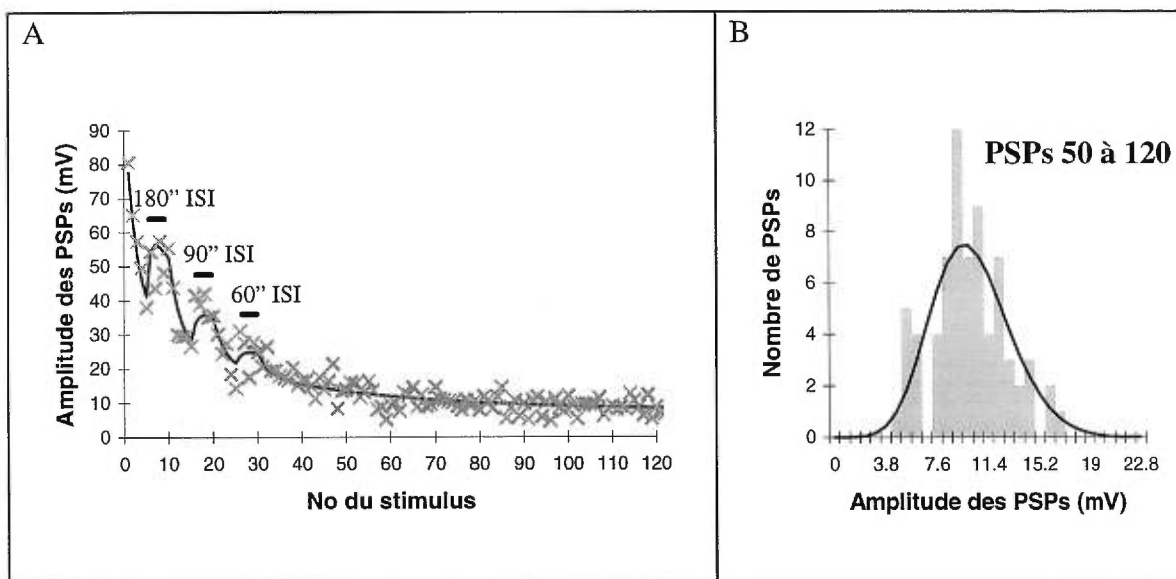


Figure 15: Fit de la cinétique et prédiction de la distribution quantique. A: La courbe expérimentale (croix) est obtenue en stimulant le neurone sensoriel à intervalle de 30 secondes, à l'exception de certaines périodes indiquées par des traits où l'intervalle inter-stimulus (ISI) est modifié à 180, 90 et 60 secondes. Le fit de la courbe expérimentale (courbe pleine) permet de trouver la valeur des paramètres n initial (le nombre de sites actifs initialement), p (la probabilité de relâche des sites), τ (la constante de temps de la recharge), et $\alpha e^{-w \cdot i}$ (la fraction des sites actifs qui s'inactivent au i ème stimulus). Le modèle utilisé ici suppose une inactivation des sites indépendante de la relâche. B: La distribution prédite par les paramètres dérivés en A (courbe pleine) reproduit convenablement la distribution expérimentale (barres) sur l'histogramme de fréquence.

Une bonne prédiction de l'histogramme de fréquence en plus d'une bonne prédiction de la cinétique est une garantie de la validité du modèle. On peut ainsi utiliser cette méthode pour tester différentes choses.

Utilisation possible de cette méthode

_Déterminer si l'inactivation est dépendante ou non de la relâche

L'hétérogénéité de la probabilité de relâche induit des distributions d'amplitude de formes plus spécifiques qui pourraient différer pour des valeurs des paramètres de recharge et de relâche générant des papp similaires. Ainsi, les modèles d'inactivation dépendante et indépendante de la relâche donnent des valeurs de papp assez proches, mais pourraient présenter des distributions d'amplitude distincts en raison de différentes proportions de synapses déjà chargées et en recharge. En comparant les distributions prédites avec les distributions expérimentales, on pourrait alors favoriser le modèle avec la meilleure superposition des courbes prédites et expérimentales.

Les expériences requises pour ce test doivent comporter un protocole de stimulation suffisamment complexe pour que les paramètres des fits convergent vers des valeurs optimales uniques, suffisamment de PSPs et une probabilité de relâche relativement élevée pour assurer la fiabilité de l'histogramme de fréquence. Une faible probabilité de relâche entraîne une distribution large avec une erreur plus importante autour de la théorie (McLachlan 1978). L'expérience de la figure23 est inutile pour ce test car la probabilité de relâche est petite, de l'ordre de 0.2, et le modèle d'inactivation dépendante de la relâche reproduit la dépression et la distribution d'amplitude aussi bien que le modèle d'inactivation indépendante de la relâche. D'autres expériences aussi longues avec des p élevés seraient nécessaires, la difficulté est toutefois de maintenir les cellules en bonne santé pendant des enregistrements qui durent de 1 à 2 heures. Augmenter la fréquence de stimulation risquerait d'entraîner une accumulation de Ca^{2+} dans les

terminaisons présynaptiques, qui pourrait modifier les paramètres de recharge et de relâche dans le temps.

_Observer les effets de différentes substances sur les paramètres phénoménologiques de la dépression

Il serait intéressant d'étudier avec cette méthode les dépressions synaptiques réalisées en présence de différentes substances ou bien avec différents niveaux de Ca^{2+} , et de cette façon voir quel niveau de la relâche est affecté. J'ai fait des expériences avec perfusion de sérotonine, de AMP cyclique et de solution de Ca^{2+} élevé, mais celles-ci ne sont pas assez longues pour que leur fit soit significatif et permettre de voir si par exemple le taux de récupération, la probabilité de relâche ou bien l'inactivation sont changés ou non.

_Variante au modèle. Estimation de l'hétérogénéité de τ .

Un ajout bénéfique aux modèles est de considérer l'hétérogénéité du temps de recharge τ à travers les sites synaptiques. L'hétérogénéité de la probabilité de relâche et l'hétérogénéité du temps τ de la recharge provoque l'hétérogénéité de la relâche à travers les sites, mais tandis que la première n'affecte pas la cinétique de la dépression et peut être estimée par un p moyen dans la modélisation, la négligence de la deuxième pourrait être responsable de la sous-évaluation des PSPs après les intervalles de 0,5 et 10 secondes dans les courbes théoriques de la figure 13A. Il est proposé dans l'article qu'un phénomène d'accumulation de Ca^{2+} pourrait expliquer cette discordance, mais quelques sites qui se rechargent très vite pourraient aussi donner ce résultat.

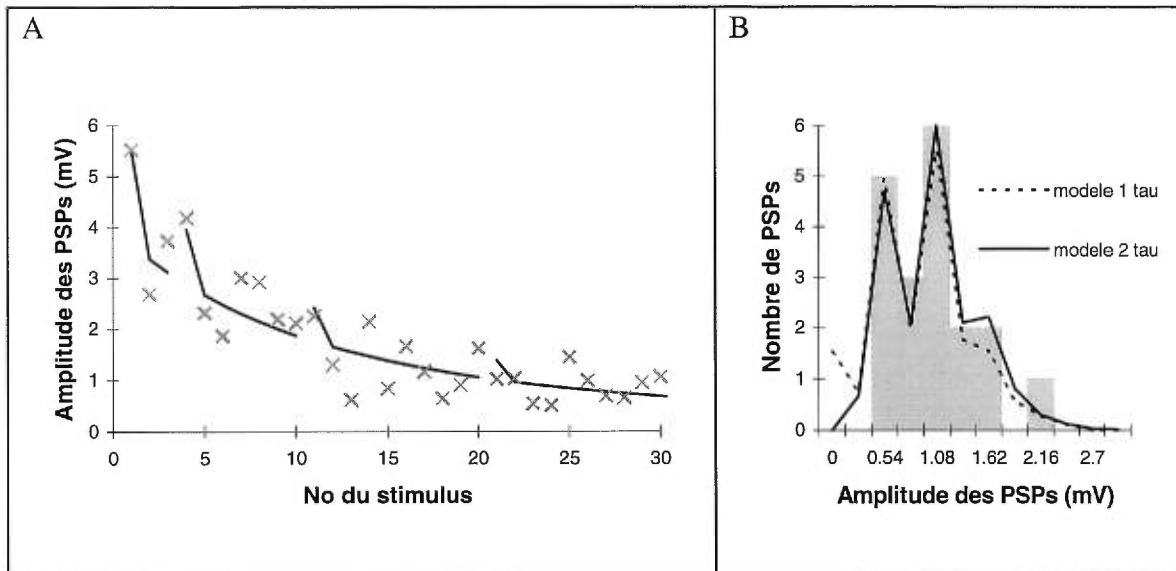


Figure 16: Fit de la cinétique et prédiction de la distribution quantique avec un modèle qui comporte 2 constantes de temps de recharge τ . A: La courbe expérimentale (croix) est obtenue en stimulant le neurone sensoriel à intervalle de 30 secondes. Des repos de 300 secondes sont appliqués après les 3e, 10e et 20e stimuli. Le fit de la courbe expérimentale (courbe pleine) permet de trouver la valeur des paramètres p , τ , la fraction $\alpha \varepsilon \cdot W^* i$ des sites actifs qui s'inactivent au ième stimulus, et la proportion de sites qui se rechargent instantanément et avec le temps τ . Le modèle utilisé ici suppose une inactivation des sites indépendante de la relâche. B: La distribution prédite par les paramètres dérivés en A (courbe pleine) reproduit convenablement la distribution expérimentale (barres) sur l'histogramme de fréquence. Un modèle avec un seul temps de recharge sur-estime le nombre d'échecs de PSPs (courbe pointillé).

Pour incorporer l'hétérogénéité du temps de recharge dans les modèles, la distribution des τ est approximée par deux valeurs, de sorte qu'un groupe de sites se rechargent immédiatement après avoir sécrété et appartiennent pour l'analyse quantique à la population de sites déjà chargés avant chaque stimulus, tandis qu'un autre groupe de sites se rechargent après un temps τ et appartiennent après avoir sécrété à la population de sites en recharge. Cette approximation a l'avantage de conserver toujours seulement deux populations de sites pour l'analyse quantique, ce qui rend encore possible la

construction d'histogrammes de fréquence (fig.24) (Construire des distributions d'amplitude avec plus de deux probabilités de relâche nécessiterait le calcul d'une multitude de termes pour chaque $P(x)$), et aussi le modèle n'est alourdi que d'un paramètre libre supplémentaire, qui indique la proportion de sites dans chaque groupe de temps de recharge. Pour la majorité des cas, un modèle qui ne tient pas compte de l'hétérogénéité de τ surestime systématiquement le nombre d'échecs (absence de PSP lors d'un stimulus) dans les distributions d'amplitude des PSPs (fig.24 B, courbe pointillée), contrairement à un modèle qui comporte deux τ (fig.24 B, courbe pleine), ce qui justifie l'insertion de ce nouveau paramètre. Ce modèle donne par ailleurs un estimé de l'hétérogénéité de la relâche.

Conclusion

L'article que nous avons soumis montre que la dépression et la facilitation par 5HT des synapses sensori-motrices de l'aplysie sont accompagnées d'un changement du n binomial plutôt que du p binomial. La simulation de la cinétique de la dépression montre que celle-ci est mieux représentée par un modèle où une fraction de sites synaptiques s'inactivent après chaque stimulus que par des modèles où la relâche diminue uniformément à tous les sites. Le mécanisme le plus simple pour décrire de tels résultats est que chaque site synaptique passe d'un état actif à un état inactif (et vice versa) sans mode transitoire, de sorte que la distribution de la probabilité de relâche des sites synaptiques reste la même.

Au cours de mes deux années de maîtrise, j'ai touché à plusieurs aspects de la recherche chez l'aplysie: j'ai appris plusieurs techniques d'enregistrement (sharp electrodes, nystatin patch, voltage-clamp), enregistré dans différentes préparations chez l'aplysie (ganglion abdominal, synapses soma-soma en culture, synapses entre des neurones qui grandissent dans des pétris traités à la polylysine (dans cette préparation le neurone sensoriel était injecté d'un marqueur fluorescent pour pouvoir distinguer les varicosités et enregistrer un nombre restreint de synapses)). J'ai aussi dû me familiariser avec les différentes techniques d'analyse, en particulier l'analyse quantique, et par la suite développer avec Marc nos propres méthodes tels l'estimation glissante du p quantique et les modèles de cinétique, etc...

Dans la même ligne que les travaux présentés dans ce mémoire, dans le futur j'aimerais exploiter la méthode "simulation de la cinétique-prédiction de l'histogramme de fréquence" pour tester de nouveau différents modèles de dépression, et étudier le changement des paramètres phénoménologiques de nos modèles lorsque l'enregistrement est effectué en présence de drogues et de différentes concentrations de Ca^{2+} .

REFERENCES

- Abrams TW, Castellucci VF, Camardo JS, Kandel ER, Lloyd PE (1984) Two endogenous neuropeptides modulate the gill and siphon withdrawal reflex in *Aplysia* by presynaptic facilitation involving cAMP-dependent closure of a serotonin-sensitive potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:7956-7960.
- Bailey, C.H., Chen, M. 1983. Morphological basis of long-term habituation and sensitization in *Aplysia*. *Science* 220, 91-93.
- Bailey CH, Chen M (1988) Morphological basis of short-term habituation in *Aplysia*. *J Neurosci* 8:2452-2459.
- Bao JX, Kandel ER, Hawkins RD (1997) Involvement of pre- and postsynaptic mechanisms in posttetanic potentiation at *Aplysia* synapses. *Science* 275:969-973.
- Bekkers, J.M., Stevens, C.F. (1995). Quantal analysis of EPSCs recorded from small numbers of synapses in hippocampal cultures. *J. Neurophysiol.* 73, 1145-1156.
- Bennett, M.V.L., Aljure, E., Nakajima, Y., Pappas, G.D. (1963). Electrotonic junctions between teleost spinal neurons: Electrophysiology and ultrastructure. *Science* 141, 262-264.
- Betz, W.J., Bewick, G.S. 1992. Optical analysis of synaptic vesicle recycling at frog neuromuscular junction. *Science* 255, 200-203.
- Blackman, J.G., Ginsborg, B.L., Ray, C. (1963). Synaptic transmission in the sympathetic ganglion of the frog. *J. Physiol. (Lond)* 167, 355-373.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. [Review]. *Nature* 361:31-39.
- Bliss, T.V.P., Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond)* 232, 331-356.
- Bolshakov VY, Siegelbaum SA (1994) Postsynaptic induction and presynaptic expression of hippocampal long-term depression. *Science* 264:1148-1152.
- Braha O, Dale N, Hochner B, Klein M, Abrams TW, Kandel ER (1990) Second messengers involved in the two processes of presynaptic facilitation that contribute to

sensitization and dishabituation in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2040-2044.

Brightman, M.W., Reese, T.S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* 40, 648-677.

Brock, L.G., Coombs, J.S., Eccles, J.C. (1952). The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode. *J. Physiol. (Lond)* 117, 431-460.

Brunelli M, Castellucci V, Kandel ER (1976) Synaptic facilitation and behavioral sensitization in *Aplysia*: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science* 194:1178-1181.

Byrne JH (1982) Analysis of synaptic depression contributing to habituation of gill-withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *Journal of Neurophysiology* 48:431-438.

Byrne JH, Kandel ER (1996) Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. [Review]. *J. Neurosci.* 16:425-35.

Byrne JH, Zwartjes R, Homayouni R, Critz SD, Eskin A (1993) Roles of second messenger pathways in neuronal plasticity and in learning and memory. Insights gained from *Aplysia*. [Review]. *Advances in Second Messenger & Phosphoprotein Research* 27:47-108.

Carew TJ, Hawkins RD, Kandel ER (1983) Differential classical conditioning of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *Science* 219:397-400.

Castellucci V, Kandel ER (1976) Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science* 194:1176-1178.

Castellucci VF, Kandel ER (1974) A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:5004-5008.

Castellucci, V., Pinsker, H., Kupfermann, I., Kandel, E.R. 1970. Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167, 1745-1748.

Ceccarelli, B., Hurlbut, W.P., Mauro, A. (1972). Depletion of vesicles from frog neuromuscular junctions by prolonged tetanic stimulation. *J. Cell Biol.* 54, 30-38.

- Charpier S, Behrends JC, Triller A, Faber DS, Korn H (1995) "Latent" inhibitory connections become functional during activity-dependent plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:117-120.
- Cohen TE, Kaplan SW, Kandel ER, Hawkins RD (1997) A simplified preparation for relating cellular events to behavior: mechanisms contributing to habituation, dishabituation, and sensitization of the *Aplysia* gill-withdrawal reflex. *Journal of Neuroscience* 17:2886-2899.
- Coulson RL, Klein M (1997) Rapid development of synaptic connections and plasticity between sensory neurons and motor neurons of *Aplysia* in cell culture: implications for learning and regulation of synaptic strength. *Journal of Neurophysiology* 77:2316-2327.
- Dale, H.H. (1935). Pharmacology and nerve endings. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 28, 319-332.
- Dale N, Kandel ER (1990) Facilitatory and inhibitory transmitters modulate spontaneous transmitter release at cultured *Aplysia* sensorimotor synapses. *J Physiol (Lond)* 421:203-222.
- Davis GW, Murphey RK (1994) Long-term regulation of short-term transmitter release properties: retrograde signaling and synaptic development. [Review]. *Trends in Neurosciences* 17:9-13.
- Del Castillo, J., Katz, B. (1956). Biophysical aspects of neuromuscular transmission. *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry* 6, 121-170.
- Del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol (Lond)* 560-573.
- De Robertis, E.D.P., Bennett, H.S. (1954). Submicroscopic vesicular component in the synapse. *Federation Proceedings* 13, 35.
- De Robertis, E.D.P., Bennett, H.S. (1955). Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biophysics, Biochemistry and Cytology* 1, 47-58.
- Dobrunz LE, Stevens CF (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18:995-1008.

- Dodge, F.A. Jr., Rahamimoff, R. (1967). Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J. Physiol.* 193, 419-432.
- Eccles, J.C., Fatt, P., Koketsu, K. (1954). Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. *J. Physiol. (Lond)* 126, 524-562.
- Eccles, J.C., Rall, W., 1951. Effects induced in a monosynaptic reflex path by its activation. *J. Neurophysiol.* 14, 353-376.
- Edwards, F.A., Konnerth, A., Sakmann, B., Busch, C. (1990). Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J. Physiol. (London)* 430, 213-49.
- Eliot LS, Kandel ER, Hawkins RD (1994) Modulation of spontaneous transmitter release during depression and posttetanic potentiation of Aplysia sensory-motor neuron synapses isolated in culture. *J Neurosci* 14:3280-3292.
- Fatt, P., Katz, B. (1951). An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J. Physiol. (Lond)* 115, 320-370.
- Frost WN, Kandel ER (1995) Structure of the network mediating siphon-elicited siphon withdrawal in Aplysia. *Journal of Neurophysiology* 73:2413-2427.
- Furshpan, E.J., Potter, D.D. (1959). Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol. (Lond)* 145, 289-325.
- Geppert, M., Südhof, T.C. (1998). RAB3 AND SYNAPTOTAGMIN: The Yin and Yang of synaptic membrane fusion. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 75-95.
- Ghirardi M, Braha O, Hochner B, Montarolo PG, Kandel ER, Dale N (1992) Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in Aplysia sensory neurons. *Neuron* 9:479-489.
- Gillis, K.D. 1995. Techniques for membrane capacitance measurements. In *single-channel Recording*, 2nd Ed. B. Sakmann and E. Neher, eds. (NY: Plenum Press), p. 155-198.
- Gingrich KJ, Byrne JH (1985) Simulation of synaptic depression, posttetanic potentiation, and presynaptic facilitation of synaptic potentials from sensory neurons mediating gill-withdrawal reflex in Aplysia. *Journal of Neurophysiology* 53:652-669.

- Goda, Y., Stevens, C.F. (1994). Two components of transmitter release at central synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 91, 12942-12946.
- Grant SG, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER (1992) Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice [see comments]. *Science* 258:1903-1910.
- Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A.J., Benfenati, F. 1993. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259, 780-785.
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T.C., Niemann, H. 1994. Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J* 13, 5051-5061.
- Hebb, D.O. (1949). *The organization of behaviour. A neuro-psychological theory.* John Wiley and Sons, London.
- Heidelberger, R., Heinemann, C., Heher, E., Matthews, G. 1994. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371, 513-515.
- Held, H. (1997). Beiträge zur Struktur der Nervenzellen und ihren Fortsatze. *Archiv für Anatomie und Physiologie, Leipzig*, 204-294.
- Hessler NA, Shirke AM, Malinow R (1993) The probability of transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature* 366:569-572.
- Heuser, J.E., Reese, T.S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 57. 315-344.
- Hochner B, Klein M, Schacher S, Kandel ER (1986) Additional component in the cellular mechanism of presynaptic facilitation contributes to behavioral dishabituation in *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83:8794-8.
- Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15:427-434.
- Israel, M., Dunant, Y., Manaranche, R. (1979). The present status of the vesicular hypothesis. *Progress in Neurobiology* 13, 237-275.
- Ito, M., Sakurai, M., Tongroach, P. (1982). Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol. (Lond)* 324, 113-134.

- James, W. (1890). *The principles of psychology*. Henry Holt, New York.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. 1982. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science* 218, 433-443.
- Katz, B. (1962). The transmission of impulses from nerve to muscle and the subcellular unit of synaptic action. *Proceedings of the Royal Society B* 155, 455-477.
- Kelly, R.B. (1993). Storage and release of neurotransmitters. *Cell* 72 / *Neuron* 10 (Suppl.), 43-53.
- Klein M, Shapiro E, Kandel ER (1980) Synaptic plasticity and the modulation of the Ca²⁺ current. *Journal of Experimental Biology* 89:117-157.
- Klein M (1993) Differential cyclic AMP dependence of facilitation at Aplysia sensorimotor synapses as a function of prior stimulation: augmentation versus restoration of transmitter release. *J Neurosci* 13:3793-3801.
- Klein M (1994) Synaptic augmentation by 5HT at rested Aplysia sensorimotor synapses: Independence of action potential prolongation. *Neuron* 13:159-166.
- Konorski, J. (1948). *Conditioned reflexes and neurone organization*. University Press, Cambridge.
- Korn H, Triller A, Mallet A, Faber DS (1981) Fluctuating responses at a central synapse: n of binomial fit predicts number of stained presynaptic boutons. *Science* 213:898-901.
- Kullmann, D.M., Nicoll, R.A. 1992. Long-term potentiation is associated with increases in quantal content and quantal amplitude. *Nature* 357, 240-244.
- Landò, L., Zucker, R.S. (1994). Ca²⁺ cooperativity in neurosecretion measured using photolabile Ca²⁺ chelators. *J. Neurophysiol.* 72, 825-830.
- Larkman, A., Hannay, T., Stratford, K., Jack, J. 1992. Presynaptic release probability influences the locus of long-term potentiation. *Nature* 360,70-73.
- Larrabee, M.G., Bronk, D.W. 1947. Prolonged facilitation of synaptic excitation in sympathetic ganglia. *J. Neurophysiol.* 10, 139-154.
- Liao D, Hessler NA, Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375:400-404.

- Liley, A.W., North, K.A.K. 1953. An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction. *J.Neurophysiol.* 16, 509-527.
- Lin XY, Glanzman DL (1994) Hebbian induction of long-term potentiation of *Aplysia* sensorimotor synapses: partial requirement for activation of an NMDA-related receptor. *Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* 255:215-221.
- Lin, X.Y., Glanzman, D.L. 1996. Long-term depression of *Aplysia* sensorimotor synapses in cell culture: inductive role of a rise in postsynaptic calcium. *J.Neurophysiol.* 76, 2111-2114.
- Lisman, J.E. 1989. A mechanism for the Hebb and anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86, 9574-9578.
- Liu G, Tsien RW (1995) Synaptic transmission at single visualized hippocampal boutons. *Neuropharmacology* 34:1407-1421.
- Llinàs, R., Steinberg, I.Z., Walton, K. (1981). Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *J. Biophys.* 33, 323-352.
- Lloyd, D.P.C. 1949. Post-tetanic potentiation of response in monosynaptic reflex pathways of spinal cord. *J. General Physiol.* 33, 147-170.
- Lynch, G., Larson, J., Kelson, S., Barrionuevo, G., Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305, 719-721.
- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Nicoll, R.A. 1989. The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission—its role in long-term potentiation. *TINS* 12, 444-450.
- Malenka, R.C., Kauer, J.A., Zucker, R.S., Nicoll, R.A. 1988. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* 242, 81-84.
- Maycox, P.R., Hell, J.W. and Jahn, R. 1990. Amino acid neurotransmission: Spotlight on synaptic vesicles. *Trends Neurosci.* 13, 83-87.
- Mckernan MG, Shinnickgallagher P (1997) Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* 390:607-611.

- McLachlan EM (1978) The statistics of transmitter release at chemical synapses. *International Review of Physiology* 17:49-117.
- McMahon, H.T., Südhof, T.C. 1995. Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin and SNAP-25 forms high affinity α -SNAP binding site. *J. Biol. Chem.* 270, 2213-2217.
- Murphy GG, Glanzman DL (1997) Mediation of classical conditioning in *Aplysia californica* by long-term potentiation of sensorimotor synapses. *Science* 278:467-471.
- Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: New tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20, 389-399.
- Palade, G.E. (1954). Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anatomical Record* 118, 335-336.
- Palay, S.L. (1954). Electron microscope study of the cytoplasm of neurons. *Anatomical Record* 118, 336.
- Palay, S.L. (1956). Synapse in the central nervous system. *J. Biophysics, Biochemistry and Cytology* 2, 193-202.
- Payton, B.W., Bennett, M.V.L., Pappas, G.D. (1969). Permeability and structure of junctional membranes at an electrotonic synapse. *Science* 166, 1641-1643.
- Redman S (1990) Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. [Review] [132 refs]. *Physiological Reviews* 70:165-198.
- Rogan MT, Staubli UV, LeDoux JE (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* 390:604-607.
- Rosenmund C, Clements JD, Westbrook GL (1993) Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse. *Science* 262:754-757.
- Rosenthal, J. (1969). Post-tetanic potentiation at the neuromuscular junction of the frog. *J. of physiol. (London)* 203, 121-33.
- Rothman, J.E., Orci, L. 1992. Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 355, 409-415.
- Sacktor TC, Schwartz JH (1990) Sensitizing stimuli cause translocation of protein kinase C in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2036-2039.

- Sakurai, M. 1990. Calcium is an intracellular mediator of the climbing fibre in induction of cerebellar long-term depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87, 3383-3385.
- Schacher S, Montarolo P, Kandel ER (1990) Selective short- and long-term effects of serotonin, small cardioactive peptide, and tetanic stimulation on sensorimotor synapses of *Aplysia* in culture. *J Neurosci* 10:3286-3294.
- Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y (1992) Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice [see comments]. *Science* 257:201-206.
- Söllner, T., Bennett, M., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., Rothman, J.E. 1993. A protein assembly-disassembly pathway that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking. *Cell* 75, 409-418.
- Squire, L.R. 1982. The neuropsychology of human memory. *Annual Review of Neuroscience* 5, 241-273.
- Stern-Bach, Y., Greenberg-Ofrath, N., Flechner, I. and Schuldiner, S. 1990. Identification and purification of a functional amine transporter from bovine chromaffin granules. *J. Exp. Biol.* 144, 1-12.
- Stevens CF, Wang Y (1994) Changes in reliability of synaptic function as a mechanism for plasticity [see comments]. *Nature* 371:704-707.
- Stopfer M, Carew TJ (1996) Heterosynaptic facilitation of tail sensory neuron synaptic transmission during habituation in tail-induced tail and siphon withdrawal reflexes of *Aplysia*. *Journal of Neuroscience* 16:4933-4948.
- Südhof, T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein-interactions. *Nature* 375, 645-653.
- Sugita S, Goldsmith JR, Baxter DA, Byrne JH (1992) Involvement of protein kinase C in serotonin-induced spike broadening and synaptic facilitation in sensorimotor connections of *Aplysia*. *J Neurophysiol* 68:643-651.
- Sulzer, D., Chen, T.K., Lau, Y.Y., Kristensen, H., Rayport, S., Ewing, A. 1995. Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J. Neurosci.* 15, 4102-8.

- Sutton, R.B, Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 357-353.
- Tauc, L. (1982). Nonvesicular release of neurotransmitter. *Physiological Reviews* 62, 857-893.
- Trudeau LE, Castellucci VF (1992) Contribution of polysynaptic pathways in the mediation and plasticity of *Aplysia* gill and siphon withdrawal reflex: evidence for differential modulation. *J Neurosci* 12:3838-3848.
- von Gersdorff H, Matthews G (1997) Depletion and replenishment of vesicle pools at a ribbon-type synaptic terminal. *Journal of Neuroscience* 17:1919-1927.
- Walmsley, B. (1991). Central synaptic transmission: studies at the connection between primary afferent fibres and dorsal spinocerebellar tract (DSCT) neurones in Clarke's column of the spinal cord. *Prog. in Neurobiol.* 36, 391-423.
- Walters ET, Byrne JH, Carew TJ, Kandel ER (1983) Mechanoafferent neurons innervating tail of *Aplysia*. I. Response properties and synaptic connections. *J Neurophysiol* 50:1522-1542.
- Walters ET, Byrne JH (1983) Associative conditioning of single sensory neurons suggests a cellular mechanism for learning. *Science* 219:405-408.
- Walters ET, Byrne JH (1985) Long-term enhancement produced by activity-dependent modulation of *Aplysia* sensory neurons. *Journal of Neuroscience* 5:662-672.
- Wang S, Wojtowicz JM, Atwood HL (1996) Synaptic recruitment during long-term potentiation at synapses of the medial perforant pathway in the dentate gyrus of the rat brain. *Synapse* 22:78-86.
- Wiesel, T.N., Hubel, D.H. (1965). Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *J. Neurophysiol.* 28, 1029-1040.
- Wojtowicz JM, Smith BR, Atwood HL (1991) Activity-dependent recruitment of silent synapses. *Ann N Y Acad Sci* 627:169-179.
- Zucker RS (1972) Crayfish escape behavior and central synapses. II. Physiological mechanisms underlying behavioral habituation. *Journal of Neurophysiology* 35:621-637.

Zucker RS (1989) Short-term synaptic plasticity. [Review]. *Annual Review of Neuroscience* 12:13-31.

Zucker RS, Bruner J (1977) Long-lasting depression and the depletion hypothesis at crayfish neuromuscular junctions. *Journal of Comparative Physiology A* 121:223-240.

Annexe

L'élaboration de plusieurs programmes informatiques sur Microsoft Excel fut nécessaire pour la réalisation de cette étude. Certains de ceux-ci comportent des méthodes nouvelles, qui ont été testées sur des données simulées.

Méthode pour trouver la taille du quantum q

Avec quatre paramètres libres, n , p , q et CV_q le coefficient de variation de q , et le petit nombre de PSPs de certaines expériences, la régression de la distribution binômiale est un moyen peu fiable pour trouver la taille du quantum q . Il est alors essentiel pour l'analyse quantique d'obtenir cette mesure d'une manière indépendante. Outre la moyenne des minis, qui n'est pas toujours facile à obtenir car toutes les synapses n'émettent pas abondamment de minis, la méthode de déconvolution est aussi utilisée dans certaines études pour trouver q , mais nécessite de même un nombre relativement élevé de PSPs pour être efficace (Redman 1990). Le programme développé repose sur un algorithme simple pour détecter les pics sur un histogramme de fréquence construit avec un incrément de petite taille (0.005-0.02 mV) (fig.17 A). Une série de gaussiennes également espacées de x mV (courbe pleine) est superposée à la distribution expérimentale (barres), et le produit des valeurs des deux distributions est calculé pour chaque incrément. Une autre série de gaussiennes (courbe en pointillé), négatives et décalées de $x/2$ par rapport à la première, est de même multipliée à la distribution expérimentale, comme pénalité pour les amplitudes d'EPSPs qui tombent entre les gaussiennes positives. La somme des produits sur tous les incréments devrait alors être maximale lorsque x égale la taille du quantum q (fig.17 B, flèche), car les gaussiennes

positives s'alignent le mieux avec les pics expérimentaux tandis que les gaussiennes négatives coïncident avec les creux.

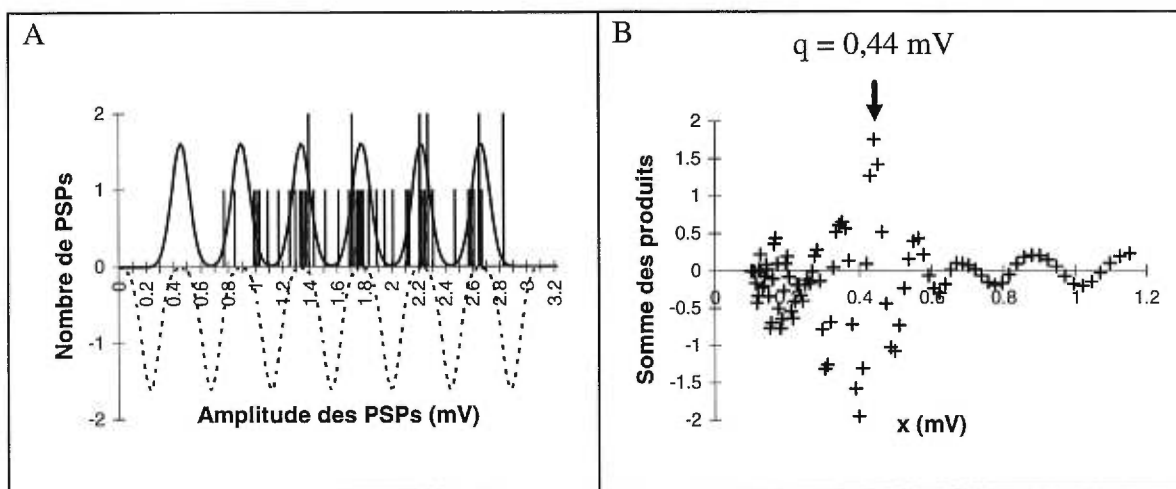


Figure17: Méthode pour trouver la taille du quantum q . A: Séries de gaussiennes (positive et négative) superposées à la distribution expérimentale (barres). Note: l'échelle des ordonnées n'est bonne que pour la distribution expérimentale. B: Sommes pour un interval essayé de x , des produits entre les gaussiennes et la distribution expérimentale effectués sur tous les incréments. La somme est maximale lorsque x égale 0.44 mV.

L'aire de chaque gaussienne est normalisée, et leur coefficient de variation est gardé constant (de sorte que la largeur des gaussiennes augmente lorsque leur espacement x augmente). L'espacement x des gaussiennes est l'unique paramètre à changer, et le balayage de sa valeur (fig.17 B) permet de trouver q , pour lequel la somme des produits est maximale.

Ce programme a été testé sur des distributions simulées avec des valeurs connues de q . Comme premier test, la distribution simulée consiste en une somme de gaussiennes d'amplitudes et de coefficient de variation variables (fig.18 , surfaces ombrées), sensées représenter les pics expérimentaux. La taille du quantum q est réglée à 0,5 mV, et une variance représentant le bruit intrinsèque des cellules ou de l'enregistrement est

additionné à la largeur des gaussiennes. Ce premier test montre qu'en général, pour un bruit et un coefficient de variation élevé (0.1 mV et 0.25 respectivement), le programme peut donner un résultat erroné lorsque les PSPs de petites amplitudes (<1 sur la fig.18 A) sont moins nombreux que ceux de grandes amplitudes (fig.18 A), tandis que dans le cas contraire (plus de petits que de gros PSPs), le résultat est correct (fig.18 B).

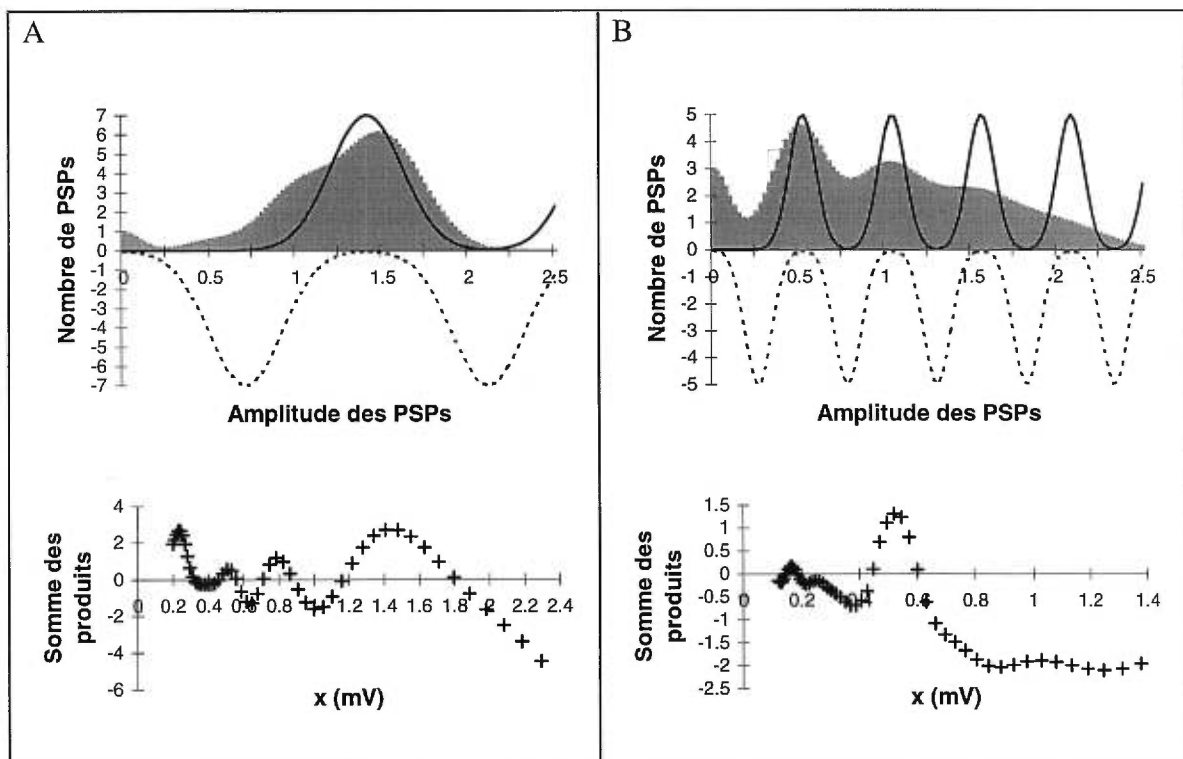


Figure18: Premier test du programme. L'algorithme est testé sur des distributions simulées de différentes formes avec des gaussiennes de coefficients de variation variables. La taille du quantum est de 0.5. A: Distribution avec plus de grands PSPs que de petits. Le programme prédit un résultat erroné autour de 1.4. B: Distribution avec plus de petits PSPs que de grands. Le programme prédit un résultat proche de 0.5.

Ce premier test suppose que chaque pic expérimental est une parfaite gaussienne, comme ce serait le cas s'il y avait un grand nombre de PSPs. Pour simuler la distribution d'une expérience qui a un petit nombre de PSPs, chaque pic expérimental est plutôt

construit en générant aléatoirement dix PSPs suivant une loi normale centrée à un multiple de q ($q = 1$) avec un certain coefficient de variation (fig.19, “1er pic, 2e pic”). Une distribution est alors formée de 5 pics (50 PSPs au total) dont les coefficients de variation égalent $CV_q * (\text{No du pic})^{1/2}$ (fig.19). Le second test consiste alors à essayer le programme sur 20 distributions simulées avec des paramètres identiques, de façon à pouvoir déterminer l’erreur de la méthode, et ceci pour différentes valeurs de CV_q (6 différents CV_q , donc au total 6*20 distributions simulées).

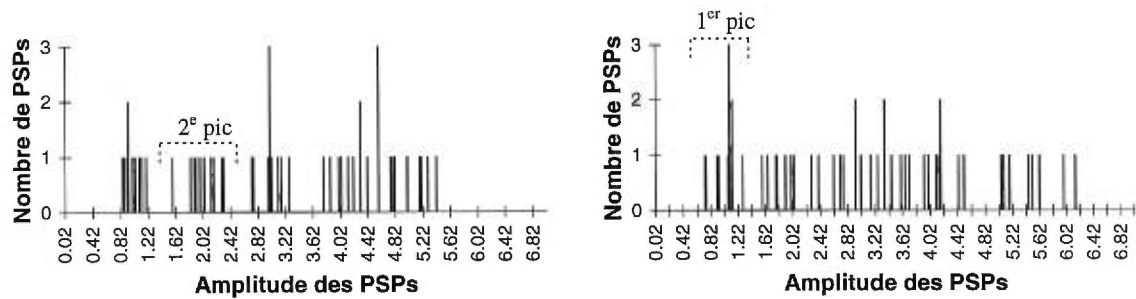


Figure19: Deuxième test pour le programme. Chaque distribution contient 5 pics de dix PSPs, et chaque pic est formé de nombres générés aléatoirement suivant une loi normale, avec des coefficients de variation de 0.15 (histogramme de gauche) et de 0.3 (histogramme de droite). La taille du quantum est de 1.

La figure20 montre que l’erreur dans l’évaluation de q augmente lorsque cvq augmente (barres d’erreurs). Chaque point indique la moyenne des 20 estimations de q pour chaque CV_q , tandis que les barres d’erreur égalent l’écart-type. À cause de la forme de la dépression des PSPs, on trouve en général plus de petits PSPs que de grands, et le problème soulevé par le premier test

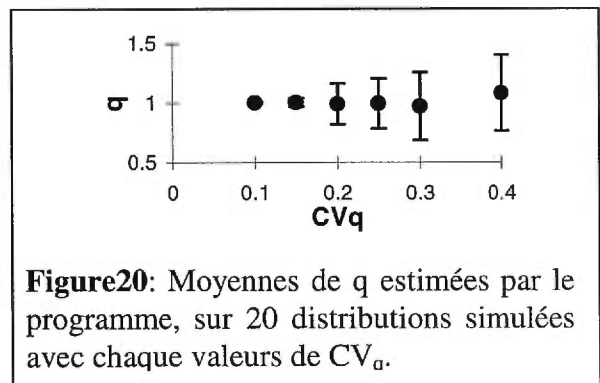


Figure20: Moyennes de q estimées par le programme, sur 20 distributions simulées avec chaque valeurs de CV_q .

ne se pose pas. Le 2ème test montre toutefois que la méthode a des limites pour des CV_q élevés.

Évaluation glissante de p

Ce programme permet de suivre l'évolution des paramètres binômiaux n et p pendant l'expression des formes de plasticité.

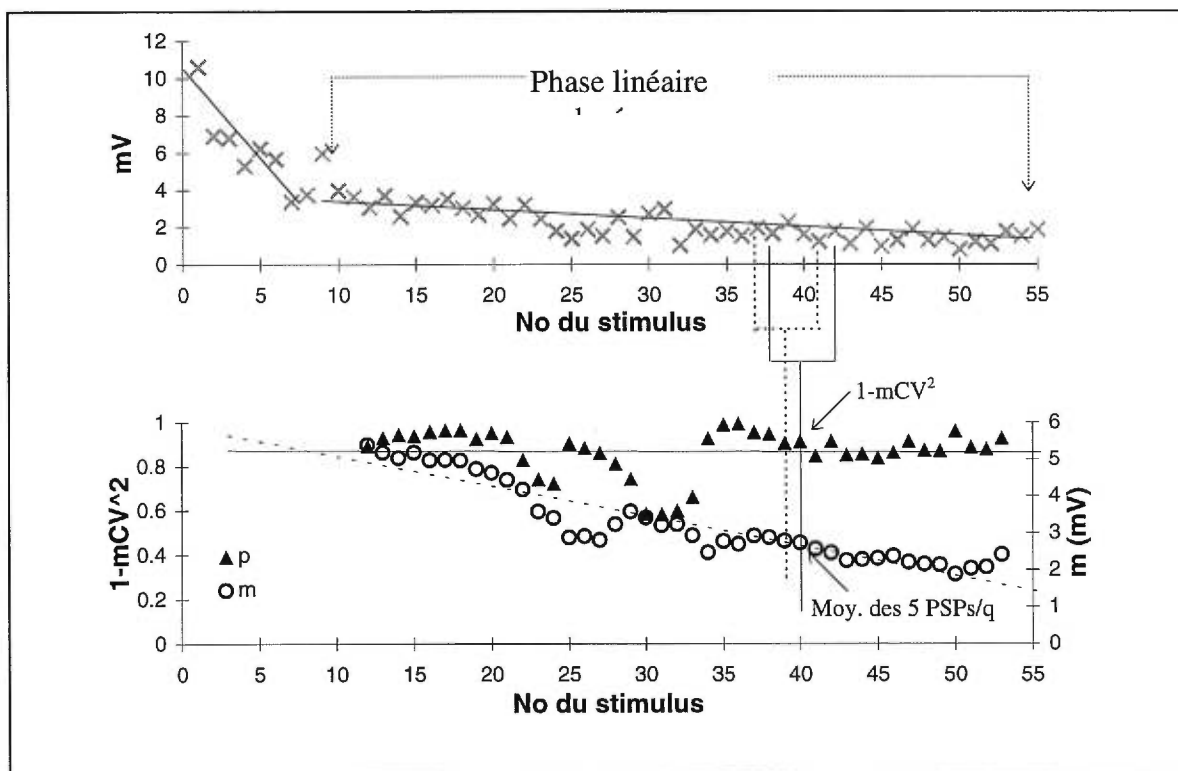


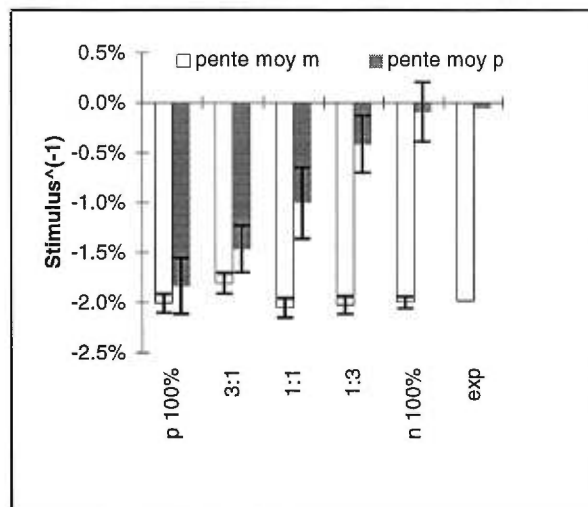
Figure 21: Évaluation glissante de la probabilité apparente de relâche. Le graphe du haut montre les deux phases (traits pleins) de la dépression synaptique (Croix). Le graphe du bas montre les valeurs de p (triangles pleins) et m (cercles) calculées pour des groupes de 5 PSPs.

La formule $p = 1 - mCV^2 + (CV_q)^2$ (McLachlan 1978), où m est le contenu quantique moyen et CV est le coefficient de variation des PSPs, est utilisée pour calculer p sur des

intervalles de cinq PSPs, qui se succèdent en se déplaçant d'un seul PSP par estimation (fig.21, triangles noires).

Cette sorte d'évaluation glissante est de même opérée pour m , le contenu quantique moyen, qui est égal à l'amplitude moyenne des PSPs divisée par q (fig.21, ronds vides). De cette façon il est possible de voir à quel degré un changement de m est accompagné d'un changement de p lors de la dépression synaptique, en comparant les pentes des régressions linéaires effectuées sur les valeurs de m et p . Afin de tester la sensibilité de cette méthode pour détecter un changement apparent de p , des simulations de la partie linéaire des dépressions synaptiques (fig.21, "Phase linéaire analysée") sont générées avec des paramètres identiques aux dépressions expérimentales, i.e. les mêmes pentes, nombres de PSPs, et valeurs de p à mi-parcours. Cinq ensembles de 15 séries de simulations (chaque série contenant 18 simulations représentant les expériences) sont construits, avec différents protocoles d'évolutions de n et p , à l'aide d'un générateur de nombre aléatoire suivant la loi binômiale: p et n sont modulés de sorte que le ratio (contr. p):(contr. n) de leurs contributions relatives pour les dépressions des ensembles 1 à 5 soit respectivement 100% p , 3:1, 1:1, 1:3 et 100% n . La figure 22 montre que le programme détecte un changement de p assez proche de son changement réel. Chaque point indique la moyenne des pentes des régressions sur p pour 15 séries de simulations. Les barres d'erreur sont les écarts-types. L'analyse des dépressions expérimentales donne un résultat qui tombe dans l'intervalle d'un changement de n uniquement (barre grise "exp").

Figure22: Sensibilité de la méthode pour détecter un changement de p. Pour une dépression moyenne de m de 2% par stimulus (barres blanches), p (barres grises) diminue de 0% à 2% par stimulus suivant que les dépressions sont simulées avec un changement uniquement de n jusqu'à un changement uniquement de p.



Distribution des p à travers les sites synaptiques

Le programme précédent détecte un changement apparent de p ou de n. La seconde phase plus lente de la dépression des synapses sensorimotrices semble être associée à un changement apparent de n uniquement. Maintenant, la question est de savoir quelles sont les façons que p et n peuvent réellement changer pour qu'il en résulte un changement apparent en n, tenant compte de l'hétérogénéité éventuelle de p aux différents sites synaptiques. Un programme a été développé, qui simule, à l'aide de deux gaussiennes d'amplitude et de largeur réglables, les distributions plausibles des p des différents sites pour une certaine valeur des paramètres suivants: La probabilité apparente p_{app} , le contenu quantique moyen m et le nombre total de sites synaptiques n_{tot} (fig.23).

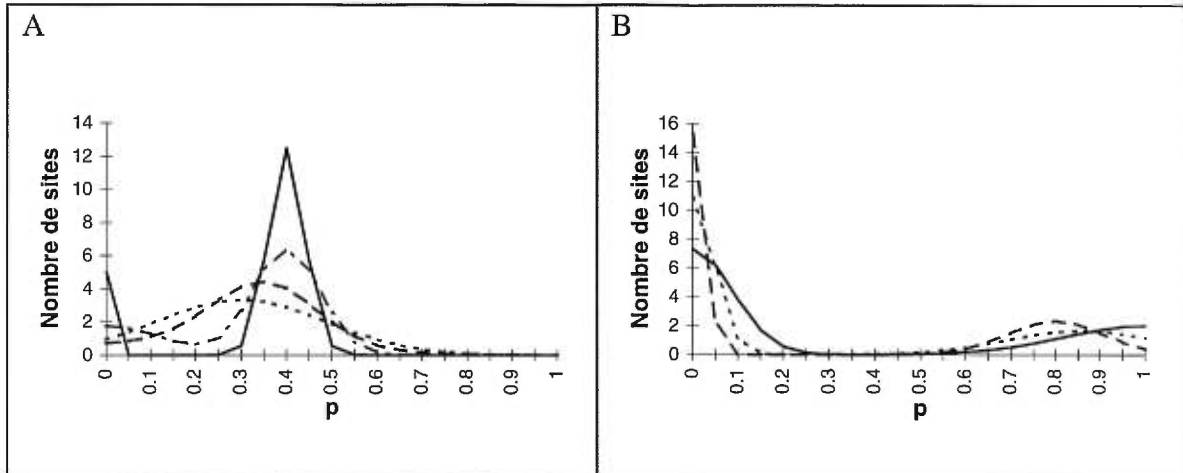


Figure 23: Distributions possibles des probabilités de relâche parmi les sites synaptiques pour $m = 10$, $n_{\text{tot}} = 30$, et A: $p_{\text{app}} = 0.4$, B: $p_{\text{app}} = 0.8$.

En général, un p_{app} élevé avec un m petit et un n_{tot} élevé donne une distribution des p divisée en deux gaussiennes de petites largeurs, l'une centrée en zéro et l'autre près de un (fig. 23 B). Le p_{app} de la distribution est calculé avec la formule (2) de l'introduction, et le programme cherche les différentes distributions qui donnent le même p_{app} que mesuré par l'analyse quantique. Il n'est pas possible de déterminer expérimentalement le nombre de sites synaptiques total n_{tot} , mais en comptant le nombre de quanta contenu dans le plus grand PSP d'une expérience, on obtient une valeur minimale du nombre de sites, et par conséquent une limite pour la dispersion des p . Pour beaucoup des expériences, après un certain nombre de stimuli, les distributions possibles des p semblent alors être limitées aux cas de la fig. 23 B, i.e. un groupe de sites sont inactifs avec des probabilités de relâche autour de zéro, tandis que d'autres sites sécrètent avec des probabilités qui peuvent être relativement hétérogènes.

Le programme permet aussi d'observer comment la distribution de p doit évoluer avec le temps de façon à avoir un certain changement de m et de p_{app} . Pour un changement de m

élevé et un p_{app} élevé, seul un transfert d'amplitude entre la gaussienne de sites actifs et celle centrée en zéro permet de voir aucun changement de p_{app} (fig.24 A), tandis qu'un déplacement et/ou un changement de largeur de la gaussienne de sites actifs engendre inévitablement une altération de p_{app} (fig.24 B).

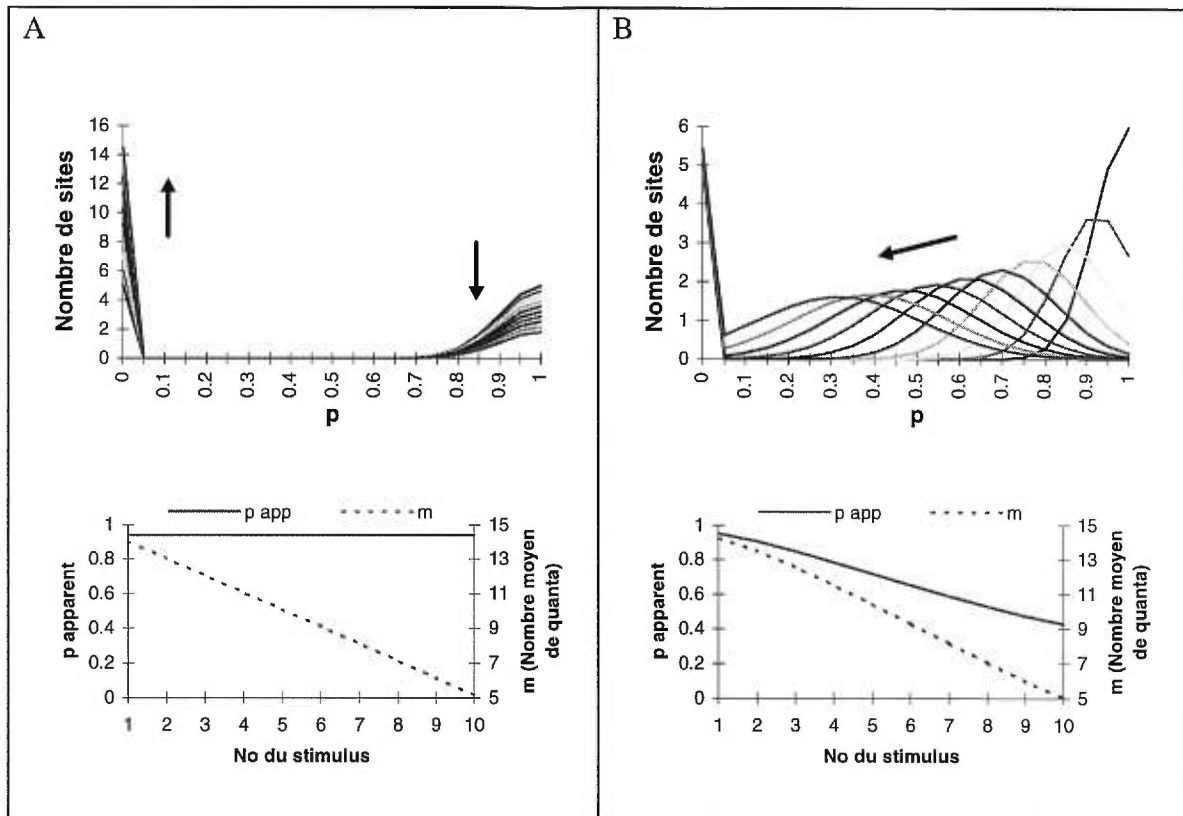


Figure 24: Évolution de p_{app} lors d'une même dépression de m obtenue par deux différentes façons de modifier les probabilités de relâche des sites synaptiques. A: Des sites s'inactivent et passent d'une probabilité de relâche proche de 1 à une probabilité nulle (graphique du haut). La probabilité de relâche apparente garde une valeur constante (graphique du bas). B: La probabilité de relâche des sites synaptiques diminue graduellement (graphique du haut). La probabilité de relâche apparente diminue de même graduellement (graphique du bas).

Dans certaines de nos expériences les conditions d'un n élevé, p_{app} élevé, m petit et d'un important changement de m n'étaient pas présentes, et il était possible de décrire la

dépression par un changement non-uniforme des p (comme expliqué dans l'introduction).

Il faut noter que ce programme permet de simuler des changements uniformes de p sur tous les sites ainsi que des changements non uniformes. Par exemple, uniquement un déplacement de la gaussienne de sites actifs vers la gauche représenterait un changement uniforme de p , tandis qu'un élargissement de la gaussienne avec le temps représenterait un changement non uniforme car certains sites garderaient toujours une probabilité de relâche de 1 tandis que la probabilité d'autres sites diminuerait.