

Table des matières

A- Résumé.....	II
B- Avant propos.....	II
C- Table des matières.....	IV
C1- Liste des figures.....	VI
D- Introduction.....	1
D1- Le système nerveux.....	2
D2- Le neurone.....	2
D3- Les synapses.....	3
D4- La plasticité synaptique.....	5
D5- L'épine post-synaptique.....	6
D6- La CaMKII.....	7
D7- La CaMKII : sa structure et son activation.....	7
D8- La CaMKII : ses auto-phosphorylations.....	10
D9- La CaMKII : ses interactions protéiques.....	10
D10- La CaMKII : ses interactions au récepteur NMDA.....	11
D11- La CaMKII : son auto-association.....	11
D12- La CaMKII : sa localisation synaptique et ses changements de localisation.....	11
D13- La CaMKII : les enjeux de la régulation de sa localisation.....	12
E- Matériel et méthodes.....	13
E1- Constructions de CaMKII-GFP et de NR2B.....	13
E2- Culture, transfection, stimulation et fixation des cellules HEK.....	13
E3- Immunocytochimie.....	13
E4- Microscopie confocale.....	14
E5- Analyse des images.....	14
E6- Cultures, transfections et imagerie de neurones.....	15
E7- Analyse du FRAP.....	16
F- Résultats.....	17
F1- La CaMKII translocalise dans le neurone suite à l'activation des récepteurs NMDA.....	17
F2- L'interaction de la CaMKII avec le récepteur NMDA (via NR2B) dépend d'une élévation de la concentration de calcium.....	18
F3- L'auto-association de la CaMKII dépend d'une élévation de la concentration de calcium et d'une baisse de pH.....	21
F4- L'auto-association de la CaMKII dépend de la structure multimérique de la CaMKII, de l'activation par le Ca ²⁺ /CaM et d'interactions du domaine catalytique, mais est inhibée par l'auto-phosphorylation de la T286.....	22

Liste des figures

Figure i) : Modèles de la structure de la CaMKII.....	9
Figure 1 : Translocalisation synaptique et extra-synaptique de la CaMKII dépendante de l'activité synaptique.....	18
Figure 2 : Interaction de la CaMKII avec NR2B dans des cellules HEK.....	20-21
Figure 3 : Auto-association de la CaMKII dans des cellules HEK.....	22
Figure 4 : Quantification de l'auto-association de la CaMKII sauvage et de certains mutants de la CaMKII.....	24
Figure 5 : Autophosphorylation dans les agrégats de CaMKII.....	28
Figure 6 : FRAP de la GFP-CaMKII dans trois épines d'un neurone.....	34
Figure 7 : Caractérisation de l'étendue du photoblanchiment dans le neurone.....	35-36
Figure 8 : Comparaison des mobilités de protéines de différente grosseur par FRAP...	39
Figure 9 : Comparaison des modélisations de trois protéines de différentes tailles dans des épines post-synaptiques.....	43
Figure 10 : Comparaison de la mobilité de la GFP dans les épines dendritiques avant ou après l'activation des récepteurs NMDA de neurones en culture..	47
Figure 11 : Comparaison de la mobilité de la GFP-CaMKII dans les épines dendritiques avant ou après l'activation des récepteurs NMDA de neurones en culture..	48
Figure 12 : Comparaison de la mobilité de la GFP-CaMKII dans les dendrites avant ou après l'activation des récepteurs NMDA de neurones en culture.....	50
Figure 13 : Comparaison de la mobilité de la GFP-CaMKII monomérique (1-326) dans les épines dendritiques avant ou après l'activation des récepteurs NMDA de neurones en culture.....	51
Figure 14 : Rôle de l'auto-association de la CaMKII dans sa translocalisation dépendante de l'activation des récepteurs NMDA.....	53

Introduction

Le système nerveux permet de recueillir des informations extérieures et intérieures, de les intégrer et d'y réagir en tenant compte de paramètres innés ou acquis par l'expérience. Il peut faire preuve d'adaptation et d'apprentissage et ces facultés sont très importantes puisqu'elles sont conservées chez une multitude d'organismes, des invertébrés jusqu'aux mammifères supérieurs. Ainsi, l'animal peut apprendre des mouvements (mémoire procédurale) ou des sensations (mémoire émotionnelle) (Eichenbaum, 2003). Par ailleurs, l'être humain, qui a la capacité de raisonner et d'intégrer des informations abstraites, possède également une mémoire pour retenir ce type d'information (mémoire déclarative). Ces processus de mémorisation se déroulent dans différentes structures du système nerveux qui sont également impliquées dans le mouvement, la sensation ou le raisonnement. Des données expérimentales démontrent que ces facultés d'adaptation et d'apprentissage ont possiblement une base physiologique qui est située au niveau cellulaire (Byrne, 2003). Par exemple, il est possible de faire « apprendre » un neurone à réagir à une stimulation en augmentant ou en diminuant sa sensibilité à la stimulation. Des agents perturbant cet apprentissage du neurone perturbent également l'apprentissage chez les animaux. De plus, l'utilisation de ces agents combinée à des techniques avancées d'imagerie moléculaire permet d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans cet apprentissage du neurone. *Au cours de ma maîtrise, j'ai étudié certains de ces mécanismes moléculaires notamment ceux impliquant un récepteur glutamatergique, le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA), et une enzyme, la protéine kinase dépendante du calcium/calmoduline (CaMKII).*

Avant de plonger dans les détails des mécanismes moléculaires impliquant la CaMKII et le récepteur NMDA et d'expliquer la méthodologie utilisée, je vais aborder l'importance de ces mécanismes moléculaires dans le fonctionnement de la signalisation post-synaptique. Par la suite, je présenterai les résultats de mes recherches et discuterai de l'implication de ceux-ci dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliquant le récepteur NMDA et la CaMKII.

Le système nerveux

Dans le cerveau, les 100 milliards de neurones forment les circuits nerveux qui sous-tendent les fonctions cérébrales alors que les cellules gliales, qui sont dix fois plus nombreuses, servent à isoler, nourrir et protéger les neurones, ainsi qu'à moduler la communication neuronale. Les neurones peuvent répondre à différents stimuli et stimuler un ou plusieurs neurones cibles afin de propager de l'information dans les circuits nerveux.

Les neurones sont regroupés en réseaux au sein de structures anatomiques qui composent le cerveau et la moelle épinière. L'hippocampe est une structure du cerveau importante pour la mémoire spatiale et la mémoire déclarative puisque sa destruction produit des déficits pour ces types de mémoire (Eichenbaum, 2003). Le réseau neuronal principal de l'hippocampe est composé du gyrus denté qui reçoit les afférences du cortex entorhinal et dont les neurones vont exciter les neurones du CA3 (Freund et Buzsaki, 1996). Les neurones du CA3 vont à leur tour exciter les neurones du CA1 qui vont acheminer l'influx vers l'extérieur de l'hippocampe. Les types de neurones de ce réseau sont des cellules granulaires (gyrus denté) et des neurones pyramidaux (CA3 et CA1). Par ailleurs, ce réseau est finement contrôlé par une grande variété de neurones inhibiteurs (interneurones). J'ai effectué mes expériences sur des neurones d'hippocampe dissociés maintenus en culture. Bien que la géométrie du réseau de l'hippocampe soit perturbé dans ce modèle, les neurones gardent plusieurs de leurs propriétés fondamentales dont celle de faire des connexions, c'est-à-dire des synapses, qui sont fonctionnelles.

Le neurone

Le neurone est un type de cellule possédant une morphologie très complexe qui lui permet de recevoir des signaux, de les intégrer, de les transporter et de les communiquer. La morphologie étendue des neurones permet d'augmenter leurs champs récepteurs et de propager l'influx nerveux sur de longues distances (Bear et al., 2001). Par ailleurs, ce type de morphologie nécessite l'utilisation de systèmes de communication et de transport intracellulaire pour lier les différentes parties du neurone au noyau afin que les éléments

nécessaires au fonctionnement du neurone qui sont synthétisés dans le corps cellulaire soient bien distribués.

Bien que le neurone soit étendu, il est également compartimenté pour séparer et isoler certains processus physiologiques et certains processus d'intégration. Le neurone est constitué de deux domaines subcellulaires distincts soit le corps cellulaire (soma ou perikaryon) et les prolongements appelés neurites composés d'un axone et de dendrites (Bear et al., 2001). L'axone sert à projeter l'influx nerveux vers d'autres neurones par les synapses. Les dendrites constituent, avec le corps cellulaire, le domaine de la cellule qui reçoit la majorité des afférences synaptiques. Ils peuvent porter des excroissances membranaires appelées épines dendritiques. Les épines dendritiques sont très abondantes sur certains types de neurones (jusqu'à 30 000-40 000 sur les neurones pyramidaux) et elles reçoivent la majorité des synapses excitatrices (Nimchinsky et al., 2002). Leurs fonctions sont méconnues, mais il a été suggéré qu'elles pourraient servir à augmenter la surface dendritique, à compartimenter les charges électriques ou les éléments de signalisation biochimique (Tsay et al., 2004). *Mon étude porte principalement sur cette structure du neurone, notamment en tant que structure post-synaptique de la synapse.*

Les synapses

Les synapses sont les jonctions entre les neurones qui permettent la transmission d'un influx nerveux d'une terminaison pré-synaptique vers un neurone post-synaptique (Bear et al., 2001). Il existe deux grands types de synapses dans le système nerveux, soit les synapses électriques et les synapses chimiques. Les synapses électriques communiquent par le passage d'un courant électrique à travers des pores reliant le neurone pré-synaptique au neurone post-synaptique. Les synapses chimiques communiquent grâce à un intermédiaire chimique, un neurotransmetteur, qui est libéré dans la fente synaptique par le neurone pré-synaptique et qui va exciter ou inhiber le neurone post-synaptique. Les synapses chimiques peuvent utiliser plusieurs types de neurotransmetteur. Parmi ceux-ci, le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans le cerveau. *C'est ce*

neurotransmetteur que j'ai utilisé pour stimuler les neurones et mesurer les changements de localisation et de mobilité de protéines suite à cette stimulation.

Les neurotransmetteurs vont activer des récepteurs post-synaptiques dont l'activation dépend de la liaison de ligands (ligands-dépendants) ce qui fera entrer des ions (récepteurs ionotropiques) ou déclencher des cascades de signalisation (récepteurs couplés à des protéines G ou récepteurs métabotropiques) dans le neurone post-synaptique. Les récepteurs glutamatergiques ionotropiques produisent rapidement leurs effets, qui dépendent du type de récepteur, sur le neurone comparativement aux récepteurs métabotropiques qui agissent comme modulateurs de la transmission synaptique rapide (Pin et Acher, 2002). Trois familles de récepteurs glutamatergiques ionotropiques jouent des rôles différents sur la transmission synaptique : 1) les récepteurs AMPA sont les médiateurs primaires de la transmission nerveuse en causant une entrée massive des ions sodiques ce qui dépolarise le neurone; 2) les récepteurs au kainate régulent l'activité des réseaux neuronaux en modulant le relâchement des neurotransmetteurs, en régulant l'activité de canaux potassiques et en contribuant à la transmission synaptique; 3) les récepteurs NMDA sont impliqués dans la signalisation post-synaptique dépendante du calcium grâce à leur perméabilité au calcium. Ainsi, l'activation des récepteurs à neurotransmetteurs provoquera une multitude de changements dans l'épine dendritique (ou post-synaptique) qui détermineront la réponse du neurone à l'influx nerveux.

Le récepteur NMDA possède une structure multimérique contenant un assemblage de sous-unités NR1, NR2 et NR3 encodées par différents gènes et isoformes variant au niveau de leurs propriétés physiologiques et moléculaires (Cull-Candy et al, 2001). Au niveau moléculaire, le récepteur NMDA est maintenant considéré comme un complexe protéique (Sheng et Pak, 2000; Husi et al, 2000) dont les interactions avec diverses protéines permettent de réguler l'organisation et la signalisation synaptique (Scannevin et Huganir, 2000). Parmi ces interactions, celles entre la CaMKII et les sous-unités NR1, NR2A et NR2B présentent l'intérêt de localiser la kinase à proximité d'une entrée de calcium dans la densité post-synaptique et, dans le cas de NR2B, de réguler son activation

(Colbran, 2004). *Mon projet de maîtrise s'intéresse à l'importance de ces interactions sur la localisation post-synaptique de la CaMKII.*

La plasticité synaptique

L'activation des récepteurs NMDA et l'entrée subséquente de calcium sont associées à des modifications de la force des synapses où la réponse de la synapse à une stimulation synaptique peut être augmentée (potentiation) ou diminuée (dépression) par des changements physiologiques et moléculaires qui se déroulent dans les synapses (Zucker, 1999). La plasticité synaptique peut être brève, par exemple, la potentiation à court terme (*short-term potentiation*, STP) dure d'une seconde à une minute, ou elle peut durer de plusieurs heures à plusieurs jours comme la potentiation à long terme (*long-term potentiation*, LTP). La STP joue un rôle important dans l'intégration des informations dans le bouton pré-synaptique. La LTP et la dépression à long terme (*long-term depression*, LTD) permettent de modifier les circuits neuronaux soutenant l'apprentissage et la mémoire en ajustant la force des synapses selon la force, la fréquence et les patrons temporels d'activité synaptique. Ces modifications se déroulent notamment dans l'épine post-synaptique, une structure spécialisée dans le décodage et l'intégration des signaux synaptiques.

L'entrée de calcium due à l'activation des récepteurs NMDA est également un élément déclencheur de nombreuses voies de signalisation dans l'épine post-synaptique notamment grâce aux protéines liant le calcium qui activent un grand nombre de protéines de signalisation (Franks et Sejnowski, 2002; Sabatini et al., 2001). Cette entrée de calcium par les récepteurs NMDA fait partie d'un ensemble de voies de signalisation où le calcium occupe la place centrale. La concentration de calcium dans le neurone peut également être régulée par d'autres moyens tels que les canaux voltages-dépendants, les réserves intracellulaires (via les canaux dépendant de la ryanodine et de l'inositol 1,4,5-triphosphate) et l'action des pompes calciques (Soderling et al., 2001). Les changements de concentration de calcium peuvent être localisés dans des structures subcellulaires sous la forme d'une élévation transitoire de calcium ou étendues à l'ensemble du neurone sous la forme d'une vague de calcium. Ainsi, les protéines de signalisation permettant de décoder

ces variations de concentration de calcium doivent être sensibles à la durée, l'amplitude ainsi qu'à la localisation de ces variations. L'activation des récepteurs NMDA produit une entrée de calcium localisée dans l'épine post-synaptique où se concentre également une protéine de signalisation importante pour la plasticité synaptique, la protéine calcium/calmoduline dépendante II (CaMKII). *Mon projet s'intéresse aux conséquences d'une activation des récepteurs NMDA sur la localisation de la CaMKII dans l'épine post-synaptique.*

L'épine post-synaptique

L'épine post-synaptique est une structure spécialisée pour répondre aux stimulations pré-synaptiques glutamatergiques. Elle est formée d'un compartiment partiellement isolé de la dendrite, appelé tête de l'épine, qui communique avec la dendrite en utilisant un conduit étroit appelé cou de l'épine (Nimchinsky et al., 2002; Sabatini et al., 2001). Les dimensions (volume de la tête $\sim 0.01-1\mu\text{m}^3$; diamètre du cou $\sim 0.1\mu\text{m}$) et la géométrie des épines varient grandement selon les régions du cerveau, l'état des synapses, les divers processus physiologiques tels que le développement neuronal et les diverses conditions pathologiques telles que les retards mentaux.

La modification des dimensions et de la géométrie de l'épine pourrait être un élément important de la plasticité synaptique (Lippman et Dunaevsky, 2005). Ces modifications impliquent probablement des variations au niveau de la polymérisation du cytosquelette notamment celle des filaments d'actine. Par ailleurs, les conséquences de changement de taille de l'épine pourraient être énormes sur la force de la synapse par l'augmentation du nombre de récepteurs et de la machinerie de signalisation associée à certains de ces récepteurs (par exemple, associée aux récepteurs NMDA) (Hayashi et Majewska, 2005). Le changement de la géométrie de l'épine pourrait être tout aussi importantes pour la synapse en altérant ou en facilitant la communication entre l'épine post-synaptique et la dendrite.

En effet, le cou de l'épine peut agir comme barrière pour la diffusion de molécules entre l'épine et la dendrite. Par exemple, la diffusion des ions pourrait être contrôlée lors

du passage à travers le cou de l'épine ce qui causerait une plus grande résistance ou une plus grande conductance du cou l'épine pour ces ions (couplage électrique) (Tsay et Yuste, 2004). Le calcium est un ion dont la quantité dans l'épine pourrait être régulée par la modification de la morphologie de l'épine (Hayashi et Majewska, 2005). De plus, la diffusion d'éléments de signalisation associés au calcium tel que la calmoduline ou la protéine kinase calcium/calmoduline dépendante II (CaMKII) pourrait également être régulée par la morphologie de l'épine.

La régulation de la diffusion des protéines de signalisation pourrait permettre de concentrer ces protéines dans l'épine ou encore de faciliter ou restreindre leur diffusion dans la dendrite (couplage biochimique). *Une partie de mon projet de maîtrise a consisté en la mesure de la diffusion de la CaMKII dans les épines de neurones en culture afin d'évaluer l'effet d'une barrière telle que le cou de l'épine sur la diffusion de la CaMKII.* Par ailleurs, comme nous le verrons à la section suivante, qui porte sur la CaMKII, une protéine de signalisation dont j'ai étudié la localisation post-synaptique, la diffusion de la CaMKII pourrait également être influencée par les multiples interactions qu'elle établie avec différentes protéines post-synaptiques.

La CaMKII

La CaMKII est une protéine kinase présente en grande quantité dans les neurones et dont la délétion produit des déficits de mémoire et d'apprentissage chez les souris (Elgersma et al., 2004). La CaMKII possède un très grand nombre de substrats à la synapse autant du côté pré-synaptique, où la CaMKII module la transmission pré-synaptique, que du côté post-synaptique, où la CaMKII phosphoryle un grand nombre de récepteurs et de protéines de signalisation participant à la plasticité synaptique (Hudmon et Schulman, 2002).

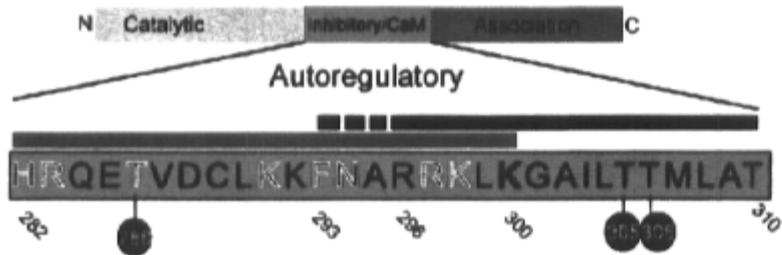
La CaMKII : sa structure et son activation

La participation de la CaMKII à la plasticité synaptique requiert un signal qui est une entrée de calcium dans l'épine post-synaptique et qui dépend de l'activation des

récepteurs NMDA (Hudmon et schulman, 2002). En effet, la CaMKII est une protéine qui est maintenue dans un état auto-inhibé lorsque la concentration de calcium est faible et qui est activée lorsque la concentration de calcium augmente. Cette auto-inhibition est causée par le repliement d'un domaine de la kinase appelé domaine auto-inhibiteur (ou domaine régulateur) sur le domaine catalytique (Figure i). Le domaine auto-inhibiteur a une structure de pseudo substrat qui ressemble à la structure des substrats de la CaMKII et qui empêche leur interaction avec la CaMKII (Figure i B). L'activation de la CaMKII a lieu lorsque les ions Ca^{2+} provoquent un changement de conformation de la calmoduline lui permettant ainsi de lier une région située sur le domaine régulateur de la CaMKII. Cette liaison de la calmoduline sur le domaine régulateur de la CaMKII change sa conformation de manière à l'éloigner du domaine catalytique tout en libérant le site de liaison des substrats.

A)

α -CaMKII



B)

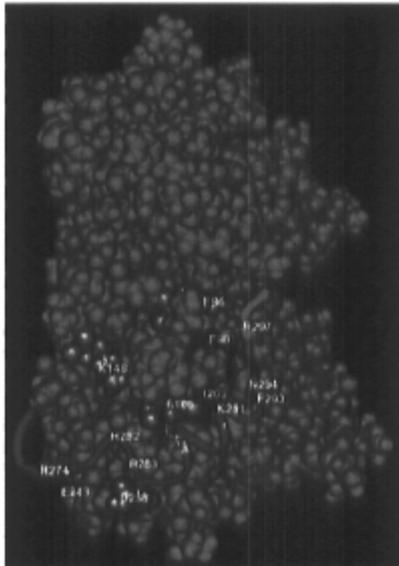


Figure i) : Modèles de la structure de la CaMKII. A) Présentation linéaire de la structure de la CaMKII où le domaine régulateur (vert) est situé entre le domaine catalytique (jaune) et le domaine d'association (rouge). Dans le domaine régulateur, les acides aminés participant aux interactions pseudo-substrats sont identifiés par la barre rouge alors que ceux participant à la liaison de la calmoduline liée au calcium ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) sont identifiés par la barre noire. B) Structure moléculaire d'un domaine catalytique (bleu) inhibé par le domaine régulateur (ruban rouge). Tiré de Hudmon et Schulman (2002)

La CaMKII : ses auto-phosphorylations

Une particularité importante de la CaMKII réside dans sa structure multimérique où 12 sous-unités sont assemblées grâce à leur domaine d'association pour former une structure en disque avec les domaines catalytiques situés en périphérie (Rosenberg et al., 2005). Cette structure confère plusieurs avantages à la CaMKII dont celui de pouvoir s'auto-phosphoryler, c'est-à-dire qu'une sous-unité peut phosphoryler une sous-unité voisine lorsque les deux sous-unités sont activées simultanément. La thréonine 286 est située à la base du domaine régulateur et son auto-phosphorylation produit trois effets importants sur la kinase (Hudmon et Schulman, 2002). 1) L'auto-phosphorylation de T286 empêche l'inhibition par le domaine régulateur et rend l'enzyme autonome, donc constitutivement active même lorsque la concentration de Ca^{2+} diminue et que Ca^{2+}/CaM se dissocie de l'enzyme. Cette auto-phosphorylation augmente de 1000 fois l'affinité de la CaMKII pour Ca^{2+}/CaM . 2) De plus, l'auto-phosphorylation de la T286 expose un site d'interaction de la CaMKII avec différentes protéines synaptiques dont le récepteur NMDA. 3) Les thréonines 305 et 306 sont également situées sur le domaine régulateur de la CaMKII et peuvent être auto-phosphorylées. Par contre, ces auto-phosphorylations sont inhibitrices puisqu'elles empêchent la liaison de Ca^{2+}/CaM (Hudmon et Schulman, 2002).

La CaMKII : ses interactions protéiques

La structure multimérique de la CaMKII permet également à la CaMKII de former des interactions multiples avec diverses protéines ou encore de former des interactions avec certaines sous-unités alors que d'autres sous-unités sont disponibles pour phosphoryler leurs substrats (Colbran, 2004). Ainsi, la CaMKII peut s'ancrer dans la densité post-synaptique et participer à l'ancrage d'autres protéines à la synapse. De plus, ces interactions peuvent confiner la CaMKII à proximité de ses substrats, ce qui permet d'assurer une efficacité et spécificité de phosphorylation. *Mon projet de maîtrise porte sur deux types d'interaction de la CaMKII qui pourraient jouer un rôle important à la synapse : l'interaction de la CaMKII avec le récepteur NMDA et l'auto-association de la CaMKII.* Ces types d'interaction pourraient participer au remodelage synaptique impliquant la CaMKII et aux changements dynamiques de localisation de la CaMKII.

La CaMKII : ses interactions avec le récepteur NMDA

Les interactions de la CaMKII avec le récepteur NMDA sont bien documentées grâce à des mesures biochimique par immunoprécipitation et *pull-down* et grâce à des observations cellulaires de colocalisation de la CaMKII avec les différentes sous-unités du récepteur NMDA dans des cellules non-neuronales. Ces interactions nécessitent l'activation de la CaMKII par $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ et certaines nécessitent également l'auto-phosphorylation de T286 (Colbran, 2004). De plus, l'interaction de la CaMKII avec NR2B peut conférer à la kinase une activité autonome indépendante du Ca^{2+} semblable à l'auto-phosphorylation de la T286 mais dont le retour à l'état non activé dépend de la dissociation de l'interaction plutôt que de la déphosphorylation par des phosphatases (Bayer et al., 2001; Bayer et al., 2006). Ainsi, les interactions de la CaMKII avec le récepteur NMDA pourraient contribuer à assurer sa localisation post-synaptique ou à maintenir son activation. *Afin de comparer ces interactions à un autre type d'interaction impliquant des holoenzymes de CaMKII et au phénomène de translocalisation de la CaMKII, j'ai examiné les interactions de différents mutants de la CaMKII avec la sous-unité NR2B du récepteur NMDA dans des cellules non-neuronales.*

La CaMKII : son auto-association

Un autre type d'interaction de la CaMKII consiste en l'interaction de plusieurs holoenzymes pour former des agrégats de CaMKII, un phénomène appelé auto-association. L'auto-association est observée *in vitro* dans des conditions mimant l'ischémie où le pH est acide, la concentration d'ATP basse et la concentration de Ca^{2+} élevée (Hudmon et al., 2001). *Pour contribuer à l'élaboration d'un modèle pour l'auto-association de la CaMKII et pour évaluer la contribution respective de i) l'auto-association de la CaMKII et ii) des interactions de la CaMKII avec NR2B sur la translocalisation synaptique, j'ai identifié des mutants de la CaMKII incapable de s'auto-associer dans des cellules non-neuronales.*

La CaMKII : sa localisation synaptique et ses changements de localisation

Une propriété importante de la CaMKII réside dans la propriété de la kinase de se translocaliser dans les neurones, c'est-à-dire de passer d'une localisation dendritique à une localisation concentrée près des synapses, suite à une stimulation électrique ou à

l'activation des récepteurs NMDA (Shen et Meyer, 1999). Cette accumulation de CaMKII semble se dérouler dans les épines post-synaptiques puisque certains agrégats de fluorescence de CaMKII colocalisent avec différents marquages de protéines synaptiques mais elle pourrait également avoir une composante extra-synaptique puisque certains agrégats se forment dans le soma et ne colocalisent pas avec les protéines synaptiques (Hudmon et al., 2005). Ce changement de localisation de la CaMKII dépend d'une entrée de calcium dans le neurone et de la liaison du complexe Ca^{2+}/CaM sur la CaMKII puisque des mutants empêchant l'activation de la CaMKII par le complexe calcium/calmoduline (comme les mutants A302R et T305/306D) inhibent la translocalisation de la CaMKII (Shen et Meyer, 1999; Hudmon et al, 2005). De plus, plusieurs mécanismes moléculaires sont susceptibles de contribuer aux changements de localisation de la CaMKII et la plupart de ces mécanismes impliquent l'ancrage de la CaMKII par différentes protéines (récepteur NMDA, auto-association de CaMKII, α -actinine, densin-180, syngap, etc.) (Colbran, 2004).

La CaMKII : les enjeux de la régulation de sa localisation

Notre interprétation du fonctionnement de la CaMKII suggère que cette enzyme participe au remodelage de la synapse suite à une activation dépendante du calcium. Or, plusieurs autres enzymes peuvent être activées par le calcium. Par conséquent, différents mécanismes doivent exister pour activer spécifiquement la CaMKII afin qu'elle phosphoryle les protéines nécessaires pour assurer le bon fonctionnement de la synapse. Un de ces mécanismes pourrait être de localiser la kinase à proximité des entrées de calcium ainsi qu'à proximité de ses substrats. *Afin de détailler les mécanismes moléculaires des différents changements de localisation de la CaMKII, j'ai étudié la mobilité de la CaMKII et de certains mutants dans différents compartiments des neurones (épines et dendrites) sous différentes conditions d'activation du neurone. Pour y parvenir, j'ai utilisé la technique de fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) qui consiste à mesurer le recouvrement de fluorescence de protéines fluorescentes (dans ce cas-ci attachée à la CaMKII) dans une région d'intérêt où les protéines fluorescentes ont été photoblanchies.*

Matériel et méthode

Constructions de CaMKII-GFP et de NR2B

La CaMKII a été étiquetée avec une GFP contenant une mutation (A207K) empêchant la dimérisation de la GFP. De plus, différents mutants de la CaMKII sauvage (WT) ont été utilisés afin de comprendre l'effet de la structure de la CaMKII sur ses dynamiques spatiales et temporelles. Ainsi, le mutant 1-326 contient seulement le domaine catalytique de la CaMKII étiquetée avec une GFP (A207K). Le mutant T305/306D de la CaMKII a également été utilisé en fonction de son incapacité à lier et à être activé par la calmoduline. D'autres mutants de la CaMKII ont été utilisés pour mesurer l'auto-association de la CaMKII ou son interaction avec NR2B : T286A, T286D, I205K, A302R, T305/306A, T286/287D, 286D-305/306A et 315-478 (domaine d'association seulement). La description détaillée de ces mutants a été publiée (Yang et Schulman, 1998). De plus, pour tester l'interaction avec NR2B, la sous-unité NR2B a été transfectée avec la GFP-CaMKII (Bayer et al., 2001).

Culture, transfection, stimulation et fixation des cellules HEK

Les cellules HEK ont été cultivées et transfectées tel que décrit dans une publication précédente (Bayer et al., 2001). Le lendemain de la transfection les cellules ont été mises en culture sur des lamelles d'aclar. Le surlendemain de la transfection les cellules ont été lavées dans du PBS (20mM) sans Ca^{2+} pendant 1 minute, soumises au protocole de stimulation puis immédiatement fixées. La stimulation pour l'auto-association utilise une solution extracellulaire (20 mM HEPES, 140 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 5 mM NaCl, 1 mg/ml glucose, pH 6.5 ou 7.5). Le protocole d'auto-association consiste à faire une première stimulation visant à tamponer le pH à 7.5 avec la nigericine 10ug/ml (1 :1000 d'un stock dans le méthanol) pendant 3 minutes, à faire une seconde stimulation visant à faire entrer le calcium avec de l'ionomycine 10uM (1 :1000 d'un stock dans le méthanol) à pH 7.5 en présence de nigericine pendant 3 minutes et à faire une troisième stimulation visant à abaisser le pH à 6.5 (avec nigericine et ionomycine) pendant 3 minutes. Les stimulations contrôles utilisent le même protocole de stimulation mais avec des solutions où le Ca^{2+} a été omis. Le protocole de stimulation pour l'interaction à NR2B utilise une solution de

HBSS (plus 25 mM HEPES, pH 7.4, avec 2 mM CaCl_2) contenant de l'ionomycine 10 μM pendant 5 minutes avec un contrôle sans Ca^{2+} .

Immunocytochimie

La localisation de NR2B a été révélée par immunocytochimie sur des cellules HEK transfectées, fixées avec de la paraformaldéhyde (PFA), lavées quatre fois dans du PBS, incubées dans une solution de blocage pendant 30 minutes (3% goat serum et triton 0.05%), incubées avec anti-NR2B (1 :500 dans solution blocage) (Zymed) pendant 2h, lavées trois fois dans du PBS, incubées avec un anti-corps secondaire couplé à un alexa 546 (GaR546) et lavées trois fois avant d'être montées sur lame.

Microscopie confocale

Des images des cellules HEK ont été obtenues avec un microscope confocal Zeiss (Thornwood, NY) LSM510 META-Axioskop FS2 Plus équipé d'un objectif 63x d'immersion à l'huile (1.4 NA). Pour mesurer l'auto-association, des images 12-bits (1024x1024 pixels de 0.1 μm x 0.1 μm) ont été acquises de façon aléatoire avec comme seul critère d'avoir au moins 4 cellules fluorescentes dans le champ de vision. La GFP a été excitée avec un laser Argon (488nm) et détectée à travers un filtre *long-pass* (LP505) avec une ouverture de diaphragme de manière à donner une tranche optique de 0.5 μm sélectionnée au milieu des cellules.

Analyse des images

Les images ont été analysées avec le programme Metamorph dans lequel la plupart des procédures ont été automatisées. D'abord les cellules ont été isolées en images séparées, puis la fluorescence de chaque cellule a été séparée avec un seuil correspondant à trois fois la moyenne de la fluorescence totale. Cette fluorescence séparée a ensuite été utilisée pour la détection d'agrégats de fluorescence en utilisant un filtre morphométrique où un agrégat correspond à un groupe contigu de pixels correspondant à une aire de 0.1 à 1 μm^2 et dont le facteur forme ($4\pi A/P^2$; A, aire; P, périmètre) >0.5 . Le facteur d'agglomération correspond à la fluorescence totale contenue dans les agrégats identifiés divisée par la fluorescence totale de la cellule.

Cultures, transfections et imagerie de neurones

Les expériences de FRAP ont été effectuées sur des neurones d'hippocampes de rat cultivés pendant deux semaines (12-16 jours) sur des lamelles d'Aclar (Bayer et al, 2001; Hudmon et al., 2005). La veille de l'expérience, les neurones ont été transfectés en matinée avec l'ADN de GFP-CaMKII (0.5ug) sauvage ou muté et de la lipofectamine 2000 (2ul). Par la suite (5h après), le milieu de transfection a été remplacé par du milieu neuf contenant ou non de l'AP-5 (100 μ M). Pour l'expérience de FRAP, une lamelle a été placée dans un bain perfusé avec une solution de blocage (HBSS, plus 10 mM HEPES, pH 7.4, 0.6 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂). Les expériences avant stimulation ont été effectuées dans cette solution alors que les expériences après stimulation ont été effectuées après un lavage (solution de blocage) de 5, 10, 15, 20 ou 25 minutes suivant une stimulation de 2 minutes avec glutamate (100 μ M) et glycine (10 μ M) dans une solution régulière (HBSS, plus 10 mM HEPES, pH 7.4, 1.2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂).

Les expériences de FRAP ont été réalisées sur le LSM510 META (objectif 63x à l'eau), selon la procédure suivante : D'abord, un neurone possédant une fluorescence principalement diffuse avec plusieurs épines visibles est sélectionné et imagé. Ensuite, un segment de dendrite est sélectionné et des régions d'intérêt (circulaire, 10 pixels de diamètre) sont tracées sur 2 à 4 épines ou sur deux régions éloignées d'une dendrite. Une expérience de FRAP est réalisée en prenant 3 images du dendrite sélectionné (pré-photoblanchiment) à faible intensité où la GFP est excitée avec une ligne de laser Argon 488nm (0.25% transmission) et détectée à travers un filtre bande passante (500-550nm) ; pour chaque image, deux acquisitions sont moyennées et la résolution est réglée pour donner une grosseur de pixel de 0.15um x 0.15um. Immédiatement après la troisième image, les régions d'intérêts sont photoblanchies en les balayant 50 fois à la transmission maximale du laser pour une durée totale de photoblanchiment d'une à trois secondes. Suite au photoblanchiment, le recouvrement de fluorescence a été mesuré pendant 200 secondes (60 image/minute) ou pendant 500 secondes (12 image/minute) et l'intensité moyenne pour chaque région a été mesurée pour chaque image.

Analyse du FRAP

Les intensités mesurées pour chaque région ont été normalisées avec la fonction $F(t) = F_t - F_{\text{post}} / F_{\text{pre}} - F_{\text{post}}$ où F_{pre} est la fluorescence moyenne de la région sur les trois images avant le photoblanchiment et F_{post} est la fluorescence de la région immédiatement après le photoblanchiment. Cette normalisation permet d'obtenir une forme fractionnelle de la courbe de recouvrement de la fluorescence, ce qui permet de rendre le recouvrement de fluorescence indépendant de la fluorescence initiale ou de la quantité de photoblanchiment induite (Soumpasis, 1983). La moyenne, la déviation standard et l'erreur standard ont été calculées pour chaque point en considérant toutes les expériences de FRAP d'une même condition. Les valeurs moyennes d'intensité normalisée de chaque point en fonction du temps ont été tracées avec l'erreur standard comme barre d'erreur et les données ont été modélisées par régression avec différentes fonctions exponentielles (voir section résultats) avec Igor Pro. Les régressions consistent à trouver les meilleures valeurs pour chaque coefficient des fonctions exponentielles utilisées afin de minimiser les valeurs de χ^2 où est défini comme

$$\chi^2 = \sum [(y - y_i) / \sigma_i]^2$$

où y est une valeur de régression obtenue pour un point donné, y_i est la valeur mesurée de ce point et σ_i est l'estimé de la déviation standard pour y_i .

Résultats

La CaMKII translocalise dans le neurone suite à l'activation des récepteurs NMDA

Il a été démontré que suite à une activation des récepteurs NMDA, la GFP-CaMKII se concentre à différents endroits dans les dendrites et le corps cellulaire de neurones en culture dissociée ou en tranche de tissu maintenue *in vitro* (Shen et meyer, 1998; Hudmon et al, 2005; Bayer et al, 2006; Otmakhov et al, 2004). La figure 1, tirée de notre article (Hudmon et al., 2005), montre la translocalisation de GFP-CaMKII dans des neurones en culture. Ainsi, les neurones sont d'abord placés dans une solution de blocage (5mM Mg^{2+} , 0.6mM Ca^{2+}) où la fluorescence est principalement diffuse dans le neurone avec une légère concentration dans les épines post-synaptiques (Figure 1A). Cette accumulation de la fluorescence dans les synapses est due à l'activité intrinsèque des neurones et de leurs récepteurs NMDA en culture (Bayer et al, 2006). Il est possible de diminuer cette pré-translocalisation par une incubation des neurones avec un antagoniste des récepteurs NMDA (AP5). Pour causer la translocalisation de la CaMKII, les neurones sont stimulés avec une solution régulière (1mM Mg^{2+} , 1.2mM Ca^{2+}) contenant du glutamate ($100\mu\text{M}$) et de la glycine ($10\mu\text{M}$) pendant deux minutes. Suite à la stimulation, on peut observer un enrichissement de la fluorescence GFP-CaMKII dans les synapses (Figure 1B). Si la stimulation est plus longue (2-5 min), on peut aussi observer une translocalisation extra-synaptique de la GFP-CaMKII où des agrégats de fluorescence se produisent également dans le corps cellulaire des neurones. Afin de déterminer quelles interactions moléculaires peuvent contribuer à la translocalisation de la CaMKII dans les neurones, nous avons testé deux hypothèses : 1) la sous-unité NR2B du récepteur NMDA permet de concentrer la GFP-CaMKII dans des compartiments subcellulaires où cette sous-unité est présente et 2) l'interaction de plusieurs CaMKII ensemble permet de concentrer la CaMKII dans des agrégats dans la cellule incluant la synapse. Ces deux types d'interaction ne sont sans doute pas les seuls pouvant contribuer à la translocalisation de la CaMKII dans les neurones et d'autres protéines pourraient être impliquées dans ce phénomène.

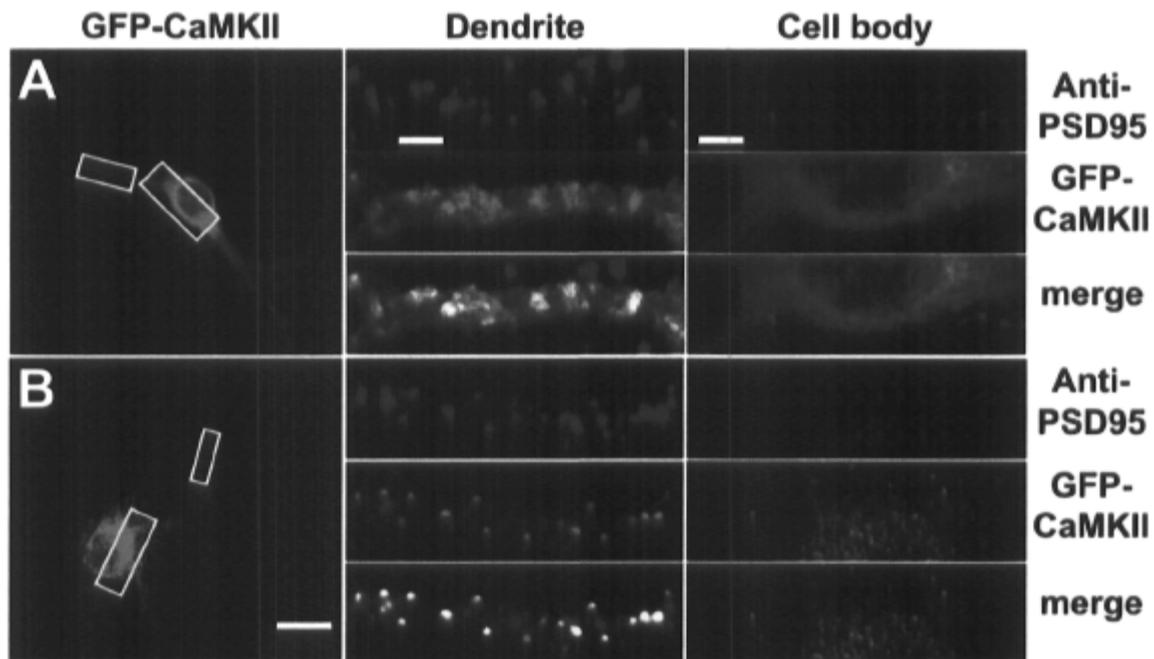


Figure 1 : Translocalisation synaptique et extra-synaptique de la CaMKII dépendante de l'activité synaptique. Des neurones en culture ont été transfectés avec de la GFP-CaMKII et stimulés avec du glutamate/glycine (100uM/10uM) pendant 5 minutes 24h après la transfection. Par la suite, les neurones ont été fixés et la localisation de la protéine PSD95 a été révélée par immunocytochimie. A) En absence de stimulation, la fluorescence de la GFP-CaMKII est principalement diffuse dans les dendrites et dans le corps cellulaire. B) Suite à la stimulation, la fluorescence de la GFP-CaMKII dans les dendrites se concentre dans les synapses marquées par l'anti-PSD95. De plus, la fluorescence de la GFP-CaMKII forme des agrégats de fluorescence non-synaptiques dans le corps cellulaire. Échelle: gauche 25 μm , centre 3 μm , droite 5 μm . Cette figure a été publiée dans Hudmon et al, 2005.

L'interaction de la CaMKII avec le récepteur NMDA (via NR2B) dépend d'une élévation de la concentration de calcium

Nous avons utilisé les cellules HEK (*human embryonic kidney cells*) pour étudier les propriétés d'interaction de la CaMKII et de NR2B puisque ces cellules sont dépourvues des composants cellulaires strictement neuronaux. Pour étudier l'interaction de la CaMKII avec NR2B, nous avons tirés profit de la localisation subcellulaire périnucléaire de NR2B afin de visualiser l'interaction par un changement de la localisation de la fluorescence de la CaMKII. Notre hypothèse, qui se base sur des travaux déjà publiés (Bayer et al., 2001),

postule que l'interaction de la CaMKII avec NR2B dépend, tout comme la translocalisation de la CaMKII à la synapse, d'une entrée de calcium dans la cellule. Ainsi, les cellules HEK co-transfectées avec GFP-CaMKII et NR2B ont été stimulées par un ionophore, l'ionomycine qui crée des pores perméables au Ca^{2+} dans la paroi cellulaire, en présence ou en absence de calcium, pendant 5 minutes. Immédiatement après la stimulation, les cellules ont été fixées et la localisation de NR2B a été révélée par immunocytochimie.

Lorsque les cellules sont stimulées avec Ca^{2+} , la fluorescence de la GFP-CaMKII adopte une localisation majoritairement périnucléaire qui colocalise avec NR2B (Figure 2). Ainsi, l'interaction de la CaMKII avec NR2B dépend d'une activation due au Ca^{2+} puisque que la GFP-CaMKII se distribue diffusément dans le cytoplasme après la stimulation contrôlée sans Ca^{2+} . Le mutant T286A est incapable de se s'auto-phosphoryler à T286 et d'être autonome par rapport au Ca^{2+} . Ce mutant colocalise avec NR2B suite à une stimulation avec Ca^{2+} ce qui montre que l'auto-phosphorylation de la T286 de la CaMKII n'est pas nécessaire pour l'interaction de la CaMKII avec NR2B. Le mutant T286D mime une autophosphorylation irréversible de la T286 de la CaMKII. Ce mutant colocalise aussi avec NR2B suite à une stimulation avec Ca^{2+} ce qui montre que l'auto-phosphorylation de la T286 de la CaMKII n'empêche pas l'interaction de la CaMKII avec NR2B. Le mutant I205K possède une mutation située dans le site de liaison du substrat où la charge de la lysine empêche des interactions hydrophobes de la CaMKII avec ses substrats. Ce mutant ne change pas sa localisation et il n'y a aucun enrichissement de fluorescence colocalisant avec NR2B après la stimulation avec Ca^{2+} ce qui suggère que la CaMKII I205K n'interagit pas avec NR2B.

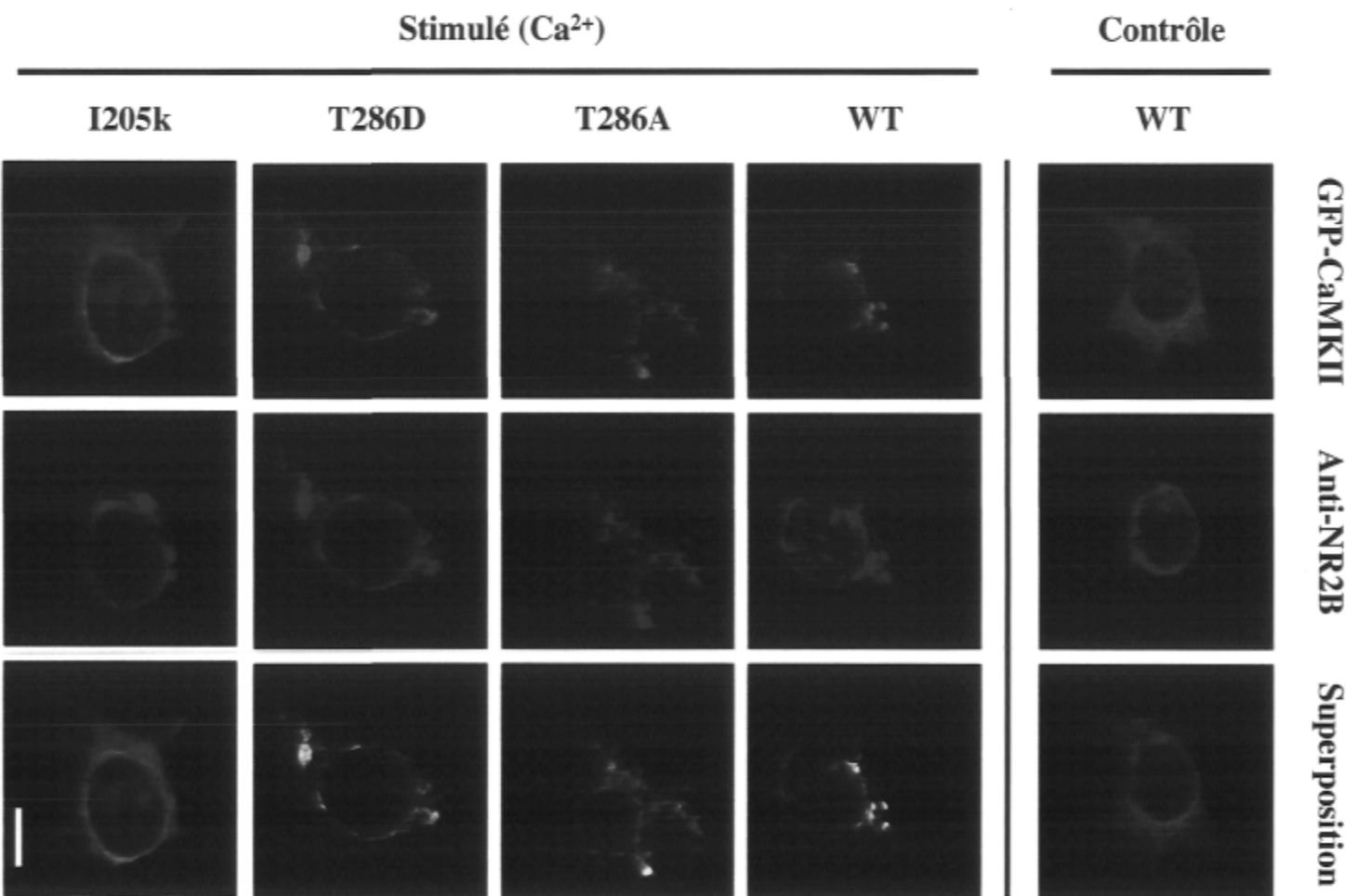
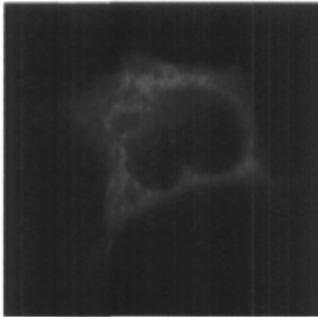


Figure 2: Interaction de la CaMKII avec NR2B dans des cellules HEK. Des cellules HEK ont été transfectées avec de la GFP-CaMKII sauvage (WT) ou mutante et NR2B. Le lendemain de la transfection, les cellules ont été stimulées avec de l'ionomycine (10 μ M) en présence ou en absence de Ca²⁺ (2mM) pendant 5 minutes et fixées. Les GFP-CaMKII WT, T286A et T286D colocalisent avec NR2B suite à la stimulation alors que la CaMKII I205K ne colocalise pas dans cette condition. Le contrôle CaMKII WT stimulé en absence de Ca²⁺ ne colocalise pas avec NR2B suite à la stimulation. Échelle 10 μ m.

L'auto-association de la CaMKII dépend d'une élévation de la concentration de calcium et d'une baisse de pH

L'auto-association d'holoenzymes de CaMKII est un phénomène qui a été observé *in vitro* en présence de Ca²⁺ et à pH acide. Ces conditions sont celles qui produisent la translocalisation de la CaMKII dans les neurones, notamment pour le Ca²⁺ mais possiblement aussi pour le pH (Irwin et al., 1994). Ces conditions ont été reproduites dans des cellules non-neurales transfectées avec la GFP-CaMKII en utilisant l'ionomycine pour faire entrer le calcium dans les cellules et la nigericine pour permettre l'échange de protons à travers la membrane plasmique. Cependant, puisque l'ionomycine est moins efficace à pH acide, nous avons stimulé en trois étapes de 3 minutes chacune : d'abord une stimulation avec nigericine à pH 7.5 pour équilibrer le pH, ensuite une stimulation avec ionomycine et nigericine à pH 7.5 (avec Ca²⁺) visant à faire entrer le calcium dans la cellule et finalement une stimulation avec avec ionomycine et nigericine à pH 6.5 (avec Ca²⁺) afin de réduire le pH intracellulaire. Cette stimulation cause la formation d'agrégats de fluorescence dans le cytoplasme de la cellule (Figure 3). Ce motif de fluorescence fait contraste avec la fluorescence cytoplasmique diffuse observée dans les cellules en absence de Ca²⁺ à pH 6.5 (Fig 3), ou en présence de Ca²⁺ à pH 7.5 (voir Figure 4). Ce patron de fluorescence est aussi très différent de celui observé en présence de Ca²⁺ et du récepteur NR2B (Fig 2). Donc, le l'augmentation de Ca²⁺ seule ou la baisse de pH seule ne sont pas suffisants pour produire l'agglomération de la GFP-CaMKII dans les cellules HEK. Ces conditions correspondent au mécanisme connu d'auto-association de la CaMKII *in vitro* (Hudmon et al, 2001).

**Sans Ca²⁺,
pH 6.5**



**Avec Ca²⁺,
pH 6.5**

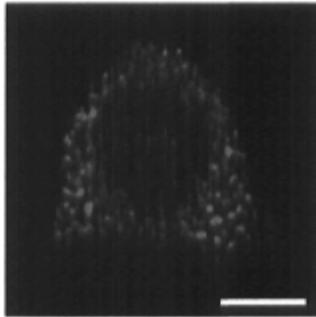


Figure 3: Auto-association de la CaMKII dans des cellules HEK. Des cellules HEK ont été transfectées avec de la GFP-CaMKII sauvage. Le lendemain de la transfection, les cellules ont été stimulées en trois étapes de 5 minutes avec de la nigericine (10ug/ml) et de l'ionomycine (10uM) en présence ou en absence de Ca²⁺ (2mM), à pH 6.5 ou à pH 7.5 et fixées. Échelle 10 µm.

L'auto-association de la CaMKII dépend de la structure multimérique de la CaMKII, de l'activation par le Ca²⁺/CaM et d'interactions du domaine catalytique, mais est inhibée par l'auto-phosphorylation de la T286

Pour identifier les éléments de structure de la CaMKII qui mène à son auto-association, j'ai testé une batterie de mutations dans l'enzyme qui sont ciblées dans le domaine catalytique et auto-inhibiteur, ainsi que dans le domaine permettant la multimérisation de l'enzyme. Pour ce faire, j'ai mis au point une méthode de quantification du phénomène dans les cellules HEK, basée sur la différence de contraste entre les agrégats fluorescents et la fluorescence moyenne de la cellule. Ainsi, pour chaque cellule choisie au hasard, les agrégats fluorescents ont été définis comme ayant i) une fluorescence au moins trois fois supérieure au reste de la cellule, ii) une aire de 0.1 à 1 µm² et iii) une forme obéissant à un critère de circularité (voir matériel et méthode) (Figure 4A, publiée dans Hudmon et al., 2005). Le facteur d'auto-association qui résulte de la quantification correspond à la fluorescence totale dans les agrégats divisée par la fluorescence totale de la cellule. Les résultats ont été compilés pour 20 cellules choisies au hasard pour chaque traitement ou pour chaque mutant (Figure 4B). Ainsi, une stimulation avec Ca²⁺ et à pH 6.5 produit un facteur d'auto-association beaucoup plus élevé qu'en absence de Ca²⁺ (p<0.001) ou qu'en présence de Ca²⁺ mais à pH 7.5.

Les éléments de structure de la CaMKII nécessaires à son auto-association ont été identifiés en utilisant deux mutants de la CaMKII composés chacun d'un domaine fonctionnel différent de la kinase. Ainsi, un mutant composé seulement du domaine catalytique de la CaMKII 1-315 ne s'auto-associe pas, alors qu'un mutant composé seulement du domaine d'oligomérisation de la CaMKII 315-478 ne s'auto-associe pas non plus (Figure 4B). Ces résultats démontrent que la structure oligomérique complète de la CaMKII est nécessaire à son auto-association. Ceci suggère que la structure multimérique de la CaMKII permet à plusieurs sous-unités d'un multimère d'interagir avec différents multimères pour que ces derniers s'auto-assoient.

Nous avons testé si l'activation de la CaMKII par le $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ est nécessaire à l'auto-association de l'enzyme. La mutation A302R, qui empêche l'activation de la CaMKII par $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ en raison d'une charge positive sur un acide aminé normalement neutre (Mukherji et Soderling, 1994; Elgersma et al., 2002), inhibe l'auto-association (Figure 4B).

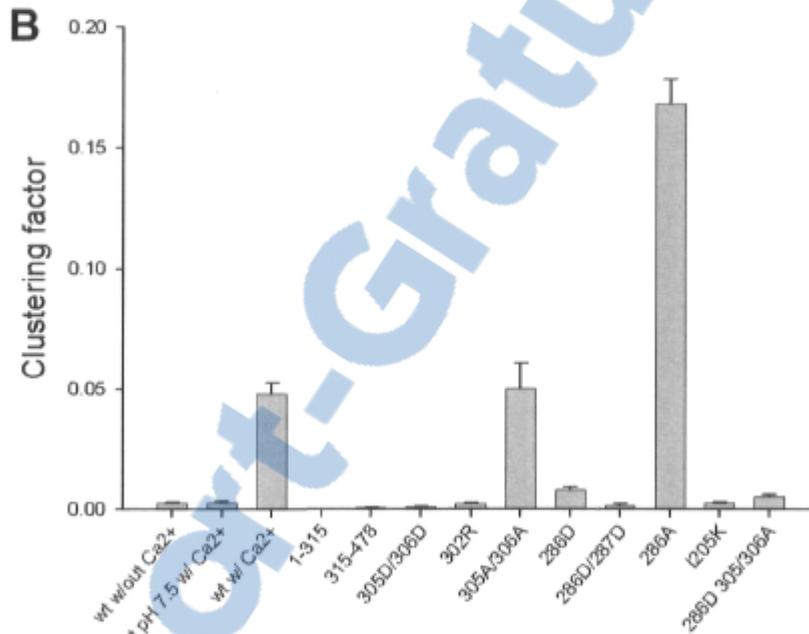
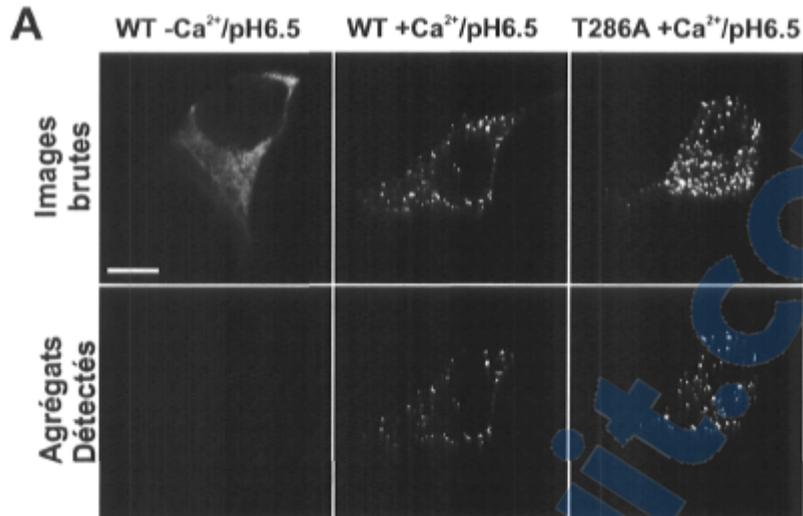


Figure 4: Quantification de l'auto-association de la CaMKII sauvage et de certains mutants de la CaMKII. A) Images brutes de cellules transfectées avec la GFP-CaMKII sauvage ou mutante et image traitées présentant les agrégats d'auto-association détectés. B) Histogramme de la quantification de l'auto-association par le facteur d'agrégation pour différents mutants de la CaMKII. Échelle 10 μ m. Cette figure a été publiée dans Hudmon et al, 2005.

La mutation T305/306D place une charge négative mimant une phosphorylation sur ces thréonines, qui elle même inhibe l'activation par $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, empêchent également l'auto-association de la CaMKII. Par contre, le mutant incapable de s'auto-phosphoryler sur les thréonines 305 et 306 (T305/306A) (Hanson et Schulman, 1992), donc toujours capable de lier $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, s'auto-associe à un niveau semblable à celui de la CaMKII sauvage. Ces résultats démontrent l'importance de l'activation de la CaMKII par $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ dans le processus de l'auto-association.

Nous avons ensuite vérifié si l'auto-association implique un type d'interaction semblable à celui de la CaMKII avec NR2B où le domaine catalytique établit des liens hydrophobes via l'acide aminé I205 (Bayer et al., 2001). En effet, le mutant I205K, qui perturbe cette interaction hydrophobe, ne s'auto-associe pas ce qui montre l'importance de I205 dans l'auto-association (Figure 4B).

L'auto-phosphorylation de T286 confère à la CaMKII une activité autonome quant à la liaison par $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Des mutations mimant cette auto-phosphorylation (T286D et T286/287D) inhibent l'auto-association tandis que des mutations empêchant cette auto-phosphorylation (T286A) la favorise. Étant donné que le mutant T286D est autonome, nous avons pensé que cette forme pourrait, de manière constitutive, être auto-phosphorylée sur les sites T305 et T306, ce qui bloquerait l'auto-association. Nous avons donc fait une mutation triple : T286D T305/306A. Cette mutation, qui mime l'auto-phosphorylation de T286 tout en empêchant celle des T305/306, ne s'auto-associe pas (Figure 4B). Ceci démontre que l'auto-phosphorylation de T286 inhibe l'auto-association et que cette inhibition ne dépend pas d'une auto-phosphorylation subséquente des T305/306.

Selon ces résultats, l'auto-association ressemble à l'interaction de la CaMKII avec NR2B puisqu'elle nécessite l'activation de la CaMKII par $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. De plus, ces deux types d'interaction impliquent l'isoleucine I205 qui établit possiblement des interactions

hydrophobes avec NR2B ou une autre CaMKII. Par contre, l'auto-association diffère de l'interaction de la CaMKII avec NR2B puisque les mutations mimant l'auto-phosphorylation de la T286 conservent la faculté d'interagir avec NR2B.

L'auto-phosphorylation de la thréonine 286 de la CaMKII diminue son auto-association mais des CaMKII auto-phosphorylées sont présentes dans les agrégats de CaMKII auto-associées.

La CaMKII sauvage a la capacité de s'auto-phosphoryler à la thréonine 286, ce qui confère une activité autonome à la kinase en maintenant séparé le segment auto-inhibiteur du domaine catalytique. Par ailleurs, l'auto-association de la CaMKII pourrait consister en l'interaction du segment auto-inhibiteur d'une CaMKII avec le domaine catalytique d'une autre CaMKII. Dans cette condition, l'auto-phosphorylation de T286 sur le segment inhibiteur pourrait perturber l'auto-association. Ainsi, tel qu'il a été vu dans la section précédente, les mutants T286D et T286/287D possèdent une ou des charges négatives qui imitent l'auto-phosphorylation de la T286 et ces mutants ne s'auto-associent pas (Figure 4B). Par ailleurs, le mutant T286A qui empêche l'auto-phosphorylation de T286 est un mutant qui s'auto-associe très fortement (T286A). Ces résultats démontrent l'importance de la T286 dans la formation des interactions d'auto-association et suggèrent que l'auto-phosphorylation de la T286 pourrait être un mécanisme régulant l'auto-association de la CaMKII.

Afin d'examiner si des sous-unités phosphorylées à T286 sont malgré tout présentes dans des agrégats de CaMKII auto-associées, nous avons mesuré le niveau de phosphorylation des agrégats par immunocytochimie avec un anticorps spécifique à la T286 phosphorylée (Figure 5, publiée dans Hudmon et al., 2005). La Figure 5 montre qu'il y a bel et bien présence de CaMKII auto-phosphorylée à la T286 dans les agrégats de CaMKII auto-associées. Ce résultat suggère que des sous-unités des CaMKII auto-associées ne participant pas à l'auto-association peuvent être auto-phosphorylées à la T286. En comparaison, les cellules stimulées sans Ca^{2+} ne présentent pas de CaMKII auto-phosphorylées à T286 tout comme les cellules transfectées avec la CaMKII incapable de

s'auto-phosphoryler à T286 (T286A) (montrant par la fait même la haute spécificité de l'anticorps).

Nos résultats obtenus à partir de transfection de GFP-CaMKII dans les cellules HEK confirment que la CaMKII interagit avec NR2B et avec elle-même dans certaines conditions. Dans notre article (Hudmon et al, 2005), mon collègue Eric LeBel a montré que les mutants incapables de s'auto-associer (Figure 4) sont moins recrutés à la synapse. De plus, une autre étude du laboratoire (Bayer et al, 2006) a montré que l'interaction CaMKII-NR2B est aussi critique pour le recrutement de la CaMKII à la synapse.

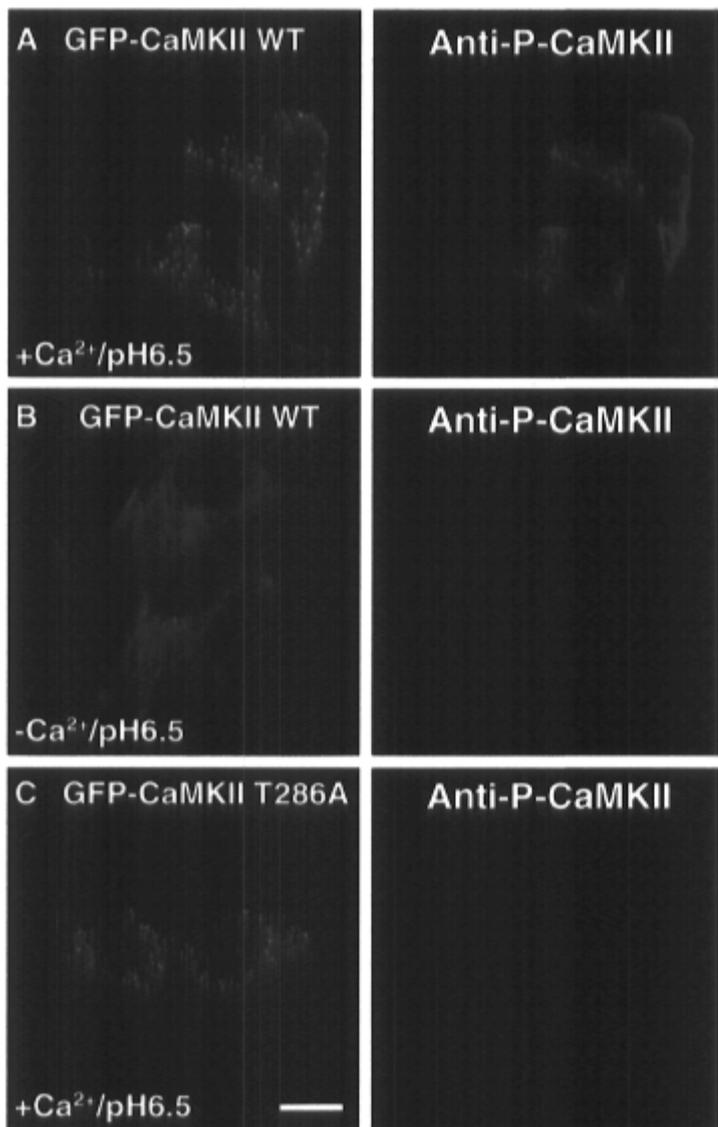


Figure 5: Autophosphorylation dans les agrégats de CaMKII. Les cellules ont été transfectées avec de la GFP-CAMKII sauvage ou T286A, stimulées pour causer l'auto-association avec ou sans Ca²⁺ et fixées. Par la suite, les CaMKII auto-phosphorylées à la T286 ont été identifiées par immunocytochimie avec un anti-corps spécifique à la T286 auto-phosphorylée. Échelle 10 µm. Cette figure a été publiée dans Hudmon et al, 2005.

Pour la suite de mon projet, j'ai posé l'hypothèse que ces deux types d'interaction pourraient modifier la mobilité de la CaMKII dans les synapses des neurones suite à l'activation des récepteurs NMDA. Nous avons vérifié si c'est le cas en mesurant la mobilité de la CaMKII dans les synapses avant et après une activation des récepteurs NMDA à l'aide de la technique de *fluorescence recovery after photobleaching* FRAP.

Le FRAP permet de mesurer la mobilité de protéines dans les épines de neurones en culture

Le FRAP est une technique qui permet de mesurer la mobilité de protéines dans des cellules vivantes. Nous avons utilisé cette technique afin de mesurer l'impact des interactions de la CaMKII à NR2B et de l'auto-association de la CaMKII sur la mobilité de la kinase dans les neurones, notamment dans les synapses. Ainsi, cette mobilité a été mesurée en photoblanchissant, à l'aide d'un faisceau laser à haute puissance (voir matériel et méthode), les protéines fluorescentes présentes dans une ou plusieurs régions choisies et en mesurant par imagerie le recouvrement de la fluorescence provenant d'un remplacement de ces protéines photoblanchies par des protéines non-photoblanchies présentes dans le reste du neurone (Figure 6). Cette technique nous permet de mesurer simultanément trois paramètres, soit la forme du recouvrement, la constante de temps et la fraction qui est mobile.

La forme de la courbe du recouvrement renseigne sur les différents types de cinétique qui agissent sur le retour de fluorescence. Deux processus peuvent influencer le recouvrement de fluorescence, soit la diffusion et les interactions moléculaires (Sprague et McNally, 2005). La diffusion dépend de la viscosité du milieu et des obstacles au mouvement des molécules. Dans le cas du FRAP, la diffusion conduit à l'échange de molécules libres photoblanchies par des molécules libres non-photoblanchies (fluorescentes). Cependant, une certaine fraction des molécules observées par FRAP peut être liée par des interactions moléculaires, ce qui fera dépendre le FRAP de l'association/dissociation des interactions moléculaires. Dans ce cas, c'est l'association et la dissociation des interactions moléculaires qui influencera l'échange de molécules libres photoblanchies

par des molécules libres non-photoblanchies et la diffusion servira seulement à conduire les molécules aux sites d'interaction.

Une façon simple de vérifier que le recouvrement de fluorescence dépend de la diffusion consiste à faire varier la grosseur de la région photoblanchie pour différentes expériences de FRAP. Le recouvrement de fluorescence dépend de la diffusion lorsque qu'il dépend de la grosseur de la région photoblanchie alors que dans le cas où il est indépendant de la grosseur de la région, il ne dépend pas de la diffusion. Par ailleurs, nos expériences de FRAP ont été effectuées dans des compartiments restreints des neurones (épine et dendrites) où la grosseur de la région photoblanchie est égale à celle de l'épine ou à celle du diamètre de la dendrite. Différents modèles mathématiques ont été conçus pour modéliser la diffusion et/ou les interactions moléculaires agissant sur le FRAP et nous avons comparé les régressions obtenues par différents modèles pour déterminer quels processus influencent le recouvrement de fluorescence.

Un modèle de recouvrement de fluorescence par diffusion utilise des fonctions de Bessel modifiées pour ajuster une fonction exponentielle au retour de fluorescence (Soumpasis, 1983; Sprague et al., 2004;) :

$$F(t) = F_{\text{mob}} * \exp(-2\tau/t) * [I_0(2\tau/t) + I_1(2\tau/t)]$$

Où t est le temps, τ est la constante de temps (s), F_{mob} la fraction mobile et I_0 et I_1 des fonctions Bessel modifiées du premier type. Ce modèle considère que les interactions moléculaires jouent un rôle mineur dans le recouvrement de fluorescence puisque seul l'échange de molécules libres participe à ce recouvrement.

La constante de temps (τ) est parfois appelée temps caractéristique de diffusion (τ_D) et a été reliée au coefficient de diffusion ($\tau_D = w^2 / 4D$) (Reits et Neefjes, 2001 ; Axelrod et al., 1976). La constante de temps correspond au temps nécessaire pour que le recouvrement de la fluorescence atteigne ~63.2% de la valeur maximale de la fluorescence mesurée au cours de l'expérience. Une autre constante importante est le temps de demi-

recouvrement ($t_{1/2} = \tau \cdot \ln(2)$). Plusieurs facteurs influencent la diffusion d'une protéine et donc le FRAP : la viscosité du cytoplasme, la température absolue et le rayon hydrodynamique de la particule. Par ailleurs, la présence d'interaction des protéines photoblanchies avec différents constituants cellulaires influencera également la diffusion des protéines lorsque ces interactions sont transitoires par rapport aux mesures de FRAP. Ces interactions auront pour effet de ralentir la diffusion et donc d'augmenter la constante de temps pour donner un coefficient de diffusion effectif (Sprague et McNally, 2005 ; Sprague et al., 2004).

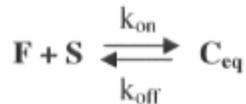
La fraction mobile (F_{mob}) correspond à la fraction de fluorescence qui est mobile pour la durée de l'expérience. Elle est limitée par les interactions stables ou la compartimentalisation des protéines photoblanchies qui ont pour effet de les immobiliser et d'empêcher leur remplacement par des protéines fluorescentes. De plus, elle dépend de la durée de l'expérience dans les cas où les protéines sont immobilisées par des interactions provisoires dont la durée est plus longue que celle de l'expérience.

Un autre modèle de recouvrement de fluorescence considère que la diffusion est beaucoup plus rapide que les échanges d'interaction, donc que les associations et dissociations de complexes moléculaires régulent le recouvrement de fluorescence alors que les molécules diffusent instantanément suite au photoblanchiment. Ce modèle utilise une exponentielle simple :

$$F(t) = F_{mob} - C_{eq} * \exp(-k_{off} t)$$

Où t est le temps, C_{eq} est la fraction de molécules liées de façon réversible, F_{mob} la fraction mobile et k_{off} (s^{-1}) est la constante du taux de dissociation.

On considère que la fraction liée de façon réversible (C_{eq}) est en équilibre avec une fraction de molécules libre (F) et un certain nombre de sites de liaison vacants (S) (Sprague et al., 2004) :



Ainsi, la fraction mobile F_{mob} correspond à l'addition de F et de C_{eq} .

Lorsque deux types d'interaction contribuent au recouvrement de fluorescence, il est possible de modifier la fonction pour décrire les deux types de fractions liées de façon réversible:

$$F(t) = F_{\text{mob}} - C_{1\text{eq}} * \exp(-k_{1\text{off}} t) - C_{2\text{eq}} * \exp(-k_{2\text{off}} t)$$

En bref, le recouvrement de fluorescence suit une fonction exponentielle où la vitesse de l'augmentation de fluorescence diminue en fonction du temps jusqu'à atteindre un équilibre où la fluorescence de la région photoblanchie est en équilibre avec celle du reste de la cellule. Cependant, le choix de la forme de l'exponentielle dépendra du type de phénomène mesuré et l'évaluation de la forme de la courbe du retour permettra de déterminer si le recouvrement de fluorescence dépend principalement de la diffusion ou des interactions moléculaires.

FRAP de la GFP-CaMKII dans les épines de neurones en culture

Nous avons mesuré la mobilité de la CaMKII dans les épines des neurones puisqu'à cet endroit elle se retrouve en grande quantité, elle peut y être activée par $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, se retrouve avec plusieurs de ses substrats et elle peut s'y concentrer davantage suite à l'activité synaptique.

Comme première expérience de FRAP, trois épines voisines d'un neurone transfecté avec GFP-CaMKII ont été photoblanchies et le recouvrement de fluorescence subséquent a été mesuré. Sur la figure 6 on peut suivre le déroulement de l'expérience et noter que la fluorescence diminue massivement pendant le photoblanchiment et qu'elle revient

graduellement dans les épines photoblanchies. Ce phénomène est visible sur les images (Figure 6B) et selon la quantification basée sur la moyenne de fluorescence dans chacune des régions (Figure 6C). La figure 6C montre que le FRAP de la CaMKII varie pour trois épines différentes selon la forme de la courbe, la durée de recouvrement (constante de temps) et la fraction mobile. En effet, la géométrie des épines, qui varie d'une épine à l'autre, influence le FRAP de la CaMKII notamment à cause du cou de l'épine qui agit comme un canal plus ou moins large régulant l'échange de CaMKII entre les compartiments photoblanchis (épine) et non photoblanchis (dendrite). De plus, chaque épine a une structure moléculaire différente notamment au niveau la quantité d'actine polymérisée, ce qui affecte la viscosité de l'épine et par conséquent la diffusion de la CaMKII. Enfin, chaque épine pourrait avoir un nombre différent de sites de liaison de CaMKII et ce nombre peut varier d'une épine à une autre.

Pour comparer les différentes expériences, nous normalisons la fluorescence par rapport à l'intensité initiale de fluorescence ainsi que par rapport à l'intensité immédiatement après le photoblanchiment (voir matériel et méthode). Nous obtenons ainsi des recouvrements de fluorescences que nous pouvons modéliser avec une fonction exponentielle. Comme il est impossible de mesurer avec certitude les dimensions ou la viscosité des épines, nous avons choisis de moyenniser le recouvrement de fluorescence de plusieurs épines afin d'obtenir le recouvrement moyen de la CaMKII dans les épines que nous pouvons modéliser avec la fonction de diffusion ou avec la fonction d'interaction. Cela nous permettra de mesurer l'effet de différentes conditions du neurone (stimulé ou non-stimulé), des synapses (avec ou sans AP5) et de la CaMKII (sauvage ou mutants) sur le FRAP de la CaMKII en utilisant des modélisations avec différentes fonctions exponentielles pour obtenir les différents paramètres de mobilité de la CaMKII. Cependant, nous avons d'abord

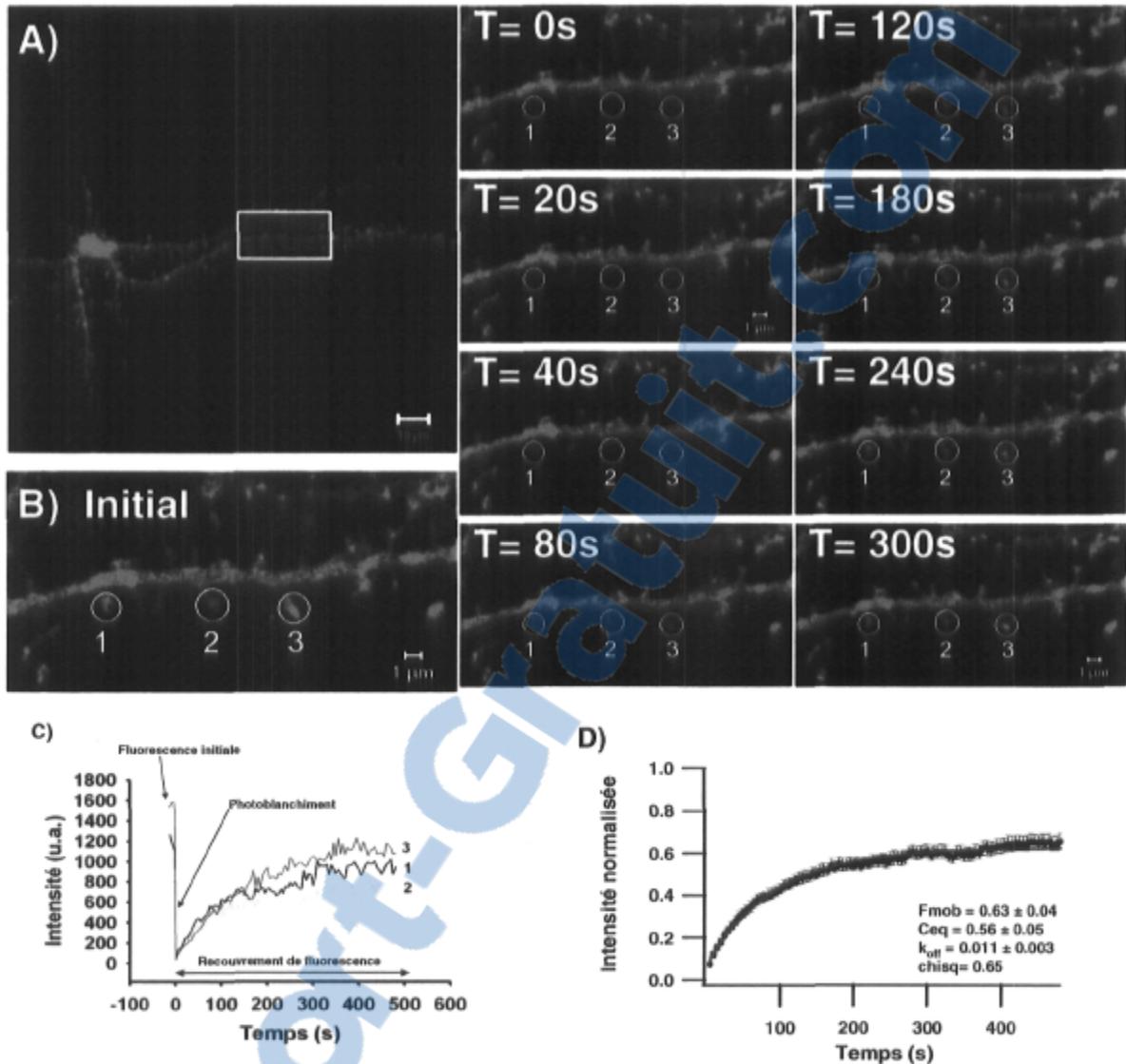
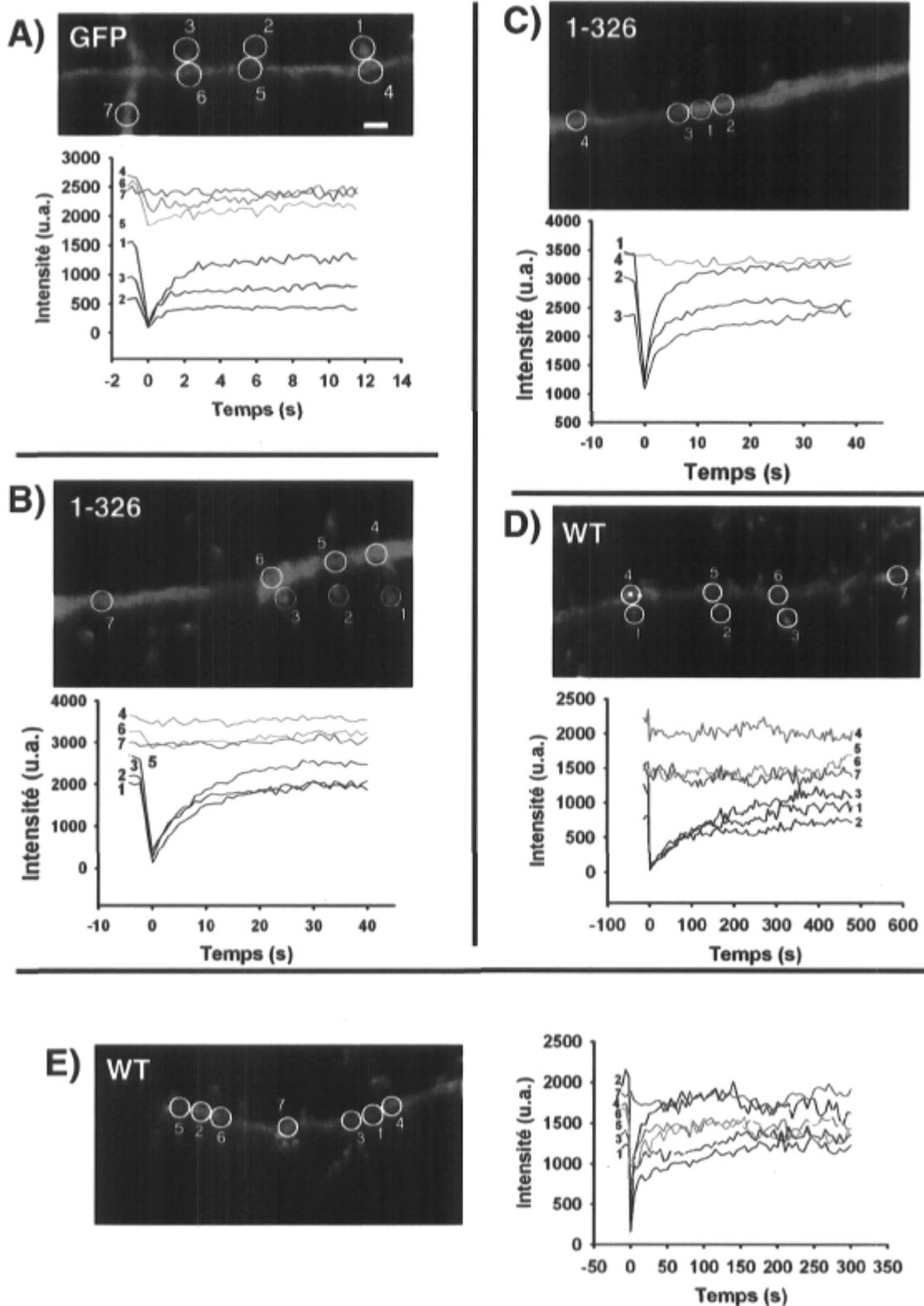


Figure 6: FRAP de la GFP-CaMKII dans trois épines d'un neurone. A) Image du neurone avec la région dendritique choisie pour effectuer l'expérience de FRAP. B) Image du dendrite avant le photoblanchiment (initial) et suite au photoblanchiment (T=0 à T=300). C) Quantification de la fluorescence pendant l'expérience de FRAP pour les trois épines. D) Recouvrement moyen de la fluorescence pour les trois épines et modélisation du recouvrement.

examiné le photoblanchiment et le recouvrement de différentes protéines selon différents temps afin de valider les méthodes de mesure et d'analyse et d'identifier les limites de notre système de FRAP.

Caractérisation de l'étendue du photoblanchiment lors du FRAP

Afin de mieux caractériser notre système, nous avons cherché à savoir si le photoblanchiment d'une région affecte la fluorescence du reste du neurone. Nous avons



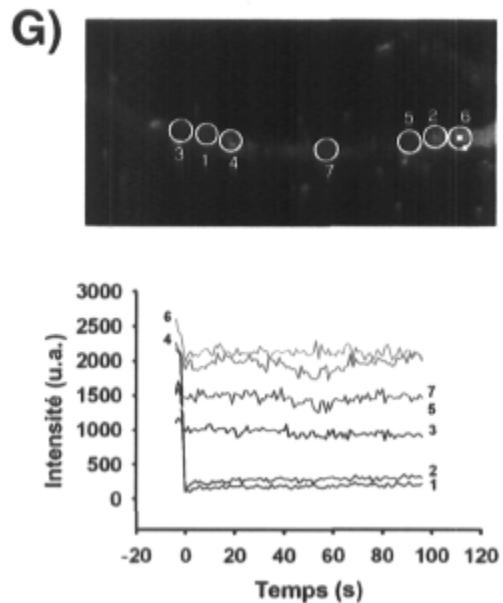
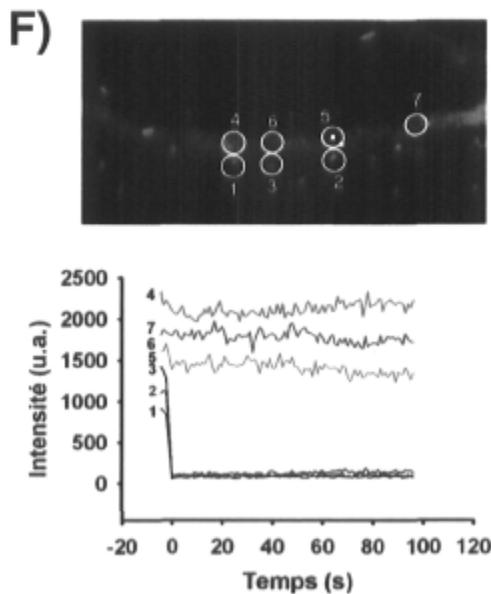


Figure 7: Caractérisation de l'étendue du photoblanchiment dans le neurone. A) GFP dans des épines. Régions 1-2-3 photoblanchies. B) GFP-CaMKII 1-326 dans des épines. Régions 1-2-3 photoblanchies. C) GFP-CaMKII 1-326 dans un dendrite. Régions 1 photoblanchies. D) GFP-CaMKII WT dans des épines. Régions 1-2-3 photoblanchies. E) GFP-CaMKII WT dans un dendrite. Régions 1-2 photoblanchies. F) GFP-CaMKII WT dans des épines (cellule fixée). Régions 1-2-3 photoblanchies. G) GFP-CaMKII WT dans un dendrite (cellule fixée). Régions 1-2 photoblanchies. Échelle pour tous les panneaux (voir A) : 1 μ m

d'abord mesuré le FRAP dans les épines d'une protéine GFP qui a été transfectée dans des neurones. Dans ce cas, on peut observer que la fluorescence diminue dans les épines photoblanchies, puis qu'elle revient rapidement pour former un plateau légèrement inférieur à la fluorescence initiale (Figure 7A). Par ailleurs, la fluorescence diminue également dans les dendrites puisqu'il y a également une diminution de fluorescence dans des régions tracées sur les dendrites au pied des épines photoblanchies. Cette diminution de fluorescence pourrait être causée par deux phénomènes : un photoblanchiment imprécis

par le laser qui déborde hors des régions choisies pour le FRAP ou une diffusion des protéines photoblanchies hors des épines exposées au laser durant le photoblanchiment.

Nous avons mesuré la précision du photoblanchiment par rapport à la région choisie (tracée sur l'image de la dendrite prise au préalable) en effectuant une expérience de FRAP sur des neurones transfectés avec la GFP-CaMKII et fixés. Nous pouvons constater qu'il n'y a aucun retour de fluorescence dans les régions photoblanchies situées dans les épines (Figure 7F) ou dans les dendrites (Figure 7G). De plus, le photoblanchiment d'une épine ne semble pas affecter la fluorescence dans la dendrite sauf lorsque la région photoblanchie est soudée à la dendrite où la perte de fluorescence dans la dendrite dépend seulement d'une faible imprécision dans la délimitation de la région photoblanchie. Dans ce cas, nous observons une perte de fluorescence sans recouvrement puisque les protéines sont fixées. Le même phénomène se produit dans la dendrite où le photoblanchiment est principalement restreint aux régions photoblanchies.

La GFP étant une molécule très petite, il est probable que sa diffusion hors de l'épine pendant le photoblanchiment soit assez importante. Ainsi, nous avons vérifié si l'augmentation de grosseur des protéines par l'attachement de la GFP au domaine catalytique de CaMKII étiqueté avec une GFP (GFP-CaMKII 1-326) (Figure 7B) ou à une CaMKII multimérique (GFP-CaMKII WT) (Figure 7D) permet de réduire la diminution de fluorescence hors des épines. Dans les deux cas, la diminution de fluorescence est réduite par rapport à la GFP jusqu'à être presque abolie pour la GFP-CaMKII WT. Ce dernier résultat confirme que c'est la diffusion rapide des petites GFP photoblanchies hors de la région exposée au laser qui cause la diminution de fluorescence observée en dehors de ces régions. De plus, on peut supposer que le photoblanchiment crée un gradient de fluorescence à l'embouchure de l'épine de la dendrite, et que ce type de diminution de fluorescence sera encore plus important pour du FRAP dans les dendrites. C'est effectivement ce qui se produit pour le FRAP de la GFP-CaMKII 1-326 (Figure 7C) ou de la GFP-CaMKII WT (Figure 7E). Par ailleurs, on peut observer que la diminution de fluorescence s'estompe vite avec la distance par rapport à la région photoblanchie puisqu'il n'y a aucune diminution de fluorescence dans des régions éloignées des régions

photoblanchies dans les épines ou dans les dendrites. De plus, la fluorescence dans ces régions éloignées reste relativement stable pour toute la durée de l'expérience, ce qui démontre que l'acquisition d'image pour mesurer le recouvrement de fluorescence ne crée pas de photoblanchiment significatif.

Des protéines de différentes grosseurs ont des mobilités différentes dans les épines de neurones en culture.

Les épines dendritiques sont séparées des dendrites par des cous qui peuvent agir comme barrière de diffusion lorsque le diamètre du cou est plus petit que celui de la tête de l'épine (Nimchinsky et al., 2002; Sabatini et al., 2005). Cette barrière de diffusion influencera la diffusion d'une protéine en fonction de sa grosseur puisque une petite protéine aura plus de facilité à franchir le cou de l'épine. Afin d'évaluer l'effet de cette barrière de diffusion par rapport à la sensibilité de nos mesures de FRAP, la mobilité de protéines de différentes tailles moléculaires a été comparée dans les épines et les dendrites de neurones en culture. Les trois types de protéines utilisés sont la GFP (28 kDa), la GFP-CaMKII 1-326 (environ 55 kDa; GFP + domaine catalytique de la CaMKII) et la GFP-CaMKII WT (environ 1030 kDa; CaMKII multimérique [12 sous-unités] + 12 GFP).

La GFP a démontré une mobilité très rapide avec une constante de temps de 0.4 secondes. On peut apprécier la rapidité de déplacement de la GFP en comparant sa vitesse de recouvrement avec celle des GFP-CaMKII WT et 1-326 (Figure 8A, 8B et 8C). On peut noter cependant que le recouvrement de fluorescence de la GFP seule est incomplet puisqu'il atteint un plateau de à ~90% du niveau de fluorescence avant photoblanchiment. L'atteinte d'un plateau dans le recouvrement de fluorescence est généralement attribué à une population de protéine qui est immobilisée dans la région photoblanchie. En effet, une protéine immobilisée empêcherait un recouvrement complet de la fluorescence en ne permettant pas à des protéines toujours fluorescentes de prendre sa place. Puisque qu'aucune interaction connue n'est sensée immobiliser la GFP dans une cellule, on pourrait spéculer qu'une petite quantité de GFP est séquestrée par des confinements moléculaires à l'intérieur de l'épine, ce qui empêcherait sa diffusion hors de l'épine une fois photoblanchie et son remplacement par des GFP non-photoblanchies. Cependant, il est plus probable que

cette fraction immobile soit gonflée artificiellement par le photoblanchiment d'une fraction importante du pool de GFP diffusible dans l'épine, puisque la constante de temps est très petite par rapport au temps de photoblanchiment (voir la section suivante sur la perte de fluorescence en dehors de la région d'intérêt). Par ailleurs, il est également possible que l'expression en très grande quantité de la GFP dans les neurones provoque des interactions non spécifiques pour cette protéine dans l'épine ce qui a pour effet d'immobiliser une fraction de la GFP.

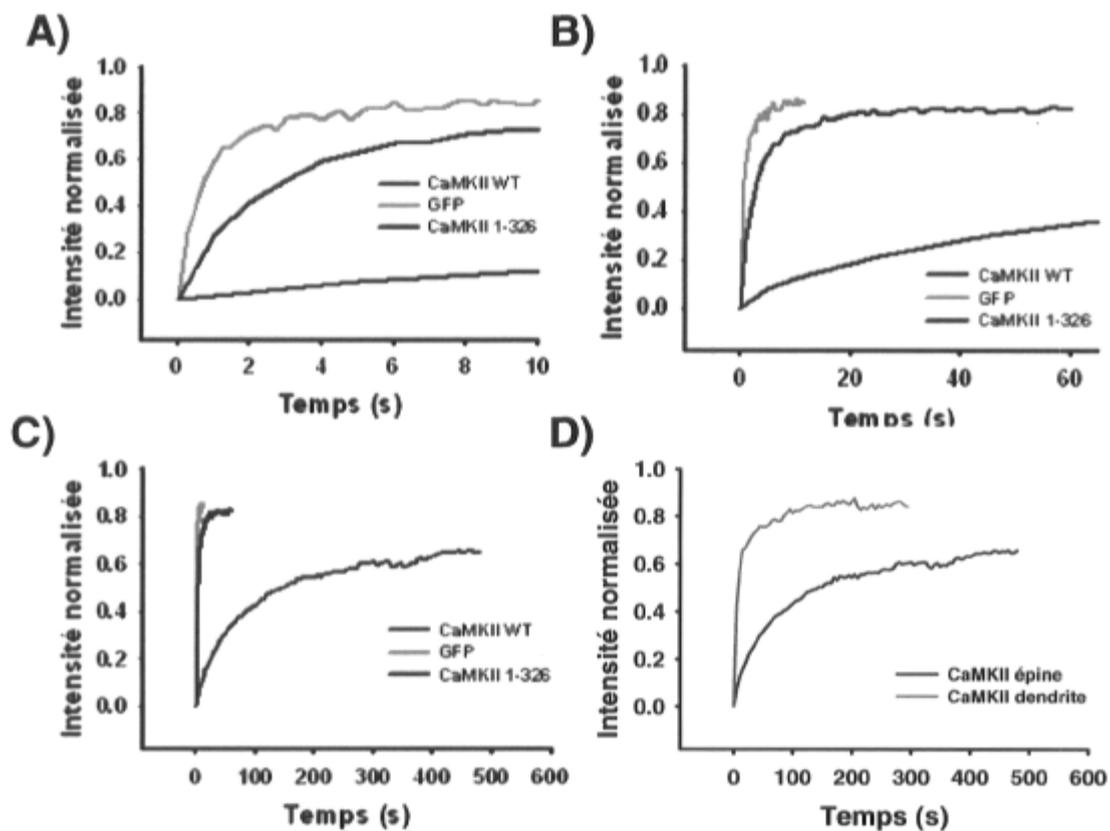


Figure 8: Comparaison des mobilités de protéines de différente grosseur par FRAP. A-B-C) Comparaison de la mobilité de la GFP (vert), de la GFP-CaMKII 1-326 (bleu) et de la GFP-CaMKII WT (brun) pour différentes échelles de temps. D) Comparaison de la mobilité de la GFP-CaMKII dans l'épine (brun) et dans la dendrite (orange). Courbes représentatives provenant d'une cellule.

La GFP-CaMKII 1-326 démontre une mobilité intermédiaire dans l'épine avec une constante de temps de 1.9 secondes qui est 4-5 fois plus lente que la GFP (Figure 8A, 8B et 8C). Cette réduction de mobilité est attendue puisque la GFP-CaMKII 1-326 a un poids moléculaire deux fois supérieur à celui de la GFP (domaine catalytique ~ 25kDa). Or, le coefficient de diffusion pour une sphère brownienne isolée est donné par l'équation de Stokes-Einstein $D=kT/6\eta\pi\sigma$ où η est la viscosité du fluide, k la constante de Boltzman, T la température et σ le rayon hydrodynamique de la molécule. Si une molécule avec un poids moléculaire plus élevé possède un rayon hydrodynamique plus élevé et que le coefficient de diffusion est inversement proportionnel au rayon hydrodynamique, alors il est probable que le coefficient de diffusion de la GFP-CaMKII 1-326 soit plus petit que la GFP. C'est effectivement le résultat obtenu, puisque la constante de temps pour la GFP-CaMKII 1-326 est plus grande que celle pour la GFP et que cette constante de temps est inversement proportionnelle au coefficient de diffusion. Par ailleurs, la fraction mobile de la GFP-CaMKII 1-326 est du même ordre de grandeur que celle de la GFP (86% vs 90% pour GFP) ce qui laisse supposer qu'une fraction de la GFP-CaMKII 1-326 est immobilisée par les mêmes types d'interactions et de séquestration que la GFP ou encore biaisée par la diffusion de la protéine lors du photoblanchiment. Cependant, on ne peut exclure que des interactions spécifiques de la CaMKII contribue à l'immobilisation de la GFP-CaMKII 1-326 dans l'épine puisque plusieurs travaux démontrent que ce domaine de la CaMKII peut interagir avec plusieurs protéines post-synaptiques (Colbran, 2004).

La GFP-CaMKII sauvage (multimérique) a un poids moléculaire de 1030 kDa ((12 sous-unités de CaMKII x 55kDa) + (12 GFP x 28kDa)). Son recouvrement de fluorescence après photoblanchiment est beaucoup plus lent, ce qui donne une constante de temps de 78 secondes pour un recouvrement de 500 secondes (Figure 8A, 8B et 8C). Ce résultat est plausible en comparaison des constantes de temps de la GFP-CaMKII 1-326 et de la GFP, puisque la GFP-CaMKII sauvage est beaucoup plus volumineuse. De plus, la GFP-CaMKII sauvage a démontré une fraction mobile plus réduite à 78%. Cette réduction de la fraction mobile par rapport à la GFP seule ou la CaMKII monomérique-GFP peut s'expliquer par le fait que sa grande taille peut causer une plus grande séquestration. De plus, les multiples sites catalytiques de l'enzyme multimérique peut augmenter le nombre

d'interactions possibles dans l'épine post-synaptique. Par ailleurs, il est possible que la réduction de mobilité soit causée par une mesure incomplète du FRAP où le recouvrement de fluorescence continuerait si l'expérience durait plus longtemps. En effet, on peut voir que la courbe de retour n'atteint pas un plateau horizontal après 500 secondes ce qui, combiné à un modèle de régression imprécis, pourrait contribuer à sous-estimer la fraction mobile. Ainsi, nous avons vérifié l'effet de la durée de la mesure du recouvrement sur sa modélisation (voir section suivante).

Interprétation de la courbe du FRAP de la GFP-CaMKII dans les épines

Pour décortiquer la forme précise du recouvrement de fluorescence de la GFP-CaMKII sauvage dans l'épine, nous avons posé l'hypothèse que plusieurs populations de GFP-CaMKII (libre, liée par Ca^{2+} /Calmoduline ou en interaction avec l'une des multiples partenaires possibles dans l'épine post-synaptique) peuvent contribuer au recouvrement de fluorescence avec des cinétiques différentes. Ainsi, ces différentes populations de CaMKII peuvent présenter une diffusion restreinte ou une diffusion complexe (Verkman, 2002). Une diffusion restreinte se produit lorsqu'une partie des molécules fluorescentes sont immobilisées par des interactions à des molécules ancrées ou bougeant très lentement ou encore lorsque les molécules fluorescentes sont séquestrées dans des compartiments. Une diffusion complexe se produit lorsque plusieurs formes de la molécule fluorescente diffusent, lorsque la diffusion est anormale ou restreinte par la géométrie.

La première étape est de déterminer comment les modèles utilisés décrivent le recouvrement de fluorescence de la CaMKII dans l'épine alors que les récepteurs NMDA sont bloqués (solution de blocage bas Ca^{2+} , haut Mg^{2+}). Ainsi, la fonction de diffusion modélise bien les données ($\chi^2=0.64$) durant la presque totalité de l'expérience avec un τ de 90 ± 38 s et une F_{mob} de 78 ± 9 % (résultats non montrés). La fonction d'interaction modélise aussi bien les données ($\chi^2=0.66$) avec une F_{mob} de 63 ± 4 %, une C_{eq} de 56 ± 5 % et une k_{off} de 0.0107 ± 0.0031 s^{-1} (Figure 9). De plus, si on inverse le k_{off} (k_{off}^{-1}) pour obtenir une constante de temps, on obtient un k_{off}^{-1} de 93 ± 27 s ce qui s'approche du τ de la fonction de diffusion. Par ailleurs, les résiduelles calculées de ces régressions montrent que les premières mesures sont surestimées par la fonction de diffusion alors que les

dernières mesures sont sous-estimées par la fonction d'interaction. Afin d'y voir plus clair nous avons utilisé les mêmes fonctions pour modéliser les 200 premières secondes de l'expérience ou les 400 dernières. De ces régressions, nous pouvons effectuer certaines constatations : 1- La fonction de diffusion modélise légèrement mieux les 400 dernières secondes alors que la fonction d'interaction modélise beaucoup mieux les 200 premières secondes. 2- Les valeurs des paramètres de régression dépendent de la partie de l'expérience modélisée et ont une incertitude beaucoup plus grande que celles provenant des régressions de l'expérience complète. 3- Le k_{off}^{-1} de la fonction d'interaction des 200 premières secondes s'approche du τ de la fonction de diffusion des 400 dernières secondes et vice-versa.

Interprétation de la courbe du FRAP de la GFP-CaMKII 1-326 dans l'épine.

La CaMKII 1-326 est une CaMKII fonctionnelle mais dont le domaine d'association a été enlevé pour en faire un CaMKII monomérique. Le recouvrement de fluorescence de cette protéine est beaucoup plus rapide et nous l'avons également modélisé avec les fonctions de diffusion et d'interaction. La fonction de diffusion modélise bien les données ($\chi^2=0.69$) avec un τ de 1.94 ± 0.69 s et une F_{mob} de 86 ± 3 % (résultats non montrés). La fonction d'interaction modélise aussi bien les données ($\chi^2=0.55$) avec une F_{mob} de 81 ± 2 %, une C_{eq} de 56 ± 5 % et une k_{off} de 0.0107 ± 0.0031 s⁻¹ (Figure 9).

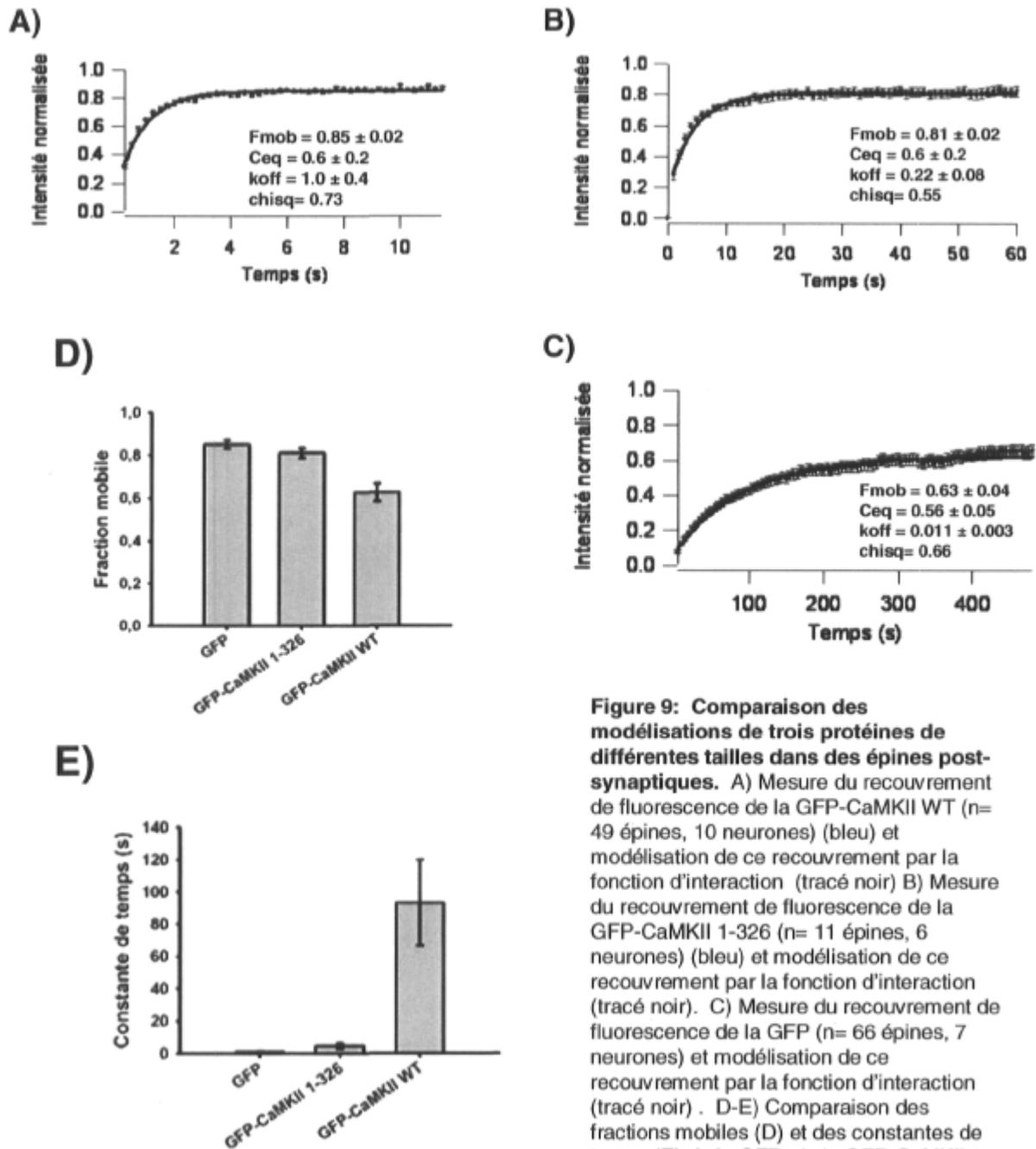


Figure 9: Comparaison des modélisations de trois protéines de différentes tailles dans des épines post-synaptiques. A) Mesure du recouvrement de fluorescence de la GFP-CaMKII WT (n= 49 épines, 10 neurones) (bleu) et modélisation de ce recouvrement par la fonction d'interaction (tracé noir) B) Mesure du recouvrement de fluorescence de la GFP-CaMKII 1-326 (n= 11 épines, 6 neurones) (bleu) et modélisation de ce recouvrement par la fonction d'interaction (tracé noir). C) Mesure du recouvrement de fluorescence de la GFP (n= 66 épines, 7 neurones) et modélisation de ce recouvrement par la fonction d'interaction (tracé noir) . D-E) Comparaison des fractions mobiles (D) et des constantes de temps (E) de la GFP, de la GFP-CaMKII 1-326 et de la GFP-CaMKII sauvage (moyenne \pm écart type)

Selon le calcul des résiduelles, la fonction de diffusion surestime les premiers points alors que la fonction d'interaction ne modélise pas bien les premiers points. Les modélisations avec les fonctions de diffusion ou d'interaction des 10 premières secondes permettent de mieux mobiliser les données selon le χ^2 que celles des 50 dernières secondes ou de l'expérience complète. Les valeurs obtenues pour les différents paramètres de régression varient sans démontrer de tendance évidente selon la partie modélisée et l'erreur associée à ces valeurs est plus importante lorsque la modélisation se limite à une fraction de l'expérience.

Interprétation de la courbe du FRAP de la GFP dans l'épine.

La GFP est une protéine soluble dans les neurones qui diffuse rapidement à cause de sa petite taille. Le recouvrement de fluorescence de cette protéine devait être mieux modélisé par la fonction de diffusion que celle d'interaction, mais les données sont aussi bien modélisées par les deux fonctions. Par ailleurs, le k_{off}^{-1} de 0.99 ± 0.37 s de la fonction d'interaction est du même ordre de grandeur que celui du τ de 0.42 ± 0.15 s de la fonction de diffusion ce qui confirme que ces deux fonctions peuvent servir pour modéliser le recouvrement de fluorescence d'une protéine diffusible photoblanchie dans l'épine. La modélisation d'une fraction de l'expérience permet encore aussi de réduire le χ^2 tout en augmentant l'incertitude sur les valeurs des paramètres de régression.

Bref, l'interprétation des différentes courbes de FRAP avec les différentes fonctions permet de voir que le recouvrement de diffusion n'est pas dû au seul phénomène de diffusion ni au seul phénomène de changement d'interaction entre protéines. Ainsi, pour le reste de nos expériences, nous avons décidé de modéliser le FRAP avec la fonction d'interaction où la constante de temps provient de l'inverse du k_{off}^{-1} .

La mobilité des protéines dépend de la morphologie compartimentée du neurone

L'épine post-synaptique est un compartiment isolé de la dendrite par un cou dont le diamètre se situe entre 0.5 et 1 μm . Cette morphologie a pour conséquence de ralentir les échanges de protéines entre la région d'intérêt photoblanchie et le reste du neurone. De plus, le cou de l'épine peut être partiellement obstrué par des molécules telles que l'appareil

de l'épine (spine apparatus), les complexes de polyribosomes associés aux synapses (SPRC) ou diverses autres protéines, telles l'actine filamenteuse. En comparaison, la dendrite est un compartiment continu de la forme d'un cylindre avec ou sans ouvertures dans la membrane donnant lieu à des épines. L'intérieur de la dendrite est également rempli d'obstacles à la diffusion, telles des protéines du cytosquelette.

Le FRAP de la CaMKII dans la dendrite est beaucoup plus rapide que dans l'épine (Figure 8D). La modélisation de ce recouvrement avec la fonction de diffusion a donné une constante de temps de 6.22 ± 1.79 s et une fraction mobile de 87 ± 3 %. La constante de temps du FRAP dans la dendrite est 24 fois plus rapide que dans l'épine alors que la fraction mobile n'est pas très différente si on considère les incertitudes associées aux mesures. La constante de temps τ du FRAP dépend de façon inversement proportionnelle de la surface d'échange entre les molécules photoblanchies et fluorescentes et du coefficient de diffusion (Schmidt, 2003). Ainsi la surface d'échange dans une dendrite de 1 μm de diamètre est de $1.57 \mu\text{m}^2$ ($2 \pi r^2$) alors que celle du cou d'une épine de 0.1 μm de diamètre est de $0.031 \mu\text{m}^2$ (πr^2) ce qui fait que l'aire d'échange du FRAP dans les dendrite est 50 fois plus grand que celui dans l'épine. Ainsi, cela pourrait suggérer que le coefficient de diffusion de la CaMKII à travers le cou de l'épine est deux fois plus élevé que celui dans la dendrite (Smith et al., 2007).

L'activation transitoire des récepteurs NMDA induit des changements pour la mobilité des protéines (GFP) dans l'épine post-synaptique

L'activation des récepteurs NMDA et l'entrée de calcium subséquente ont une multitude de conséquences sur la physiologie de l'épine notamment sur sa morphologie, sa motilité et sur son cytosquelette. Par exemple, un changement de morphologie, notamment au niveau du cou de l'épine pourrait modifier les échanges par diffusion de protéines entre l'épine et la dendrite. Une modification des interactions de certaines protéines menant à une polymérisation du cytosquelette pourrait faire obstacle à la diffusion et diminuer la mobilité des protéines dans l'épine. Ainsi nous avons mesuré le recouvrement de fluorescence dû à une protéine inerte et libre dans le cytoplasme, la GFP, afin de voir si une activation transitoire des récepteurs NMDA par perfusion d'une solution contenant du

calcium, du glutamate et de la glycine pendant deux minutes change sa mobilité dans les épines post-synaptique des neurones. Dans l'affirmative, la diffusion de la totalité des protéines pourrait être affectée par ce type d'activation des récepteurs NMDA et cela nécessiterait de considérer ces phénomènes de perturbation de diffusion dans l'interprétation de la mobilité de la CaMKII.

Le recouvrement de fluorescence de la GFP a été mesuré de 5 à 15 minutes après l'activation afin de déceler des changements de mobilité suivant l'activation des récepteurs NMDA. Au cours de cette période, aucun changement notable de la fraction mobile de la GFP seule n'a été mesuré (Figure 10A). Par contre, la vitesse du recouvrement a augmenté puisque la constante de temps a diminué après l'activation des récepteurs NMDA (Figure 1B). Ce résultat fait contraste avec celui obtenu par un autre groupe de recherche où ils montrent que la diffusion d'une protéine est diminuée suite à l'activation du neurone (Bloodgood et Sabatini, 2005). Cependant, cette diminution de diffusion n'est pas observée lorsqu'ils utilisent une libération de glutamate encagé, mais seulement lorsque la libération de glutamate est combinée à une rétro-propagation de potentiel d'action.

Nous avons également pré-incubé les neurones avec l'AP5, un bloqueur des récepteurs NMDA afin de vérifier si l'activité spontanée des récepteurs NMDA de neurones en culture change la mobilité des protéines avant ou après l'activation transitoire des récepteurs NMDA. La fraction mobile est constante avec ou sans AP5 et ce, avant et après l'activation des récepteurs NMDA (Figure 10A). Par contre, la vitesse de diffusion de la GFP est plus lente avant l'activation des récepteurs NMDA lors de la pré-incubation des neurones qu'en l'absence de cette pré-incubation (Figure 10B). Cependant, à cause de la grande variabilité des mesures on ne peut pas démontrer de différences significatives entre ces vitesses de diffusion. Il faudrait un plus grand nombre d'expériences pour confirmer la tendance observée. Par contre, cette différence des vitesses de diffusion de la GFP s'estompe après l'activation des récepteurs NMDA.

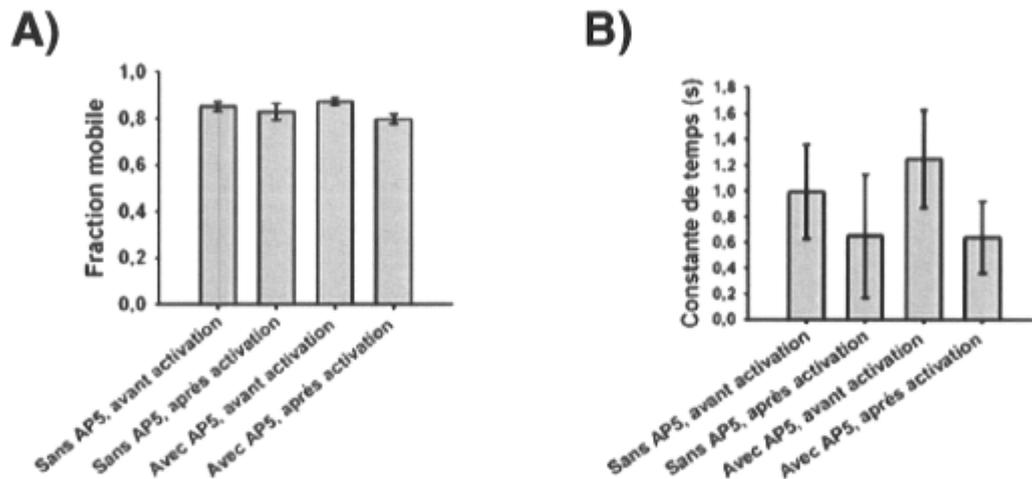


Figure 10: Comparaison de la mobilité de la GFP dans les épines dendritiques avant ou après l'activation des récepteurs NMDA de neurones en culture. Fraction mobile (A) et constante de temps (B) pour le recouvrement de fluorescence dans les épines de la GFP avant (sans AP5 n= 66 épines, 7 neurones, avec AP5 n= 22 épines, 6 neurones) ou après (sans AP5 n= 22 épines, 6 neurones, avec AP5 n= 18 épines, 6 neurones) l'activation des récepteurs NMDA dans des neurones pré-incubés ou non avec de l'AP5.

L'effet de l'activation transitoire des récepteurs NMDA sur la mobilité de la CaMKII dans :

L'épine post-synaptique

L'activation des récepteurs NMDA par une perfusion de deux minutes d'une solution contenant du glutamate, de la glycine et du calcium cause une entrée massive de calcium dans l'épine post-synaptique et une activation de la signalisation associée au calcium (Kennedy et al., 2005). De plus, ce type d'activation des récepteurs NMDA cause le recrutement synaptique de la CaMKII qui translocalise pour former des agrégats post-synaptiques (Shen et Meyer, 1998). Le blocage subséquent de ces récepteurs produit une dissociation incomplète de la CaMKII dans l'épine post-synaptique puisque la quantité de fluorescence de la CaMKII présente dans l'épine est plus élevée qu'avant l'activation (Bayer et al., 2006). Ainsi, cette fraction de CaMKII coincée dans l'épine devrait diminuer la fraction mobile. Or, ce n'est pas le cas puisque la fraction mobile lors de la modélisation avec la fonction de diffusion reste semblable avant et après l'activation des récepteurs

NMDA (Figure 11A). Par contre, la vitesse de diffusion de la CaMKII augmente légèrement puisque la constante de temps après l'activation est moins élevée que celle d'avant bien que l'incertitude associée aux valeurs soit grande (Figure 11B).

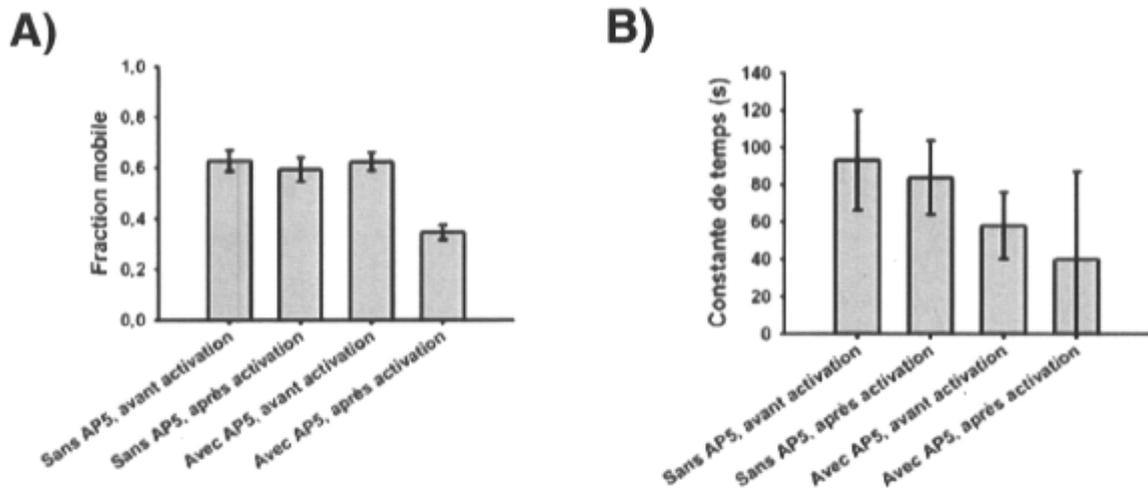


Figure 11: Comparaison de la mobilité de la GFP-CaMKII dans les épines dendritiques avant ou après l'activation des récepteurs NMDA de neurones en culture. Fraction mobile (A) ou constante de temps (B) pour le recouvrement de fluorescence dans les épines de la GFP-CaMKII avant (sans AP5 n= 49 épines, 10 neurones, avec AP5 n= 27 épines, 9 neurones) ou après (sans AP5 n= 22 épines, 10 neurones, avec AP5 n= 13 épines, 9 neurones) l'activation des récepteurs NMDA dans des neurones incubés ou non avec de l'AP5. (moyenne ± écart type)

Plusieurs types d'interactions de la CaMKII à la synapse dépendent de l'activation des récepteurs NMDA. Ainsi, l'activité spontanée des neurones en culture pourrait contribuer à assurer la localisation de CaMKII dans les épines des neurones (Bayer et al., 2006). Nous avons alors mesuré la mobilité de la CaMKII dans les épines synaptiques suite à un pré-blocage des récepteurs NMDA avec l'AP5. La fraction mobile de la CaMKII ne change pas par rapport à la condition sans AP5 avant l'activation des récepteurs NMDA. Par contre, la fraction mobile diminue de moitié suite à l'activation des récepteurs NMDA dans le cas d'un pré-blocage avec l'AP5. La vitesse de diffusion augmente lors du pré-blocage avec l'AP5 avant l'activation des récepteurs NMDA. De plus, elle augmente encore davantage suite à l'activation des récepteurs NMDA lors du pré-blocage avec l'AP5. Ainsi, un pré-blocage des récepteur NMDA diminue la fraction qui est mobile suite à

l'activation des récepteurs NMDA, mais cette fraction mobile diffuse beaucoup plus vite dans l'épine synaptique.

La dendrite

Les dendrites sont la partie du neurone reliant les synapses au corps cellulaire du neurone. La CaMKII située dans les dendrites est également susceptible d'être activée lors de l'activation des récepteurs NMDA puisque i) ces récepteurs sont aussi situés sur les dendrites et ii) puisque l'entrée de calcium dans l'épine peut déborder vers la dendrite. De plus, la structure moléculaire de la dendrite diffère de celle de l'épine post-synaptique ce qui pourrait influencer le comportement de la CaMKII dans la dendrite suite à l'activation des récepteurs NMDA. Ainsi, contrairement à ce qui est observé dans l'épine, la fraction mobile obtenue par la modélisation avec la fonction de diffusion diminue de moitié suite à l'activation des récepteurs NMDA (Figure 12A). Par ailleurs, la vitesse de diffusion de la CaMKII est semblable avant et après l'activation des récepteurs NMDA (Figure 12B). Ces résultats suggèrent que la diminution de la fraction mobile dans la dendrite pourrait diminuer la quantité de CaMKII disponible pour diffuser dans les épines synaptiques suite à l'activation des récepteurs NMDA. Cependant, la fraction mobile disponible pour diffuser dans l'épine synaptique diffuse à la même vitesse dans la dendrite avant et après l'activation des récepteurs NMDA.

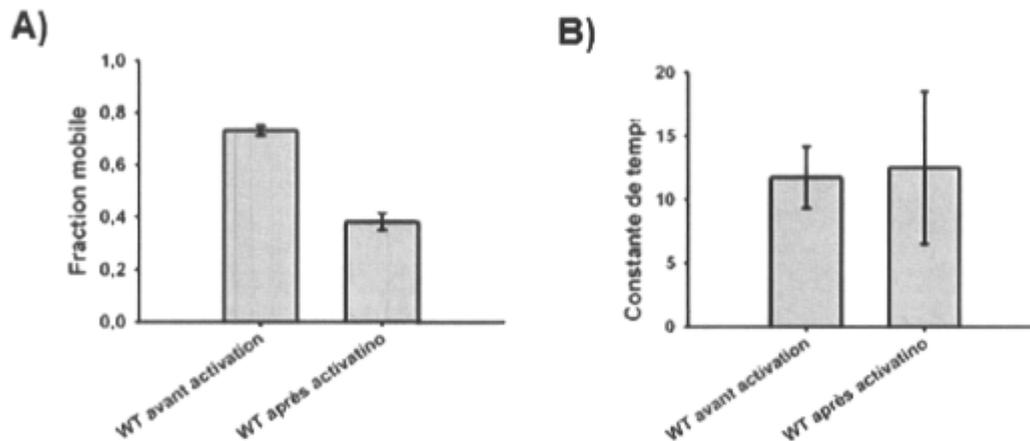


Figure 12: Comparaison de la mobilité de la GFP-CaMKII dans les dendrites avant ou après l'activation des récepteurs NMDA de neurones en culture. Fraction mobile (A) ou constante de temps (B) pour le recouvrement de fluorescence dans les dendrites de la CaMKII sauvage avant (n= 25 dendrites, 10 neurones) ou après (n= 7 dendrites, 7 neurones) l'activation des récepteurs NMDA dans des neurones en culture. (moyenne ± écart type)

L'activation transitoire des récepteurs NMDA modifie la mobilité de la CaMKII 1-326 dans l'épine

La CaMKII 1-326 est une CaMKII dont le domaine d'association a été retiré des domaines catalytique et régulateur pour former une CaMKII fonctionnelle monomérique. La comparaison de la CaMKII monomérique avec la CaMKII sauvage permet d'évaluer l'importance de la structure multimérique de la CaMKII sur sa mobilité lors de l'activation transitoire des récepteurs NMDA. Contrairement à la CaMKII multimérique, la fraction mobile de la CaMKII monomérique augmente légèrement suite à l'activation des récepteurs NMDA (Figure 13A). De plus, la vitesse de diffusion de la CaMKII monomérique est plus lente suite à l'activation des récepteurs NMDA puisque la constante de temps double (Figure 13B). Ces résultats suggèrent que la CaMKII monomérique pourrait former des interactions réversibles suite à l'activation des récepteurs NMDA ce qui aurait pour effet de diminuer sa vitesse de diffusion. Par contre, la CaMKII multimérique n'établirait pas ces

interactions ou formerait des interactions irréversibles qui n'influenceraient pas sa fraction mobile ou sa vitesse de diffusion.

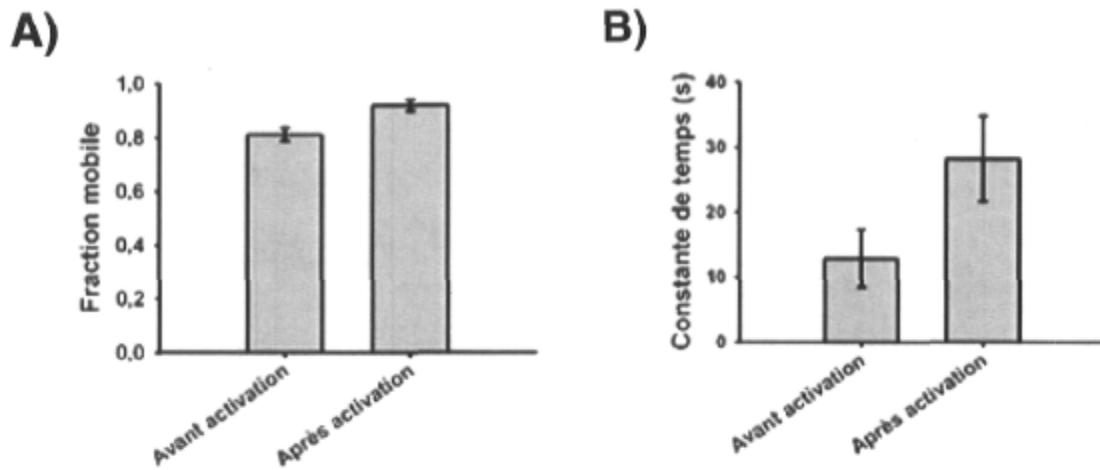


Figure 13: Comparaison de la mobilité de la GFP-CaMKII monomérique (1-326) dans les épines dendritiques avant ou après l'activation des récepteurs NMDA de neurones en culture. Fraction mobile (A) ou constante de temps (B) pour le recouvrement de fluorescence dans les épines de la GFP-CaMKII monomérique (1-326) avant (n= 11 épines, 6 neurones) ou après (n= 11 épines, 6 neurones) l'activation des récepteurs NMDA dans des neurones en culture. (moyenne ± écart type)

Discussion

La CaMKII est une enzyme importante pour le bon fonctionnement des synapses puisqu'elle participe au renforcement synaptique dépendant de l'activité synaptique (Hudmon et Schulman, 2002). Par ailleurs, on commence à connaître plusieurs éléments de sa structure, de son activation et de son fonctionnement. Parmi ces éléments, la translocalisation de l'enzyme est importante puisqu'elle permet de concentrer les effets de la CaMKII dans les épines synaptiques, là où se trouvent les cibles de la CaMKII qui participent au renforcement synaptique. Mon projet de maîtrise a porté essentiellement sur les mécanismes de la translocalisation de la CaMKII à la synapse suite à l'activation des récepteurs NMDA. Ce projet s'est déroulé en deux parties : 1- étude des interactions de la CaMKII et 2- étude de la mobilité de la CaMKII.

Étude des interactions de la CaMKII

L'interaction de la CaMKII avec la sous-unité NR2B du récepteur NMDA et l'auto-association de la CaMKII sont deux mécanismes qui pourraient contribuer à assurer la translocalisation synaptique de la CaMKII. J'ai étudié ces mécanismes avec des mutants de la CaMKII transfectés dans des cellules non-neuronales afin de comparer les propriétés de ces interactions avec les propriétés de la translocalisation de différents mutants de la CaMKII dans les neurones (Figure 14 tirée de Hudmon et al, 2005; Bayer et al, 2006).

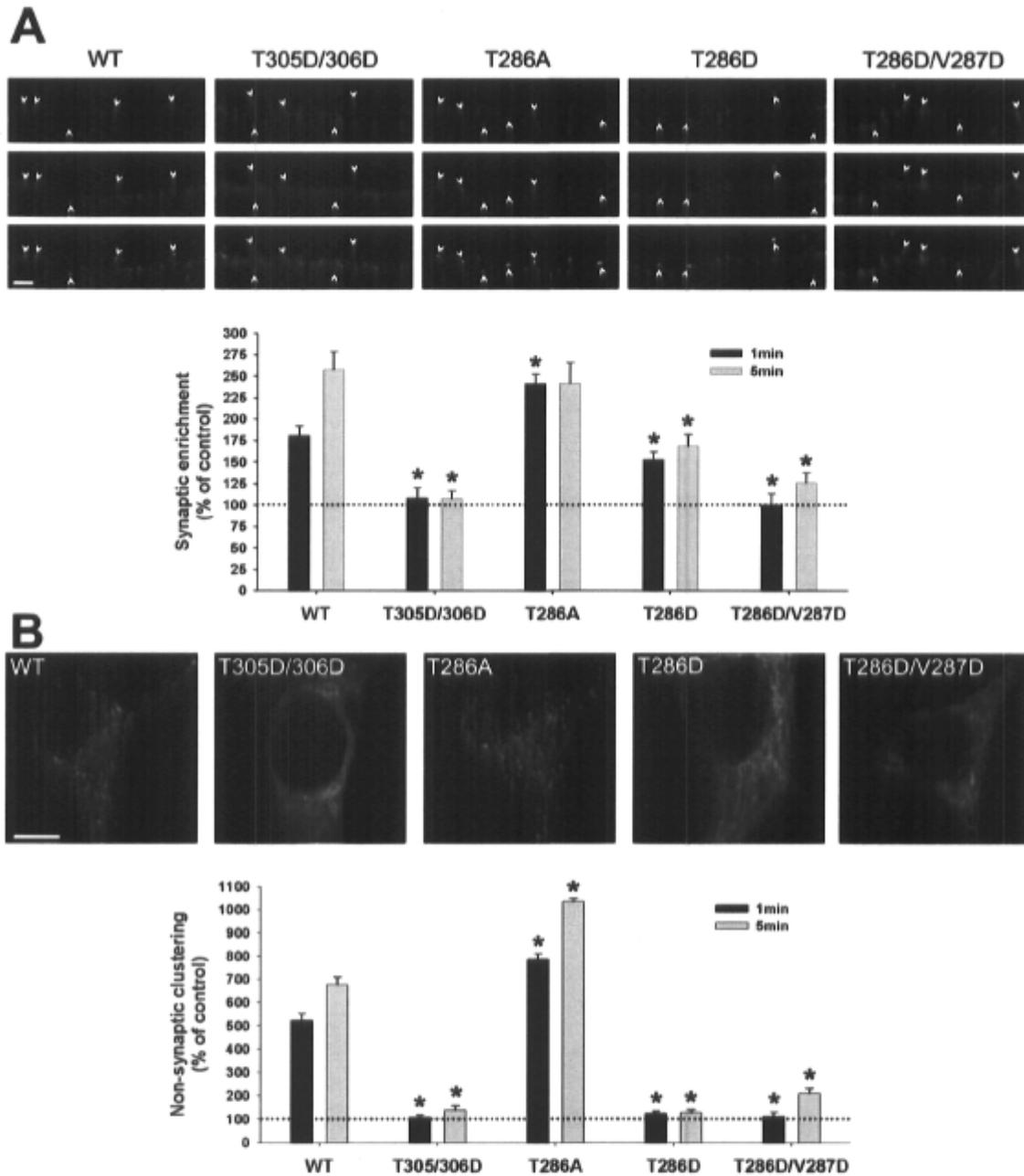


Figure 14 : Rôle de l'auto-association de la CaMKII dans sa translocalisation dépendante de l'activation des récepteurs NMDA. Des neurones en culture exprimant la GFP-CaMKII ont été stimulés pendant 1 ou 5 minutes avec un agoniste des récepteurs NMDA, immédiatement fixés et imagés. A) Images et quantification de la translocalisation de la CaMKII sauvage (WT) ou mutante (T305/306A, T286A, T286D, T286D/V287D) dans les épines dendritiques. B) Images et quantification de la translocalisation de la CaMKII sauvage (WT) ou mutante (T305/306A, T286A, T286D, T286D/V287D) dans le corps cellulaire. Cette figure a été publiée dans Hudmon et al., 2005.

La CaMKII possède la propriété de s'auto-phosphoryler à la T286, ce qui confère à l'enzyme une activité autonome indépendante de la liaison de Ca^{2+}/CaM . Mes expériences démontrent que cette auto-phosphorylation de la CaMKII (mutant T286D) n'empêche pas son interaction avec NR2B (Figure 2). Ce mutant peut également translocaliser dans les synapses, par contre de manière réduite par rapport à la CaMKII sauvage (Figure 14). En revanche, mes résultats démontrent que l'auto-association de la CaMKII est diminuée par l'autophosphorylation de la CaMKII (T286D) (Figure 4). Ce résultat pourrait expliquer que le mutant T286D translocalise à la synapse plus faiblement que la CaMKII sauvage (Figure 14) (Hudmon et al., 2005). Mais si l'autophosphorylation réduit sa translocalisation à la synapse, comment peut-on envisager qu'une CaMKII autonome (phosphorylée à T286) puisse être localisée dans la synapse? Cette question est pertinente, car la phosphorylation à la Th286 est capitale pour son action sur le remodelage synaptique (Lisman et al, 2002). Ma collègue Amélie Forest a par ailleurs clairement montré que la CaMKII synaptique est phosphorylée après stimulation par les récepteurs NMDA (A. Forest, 2006). Afin d'adresser cette question, j'ai regardé si les agrégats de CaMKII auto-associés dans les cellules HEK sont phosphorylés à la Thr286. En effet, au moins certaines sous-unités de la CaMKII sont phosphorylées dans les agrégats de CaMKII auto-associée (Figure 5), suggérant que leur auto-phosphorylation n'inhibe pas complètement l'auto-association d'holoenzymes CaMKII. En revanche, j'ai observé que le mutant T286D ne peut s'auto-associer. Ces résultats apparemment paradoxaux peuvent en fait s'expliquer de la façon suivante. Comme la CaMKII est multimérique, il suffit que plusieurs sous-unités ne soient pas auto-phosphorylées pour que l'auto-association puisse se produire. Ainsi le mutant T286A, qui ne peut s'auto-phosphoryler a montré une capacité beaucoup plus grande que la sauvage à l'auto-association (Figure 4). La forme sauvage s'auto-associerait donc moins que la T286A en raison de l'autophosphorylation de certaines sous-unités. La figure 14 montre une illustration présentée dans Hudmon et al (2005), illustrant notre modèle de l'auto-association.

Par la suite, nous avons vérifié si l'auto-phosphorylation de T286 de la CaMKII est nécessaire à l'interaction avec NR2B en utilisant le mutant incapable de s'autophosphoryler (T286A). Ce mutant peut interagir avec NR2B (Figure 2) et il peut également translocaliser dans les synapses (Figure 14), ce qui indique que l'auto-phosphorylation de T286 n'est pas nécessaire pour l'interaction à NR2B ou pour la translocalisation synaptique de la CaMKII. Nous avons également utilisé d'autres mutants pour déterminer les mécanismes moléculaires de l'interaction à NR2B et de l'auto-association de la CaMKII. Les résultats obtenus supportent l'hypothèse que ces deux formes d'interactions contribuent à l'accumulation synaptique de la CaMKII, suite à l'activation des récepteurs NMDA (Hudmon et al., 2005; Bayer et al., 2006). En effet, tous les mutants qui empêchent l'interaction à NR2B ou l'auto-association de la CaMKII diminuent la translocalisation de la CaMKII dans les synapses.

Étude de la mobilité de la CaMKII

La translocalisation synaptique de la CaMKII consiste en une accumulation de la CaMKII dans les épines dendritiques suite à l'activation des récepteurs NMDA. Cette accumulation synaptique de la CaMKII implique un changement de mobilité de l'enzyme suite à l'activation des récepteurs NMDA, de sorte qu'une fraction de l'enzyme demeure immobile dans l'épine. La deuxième partie de mon projet de maîtrise a consisté à étudier la mobilité de la CaMKII dans des neurones en culture à l'aide de la technique de microscopie confocale de *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP). Le FRAP permet de déterminer la fraction d'enzyme qui est immobilisée pour la durée de l'expérience et la vitesse (constante de temps) de diffusion de la CaMKII.

Mes premiers résultats montrent que le recouvrement de fluorescence varie beaucoup dans les neurones en fonction des différentes épines (Figure 6C). En effet, la configuration de l'épine limite la diffusion de la CaMKII par le passage dans un conduit étroit, le cou de l'épine. Or, le cou d'une épine peut être plus ou moins large et plus ou moins long, ce qui influence les échanges de CaMKII entre l'épine et la dendrite. J'ai essayé d'établir des corrélations entre la longueur du cou de l'épine et la constante de temps du FRAP. Mes résultats n'ont pas montré de corrélation nette entre les deux (résultats non

montrés). De plus, je n'ai pu établir de corrélation entre la quantité de CaMKII présente initialement dans l'épine et la constante de temps ou la fraction de CaMKII immobilisée (résultats non montrés). Ainsi, pour le reste de mes analyses, j'ai utilisé la moyenne de plusieurs expériences de FRAP sur des épines choisies au hasard et comparé différentes conditions.

Pour estimer le coefficient de diffusion d'une protéine dans une cellule, nous pouvons utiliser la relation de Stokes-Einstein ($D = k_B T / 6 \Pi \eta r$), qui stipule que le coefficient de diffusion est inversement proportionnel au rayon (r) de la protéine et à la viscosité du cytoplasme (η). Cette dépendance de la grosseur de la protéine sur sa diffusion, nous a amené à poser l'hypothèse que la GFP-CaMKII, par sa structure multimérique, doit avoir une diffusion beaucoup moins rapide qu'une GFP-CaMKII monomérique ou qu'une GFP seule. En effet, notre hypothèse s'est révélée vraie, puisque la GFP-CaMKII multimérique a une constante de temps beaucoup plus grande que celle de la GFP-CaMKII monomérique et celle de la GFP seule (Figure 8 et figure 9).

La morphologie compartimentée de l'épine limite la diffusion au passage des protéines par le cou de l'épine. Ainsi, nous avons vérifié que le recouvrement de fluorescence devrait être plus long dans l'épine que dans la dendrite. Effectivement, la constante de temps du recouvrement de fluorescence dans la dendrite est environ 7 fois plus petite que celle dans l'épine (Figure 8, 11 et 12). De plus, la fraction mobile est légèrement plus élevée dans la dendrite.

La question de l'effet de l'activation des récepteurs NMDA sur la mobilité de la CaMKII a par la suite été soulevée puisque cette activation cause la translocalisation synaptique de la CaMKII. Notre hypothèse était que l'activation des récepteurs NMDA cause une diminution de la mobilité de la CaMKII dans les épines en diminuant la fraction mobile et possiblement en ralentissant la diffusion de la CaMKII. Nos résultats ont, au départ, suggéré que notre hypothèse était fausse puisque les résultats obtenus démontrent que la fraction mobile ne change pas suite à l'activation des récepteurs NMDA (Figure 11). De plus, la constante de temps diminue suite à cette activation. Pour expliquer ces résultats nous avons posé deux hypothèses : 1- la fraction mobile ne diminue pas puisqu'une

quantité importante de CaMKII est déjà immobilisée à cause de l'activité spontanée des neurones en culture et 2- la constante de temps diminue à cause de changement morphologiques de l'épine suite à l'activation des récepteurs NMDA, ce qui accélère la diffusion des protéines à travers le cou de l'épine. Pour tester la première hypothèse, nous avons incubé les cultures de neurone avec un antagoniste des récepteurs NMDA (AP5) avant d'effectuer les expériences de FRAP. Cette incubation nous a permis de valider l'hypothèse voulant que l'activation des récepteurs NMDA diminue la mobilité de la CaMKII puisque pour ces conditions, la fraction mobile de la CaMKII a diminué suite à l'activation des récepteurs NMDA (Figure 11). La deuxième hypothèse a été testée en mesurant la mobilité de la GFP seule avant et après l'activation des récepteurs NMDA. Nous avons observé qu'effectivement la constante de temps pour la GFP seule diminue après l'activation des récepteurs NMDA, suggérant qu'un changement au niveau de l'épine pourrait être impliqué.

Quel serait le mécanisme d'immobilisation de la CaMKII dans l'épine? On peut penser que plusieurs interactions entre l'enzyme et ses cibles en sont responsables. Cependant, la plus probable serait celle avec le récepteur NR2B lui même, car notre équipe (Bayer et al, 2006) a montré que cette interaction peut se verrouiller *in vitro*, même après que le Ca^{2+} soit retiré.

Mes résultats montrent aussi que seule la forme multimérique de l'enzyme s'immobilise après stimulation des récepteurs NMDA. En effet, la forme monomérique demeure autant mobile dans ces conditions. Ces résultats suggèrent que les interactions multiples qu'un dodécamère peut avoir avec de nombreuses cibles augmentent significativement ses chances de se retrouver ancré. De plus, l'auto-association des multimères mènerait à de gros agrégats dont la mobilité dans l'épine s'avère largement réduite. De cette façon, la CaMKII pourrait former tout un échafaudage dans l'épine qui pourrait servir à recruter d'autres protéines synaptiques. En effet, la CaMKII interagit avec un très grand nombre de protéines (Colbran, 2004). Étant donné que la CaMKII auto-associée peut quand même être autophosphorylée, on peut penser que cet échafaudage d'enzyme serait catalytiquement actif, agissant ainsi sur ses cibles.

Nous avons également quantifié si l'activation des récepteurs NMDA modifie la mobilité de la CaMKII dans la dendrite. Contrairement à nos attentes, la fraction mobile de la CaMKII diminue de moitié lors de l'activation des récepteurs NMDA bien que la vitesse de diffusion ne change pas. Ceci suggère que des interactions pourraient également immobiliser la CaMKII dans la dendrite suite à l'activation des récepteurs NMDA. Donc, l'immobilisation de la CaMKII ne serait pas limitée à l'épine. On peut s'attendre à ce que des synapses sur le tronc des dendrites soient aussi présentes et que dans ces synapses la CaMKII soit aussi immobilisée. De plus, le récepteur NR2B pourrait verrouiller des CaMKII dans des synapses sur le tronc. D'autres cibles dendritiques sont possiblement impliquées. Mon collègue Eric LeBel a d'ailleurs montré que les microtubules interagissent aussi avec la CaMKII activée (résultats non publiés). Il sera intéressant de disséquer davantage le mécanisme d'ancrage synaptique versus non-synaptique de l'enzyme.

Conclusion

Le remodelage synaptique dépendant de l'activation des récepteurs NMDA est un processus qui semble être important pour la potentialisation ou la dépression synaptique dépendante de l'activité de la synapse (Collingridge et Bliss 1995). L'entrée de calcium associée à cette activation est un point de départ d'une multitude de voies de signalisation qui conduiront au remodelage synaptique. La CaMKII, qui est présente à la synapse, est activée par cette entrée de calcium, via la calmoduline. Or, en plus de l'activation des CaMKIIs présentes dans la synapse, l'entrée de calcium cause un recrutement synaptique de CaMKII additionnelle à partir des dendrites. Les résultats obtenus au cours de mon projet de maîtrise montrent que l'interaction de la CaMKII à NR2B et l'auto-association de la CaMKII sont deux phénomènes qui sont susceptibles de contribuer à la translocalisation synaptique de la CaMKII. De plus, mes résultats montrent comment la régulation de l'activation de la CaMKII peut participer à la régulation de ces interactions. Ce qui est particulièrement intéressant est que la translocalisation synaptique de la CaMKII n'est pas totalement réversible et qu'une fraction significative de l'enzyme demeure dans la synapse après sa stimulation. On peut penser que cette rétention de CaMKII dans la synapse serait un élément clé dans la signalisation qui mène aux changements plastiques à long-terme associés à l'activation des récepteurs NMDA (Lisman et al., 2002; Rongo, 2002). En effet, la rétention de la CaMKII dans la synapse la place à un endroit clé pour agir sur ses substrats synaptiques. De plus, l'enzyme s'y retrouve dans un mode partiellement autonome, par son autophosphorylation (Forest, 2006) et son interaction avec le récepteur NR2B (Bayer et al, 2001, 2006). Ainsi, il sera très intéressant de tester si cette rétention de l'enzyme à long-terme dans la synapse joue un rôle sur la plasticité synaptique.

Bibliographie:

- Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E, Webb WW. (1976) *Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics*. Biophys J. Sep;16(9):1055-69.
- Bayer K.U., De Koninck P., Leonard A.S., Hell J.W., Schulman H. (2001) *Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation*. Nature Jun 14;411(6839):801-5.
- Bayer K.U., LeBel E., McDonald G.L., O'Leary H., Schulman H., De Koninck P. (2006) *Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B*. J Neurosci. Jan 25;26(4):1164-74.
- Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (2001) *Neurosciences - À la découverte du cerveau*, Éditions Pradel, Chapitre 2, pp. 23-49.
- Bloodgood BL, Sabatini BL. (2005) *Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines*. Science. 2005 Nov 4;310(5749):866-9.
- Byrne, J.H. (2003) *Fundamental Neuroscience*, Academic Press, chapter Chapter 50: Learning and memory: Basic mechanisms, pp. 1275-1298.
- Colbran, R.J. (2004) *Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. Biochem J. Feb 15;378(Pt 1):1-16.
- Collingridge GL, Bliss TV. (1995) *Memories of NMDA receptors and LTP*. Trends Neurosci. 1995 Feb;18(2):54-6.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M. (2001) *NMDA receptor subunits: diversity, development and disease*. Curr Opin Neurobiol. Jun;11(3):327-35.
- Eichenbaum, H.B. (2003) *Fundamental Neuroscience*, Academic Press, chapter Chapter 51: Learning and memory:brain systems, pp. 1299-1327.
- Elgersma Y., Sweatt J.D., Giese K.P. (2004) *Mouse genetic approaches to investigating calcium/calmodulin-dependent protein kinase II function in plasticity and cognition*. J Neurosci. Sep 29;24(39):8410-5
- Forest A. (2006). Les mécanismes cellulaires et moléculaires du remodelage synaptique impliquant la protéine kinase Ca²⁺-CaM dépendante II, mémoire de maîtrise, Université Laval, #23500.
- Franks, K.M., Sejnowski, T.J. (2002) *Complexity of calcium signaling in synaptic spines*.

Bioessays. Dec;24(12):1130-44.

Freund TF, Buzsaki G. (1996) *Interneurons of the hippocampus*. *Hippocampus*. 1996;6(4):347-470.

Hanson PI, Schulman H. (1992) *Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis*. *J Biol Chem*. Aug 25;267(24):17216-24.

Hayashi Y., Majewska A.K. (2005) *Dendritic spine geometry: functional implication and regulation*. *Neuron*. May 19;46(4):529-32.

Hudmon A, Kim SA, Kolb SJ, Stoops JK, Waxham MN. (2001) *Light scattering and transmission electron microscopy studies reveal a mechanism for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II self-association*. *J Neurochem*. Mar;76(5):1364-75.

Hudmon A., Lebel E., Roy H., Sik A., Schulman H., Waxham M.N., De Koninck P. (2005) *A mechanism for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association*. *J Neurosci*. Jul 27;25(30):6971-83.

Hudmon A, Schulman H. (2002) *Neuronal CA²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function*. *Annu Rev Biochem*. 71:473-510

Hudmon A., Schulman H. (2002a) *Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*. *Biochem J*. Jun 15;364(Pt 3):593-611.

Husi, H., Ward, M.A., Choudhary, J.S., Blackstock, W.P., Grant, S.G. (2000) *Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes*. *Nat Neurosci*. Jul;3(7):661-9.

Lippman J., Dunaevsky A. (2005) *Dendritic spine morphogenesis and plasticity*. *J Neurobiol*. Jul;64(1):47-57.

Lisman J, Schulman H, Cline H. (2002) *The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory*. *Nat Rev Neurosci*. Mar;3(3):175-90.

Mukherji S, Soderling TR. (1994) *Mutational analysis of Ca(2+)-independent autophosphorylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. *J Biol Chem*. Jun 9;270(23):14062-7.

Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., Svoboda, K. (2002) *Structure and function of dendritic spines*. *Annu Rev Physiol*. 64:313-53.

Otmakhov N, Tao-Cheng JH, Carpenter S, Asrican B, Dosemeci A, Reese TS, Lisman J. (2004) *Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in*

- dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation.* J Neurosci. Oct 20;24(42):9324-31.
- Pin, J.P., Acher, F. (2002) *The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology.* Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. Jun;1(3):297-317
- Reits EA, Neefjes JJ. (2001) *From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells.* Nat Cell Biol. 2001 Jun;3(6):E145-7.
- Rongo C. (2002) *A fresh look at the role of CaMKII in hippocampal synaptic plasticity and memory.* Bioessays. 2002 Mar;24(3):223-33.
- Rosenberg O.S., Deindl S., Sung R.J., Nairn A.C., Kuriyan J. (2005) *Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme.* Cell. Dec 2;123(5):849-60.
- Sabatini, B.L., Maravall, M., Svoboda, K. (2001) *Ca(2+) signaling in dendritic spines.* Curr Opin Neurobiol. Jun;11(3):349-56.
- Scannevin RH, Huganir RL. (2000) *Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses.* Nat Rev Neurosci. Nov;1(2):133-41.
- Shen K, Meyer T. (1999) *Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation.* Science. Apr 2;284(5411):162-6.
- Sheng, M, Pak, D.T. (2000) *Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins.* Annu Rev Physiol. 62:755-78.
- Smith BA, Roy H, De Koninck P, Grutter P, De Koninck Y. (2007) *Dendritic spine viscoelasticity and soft-glassy nature: balancing dynamic remodeling with structural stability.* Biophys J. 2007 Feb 15;92(4):1419-30.
- Sprague BL, McNally JG. (2005) *FRAP analysis of binding: proper and fitting.* Trends Cell Biol. Feb;15(2):84-91.
- Sprague BL, Pego RL, Stavreva DA, McNally JG. (2004) *Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching.* Biophys J. Jun;86(6):3473-95.
- Soderling, T.R., Chang, B., Brickey, D. (2001) *Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II.* J Biol Chem. Feb 9;276(6):3719-22.
- Soumpasis DM. (1983) *Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments.* Biophys J. 1983 Jan;41(1):95-7.
- Tsay, D., Yuste, R. (2004) *On the electrical function of dendritic spines.* Trends Neurosci. Feb;27(2):77-83.

Verkman AS. (2002) *Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments*. Trends Biochem Sci. Jan;27(1):27-33.

Yang E, Schulman H. (1999) *Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. J Biol Chem. Sep 10;274(37):26199-208.

Zucker, R.S. (1999) *Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity*. Curr Opin Neurobiol. Jun;9(3):305-13.