

## Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract .....	iii
Remerciements.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des figures .....	viii
Abréviations.....	xi
1 Introduction.....	1
1.1 Du neurone à la synapse.....	1
1.2 La transmission synaptique .....	4
1.3 L'épine dendritique et la densité postsynaptique .....	6
1.4 Les récepteurs membranaires.....	7
1.5 Régulation de la transmission synaptique excitatrice .....	11
1.6 Diffusion latérale et variation du nombre de récepteurs synaptiques .....	25
1.7 Conclusion .....	35
2 Suivi de molécules uniques : développement et applications aux récepteurs membranaires.....	39
2.1 Introduction.....	39
2.2 Matériel et méthodes.....	39
2.3 La méthode de suivi de molécules uniques.....	42
2.4 Application aux récepteurs AMPA .....	65
2.5 Discussion .....	70
2.6 Conclusion .....	72
3 La CaMKII immobilise les récepteurs AMPA aux synapses par la phosphorylation de stargazine .....	74
3.1 Avant-propos.....	74
3.2 Summary .....	80
3.3 Introduction.....	80
3.4 Experimental Procedures .....	82
3.5 Results.....	86

3.6	Discussion .....	103
3.7	References .....	109
3.8	Supplemental Material .....	115
4	Le rôle différentiel de la $\alpha$ CaMKII et de la $\beta$ CaMKII dans l'adressage des récepteurs AMPA aux synapses durant la plasticité synaptique .....	130
4.1	Introduction .....	130
4.2	Matériel et méthodes .....	132
4.3	Résultats .....	135
4.4	Discussion .....	148
4.5	Conclusion .....	155
4.6	Bibliographie .....	155
5	Étude du rôle de la CaMKII dans l'exocytose des récepteurs AMPA .....	158
5.1	Avant-propos .....	158
5.2	Introduction .....	158
5.3	Matériel et méthodes .....	159
5.4	Résultats .....	160
5.5	Discussion .....	170
5.6	Conclusion .....	171
6	Discussion générale .....	172
7	Conclusion .....	186
8	Bibliographie .....	187

## Liste des figures

FIGURE 1.1 : DESSINS EFFECTUÉS PAR CAJAL SUR DIFFÉRENTES STRUCTURES DU CERVEAU .....	2
FIGURE 1.2 : UTILISATION DE LA FLUORESCENCE POUR VISUALISER LES NEURONES .....	3
FIGURE 1.3 : DU NEURONE À LA SYNAPSE .....	4
FIGURE 1.4 : TRANSMISSION SYNAPTIQUE. ....	5
FIGURE 1.5 : PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA DENSITÉ POSTSYNAPTIQUE. ....	7
FIGURE 1.6 : RÉCEPTEURS AU GLUTAMATE .....	8
FIGURE 1.7 : EXPÉRIENCE TYPIQUE DE LTP .....	12
FIGURE 1.8 : INDUCTION DE LA LTP PAR LE RÉCEPTEUR NMDA. ....	13
FIGURE 1.9 : PROPRIÉTÉS DE LA CAMKII.....	16
FIGURE 1.10 : RÉCEPTEUR AMPA ET LES SITES DE PHOSPHORYLATION.....	21
FIGURE 1.11 : MODÈLE DE MOSAÏQUE FLUIDE. ....	26
FIGURE 1.12 : MODES DE DIFFUSION LATÉRALE À LA SURFACE CELLULAIRE. ....	28
FIGURE 1.13 : DIFFUSION MEMBRANAIRE DES RÉCEPTEURS AMPA.....	31
FIGURE 1.14 : LA SYNAPSE EN MOUVEMENT. ....	35
FIGURE 2.1 : SCHÉMA EXPÉRIMENTAL .....	41
FIGURE 2.2 : LES DIFFÉRENTES ÉTIQUETTES UTILISÉES DANS LE SUIVI DE MOLÉCULES UNIQUES.....	43
FIGURE 2.3 : PROPRIÉTÉS DES POINTS QUANTIQUES. ....	46
FIGURE 2.4 : EFFET DE LA TAILLE DE L'ÉTIQUETTE.....	48
FIGURE 2.5 : UTILISATION D'UNE PIPETTE POUR MARQUER LES RÉCEPTEURS. ....	51
FIGURE 2.6 : DIAGRAMME SCHÉMATIQUE DES ÉTAPES IMPLIQUÉES DANS LE SPT. ....	53
FIGURE 2.7 : ALGORITHME DE DÉTECTION DES QD. ....	55
FIGURE 2.8 : EXEMPLE DE QD UNIQUE ET RÉGRESSION GAUSSIENNE POUR LA LOCALISATION DE LA PROTÉINE ASSOCIÉE. ....	57
FIGURE 2.9 : CALIBRATION ET CALCUL DE RÉOLUTION SUR LA LOCALISATION DES QD UNIQUES SUR CELLULES VIVANTES.....	59
FIGURE 2.10 : EXEMPLES DE TRAJECTOIRES .....	61
FIGURE 2.11 : TRAJECTOIRES ET COURBES DE MSD. ....	63
FIGURE 2.12 : MARQUAGE PRÉSYNAPTICQUE DE SYNAPSES.....	66
FIGURE 2.13 : MARQUAGE POSTSYNAPTICQUE. ....	67
FIGURE 2.14 : SPÉCIFICITÉ DU MARQUAGE. ....	68
FIGURE 2.15 : EXEMPLE D'ANALYSE DE QD. ....	69

FIGURE 2.16 : LA DIFFUSION DES RÉCEPTEURS AUX SYNAPSES .....	70
FIGURE 3.1 : LA STIMULATION CLTP DÉCLENCHÉ L'ACCUMULATION DES RÉCEPTEURS AMPA AUX SYNAPSES. .....	75
FIGURE 3.2 : CORRÉLATION ENTRE L'AUGMENTATION DE LA FLUORESCENCE DE GLUA1-SEP AUX SYNAPSES ET L'IMMOBILISATION D'UN RÉCEPTEUR SUITE À LA CLTP. ....	76
FIGURE 3.3 : EXEMPLE DE PLUSIEURS TRAJECTOIRES SYNAPTIQUES DES RÉCEPTEURS AMPA AVANT, PENDANT ET APRÈS LA CLTP .....	77
FIGURE 3.4 : CAMKII TRANSLOCATION PROMOTES THE DIFFUSIONAL TRAPPING OF AMPARS.....	88
FIGURE 3.5 : ENDOGENOUS CAMKII ACTIVATION TRIGGERS AMPAR SURFACE IMMOBILIZATION. ....	91
FIGURE 3.6 : CAMKII MEDIATES THE ACTIVITY-DEPENDENT IMMOBILIZATION OF AMPARS.....	94
FIGURE 3.7 : OVEREXPRESSION OF CONSTITUTIVELY ACTIVE CAMKII PROMOTES THE IMMOBILIZATION OF AMPARS CONTAINING THE GLUA1 AND GLUA2 SUBUNITS. ....	96
FIGURE 3.8 : CAMKII IMMOBILIZES AMPARS THROUGH STARGAZIN. ....	98
FIGURE 3.9 : CAMKII MODULATION OF PAIRED-PULSE DEPRESSION OF EPSCS IN MONOSYNAPTICALLY CONNECTED CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS.....	102
FIGURE 3.10 : MODEL OF NMDA RECEPTOR-DEPENDENT TRAPPING OF LATERALLY DIFFUSING AMPARS. .	103
FIGURE 3.11 (S1) : AMPARS ARE NOT TRAPPED AT SYNAPSES WITH FAILED ACAMKII::GFP TRANSLOCATION. .....	117
FIGURE 3.12 (S2) : CLTP STIMULATION TRIGGERS THE SIMULTANEOUS IMMOBILISATION AND ACCUMULATION OF AMPARS AT SYNAPSES .....	119
FIGURE 3.13 (S3) : HIGH FREQUENCY STIMULATION (HFS) PROMOTES THE SYNAPTIC TRANSLOCATION OF ACAMKII::GFP. ....	121
FIGURE 3.14 (S4) : ENDOGENOUS PSD95 IS PRESENT AT BOTH EXTRASYNAPTIC AND SYNAPTIC SITES. ....	122
FIGURE 3.15 (S5) : OVER EXPRESSION OF CONSTITUTIVELY ACTIVE CAMKII HAS NO EFFECT ON RECOMBINANT GLUA2-AMPARS.....	123
FIGURE 3.16 (S6) : OVER EXPRESSION OF CONSTITUTIVELY ACTIVE CAMKII IMMOBILIZES AMPARS BUT NOT GABARS .....	124
FIGURE 4. 1: EFFICACITÉ DES SHRNA ET DES RESCUES. ....	137
FIGURE 4.2: DIFFÉRENTS EFFETS DES ISOFORMES A/B SUR LA DIFFUSION SYNAPTIQUE DES RÉCEPTEURS AMPA.....	138
FIGURE 4.3: EFFETS DIFFÉRENTIELS D'ACAMKII ET BCAMKII SUR LA DIFFUSION SYNAPTIQUE DES RÉCEPTEURS AMPA.....	140

FIGURE 4.4 : LA BCAMKII EST REQUISE POUR L'IMMOBILISATION DES RÉCEPTEURS AMPA AUX SYNAPSES. 142	
FIGURE 4.5 : EFFET DIFFÉRENTIEL DES ISOFORMES A/B DE LA CAMKII SUR LA MOBILITÉ DES RÉCEPTEURS AMPA AUX SYNAPSES. LA BCAMKII EST REQUISE POUR L'IMMOBILISATION DES RÉCEPTEURS AMPA AUX SYNAPSES. ....144	144
FIGURE 4.6 : LA CAMKII EST REQUISE POUR L'IMMOBILISATION DES RÉCEPTEURS AUX SYNAPSES. ....146	146
FIGURE 4.7 : LA RÉDUCTION DU NOMBRE DE BCAMKII RÉDUIT LA MATURATION DES ÉPINES DENDRITIQUES ET AUGMENTE LA LONGUEUR DES PROTRUSIONS FILOPODIALES. ....148	148
FIGURE 4.8 : MODÈLE DES DIFFÉRENTS MODES D'ACTION DE L'ACAMKII ET DE LA BCAMKII. ....153	153
FIGURE 5.1 : TRANSLOCATION DE L'ACAMKII À DES SITES DENDRITIQUES PRÈS DE SYNAPSES DÉPENDANT DE L'ACTIVITÉ. ....161	161
FIGURE 5.2 : LA TRANSLOCATION DENDRITIQUE DE L'ACAMKII EST CORRÉLÉE AVEC UNE AUGMENTATION DE GLUA1 DE SURFACE AUX SITES POSTSYNAPTiques. ....162	162
FIGURE 5.3 : LE REMPLACEMENT DE L'ACAMKII PAR LE MUTANT E96K EMPÊCHE L'AUGMENTATION DE L'INSERTION DE GLUA1 DE SURFACE AUX SYNAPSES PENDANT L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE. ....164	164
FIGURE 5.4 : PRINCIPE ET EXEMPLES D'EXOCYTOSE DE GLUA1-SEP AUX DENDRITES DE NEURONES. ....165	165
FIGURE 5.5 : SCHÉMA DE L'ALGORITHME DE DÉTECTION DE L'EXOCYTOSE. ....167	167
FIGURE 5.6 : RÉGULATION DE L'EXOCYTOSE GLUA1-SEP PAR LA CAMKII. ....169	169
FIGURE 6.1 : COMPARAISON DES MÉTHODES OPTIQUES UTILISÉES POUR QUANTIFIER LA MOBILITÉ DES PROTÉINES DANS LES NEURONES .....173	173
FIGURE 6.2 : LE SPT-PALM .....179	179
FIGURE 6.3 : SCHÉMA DE L'INSTALLATION EXPÉRIMENTALE POUR LE UPAIN. ....180	180
FIGURE 6.4 : MODÈLE POUR LA PHOSPHORYLATION DES TARP (STARGAZINE) .....182	182
FIGURE 6.5 : RÉGULATION DES RÉCEPTEURS AMPA PENDANT LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE. ....183	183

## Abréviations

AMPA:  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionic Acid

AMPA:  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionic Acid Receptor

BSA: Bovine Serum Albumin

CAMKII: Calmodulin dependent Kinase II

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

CCD: Charge Coupled Device

FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy

FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching

GluR: Glutamatergic Receptor

GFP: Green Fluorescent Protein

LTP/LTD: Long Term Potentiation/Depression

MSD: Mean Squared Displacement

NA: Numerical Aperture

NMDA: N-Methyl-D-aspartic Acid

NMDAR: N-Methyl-D-aspartic Acid Receptor

PSD: Post-Synaptic Density

PSD95: Postsynaptic Density Protein 95

QD: Quantum Dot

rAMPA: Récepteur AMPA

SEP: Super Ecliptic Phluorin

SMT: Single-Molecule Tracking

SPT: Single-Particle Tracking

SNC: Système nerveux central

# 1 Introduction

## 1.1 Du neurone à la synapse

Avant les années 1900, les scientifiques considéraient le cerveau comme une masse de tissu uniforme. Il était généralement admis que le système nerveux était constitué d'un maillage fusionné ne comportant pas de cellules isolées. Cependant, c'est en utilisant une nouvelle méthode de marquage des neurones développée par le neuropathologiste italien Camillo Golgi que Ramon y Cajal énonça un nouveau concept de théorie neuronale. Le marquage de Golgi permet de marquer aléatoirement quelques cellules au travers du cerveau permettant d'isoler et de contraster un neurone dans son réseau. C'est ainsi qu'en utilisant cette méthodologie que Cajal a pu observer les neurones individuellement car le marquage de Golgi révèle toute l'arborisation de la cellule dans l'échantillon. Cajal a déduit que le cerveau est en fait constitué de cellules discrètes interconnectées. Ses travaux neuro-anatomiques lui ont permis d'énoncer la doctrine du neurone, qui stipule que chaque neurone est une entité individuelle ayant son propre métabolisme et grandit indépendamment des autres; que le neurone peut être divisé en trois parties : un axone à une extrémité, un corps cellulaire et des dendrites à l'autre extrémité; que le signal dans le neurone se propage des dendrites jusqu'à l'axone. Cajal a énoncé que l'échange d'information se fait par contact discret situé en un endroit : la synapse. Il fit ses déductions par l'observation de la morphologie des neurones sous son microscope et il obtint le prix Nobel de médecine en 1906. La figure 1 montre des structures du cerveau dessinées à la main par Cajal; on peut déjà y remarquer l'incroyable complexité des connexions entre les neurones.

Tectum optique    Cortex frontal    Hippocampe

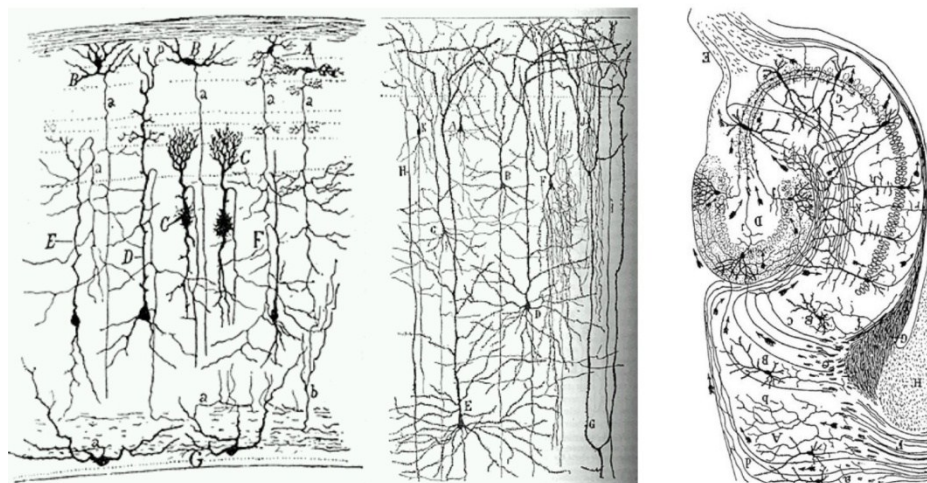


Figure 1.1 : Dessins effectués par Cajal sur différentes structures du cerveau (Ramon y Cajal web).

Aujourd'hui, les neuroscientifiques utilisent des techniques plus évoluées pour étudier les neurones. Cependant, comme Cajal, la stratégie de marquer un neurone individuel dans son réseau reste toujours présente. La solution de nitrate d'argent a été remplacée par des marqueurs fluorescents. L'utilisation de la fluorescence est très populaire, car jumelée à la génétique et aux anticorps, elle permet de marquer et d'isoler des types spécifiques de neurones dans une structure; elle permet aussi de visualiser des protéines propres aux différents compartiments cellulaires. Dans la figure 1.2, le panneau A montre une tranche d'hippocampe dont les neurones sont marqués à l'aide de la GFP. Les panneaux B-C nous montrent un montage de divers marqueurs neuronaux. Les différentes couleurs de fluorescence nous permettent d'identifier des neurones en leur attribuant un canal de fluorescence à chaque type cellulaire. Dans l'exemple au panneau C, les neurones sont en vert, les noyaux de cellules sont en bleu et une protéine intracellulaire (la CaMKII) est en rouge.



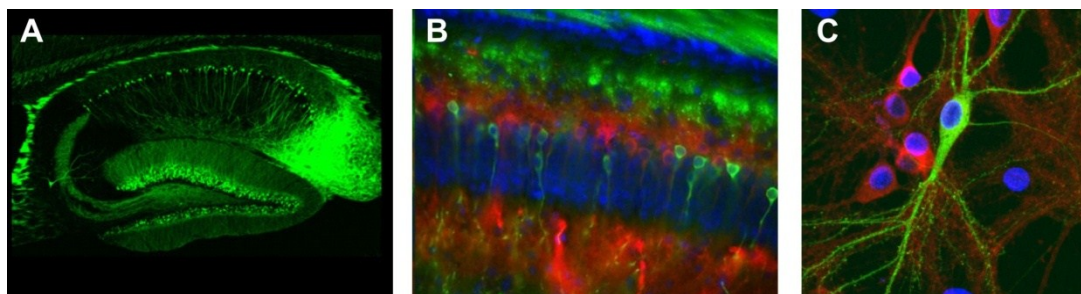


Figure 1.2 : Utilisation de la fluorescence pour visualiser les neurones **(A)** Tranche d'hippocampe exprimant la YFP (K. Murai). **(B)** Expressions de GFP-tau et CAMKII dans un hippocampe de souris région du CA1 (Hoerder-Suabedissen, Jacobs, Campagnoni et Molnar, Oxford Neurosciences). **(C)** Neurones de culture d'hippocampe. Les cellules sont marquées en rouge pour la CaMKII et en bleu pour les noyaux. L'expression de la GFP permet d'isoler un neurone pour l'étude de protéines spécifiques (Labrecque, Lemelin, De Koninck).

Les travaux récents ont permis de démontrer la directionnalité de la synapse tel qu'il a été prédit par Cajal, soit que le transfert d'information se fait à partir des terminaisons axonales vers les épines dendritiques pour ensuite être intégré au corps cellulaire et envoyé vers un autre neurone par l'axone. Il existe plusieurs types de synapses; elle est soit chimique ou électrique, excitatrice ou inhibitrice. Ce n'est cependant que vers les années 1950, avec l'arrivée de la microscopie électronique, qu'il fut possible de vérifier ces théories. Cette avancée technologique a permis entre autres de révéler la structure fine de la synapse chimique excitatrice, soit le terminal présynaptique, les vésicules remplies de neurotransmetteurs, la fente synaptique, la membrane postsynaptique, la densité postsynaptique, les épines et les filaments du cytosquelette (figure 1.3).

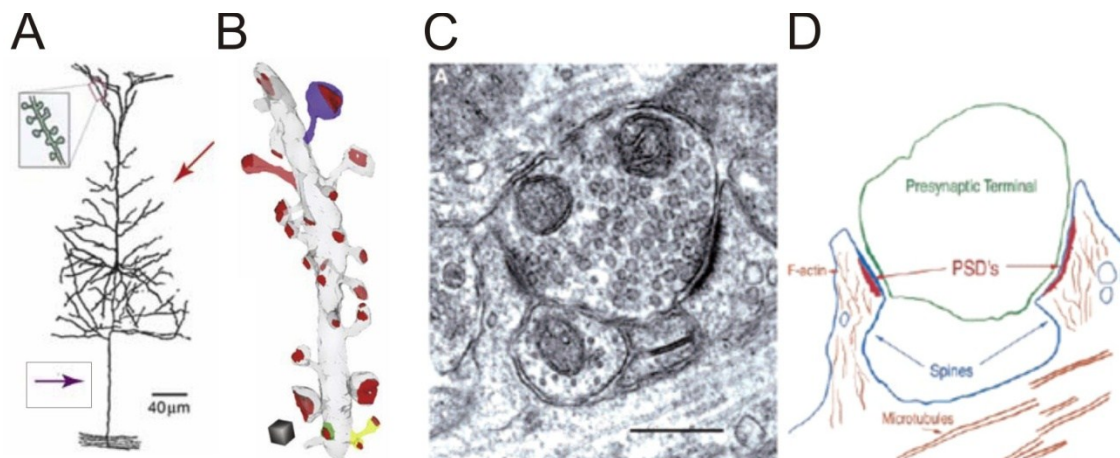


Figure 1.3 : Du neurone à la synapse (Kennedy 2000; Newpher and Ehlers 2009) **(A)** Tracé d'un neurone pyramidal du cortex marqué par la technique de Golgi, adapté de Ramon y Cajal, 1911. La flèche rouge indique les dendrites du neurone où se retrouvent les épines (insertion en haut à gauche) qui reçoivent les entrées présynaptiques. La flèche mauve indique l'axone du neurone qui émerge du corps cellulaire, celui-ci transporte le potentiel d'action pour contacter les neurones postsynaptiques. Barre = 40 μm. **(B)** Rendu 3D d'une dendrite de neurone d'hippocampe reconstruit à partir d'une série de sections de micrographie électronique, démontrant la variabilité de la morphologie des épines. À partir du haut, une épine en forme de champignon (mauve), une épine allongée (thin) (rouge) et stubby (vert), et une épine double (jaune). La géométrie des épines a un effet important sur la force de la synapse. Cube = 1 μm<sup>3</sup>. **(C)** Section unitaire en microscopie électronique de la synapse. Il est possible d'en discerner les éléments essentiels. Barre = 400 nm. **(D)** Schéma de cette même synapse. Les dendrites contiennent des microtubules qui permettent le transport des protéines du corps cellulaire.

Dans ce projet de doctorat, j'ai étudié les mécanismes moléculaires de la synapse chimique excitatrice impliqués dans l'apprentissage et la mémoire. La transmission synaptique et sa régulation constituent le champ de recherche de mon projet de doctorat. Regardons premièrement par quels moyens les neurones transmettent de l'information de l'un à l'autre.

## 1.2 La transmission synaptique

Il est bien connu que les neurones propagent l'information par un phénomène électrique. Les neurones du cerveau baignent dans un milieu aqueux composé d'ions, l'échange de chaque côté de la membrane cellulaire génère des courants d'où l'électricité du neurone. Cet échange engendre un signal électrique transitoire produit par une altération

des propriétés électriques de la membrane que l'on a qualifié de potentiel d'action (Hodgkin and Huxley 1945). Le potentiel d'action sert à propager l'information à travers un neurone; cependant, la plus grande partie de la transmission et de l'intégration du signal d'un neurone à un autre se fait dans la synapse. Regardons par quels procédés la synapse excitatrice ionotropique fait le relais entre deux neurones en transformant le signal électrique en signal chimique afin d'intégrer l'information.

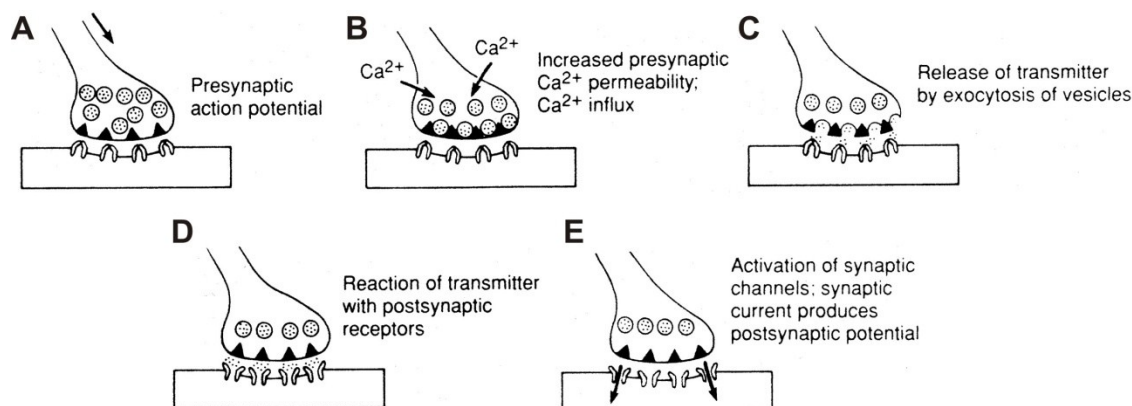


Figure 1.4 : Transmission synaptique. Le potentiel d'action déclenche l'entrée de calcium dans le bouton présynaptique et la libération de neurotransmetteur dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs activent les canaux postsynaptiques et génèrent les courants permettant l'échange d'information (Adapté de Ben Best : Learning, Memory and Plasticity).

L'arrivée du potentiel d'action au bouton présynaptique dépolarise la membrane et permet aux canaux calciques dépendants du voltage de s'ouvrir, créant ainsi un influx de calcium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire (Calakos and Scheller 1996). L'augmentation de la concentration de calcium déclenche la fusion des vésicules chargées de neurotransmetteurs à la membrane (figure 1.4). Par la suite, il y a exocytose des vésicules présynaptiques et un relâchement subséquent des neurotransmetteurs. Ceux-ci se propagent dans la fente synaptique et se lient aux récepteurs sur la membrane postsynaptique. La liaison entre le récepteur et le neurotransmetteur ouvre le pore du récepteur et permet l'échange d'ions de chaque côté de la membrane cellulaire. Finalement, une activation suffisante des récepteurs postsynaptiques entraîne une dépolarisation de la membrane menant à un autre potentiel d'action. Les synapses excitatrices possèdent un compartiment postsynaptique, une protubérance de la membrane en forme d'épine (figure 1.3b) dont l'extrémité est riche en récepteurs à neurotransmetteurs, c'est à cet endroit que

se produit la première intégration du signal. L'épine contient une multitude de protéines dont l'activation, la localisation et l'association avec des partenaires sont régulées par l'activité synaptique. Voyons brièvement les composants de l'épine postsynaptique.

### **1.3 L'épine dendritique et la densité postsynaptique**

Les épines se retrouvent sur plus de 90 % des synapses excitatrices du système nerveux central (Harris and Kater 1994). Ils se présentent comme une extrusion de la dendrite qui peut mesurer de 1 à 3  $\mu\text{m}$  de long et moins de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre (Kennedy 2000). Les épines se présentent généralement sous la forme d'un champignon. Elles possèdent un petit cou qui émerge de la dendrite et se terminent par une tête plus large pourvue d'une synapse (figure 1.3). On y retrouve plusieurs types de protéines et elles servent de compartiment biochimique qui intègre le signal transmis. À l'extrémité supérieure de l'épine, se trouve une bande plus foncée, bien visible au microscope électronique (figure 1.3c), caractéristique d'une très forte concentration de protéines nommée la densité postsynaptique (PSD).

Composée d'une multitude de protéines régulatrices, la PSD est une spécialisation du cytosquelette à la jonction synaptique. Elle repose sous la membrane postsynaptique jouxté à la zone active de la synapse et des vésicules arrimées au terminal présynaptique (Ziff 1997). La PSD a la forme d'un disque et elle joue un rôle fonctionnel, car certaines protéines font contact avec le domaine cytoplasmique des canaux ioniques de la membrane postsynaptique (figures 1.4 et 1.5). La PSD est située directement dans la voie des flux ioniques intracellulaires et de la cascade des seconds messagers générée par les neurotransmetteurs. La PSD fournit une matrice structurale qui rassemble les canaux ioniques dans la membrane postsynaptique et ancre les molécules de signalisation telles les kinases et les phosphatases à la synapse (Kennedy 2000). Ces propriétés suggèrent que la PSD constitue un site de régulation de la machinerie de transduction de signal, qu'elle relie les molécules régulatrices à leurs cibles, qu'elle coordonne les changements développementaux et qu'elle structure les changements dépendants de l'activité (Ziff 1997). La PSD joue un rôle très important dans la transmission synaptique.

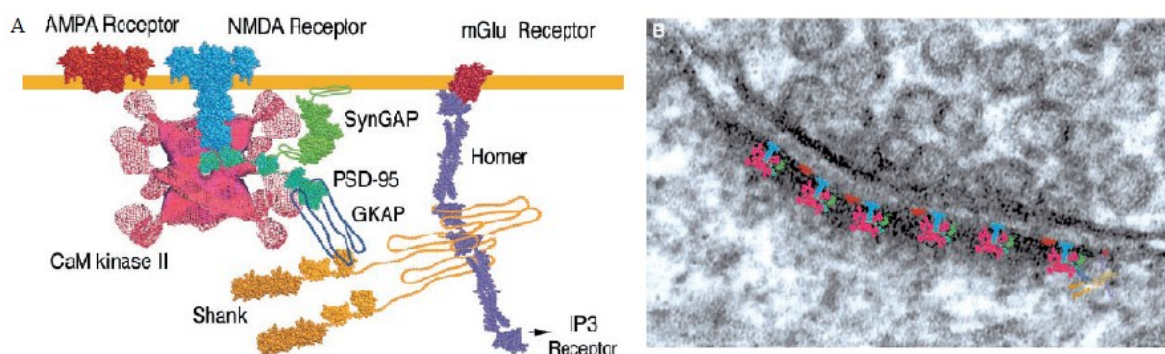


Figure 1.5 : Protéines impliquées dans la densité postsynaptique. **(A)** Différents types de protéines dans la densité postsynaptique. **(B)** Superposition à l'échelle des protéines du schéma (A) sur une PSD de 400 nm de diamètre. On remarque qu'elles s'insèrent facilement dans la PSD et qu'il reste encore de la place pour d'autres protéines (Kennedy 2000).

Après avoir fait la revue des principales composantes de la synapse, nous allons nous attarder aux récepteurs synaptiques glutamatergiques puisqu'ils sont l'élément central de ce projet de doctorat. Afin de bien comprendre les interactions de ceux-ci avec les protéines de la PSD, la prochaine section traitera de leurs structures et de leurs propriétés biophysiques.

## 1.4 Les récepteurs membranaires

Il existe deux types de récepteurs : les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques. Les récepteurs ionotropiques sont essentiellement présents dans le système nerveux; on les appelle aussi récepteurs ligands dépendants ou récepteurs canaux. Ce sont des récepteurs pour les neurotransmetteurs. Ils sont composés de plusieurs sous-unités protéiques qui délimitent un canal au travers de la membrane plasmique. La liaison avec le neurotransmetteur entraîne l'ouverture du canal transmembranaire perméable aux ions, changeant ainsi le potentiel de membrane. Ces modifications quasi immédiates de l'état de charge électrique de la membrane plasmique jouent sur l'excitabilité de la cellule cible.

Les récepteurs métabotropiques sont plus largement distribués dans l'organisme et concernent la réception des signaux véhiculés par la plupart des ligands

(neurotransmetteurs, hormones, facteurs trophiques, etc.). Ce sont des protéines transmembranaires dont la structure ne délimite pas de canaux ioniques mais qui, au niveau de leurs faces intracellulaires, s'associent avec d'autres protéines qui constituent un système de réaction en chaîne : le système de transduction. Celui-ci assure donc la transduction du message extracellulaire, c'est-à-dire la transmission du signal au travers de la membrane puis sa traduction en un nouveau messenger intracellulaire qui engendre une réponse physiologique de la cellule.

Dans cette section, nous allons nous concentrer sur les récepteurs ionotropiques (figure 1.6). Les trois types de récepteurs ionotropiques portent le nom de leur agoniste le plus sélectif : i) le récepteur AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate) (rAMPA); ii) le récepteur kaïnate; iii) le récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (rNMDA). Les deux premiers types sont également qualifiés de non-NMDA par opposition au dernier. Ce sont des récepteurs canaux perméables aux cations qui ont chacun leurs propriétés cinétiques, leur perméabilité au calcium ainsi que leur modulation par des composés endogènes autres que le glutamate.

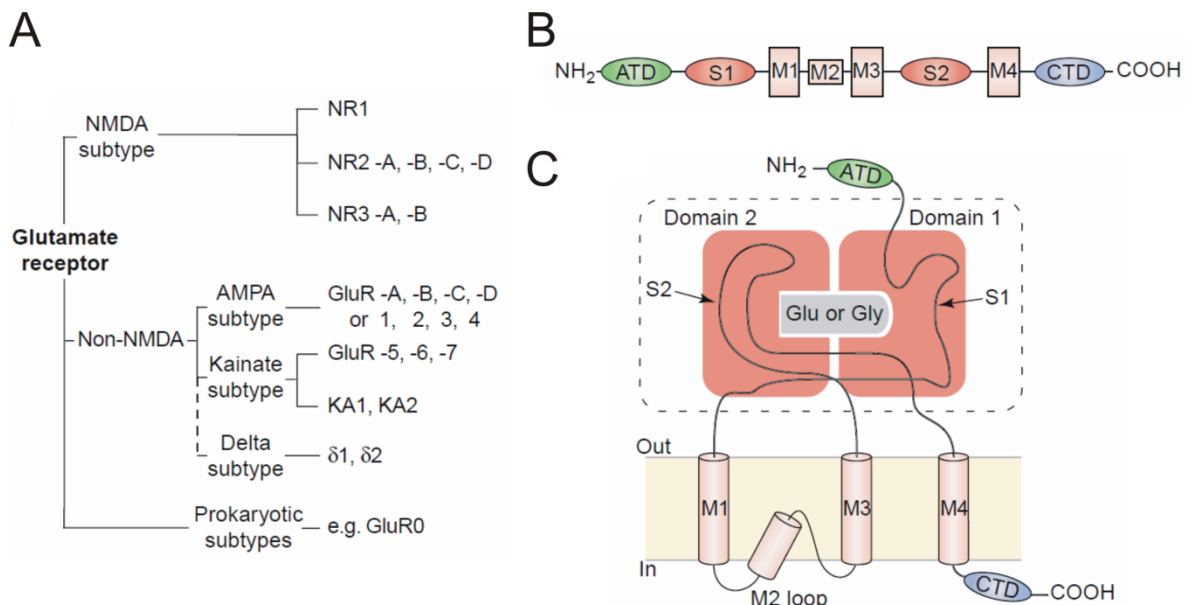


Figure 1.6 : Récepteurs au glutamate (A) Les différents types (B) Sous-unité déroulée (C) Topologie membranaire de la sous-unité (Wollmuth and Sobolevsky 2004)

Les sous-unités entrant dans la composition des rAMPA sont synthétisées à partir de quatre gènes qui encodent pour quatre sous-unités GluA1-4 ayant une homologie de séquence de près de 70 % (Collingridge, Isaac et al. 2004). Deux techniques ont permis de révéler la distribution des rAMPA dans le cerveau : la technique d'hybridation *in situ* qui localise une séquence de nucléotides connue d'ARN ou d'ADN sur une coupe histologique de tissu, et l'immunocytochimie en fluorescence qui utilise des anticorps dirigés contre les sous-unités GluA1-4. Ces travaux ont démontré que l'on retrouve des récepteurs dans presque toutes les régions du cerveau suggérant ainsi leur rôle clé dans la transmission synaptique. Les sous-unités GluA1 à GluA3 sont enrichies dans les couches externes du cortex, l'hippocampe, les régions olfactives, les ganglions de la base, le septum latéral et l'amygdale. La sous-unité GluA4 est aussi présente dans le SNC, mais à des niveaux d'expression plus faibles, excepté dans le noyau réticulaire thalamique et le cervelet où la sous-unité est abondante (Santos, Carvalho et al. 2009).

Les sous-unités GluA1-4 du rAMPA se combinent en tétramères de différentes stœchiométries qui déterminent la fonction du canal tel leur désensibilisation, la conductance (Ozawa, Kamiya et al. 1998) et leur adressage aux synapses (Malinow, Mainen et al. 2000). Les rAMPA sont perméables aux cations monovalents et leur perméabilité au calcium dépend de leur composition en sous-unités. Dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, les canaux AMPA ne sont que très peu perméables au calcium. Leur activation produit donc l'apparition d'un courant entrant résultant d'une importante entrée d'ions  $\text{Na}^+$ , et éventuellement d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (si absence de GluR2) et une légère sortie d'ions  $\text{K}^+$  à travers le canal, entraînant ainsi une dépolarisation de la cellule (Kullmann 1999; Turrigiano 2000; Wang, Wilson et al. 2001). La stargazine qui appartient à la famille des protéines transmembranaires régulatrices associées aux rAMPA (TARP) qui se lie aux rAMPA (Kato, Gill et al. 2010). Les TARP agissent comme une sous-unité auxiliaire requise pour la maturation du rAMPA, leur adressage aux synapses et modulent la fonction du canal (Chen, Chetkovich et al. 2000; Korber, Werner et al. 2007; Ziff 2007).

Chaque sous-unité du rAMPA possède environ 900 acides aminés et a une masse moléculaire de 105 kDa. Chacune possède quatre domaines hydrophobiques : TM1, TM3 et

TM4 qui traversent la membrane et TM2 qui fait face au cytoplasme, ne traverse pas la membrane et forme une partie du pore du canal (figure 1.6). Le domaine de liaison au glutamate se retrouve dans la partie extracellulaire et initie les changements de conformation qui permettent l'ouverture du pore lors de la liaison du canal au glutamate. Finalement, la partie c-terminale des sous unités du rAMPA montre des différences entre les sous-unités. GluA1, GluA4 et une forme alternative de GluA2 (GluA2L) ont une queue c-terminale plus longue et une forte homologie entre elles. À l'opposé, la forme dominante de GluA2, GluA3 et la forme courte de GluA4 (GluA4c) ont une queue courte et homologue entre elles. Les récepteurs qui sont composés d'une courte queue cytoplasmique (GluA2/3) cyclent continuellement à l'intérieur et à l'extérieur des synapses avec une constante de temps de 15 minutes (Passafaro, Piech et al. 2001), tandis que les récepteurs qui contiennent une longue queue cytoplasmique sont insérés aux synapses par des mécanismes dépendant de l'activité (Hayashi, Shi et al. 2000). Chaque sous-unité lie spécifiquement des protéines intracellulaires par la queue c-terminale et ces interactions jouent un rôle important dans le contrôle de l'adressage des récepteurs aux synapses ou leur stabilisation dans la synapse.

Les récepteurs kaïnates sont codés par cinq gènes différents et forment deux familles. La première famille est constituée des sous-unités GluK1, GluK2 et GluK3 et la seconde par les sous-unités GluK4 et GluK5 (Lerma 2003). Comme les rAMPA, les récepteurs kaïnate sont des canaux perméables aux cations et dont la perméabilité au calcium ainsi que les propriétés cinétiques dépendent également de leur composition en sous-unités. L'activation de ces récepteurs peut affecter la libération du GABA et du glutamate (Kullmann 2001). Ils sont également impliqués dans des formes de plasticité synaptique à long terme (Kullmann 2001).

Pour les rNMDA la sous-unité NR1 est nécessaire à la formation du canal tandis que les sous-unités NR2A, B, C et D lui confèrent des propriétés spécifiques. L'activation du rNMDA nécessite en plus de la liaison avec son ligand une dépolarisation membranaire. En effet, pour des potentiels hyperpolarisés, le canal du récepteur est bloqué par une fixation voltage dépendante d'ions  $Mg^{2+}$  présents dans le milieu extracellulaire. La courbe



courant/potentiel du récepteur-canal NMDA possède, en présence de concentrations physiologiques de  $Mg^{2+}$ , une région de pente négative pour des potentiels plus hyperpolarisés que  $-40mV$  (Nowak, Bregestovski et al. 1984). Cette dépendance vis-à-vis du potentiel confère au rNMDA des propriétés de détecteur de coïncidence. Les rNMDA sont perméables aux ions monovalents et au calcium. L'influx de  $Ca^{2+}$  à l'intérieur de la cellule postsynaptique entraîne l'activation de cascades de signalisation intracellulaires. L'activité des rNMDA est notamment indispensable pour l'induction de certaines formes de plasticités neuronales, telles que les changements à long terme dans la force de la transmission synaptique, sous forme de potentiation (LTP) ou de dépression (LTD).

La grande polyvalence et la flexibilité des récepteurs glutamates leurs confèrent un important rôle physiologique. C'est pourquoi nous allons discuter de la régulation de la transmission synaptique excitatrice.

## 1.5 Régulation de la transmission synaptique excitatrice

Depuis que Cajal a proposé que le cerveau soit formé de neurones individuels connectés par des synapses, les scientifiques ont prétendu que le stockage de l'information dans le cerveau est relié à un changement dans ces structures. C'est en 1949 que le psychologue Donald Hebb formula clairement l'hypothèse que les synapses seraient malléables. Il eut l'intuition que les cellules nerveuses dans un réseau ont une capacité variable à transmettre l'influx nerveux et il spécula que le cerveau emmagasine la mémoire en changeant la force des connexions entre les neurones. En effet, il émit le postulat que deux neurones en activité au même moment créent ou renforcent leur connexion de sorte que l'activation de l'un par l'autre sera plus facile dans le futur, souvent paraphrasé comme «*Neurons that fire together wire together*». Cependant, cette hypothèse ne fut démontrée expérimentalement que deux décennies plus tard. Ainsi, c'est en 1973 que Tim Bliss et Terje Lømo décrivent un phénomène dans l'hippocampe de lapin qui semble remplir les critères de la théorie de Hebb : un changement de la réponse synaptique induite par une forte et brève activation synaptique, un changement soutenu pendant des heures, jours ou plus longtemps encore (Bliss and Lomo 1973). Ce phénomène a été nommé potentialisation à long terme et est aussi connu sous l'abréviation anglophone LTP (figure 1.7). Le temps

d'induction de la LTP est très rapide, soit de l'ordre de la milliseconde; les protocoles typiques utilisent un train de 50-100 stimuli à 100 Hz appelés stimulations tétaniques (Bliss and Collingridge 1993). Malgré cette courte stimulation, la potentialisation doit se maintenir pendant plusieurs heures, il doit donc exister une mécanistique cellulaire et moléculaire très bien définie qui permet un changement de la force des synapses. Regardons quelles sont les bases fondamentales de l'induction de la LTP.

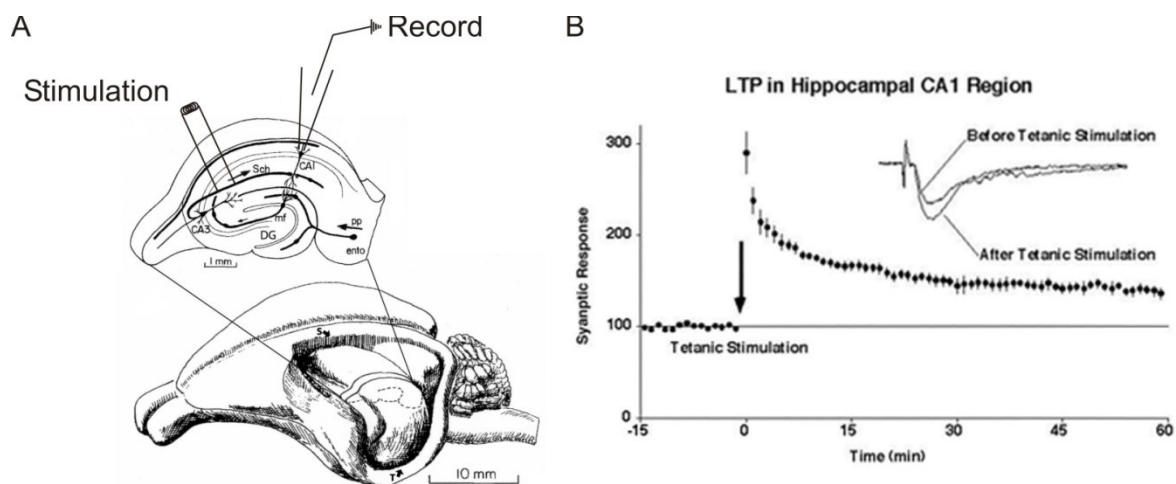


Figure 1.7 : Expérience typique de LTP. (A) Tranche de cerveau d'hippocampe de rat. La stimulation du CA3 induit une augmentation de la réponse synaptique du CA1 (adapté de Synaptic Plasticity and Spatial Representations in the Hippocampus, cognet.mit.edu). (B) Réponse synaptique du CA1 suite à une stimulation tétanique (adapté de Yasunori Hayashi web).

### 1.5.1 Induction de la LTP

Il est important de noter que la régulation de la transmission synaptique peut être classée en deux catégories : (1) un changement de la relâche de neurotransmetteurs présynaptiques; (2) une modulation de la fonction des récepteurs postsynaptiques (Nicoll and Malenka 1995). Malgré que la modulation de la relâche de neurotransmetteurs soit un procédé très efficace et que plusieurs études en démontrent l'importance (Bekkers and Stevens 1990; Malinow and Tsien 1990; Enoki, Hu et al. 2009), dans cette revue nous allons nous concentrer sur les mécanismes postsynaptiques de régulation de la transmission.

Suite au relâchement du glutamate présynaptique lors de la transmission synaptique, les rAMPA sont activés et permettent aux ions (principalement le  $\text{Na}^+$ ) d'entrer dans la cellule menant à la dépolarisation de la membrane. Au repos, le potentiel membranaire est de  $-60/-70$  mV et la majorité des rNMDA sont bloqués par l'ion de  $\text{Mg}^{2+}$  (figure 1.8 gauche). Une forte transmission synaptique permet d'activer plusieurs rAMPA menant ainsi à la dépolarisation du compartiment postsynaptique  $+10$  mV. La dépolarisation dissocie le  $\text{Mg}^{2+}$  du rNMDA et lorsque le glutamate se lie au même moment au récepteur, il y a ouverture du canal permettant au  $\text{Na}^+$  et au  $\text{Ca}^{2+}$  d'entrer dans l'épine dendritique. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  résultante à l'intérieur de l'épine est le signal critique pour l'induction de la LTP (figure 1.8 droite).

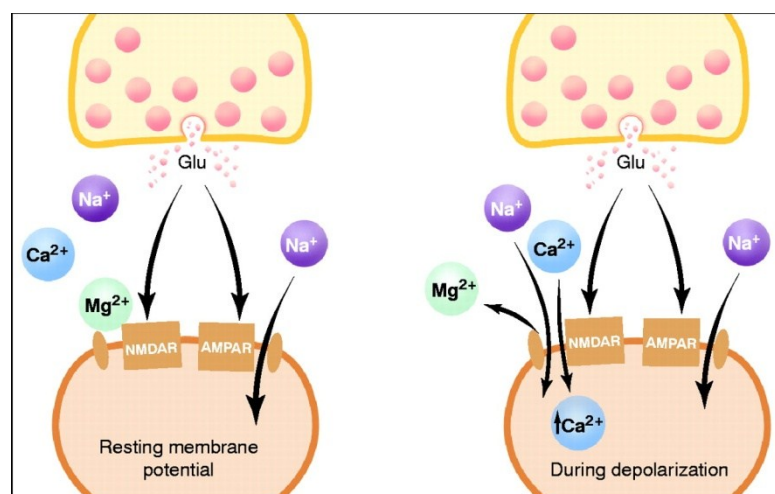


Figure 1. 8 : Induction de la LTP par le rNMDA. (Malenka and Nicoll 1999)

Pour activer le rNMDA, il doit y avoir dépolarisation et liaison au glutamate, le rNMDA est donc un parfait détecteur de coïncidence et son ouverture permet d'induire la LTP. Dans les premières études sur la LTP, il a été montré que les antagonistes (bloqueurs) du rNMDA ont un effet minimal sur la transmission synaptique basale, mais inhibent complètement la génération de la LTP (Collingridge, Kehl et al. 1983). Similairement, l'utilisation de chélateurs de  $\text{Ca}^{2+}$  prévient l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'épine postsynaptique et bloque la LTP (Lynch, Larson et al. 1983), tandis que l'augmentation directe de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  par photolyse de calcium engagé peut reproduire des phénomènes de LTP (Malenka, Kauer et al. 1988). Plus tard, l'utilisation de la technique de l'imagerie calcique a permis de montrer qu'une stimulation tétaïque élève la

concentration de calcium dans les dendrites et les épines (Regehr and Tank 1990). Cette élévation localisée est bloquée par l'antagoniste du rNMDA, l'acide 2-amino-5-phosphonovalérique (APV); ceci confirma directement que l'augmentation de calcium dans l'épine provient du rNMDA tel qu'il a été prédit par les modèles de l'induction de LTP. Il est couramment admis qu'une courte élévation calcique de 1-3 s doit être atteinte pour induire la LTP (Malenka and Nicoll 1999). Une augmentation de calcium postsynaptique qui n'atteint pas le seuil d'induction de la LTP va induire une potentialisation à court terme (STP) de cinq à vingt minutes ou même une dépression à long terme (LTD). Donc, les manipulations qui influencent la dynamique calcique vont avoir une grande influence sur la plasticité synaptique. Malgré le fait que les rNMDA sont la principale source d'entrée de calcium dans l'épine, il existe d'autres sources de calcium, comme les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant du voltage; leurs activations peuvent générer la LTP, STP ou LTD (Teyler, Cavus et al. 1994). Cependant, les mécanismes de ce type de LTP ne seront pas couverts dans cette revue. Regardons maintenant les molécules qui vont traduire le signal calcique provenant du rNMDA en mécanisme d'expression de la LTP.

### **1.5.2 Mécanismes de traduction du signal**

Quelles sont les voies qui sont activées par le  $\text{Ca}^{2+}$  et qui permettent de traduire le signal en une augmentation de la force synaptique? À un niveau normal, la concentration effective du  $\text{Ca}^{2+}$  est de  $\sim 70$  nM et, en réponse à l'activation du rNMDA, elle monte jusqu'à un maximum de  $\sim 10$ - $30$   $\mu\text{M}$  (Kennedy, Beale et al. 2005). Il existe d'autres sources de calcium dans l'épine postsynaptique, comme les canaux calciques dépendants du voltage, mais ils n'ont pas la même dynamique spatiale et temporelle que le rNMDA et doivent activer d'autres voies de signalisation dans la cellule. Dans cette revue, nous allons nous concentrer sur le calcium provenant du rNMDA. Le calcium possède plusieurs cibles à l'intérieur de l'épine synaptique; sa cible principale est la calmoduline (CaM), une protéine régulatrice qui lie le calcium. Malgré l'énorme gradient de concentration dans l'épine (de  $10^{-6}$  à  $10^{-9}$  nM), le calcium y reste confiné à l'intérieur puisque la CaM et plusieurs autres protéines activées par le calcium (PKC, PYK2, Calpain et CalDAG-GEF1) sont en compétition pour le calcium libre (Kennedy, Beale et al. 2005). Seulement une fraction de la CaM peut-être activée lors d'une activation du rNMDA, car 95 % du calcium

est immédiatement chélatée en entrant dans l'épine. La CaM et les autres tampons de calcium sont donc en compétition pour le 5 % de calcium restant dans le cytosol. Suite à la liaison de la CaM au calcium, il existe au moins six enzymes dépendantes de la CaM qui peuvent être activées : Adénylate Cyclase, CaMKII, Rasguanine, Nucleotide-Releasing Factor 1 (RasGRF1), nNuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS), Phosphodiesterase1 (PDE1) et Calcineurine. Il y a donc une féroce compétition entre les protéines activées par le calcium, on peut se demander parmi celles-ci quelles sont les molécules qui jouent un rôle clé dans l'expression de la LTP?

Une quantité énorme d'études démontrent que l'implication de la  $\alpha$ -calcium-calmoduline-dépendante-kinase-II (CaMKII) est absolument requise pour l'induction de la LTP (Lisman and Goldring 1988; Silva, Wang et al. 1992; Soderling 1993; Stevens, Tonegawa et al. 1994; Lisman, Schulman et al. 2002). La CaMKII est une serine/thréonine protéine kinase très abondante dans le cerveau (figure 1.9) (Peng, Kim et al. 2004). Chez les mammifères, la CaMKII est encodée par une famille de quatre gènes,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . L' $\alpha$ CaMKII et la  $\beta$ CaMKII sont particulièrement enrichies dans le cerveau, spécialement dans les densités postsynaptiques (Bennett, Erondou et al. 1983; Peng, Kim et al. 2004). La CaMKII est un élément central dans la régulation des synapses glutamatergiques, car elle détecte l'augmentation de  $Ca^{2+}$  dans l'épine et initie la cascade biochimique qui permet la potentialisation de la synapse. En effet, à l'ouverture du canal NMDA, la CaMKII translocalise aux synapses (Shen and Meyer 1999) et elle est en mesure de décoder les fréquences d'oscillations du calcium (De Koninck and Schulman 1998). De plus, elle se lie au rNMDA et sa liaison avec la sous-unité NR2B du récepteur active la CaMKII de façon permanente (figure 1.9) (Bayer, De Koninck et al. 2001). Aussi, le maintien du complexe CaMKII/GluN2B est important dans la maintenance de la LTP (Sanhueza, Fernandez-Villalobos et al. 2011). La CaMKII agit donc comme transducteur pendant l'induction de la LTP, car l'application extracellulaire ou intracellulaire d'inhibiteurs de CaMKII tels le KN62 ou le KN93 bloque l'induction de la LTP (Malinow, Madison et al. 1988; Malenka, Kauer et al. 1989; Malinow, Schulman et al. 1989; Ito, Hidaka et al. 1991). Il a été démontré que ces drogues inhibent non seulement la CaMKII, mais aussi d'autres protéines kinases dépendant du  $Ca^{2+}$ /CaM telles la CaMKI, la CaMKIV ainsi que les

canaux calciques (Gao, Blair et al. 2006; Redondo, Okuno et al. 2011). Malgré tout, la CaMKII est considérée comme le type kinase le plus critique puisque l'impossibilité d'induire la LTP a été reportée chez des animaux qui ont une perturbation du gène de la CaMKII (Silva, Paylor et al. 1992). De plus, l'injection postsynaptique d'une forme active de la CaMKII augmente la transmission synaptique des courants médiés par les rAMPA et empêche une seconde induction de LTP (Lledo, Hjelmstad et al. 1995; Shirke and Malinow 1997). Aussi, l'infection par un virus d'une CaMKII active augmente la transmission synaptique en insérant les rAMPA aux synapses, reproduisant les mécanismes de l'induction synaptique (Hayashi, Shi et al. 2000).

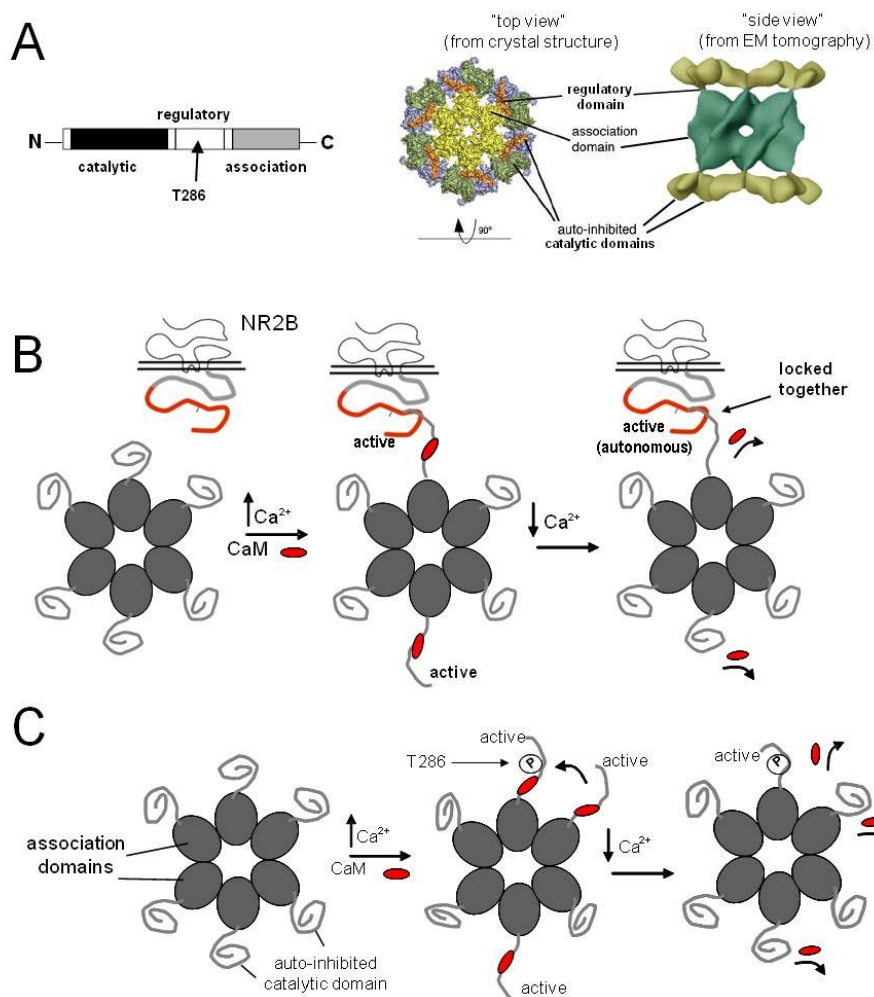


Figure 1.9 : Propriétés de la CaMKII. **(A)** Structure linéaire des 3 domaines de la CaMKII. La T286 est la phosphorylation clé de l'autonomie de la CaMKII. Structure cristallographique (Rosenberg, Deindl et al. 2005) et en tomographie de microscopie électronique (Kolodziej, Hudmon et al. 2000). **(B)** La CaMKII

activée se lie à la queue c-terminale du récepteur NR2B de manière dépendante de l'activité. Suite à une baisse de calcium, la CaMKII reste liée au rNMDA et est autonome. (C) Autorégulation de la CaMKII. La CaMKII est inactive à une basse concentration de calcium et le segment autoinhibiteur recouvre la région catalytique. La liaison avec la  $Ca^{2+}/CaM$  déplace le domaine inhibiteur activant ainsi l'enzyme. La liaison avec deux CaM permet aux sous-unités de se phosphoryler sur la T286 dans la même enzyme (autophosphorylation). Suite à la chute de concentration du calcium, la CaM se dissocie de la CaMKII, mais l'enzyme reste active (activité autonome).

En plus de son rôle de transducteur pendant l'induction de la LTP, l'enzyme pourrait aussi être directement responsable de la persistance de la LTP et ainsi avoir une implication dans la fonction de la mémoire. La preuve la plus forte de cette idée provient du fait que la CaMKII reste activée pendant au moins une heure après l'induction de la LTP (Lisman, Schulman et al. 2002). De plus, l'autophosphorylation sur la thréonine 286 est cruciale pour son activation persistante; une mutation qui élimine la phosphorylation de ce site bloque la LTP. Afin de déterminer son rôle dans la mémoire, il reste tout de même à déterminer clairement combien de temps cette activité persiste. L'activité persistante de la CaMKII pourrait aussi servir comme une étiquette sur l'histoire de l'activité synaptique.

Dans l'épine synaptique, il existe aussi d'autres protéines kinases, incluant la protéine kinase C (PKC), l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP), la protéine kinase (PKA), la tyrosine kinase Src et la Mitogen-activated protein kinase (MAPK), qui pourraient toutes contribuer à la LTP (Gustafsson and Wigstrom 1988; Malinow, Schulman et al. 1989; Frey, Huang et al. 1993; Matthies and Reymann 1993; English and Sweatt 1996; Lu, Roder et al. 1998). Cependant, dans ces travaux, nous nous sommes concentrés sur les rôles de la CaMKII dans la plasticité synaptique.

En résumé, lors de l'induction de la LTP, le calcium entre par le rNMDA et permet d'activer les kinases situées dans l'épine postsynaptique. Ces dernières peuvent activer des voies d'activation protéique menant à une augmentation de la force synaptique. Les récepteurs jouent un rôle important dans la force synaptique et sont régulés par les kinases. Dans la prochaine section, regardons par quels moyens la synapse peut être potentialisée en

régulant la phosphorylation des récepteurs présents à la synapse et en changeant la dynamique d'endo/exocytose pour varier le nombre de récepteurs à la synapse.

### 1.5.3 Mécanismes d'expression de la LTP

L'augmentation du nombre de rAMPA à la synapse est un mécanisme majoritairement accepté quant à l'expression postsynaptique de la LTP. Cependant, avant les années 1980, on pensait que les récepteurs à neurotransmetteurs étaient extrêmement stables dans la synapse. Ils y résident confinés toute la durée de vie de la protéine, qui varie de jours à semaines (Choquet 2010) et ce, même si les premières hypothèses proposées dans la mémoire impliquent une augmentation du nombre de récepteurs aux synapses (Lynch and Baudry 1984). Les deux premières hypothèses pour augmenter la force d'une synapse sont la phosphorylation des récepteurs aux synapses et une augmentation du nombre de récepteurs aux synapses par exocytose. Examinons ces deux mécanismes qui permettent de moduler la force d'une synapse.

#### *Phosphorylation des récepteurs*

Dans les années 1980, les modifications de l'efficacité de la transmission postsynaptique observées dans la LTP et la LTD, étaient perçues comme un changement des propriétés biophysiques des récepteurs telles la conductance ou la probabilité d'ouverture (Derkach, Barria et al. 1999; Banke, Bowie et al. 2000; Scannevin and Huganir 2000). Un mécanisme qui permet de moduler l'efficacité des canaux ioniques est la phosphorylation de la queue c-terminale des récepteurs. La phosphorylation est l'addition d'un groupe phosphate ( $\text{PO}_4$ ) à une protéine ou à une petite molécule par une enzyme kinase et est reconnue comme un important mécanisme de régulation des protéines. Les rAMPA, comme plusieurs autres protéines, sont sujets à la phosphorylation par plusieurs kinases, incluant la PKA, la PKC et la CaMKII (Nakazawa, Mikawa et al. 1995; Swope, Moss et al. 1999). La phosphorylation de ces protéines change les propriétés du canal et on croit que la phosphorylation joue un rôle majeur dans l'induction et l'expression de la LTP (Mulkey, Herron et al. 1993; Lu, Roder et al. 1998; Malenka and Nicoll 1999; Lee, Barbarosie et al. 2000). Regardons quelle est la nature des changements dans la biophysique de la sous-unité GluA1 du rAMPA impliquée dans la LTP.



La sous-unité GluA1 du rAMPA peut être phosphorylée sur quatre sites localisés dans la partie c-terminale de la protéine, soit S845, S831, S818 et S567 (figure 1.10). Il a été montré que la PKA phosphoryle spécifiquement le site S845 sur les récepteurs GluA1 transfectés dans les cellules HEK ainsi que dans la culture de neurones. La mutation S845A bloque la phosphorylation par la PKA (Roche, O'Brien et al. 1996). Testée en surexpression de GluA1 dans les cellules HEK, l'application de la PKA active résulte en une potentialisation de 40 % du courant maximal sur les récepteurs homomériques de GluA1 (Roche, O'Brien et al. 1996). Cette potentialisation est sûrement due à une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal et non à une augmentation de la conductance du canal ou de son temps d'ouverture (Banke, Bowie et al. 2000). Aussi, la mutation sur S845, le site de la PKA sur GluA1, prévient l'insertion de récepteurs GluA1 aux synapses même en présence de la CaMKII constitutivement active (Esteban, Shi et al. 2003).

Dans les tranches de cerveau, en utilisant un anticorps dirigé contre les résidus de phosphorylation dans la queue c-terminale de GluA1, les westerns blots ont montré que le site S831 est phosphorylé par la PKC et la CaMKII (Mammen, Kameyama et al. 1997). L'activation de la PKC dans les tranches de cerveau augmente la fréquence et l'amplitude des minis EPSC du rAMPA dans les neurones du CA1 (Carroll, Nicoll et al. 1998), indiquant que la PKC est impliquée dans la régulation de la transmission synaptique en phosphorylant les récepteurs. En utilisant des anticorps spécifiques contre les peptides de phosphorylation et de la mutagenèse ciblée sur des sites, il a été montré que la CaMKII phosphoryle GluA1 aussi sur la S831 (Nakazawa, Mikawa et al. 1995). L'application intracellulaire ou l'expression de la CaMKII active augmente les courants médiés par les rAMPA dans la culture neuronale (McGlade-McCulloh, Yamamoto et al. 1993) et dans les tranches de cerveau (Pettit, Perlman et al. 1994). D'un autre côté, l'application d'un inhibiteur de phosphatase potentialise les EPSC du rAMPA, mais pas le rNMDA et cet effet peut être bloqué par des inhibiteurs de la CaMKII (Figurov, Boddeke et al. 1993). Pour confirmer que les changements fonctionnels du rAMPA sont réellement dus à une phosphorylation directe du récepteur par la CaMKII, il a été montré que la mutation

spécifique du site S831A n'est pas phosphorylée par la CaMKII et non potentialisée (Barria, Muller et al. 1997). De plus, des enregistrements de canaux unitaires ont montré que la sous-unité GluA1 possède plusieurs états de conductance et que la co-expression de la CaMKII augmente la proportion des récepteurs avec une plus haute conductance (Derkach, Barria et al. 1999), indiquant que la CaMKII est impliquée dans la LTP soit en augmentant directement la conductance des rAMPA à la synapse ou en recrutant de nouveaux rAMPA qui possèdent une haute conductance. Cependant, la phosphorylation sur la S831 par la CaMKII ne semble pas requise pour l'insertion des récepteurs aux synapses, car la mutation S831A ne prévient pas l'apport des récepteurs aux synapses lorsque jumelées à une expression d'une CaMKII constitutivement active (Hayashi, Shi et al. 2000).

La phosphorylation de la S818 semble spécifique pour la PKC et une mutation phosphomimétique promeut l'incorporation des GluA1 aux synapses (Boehm, Kang et al. 2006). De plus, le site S567 est phosphorylé par la CaMKII, l'expression du mutant phosphomimétique S567D diminue de ~45 % la transmission synaptique et l'expression de la S567A augmente de ~82 % la transmission (Lu, Isozaki et al. 2010). Donc, la phosphorylation du rAMPA joue un rôle important dans la régulation des fonctions du récepteur, pouvant ainsi altérer la transmission et la plasticité synaptique.

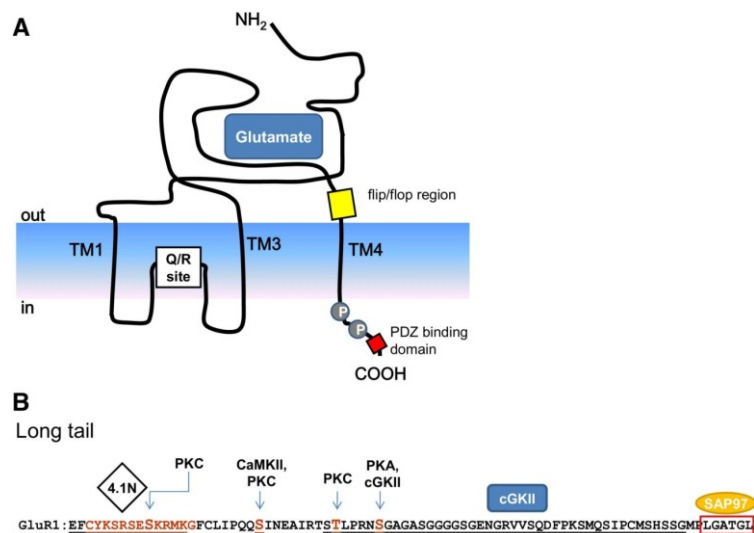


Figure 1.10 : Récepteur AMPA et les sites de phosphorylation par les kinases sur la queue c-terminale de la sous-unité GluA1 (Santos, Carvalho et al. 2009).

Aussi, la stargazine est une protéine transmembranaire connue pour s'associer au rAMPA. Elle régule la localisation synaptique des rAMPA par deux mécanismes distincts soit par la livraison de rAMPA à la surface et en localisant les récepteurs aux synapses en se liant aux protéines d'ancrage telles la PSD-95/SAP-90 et les PDZ. Il a été montré que la partie c-terminale de la stargazine contient une séquence de phosphorylation par la PKA (Choi, Ko et al. 2002). La phosphorylation par la PKA diminue l'interaction entre la stargazine et la PSD-95. Il a aussi été montré que la stargazine peut être phosphorylée par la CaMKII et la PKC (Tomita, Stein et al. 2005). Inversement, cette phosphorylation de stargazine favorise le trafic synaptique des rAMPA. Dans les synapses de l'hippocampe, la LTP et la LTD exigent respectivement la phosphorylation et la déphosphorylation de la stargazine (Tomita, Stein et al. 2005). Ces résultats établissent la stargazine comme un substrat essentiel dans le contrôle bidirectionnel de la force synaptique, qui sous-tend les aspects de l'apprentissage et la mémoire.

La phosphorylation des récepteurs et de leurs protéines associées permet donc de moduler les propriétés biophysiques des récepteurs présents à la membrane synaptique (figure 1.10). Cependant, il existe des synapses qui dans des conditions normales de transmission synaptique sont silencieuses (Isaac, Nicoll et al. 1995; Liao, Hessler et al. 1995). Elles sont incapables de répondre au relâchement de glutamate présynaptique en

raison du manque de rAMPA fonctionnels et du blocage dépendant du voltage du rNMDA par le  $Mg^{2+}$ . Dans un contexte de plasticité, l'hypothèse de synapse silencieuse propose que les rAMPA fonctionnels soient introduits dans la synapse silencieuse pour potentialiser la neurotransmission suite à une induction de la LTP (Liao, Hessler et al. 1995; Malenka and Nicoll 1997). L'existence de la synapse silencieuse est soutenue par les études en immunocytochimie et en microscopie électronique, qui montrent qu'une proportion des synapses existantes dans le développement exprime seulement le rNMDA (Liao, Zhang et al. 1999). De plus, les études électrophysiologiques ont démontré l'existence de synapses qui expriment seulement les réponses médiées par le rNMDA, mais pas de courants de type AMPA (Petralia, Esteban et al. 1999). De plus haute importance, ces études ont montré qu'avec l'induction de la LTP, les synapses contenant uniquement des rNMDA sont révélés (« unsilenced ») par l'apparition rapide des courants médiés par les rAMPA (Malenka and Nicoll 1997). La synapse silencieuse permet de supposer que le nombre de récepteurs aux synapses n'est pas fixe, mais qu'il peut varier en fonction de l'activité. Alors, pris ensemble, ces résultats suggèrent fortement qu'une insertion dépendante de l'activité des rAMPA aux synapses silencieuses peut-être un mécanisme important dans l'expression de la LTP (Isaac, Nicoll et al. 1995; Malenka and Nicoll 1997; Liao, Zhang et al. 1999; Petralia, Esteban et al. 1999). Inversement, une perte des rAMPA synaptiques est reliée à la LTD (Luthi, Chittajallu et al. 1999). Ces études suggèrent aussi que les récepteurs sont régulés aux synapses et qu'il est possible de faire varier dynamiquement le nombre de récepteurs en fonction de l'activité synaptique. Regardons un mécanisme d'exocytose qui permet de faire varier le nombre de récepteurs aux synapses.

#### *Variation du nombre de récepteurs par exocytose*

Un tournant majeur dans notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité synaptique est survenu lorsque différents laboratoires ont montré que les récepteurs à neurotransmetteurs ne sont pas stables à la membrane synaptique, mais qu'ils subissent un recyclage constant engendré par des procédés d'endocytose et d'exocytose (Malenka and Nicoll 1999; Carroll, Beattie et al. 2001; Song and Huganir 2002; Collingridge, Isaac et al. 2004). Ce recyclage constant a été initialement démontré pour les rAMPA, mais a été étendu par la suite à la plupart des types de

récepteurs (Kittler and Moss 2003; Bernard, Decossas et al. 2006). Plusieurs études montrent que les rAMPA résident à la membrane seulement pour une dizaine de minutes, au lieu de plusieurs jours tel que postulé précédemment (Ehlers 2000; Passafaro, Piech et al. 2001). Encore plus important, il a été démontré que la régulation du recyclage des rAMPA est associée aux paradigmes de plasticité synaptique (Carroll, Lissin et al. 1999; Luscher, Xia et al. 1999; Heynen, Quinlan et al. 2000; Petrini, Lu et al. 2009). Ces voies d'endo/exocytoses sont des mécanismes importants pour enrichir ou pour retirer des rAMPA aux synapses. Regardons quelques faits marquants des études d'exocytose des rAMPA dendritiques impliqués dans la plasticité synaptique.

Les premières évidences qui démontrent que l'exocytose est requise dans la plasticité postsynaptique proviennent des expériences où des facteurs qui inhibent la fusion à la membrane ont été infusés dans un neurone postsynaptique par une pipette d'enregistrement (Lledo, Zhang et al. 1998). Chacun de ces facteurs, comme le N-ethylmaleide, la botulinum toxin B (Botox) et un court peptide désigné pour interférer avec les protéines de fusion de membrane soit entre la NFS et la SNAP, a bloqué la LTP induite par une stimulation des axones de collatéral de Schaffer. Ces premières observations ont mené à un modèle où les vésicules intradendritiques contenant des rAMPA fusionnent avec la membrane plasmique suite à un protocole de LTP menant à une augmentation du nombre de récepteurs à la membrane. Sachant que la variation du nombre de récepteurs aux synapses permet de moduler la force de celles-ci, des efforts ont été déployés pour déterminer l'endroit de l'exocytose. La première démonstration en imagerie de l'exocytose dépendante de l'activité dans les dendrites a été effectuée avec le colorant lipophile FM1-43 qui s'incorpore aux membranes (Maletic-Savatic and Malinow 1998). Suite à une incubation de plusieurs heures, le colorant s'insère dans les stores intracellulaires par l'endocytose des membranes. Les chercheurs ont montré que quelques minutes après l'application d'un ionophore de calcium, le A23187, la fusion des vésicules dans la dendrite est détectée par une perte de fluorescence du marquage de FM1-43. De plus, dans une seconde étude, ils ont montré que cette exocytose est dépendante de l'entrée de calcium et de la CaMKII (Maletic-Savatic, Koothan et al. 1998); cependant, avec ce colorant il n'est pas possible de déterminer quelles molécules sont apportées à la membrane. Quelques

années plus tard, Adesnik et al. a utilisé un antagoniste photoréactif irréversible des rAMPA (ANQX) pour investir directement l'adressage des rAMPA en temps réel. En perfusant l'ANQX sur les cellules et en les illuminant avec de la lumière UV, ils ont bloqué de façon irréversible les canaux AMPA présents à la membrane (Adesnik, Nicoll et al. 2005). Ils ont trouvé que les courants des rAMPA extrasynaptiques retournent au niveau de base plus rapidement que les courants synaptiques, impliquant que l'exocytose des récepteurs se produit dans des compartiments extrasynaptiques. Ces résultats démontrent que les nouveaux récepteurs doivent diffuser dans la membrane afin d'enrichir et de résider dans les synapses.

Pour visualiser directement les événements d'exocytose des rAMPA, les études plus récentes ont utilisé une sonde basée sur la super éclipique pHluorin (SEP), une GFP sensible au pH qui est fluorescente à un pH neutre, mais quenchée à un pH acide par exemple dans les vésicules dendritiques (Miesenbock, De Angelis et al. 1998). Des constructions de SEP fusionnées aux sous-unités des rAMPA tel GluA1-SEP ou GluA2-SEP ont été utilisées pour mesurer la régulation des récepteurs dans la plasticité synaptique. L'exposition des neurones à une solution de  $0\text{Mg}^{2+}$ /Glycine, augmente la fréquence des événements d'exocytose de GluA1-SEP, ce qui suggère que les stores de GluA1 emmagasinés dans la cellule sont mobilisés par l'activation du rNMDA (Yudowski, Puthenveedu et al. 2007). Inversement, un antagoniste des récepteurs NMDA, l'APV et le TTX diminuent la fréquence des événements d'exocytose. Cette étude ainsi que d'autres montrent que les événements d'exocytose ont été observés dans tout le compartiment somato-dendritique mais pas directement dans les épines (Yudowski, Puthenveedu et al. 2007; Lin, Makino et al. 2009; Makino and Malinow 2009), les récepteurs semblent donc encore une fois s'insérer aux synapses par diffusion dans la membrane. Cependant, Kennedy et al. a pu montrer une forme d'exocytose directement dans l'épine dendritique qui apparaît dans des microdomaines membranaires enrichis de la t-SNARE syntaxine 4 (Stx4). La Stx4 régule l'exocytose des épines et sa perturbation diminue la LTP dans les synapses de l'hippocampe (Kennedy, Davison et al. 2010). Finalement, Patterson et al. a combiné le dé-encagement de glutamate en deux photons avec l'imagerie deux photons de GluA1-SEP dans des tranches d'hippocampe pour mesurer les événements d'exocytose

individuels de rAMPA à proximité des épines subissant la LTP (Patterson, Szatmari et al. 2010). Il a observé des événements d'exocytose dans les dendrites et dans les épines dans des conditions basales. Le taux de l'exocytose des rAMPA est cinq fois plus important pendant l'induction de la LTP et revient au niveau de base en environ une minute. Les rAMPA sont insérés et piégés dans l'épine d'une manière dépendante de l'activité. De plus, l'exocytose dépendante de l'activité requiert de la voie Ras-ERK, mais pas la CaMKII. Il a mesuré que la proportion des rAMPA qui atteignent l'épine stimulée provient d'une combinaison de récepteurs de surface préexistante (70-90 %) et des récepteurs nouvellement exocytosés (10-30%).

Les études qui portent sur l'exocytose ont permis de démontrer que les récepteurs sont en constant recyclage à la membrane plasmique. L'ajout de récepteurs aux synapses est un procédé extrêmement dynamique dépendant de l'activité neuronale. De plus, l'échange des récepteurs membranaires dans les compartiments extrasynaptiques et synaptiques est un mécanisme crucial dans la régulation du nombre de récepteurs aux synapses. Regardons par quels mécanismes les récepteurs diffusent dans la membrane et comment ils peuvent être insérés aux synapses.

## **1.6 Diffusion latérale et variation du nombre de récepteurs synaptiques**

Avant les années 1980, pour expliquer la stabilité de la mémoire, on tendait vers une vision où les récepteurs ne possèdent pas ou peu de mouvement aux synapses. Avec la découverte que les récepteurs subissent un recyclage constant entre la membrane plasmique et les compartiments intracellulaires, un mécanisme de diffusion membranaire des récepteurs a émergé. Les protéines membranaires démontrent un mouvement brownien caractéristique de molécules en agitation thermique tel que décrit par le botaniste Robert Brown en 1827. L'agitation des récepteurs est une conséquence directe de la propriété des membranes cellulaires qui se comportent comme un fluide visqueux. La diffusion latérale permet d'enrichir ou de diminuer le nombre de récepteurs aux synapses (Tardin, Cognet et al. 2003). De plus, la composante membranaire constitue un apport majoritaire à

l'augmentation du nombre de récepteurs aux synapses lors de l'expression de la LTP (Makino and Malinow 2009; Patterson, Szatmari et al. 2010). Dans cette section, nous décrirons brièvement la biophysique concernant la diffusion des protéines membranaires, l'évolution des techniques et des mesures utilisées concernant les récepteurs dans les neurones ainsi que l'implication de la diffusion latérale dans la variation du nombre de récepteurs à la synapse.

Tel que décrit précédemment, les récepteurs sont des protéines transmembranaires qui ont un domaine membranaire hydrophobe et deux domaines hydrophiles intracellulaire et extracellulaire. Les récepteurs se retrouvent donc coincés dans la membrane. Le modèle décrit par Singer et Nicolson a établi que la membrane cellulaire est une mosaïque fluide. Ils décrivent la membrane cellulaire comme une structure mosaïque composée d'une double couche de phospholipides insérée par des protéines globulaires (figure 1.11) (Singer and Nicolson 1972). La membrane est considérée comme un fluide à deux dimensions qui permet la libre diffusion des protéines. Le mouvement observé est aléatoire et il est possible d'appliquer l'analyse de mouvement brownien aux molécules diffusant dans la bicouche de phospholipides.

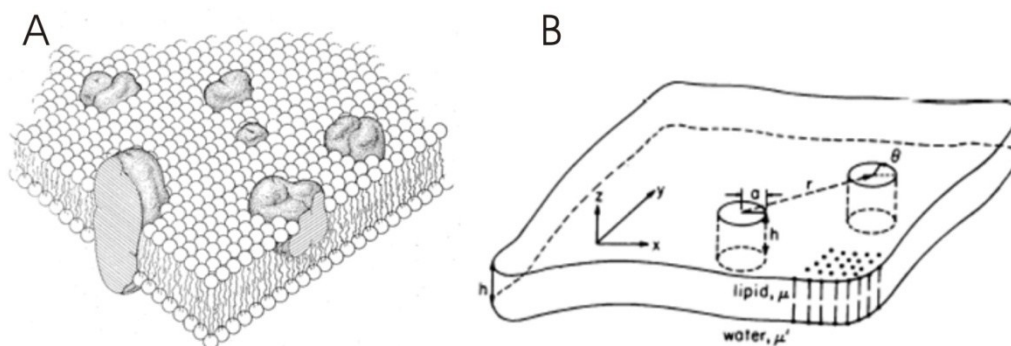


Figure 1.11 : Modèle de mosaïque fluide. **(A)** Les corps solides représentent les protéines globulaires et les autres molécules sont une couche de phospholipides. (Singer and Nicolson 1972). **(B)** Illustration permettant l'analyse de la diffusion membranaire. Les particules cylindriques encastrées dans la bicouche de lipides entourés de phases aqueuses de chaque côté. La particule peut se déplacer latéralement dans le plan x-y et tourner autour de l'axe z (Saffman and Delbruck 1975).



Les modèles pour quantifier la diffusion brownienne dans la membrane ont été développés par Saffman et Delbrück en 1975. Ils se sont inspirés des modèles précédemment développés par Einstein et Smoluchowski en 1906 (Saffman and Delbruck 1975). En utilisant un modèle simple qui considère que la membrane est un mince plan infini de liquide visqueux qui sépare des régions infinies d'un milieu moins visqueux (de l'eau) et des molécules cylindriques avec un axe perpendiculaire au plan de la feuille, il est possible d'obtenir des relations pour ses molécules se déplaçant dans la membrane. La diffusion d'une particule due au mouvement brownien est décrite par ses coefficients de diffusion de translation  $D_T$  et rotationnel  $D_R$ . Pour le mouvement dans un plan et la rotation autour d'un axe perpendiculaire :

$$\overline{r^2} = 4D_T t \quad \overline{\theta^2} = 2D_R t \quad [1]$$

où « $\overline{r^2}$ » et « $\overline{\theta^2}$ » sont le déplacement et la rotation angulaire moyens au carré en fonction du temps « $t$ »; les coefficients de diffusion sont liés à la mobilité des particules par les équations d'Einstein :

$$D_T = k_B T b_T \quad D_R = k_B T b_R \quad [2]$$

où « $k_B$ » est la constante de Boltzman, « $T$ » la température absolue, « $b$ » la mobilité définie par la vitesse produite par unité de force ou de torque. Le modèle membranaire de Singer et Nicolson permet aux protéines membranaires de diffuser librement sur toute la cellule. Cependant, en raison de la structure très complexe des neurones, la majorité des protéines membranaires ne bénéficient pas d'une diffusion latérale sans restriction. Les protéines membranaires démontrent différents modes de diffusion, certaines protéines sont confinées pendant un certain temps dans un endroit restreint, mais peuvent en échapper (figure 1.12). Le mode de diffusion confinée peut être expliqué par la présence d'autres protéines à la membrane ou par des protéines intracellulaires qui bloquent la diffusion. L'axone, les dendrites et particulièrement les synapses possèdent leurs propres caractéristiques membranaires influençant chacun à leur façon la transmission synaptique. Regardons quelles sont les techniques utilisées pour étudier la diffusion latérale ainsi que les voies de régulations membranaires des rAMPA aux synapses.

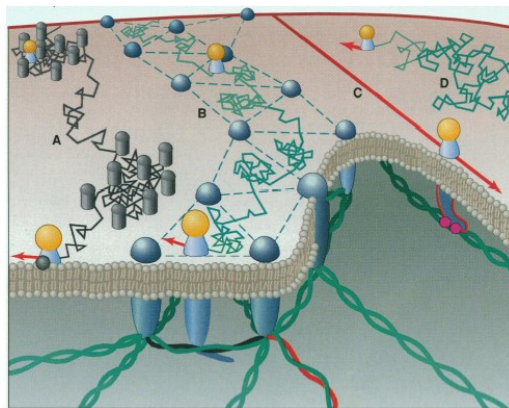


Figure 1.12 : Modes de diffusion latérale à la surface cellulaire. **(A)** Modèle de la clôture de protéine. **(B)** Modèle de la clôture du cytosquelette. **(C)** Transport actif. **(D)** Diffusion libre (Jacobson, Sheets et al. 1995).

De multiples méthodes ont été développées pour mesurer les mouvements des rAMPA en temps réel. Ceux-ci peuvent être classés en trois grandes catégories : les approches électrophysiologiques, les méthodes de microscopie confocale et les méthodes optiques en molécules uniques. Les approches électrophysiologiques ont été utilisées pour mesurer indirectement le mouvement de surface du rAMPA et du rNMDA. Tovar et Westbrook ont examiné la stabilité des rNMDA synaptiques sur les neurones de l'hippocampe en culture en utilisant les bloqueurs de canal ouvert comme le MK-801 et la kétamine pour bloquer uniquement les rNMDA synaptiques (Tovar and Westbrook 2002). Suite au blocage irréversible du rNMDA par le MK-801, les courants médiés par les rNMDA ont été récupérés. Cette reprise ne peut être attribuée à la perte de liaison du MK-801 au canal ou à l'insertion de nouveaux récepteurs. De plus, ils ont montré qu'au moins 65 % des rNMDA synaptiques étaient mobiles. Ces expériences suggèrent donc que les rNMDA se déplacent latéralement entre les pools extrasynaptiques et synaptiques et l'existence d'une régulation dynamique des récepteurs à la synapse.

Une mesure électrophysiologique des rAMPA a été effectuée par Adesnik et ses collègues; tel que décrit précédemment, ils ont utilisé un antagoniste photoréactif des rAMPA, l'ANQX (6-azido-7-nitro-1, 4-dihydroquinoxaline-2, 3-dione) (Adesnik, Nicoll et al. 2005). La photoactivation globale ou focale (par la lumière UV) a permis de mesurer la récupération des courants AMPA après l'inactivation spécifique de toutes ou seulement une sous-population de rAMPA à la surface. Le taux de renouvellement des récepteurs

synaptiques au pool intracellulaire était étonnamment lent, de l'ordre de plusieurs heures, différant de résultats précédents (Ehlers 2000; Lin, Ju et al. 2000; Man, Lin et al. 2000; Sheng and Lee 2001). En revanche, dans le compartiment somatique, les rAMPA se sont révélés à être rapidement exocytosés à la membrane plasmique. Surtout, il a également été constaté que les rAMPA à la surface du soma ont un taux de diffusion latérale élevé. Ainsi, il est possible que les nouveaux rAMPA fonctionnels aux synapses proviennent des récepteurs exocytosés au soma et en passant par les dendrites par la diffusion latérale. Cette hypothèse doit être confirmée et a été contestée par les modèles théoriques qui suggèrent que la diffusion membranaire latérale seule est insuffisante en tant que mécanisme de l'apport de rAMPA du soma aux dendrites distales (Earnshaw and Bressloff 2008). Les approches électrophysiologiques ont permis de démontrer une régulation dynamique des récepteurs à la synapse, mais ces techniques n'ont pas la résolution spatiale suffisante pour évaluer la régulation dynamique des récepteurs dans une synapse individuelle. Cependant, la microscopie optique permet une telle résolution. Regardons ce que les techniques optiques en microscopie confocale nous ont appris sur la diffusion des récepteurs aux synapses.

Les méthodes d'imagerie confocale en fluorescence utilisent l'approche d'une variante pH-sensible de la protéine fluorescente verte (GFP), la superécliptique phluorin ou SEP (Ashby, De La Rue et al. 2004). Bien que la GFP a longtemps été utilisée pour suivre la distribution globale des rAMPA (Shi, Hayashi et al. 1999; Perestenko and Henley 2003) dans les paramètres physiologiques, le nombre relativement élevé de récepteurs intracellulaires par rapport au nombre de récepteurs à la surface a empêché l'utilisation de la GFP pour suivre précisément les rAMPA à la surface. La SEP est quenché dans le pH acide des organites intracellulaires (par exemple, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, vésicules de sécrétion), alors qu'il devient fluorescent à un pH neutre ou plus élevé comme le milieu extracellulaire. Ainsi, afin de visualiser et de mesurer le mouvement des récepteurs fusionnés avec la SEP, la plupart des laboratoires utilisent le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) (Axelrod, Ravdin et al. 1976). Dans cette approche, les fluorophores sont photoblanchis dans une petite zone membranaire par un éclairage intense, idéalement par un laser focalisé. Comme les molécules voisines diffusent

dans la membrane, ils repeuplent partiellement la zone blanchie. Deux paramètres peuvent être obtenus à partir des courbes du FRAP: (i) le taux de récupération, qui se rapporte directement au coefficient de diffusion des récepteurs et (ii) la fraction mobile.

Le FRAP et l'imagerie simple de rAMPA couplés à SEP la (SEP-rAMPA) ont démontré (i) que la diffusion latérale promeut l'échange constitutif des rAMPA aux épines dendritiques et qu'elle est régulée par la morphologie de l'épine (Ashby, Maier et al. 2006), (ii) que la perte des rAMPA dans les épines lors de protocoles de LTD est précédée par une endocytose extrasynaptique (Ashby et al., 2004), (iii) que les rAMPA diffusent dans la membrane plasmique des neurones dans des tranches de cerveau organotypiques à des taux comparables à ceux observés dans les neurones de culture (Heine, Thoumine et al. 2008; Makino and Malinow 2009), (iv) que la dérive des membranes dépendante de la dynamine peut recruter les rAMPA aux épines dendritiques (Jaskolski, Mayo-Martin et al. 2009), (v) les rôles respectifs de la diffusion membranaire et de l'endocytose des rAMPA dans le renouvellement des récepteurs aux synapses (Petrini, Lu et al. 2009) et (vi) l'incorporation des rAMPA dans les synapses pendant la potentialisation à long terme (LTP) (Kopec, Li et al. 2006; Makino and Malinow 2009).

La SEP est de plus en plus utilisée pour mesurer la régulation de surface et le recyclage des rAMPA. Le FRAP est une approche d'imagerie en fluorescence qui mesure le retour de centaines de milliers de récepteurs présents dans la tache blanchie. Cependant, les techniques d'imagerie de molécules uniques qui ont été développées donnent accès à toute la distribution des comportements de récepteurs membranaires éliminant l'effet de population. Alors, contrairement aux techniques en molécules uniques, le FRAP est moins précis et fournit moins d'informations, mais a le grand avantage d'être simple à utiliser et applicable pour les études dans les tranches de cerveau. La technique des molécules uniques permet d'étudier directement le comportement de récepteurs dans la synapse, il est donc possible d'élucider les mécanismes d'immobilisation des récepteurs aux sites synaptiques.

En molécule unique, le premier enregistrement du mouvement des rAMPA à la surface des neurones a été effectué par Borgdorff & Choquet (2002), ils ont utilisé une approche relativement grossière de suivi de récepteur unique en vidéomicroscopie à l'aide de billes de latex micrométriques liés via des anticorps contre la sous-unité GluA2 endogène de rAMPA (Borgdorff and Choquet 2002). Dans ce travail initial, ils ont obtenu la preuve que les rAMPA se déplacent à la surface des neurones de l'hippocampe en culture par diffusion brownienne. Ils ont constaté qu'en moins de quelques secondes les rAMPA alternent entre un comportement diffusif et stationnaire. Ils ont également obtenu la première preuve que la diffusion des rAMPA est régulée (figure 1.13). En effet, la hausse du calcium intracellulaire, un messenger clé dans la plasticité synaptique, déclenche rapidement l'immobilisation et l'accumulation locale des récepteurs à la surface des neurones. Ce travail avait plusieurs limitations importantes, notamment l'utilisation de billes de latex comme sonde qui empêche le suivi de récepteurs synaptiques, l'utilisation d'un ionophore de calcium non physiologique pour élever le calcium intracellulaire et l'utilisation de cultures primaires de neurones au lieu de préparations plus pertinentes physiologiquement, comme la préparation des tranches de cerveau.

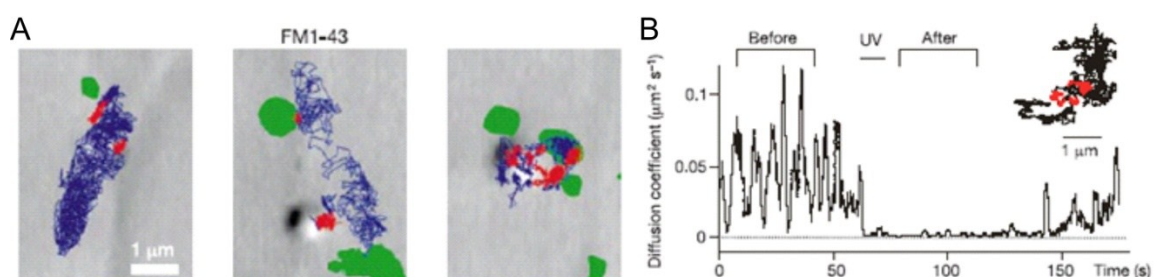


Figure 1.13 : Diffusion membranaire des rAMPA **(A)** Trajectoire des récepteurs rAMPA contenant la sous-unité GluR2. En bleu mouvement libre, en rouge mouvement confiné et le vert est le FM1-43 qui marque les vésicules présynaptiques. **(B)** Le coefficient de diffusion diminue drastiquement après le flash d'UV qui libère le calcium extracellulaire (Borgdorff and Choquet 2002).

Une variété d'approches optiques et biochimiques a depuis été utilisée pour enquêter sur la régulation de surface des rAMPA dans différents contextes. Afin d'y faire face, deux défis importants doivent être relevés, premièrement la mesure du mouvement des récepteurs à l'intérieur de la fente synaptique et deuxièmement être capable de le faire dans les tissus plus intacts comme les tranches de cerveau. Les deux défis nécessitent l'utilisation

de meilleures sondes que les billes de latex initialement utilisées. Plusieurs percées technologiques ont été importantes dans cette entreprise. La capacité d'enregistrer le mouvement de petits fluorophores individuels, qu'ils soient organiques tels que les colorants de cyanine (Tardin, Cognet et al. 2003) ou inorganiques tels que les points quantiques semi-conducteurs (Tardin, Cognet et al. 2003), a joué un rôle important en permettant l'enregistrement du mouvement des rAMPA directement à l'intérieur des synapses (Groc, Lafourcade et al. 2007; Groc, Choquet et al. 2008). Une série d'études utilisant ces sondes ont établi qu'une grande proportion de rAMPA sont également mobiles à l'intérieur des synapses et que les récepteurs échangent de manière permanente entre les domaines synaptiques et extrasynaptiques (Triller and Choquet 2008). Cependant, bien que les rAMPA synaptiques soient mobiles, leur mouvement est très différent de celui des récepteurs extrasynaptiques. Alors que ces derniers démontrent, au moins dans une première approximation, un mouvement purement aléatoire brownien, les récepteurs synaptiques affichent un mouvement très confiné. Ce qui apparaît dans l'observation de leur mouvement instantané, c'est à dire dans la plage de temps milliseconde, c'est un mouvement assez rapide, atteignant environ la moitié de celle des récepteurs extrasynaptiques (Tardin, Cognet et al. 2003; Bats, Groc et al. 2007; Heine, Groc et al. 2008). Toutefois, lorsque le coefficient de diffusion est mesuré sur quelques secondes, il tombe à des valeurs beaucoup plus faibles que celles mesurées dans la membrane extrasynaptique. C'est parce que les déplacements observés pour les durées plus longues (en secondes) atteignent un plateau de quelques centaines de nanomètres. Une différence similaire entre le coefficient de diffusion instantanée ou «micro» et de la diffusion à long terme, ou «macro», a déjà été observée par Fujiwara en 2002 et attribuée à la diffusion entre les sous-compartiments membranaires, la hop-diffusion (Fujiwara, Ritchie et al. 2002). Dans ce modèle, les molécules sont libres de se déplacer à l'intérieur, mais confinées à l'intérieur des compartiments délimités par des obstacles (qui pourraient être des clôtures ou des piquets). Ils échappent à l'occasion de ces domaines (figure 1.14), leur permettant de diffuser sur de longues distances, mais avec un coefficient apparent de diffusion faible. Un modèle similaire pourrait s'appliquer aux synapses.

Par la suite, le laboratoire de Daniel Choquet a utilisé les techniques de molécules uniques pour élucider l'interaction des récepteurs avec les protéines de la densité postsynaptique. Voici quatre études très importantes concernant la diffusion membranaire des rAMPA et les interactions à la synapse : (i) en utilisant le suivi de fluorophores uniques permettant ainsi d'accéder à la fente synaptique, il a été montré que les mobilités latérales sont différentes pour les rAMPA et les rNMDA, que des changements dans l'activité neuronale modifient la mobilité du rAMPA mais pas celle du rNMDA, tandis que l'activation de la protéine kinase C (PKC) modifie la mobilité des deux récepteurs (Groc, Heine et al. 2004) (ii) l'utilisation de points quantiques uniques a démontré que l'échange de rAMPA entre les sites extrasynaptiques et synaptiques par diffusion latérale dépend principalement de l'interaction entre la stargazine et la PSD-95. L'échange ne dépend pas de la queue c-terminale de la sous-unité GluA2 du rAMPA, mais de la queue c-terminale de la stargazine. Ainsi, la perturbation des interactions entre la stargazine et la PSD-95 augmente fortement la diffusion de surface des rAMPA empêchant ainsi l'accumulation des rAMPA aux sites postsynaptiques. Ces résultats suggèrent un modèle dans lequel l'interaction stargazine-PSD-95 joue un rôle clé pour piéger et stabiliser transitoirement les rAMPA diffusant dans la densité postsynaptique (Bats, Groc et al. 2007). (iii) Il a été montré que l'activité synaptique immobilise localement la sous-unité GluA1 du rAMPA aux synapses. En utilisant le suivi de points quantiques uniques et en utilisant une toxine qui bloque l'activité des boutons présynaptiques individuels, il a été montré que l'activité synaptique locale réduit l'échange entre les domaines synaptiques et extrasynaptiques des rAMPA par diffusion, résultant en une accumulation postsynaptique des GluA1. La mesure de la diffusion des GluA1 dans les synapses voisines inactives a révélé que GluA1 est très mobile à ces synapses et qu'ils s'échappent plus fréquemment des synapses. Ainsi, l'activité locale restreint la mobilité de GluA1 sur une échelle submicronique, ce qui permet de définir l'activité de la synapse comme un mécanisme d'entrée spécifique pour régler la composition et le nombre des rAMPA (Ehlers, Heine et al. 2007). (iv) Il a été démontré que la présence des zones d'endocytose dans les épines et le recyclage des rAMPA permet de maintenir un bassin de rAMPA mobiles aux synapses. Aussi, les chercheurs ont constaté que la potentialisation synaptique est accompagnée d'une accumulation et d'une immobilisation du rAMPA aux synapses, résultant à la fois de l'exocytose et de la

stabilisation des récepteurs à la PSD. Ainsi, le recyclage des récepteurs est crucial pour maintenir une population mobile de rAMPA à la surface pouvant être livrée aux synapses pour augmenter la force synaptique (Petrini, Lu et al. 2009).

Finalement, le mouvement des récepteurs à l'intérieur et à l'extérieur des synapses est l'un des mécanismes fondamentaux pour changer rapidement le nombre de récepteurs fonctionnels pendant la transmission basale et la plasticité synaptique. Les études récentes ont montré que la variation du nombre de récepteurs synaptiques est régulée par la phosphorylation, l'endocytose/l'exocytose ainsi que par la diffusion latérale des récepteurs dans le plan de la membrane. Ces événements sont interdépendants, ils sont réglementés par l'activité neuronale et par les interactions avec les protéines de la PSD. Le mouvement perpétuel des récepteurs doit être concilié avec l'apparente stabilité et la plasticité de la membrane postsynaptique. Dans une synapse, la densité moyenne locale des récepteurs correspond à un équilibre entre les récepteurs entrants ou sortants par la membrane. Ainsi, la stabilité de la PSD et de ses récepteurs associés doit être considérée dans un contexte d'assemblage moléculaire en équilibre, permettant l'échange de ses éléments, sans changer la valeur de moyenne ou de l'organisation générale. À la lumière des résultats obtenus par les techniques électrophysiologiques et optiques, la membrane postsynaptique doit maintenant être considérée comme une structure statistique anisotrope. Plus précisément, le domaine postsynaptique enrichi en récepteurs se comporte comme un donneur ou un accepteur de récepteurs, dans un échange continu entre les pools synaptiques et non synaptiques (figure 1.14).



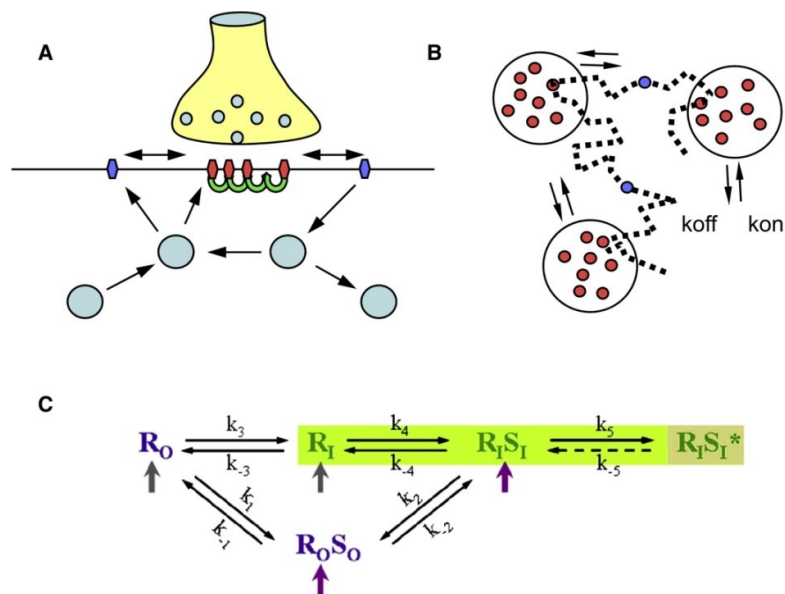


Figure 1.14 : La synapse en mouvement. **(A)** Les récepteurs échangent perpétuellement entre les domaines synaptiques (en rouge), extrasynaptiques (en bleu) et intracellulaires. Le pool intracellulaire inclut la synthèse, le transport, l'apport à la membrane, le recyclage et la dégradation. **(B)** Représentation des synapses (cercles) vues par le dessus avec des récepteurs diffusant dans la membrane avec une constante d'entrée ( $K_{on}$ ) et de sortie ( $K_{off}$ ) aux synapses. **(C)** Schéma des étapes pour la stabilisation des récepteurs aux synapses. Les récepteurs (R) pourraient être préassemblés avec une protéine de stabilisation (S) à l'extérieur des synapses (indice O) et livrés à la membrane ( $k_1, k_2$ ) avec ou sans la protéine de stabilisation (flèche mauve). Les récepteurs peuvent entrer dans les synapses (indice  $k_3$ ) définie par la zone verte et être stabilisés par une protéine stabilisatrice ( $k_4$ ) et atteindre un haut niveau de stabilisation ( $k_5$ ) (Triller and Choquet 2008).

En conséquence du mouvement perpétuel des récepteurs aux synapses, l'augmentation du nombre de récepteurs aux synapses lors de la plasticité peut être considérée comme un changement dans le point de réglage de l'équilibre entre les récepteurs synaptiques et extrasynaptiques (figure 1.14c). Cet équilibre est régulé par des interactions avec les molécules de la PSD soit en changeant le nombre de molécules à la PSD ou l'affinité des récepteurs pour les protéines d'ancrage. Tout changement dans ces deux paramètres aura comme conséquence de modifier le nombre de récepteurs postsynaptiques.

## 1.7 Conclusion

Dans ce projet de doctorat, j'ai étudié les interactions moléculaires des rAMPA aux synapses dans les paradigmes de plasticité. Au début du projet, seulement deux laboratoires

utilisaient la technique de suivi de molécules uniques appliquée aux récepteurs neuronaux (Meier, Vannier et al. 2001; Serge, Fourgeaud et al. 2002). De plus, l'utilisation des points quantiques comme sonde fluorescente n'en était qu'à ses balbutiements (Dahan, Levi et al. 2003; Groc, Heine et al. 2004). Contrairement à aujourd'hui, il était impossible d'acheter commercialement les points quantiques et on devait se les procurer chez les laboratoires producteurs (Dubertret, Skourides et al. 2002). J'ai donc eu à développer la technique de suivi de molécules uniques à partir de zéro dans le laboratoire, incluant l'identification i) d'anticorps disponibles sur le marché qui sont suffisamment spécifiques pour l'application (qui s'avèrent rares), et ii) de QD suffisamment stables, bio-compatibles et fonctionnalisés. Une fois trouvés, j'ai mis au point iii) les conditions d'application d'anticorps-QD sur les neurones, iv) les protocoles d'imagerie optique et v) les programmes d'analyse de suivi de molécules uniques. La somme de temps que toutes ces étapes ont nécessité fut considérable (presque quatre ans), particulièrement en raison de la portion programmation, de quelques difficultés rencontrées au niveau de la spécificité des anticorps, de la disponibilité d'outils moléculaires et des QD de qualité, et de ma transition de la physique au domaine des neurosciences. Le chapitre 2 décrira l'implémentation de la technique de suivi de points quantiques uniques sur les récepteurs neuronaux.

Une fois la technique bien établie, je me suis penché sur les mécanismes d'immobilisation des récepteurs aux synapses lors de la plasticité synaptique. Il n'était pas encore connu comment les changements locaux de diffusion des récepteurs sont régulés dans la plasticité synaptique. Lors de processus de la LTP, les mécanismes sous-tendant les changements dans le nombre de récepteurs à la membrane étaient peu connus. Quelles sont les protéines postsynaptiques impliquées dans l'augmentation des récepteurs aux synapses? On savait que la CaMKII a une implication essentielle dans la LTP et qu'elle translocalise aux synapses lors de l'activité synaptique (Shen and Meyer 1999; Hudmon, Lebel et al. 2005). Cependant, aucun mécanisme n'avait été décrit qui mettait en lien l'immobilisation des récepteurs aux synapses et la CaMKII. C'est dans cette optique que s'inscrit le chapitre 3. Pour répondre à ces questions, j'ai utilisé la technique d'imagerie de molécules uniques des rAMPA aux synapses combinée avec l'imagerie optique en fluorescence, la pharmacologie et des outils génétiques modifiant la CaMKII. Aussi, j'ai mis en place des

paradigmes de plasticité qui induisent la LTP dans les neurones de l'hippocampe en culture afin d'évaluer les mécanismes moléculaires qui permettent de varier le nombre de récepteurs aux synapses.

Ensuite, je me suis intéressé à deux différents isoformes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) de la CaMKII et leurs implications dans la diffusion des rAMPA aux synapses ainsi que dans la plasticité. Les fonctions de l' $\alpha$ CaMKII dans la plasticité synaptique ont été largement étudiées (Malinow, Schulman et al. 1989; Pettit, Perlman et al. 1994; Hayashi, Shi et al. 2000; Bayer, De Koninck et al. 2001; Sanhueza, Fernandez-Villalobos et al. 2011). Cependant, très peu de travaux démontrent l'implication de la  $\beta$ CaMKII dans la régulation des rAMPA. On sait cependant que, dans le développement et la plasticité, la  $\beta$ CaMKII est cruciale pour le maintien de la structure des synapses (Fink, Bayer et al. 2003; Okamoto, Narayanan et al. 2007). À l'aide des techniques développées précédemment, j'ai étudié l'impact des deux sous-unités  $\alpha$ CaMKII et  $\beta$ CaMKII dans la régulation de la diffusion des rAMPA aux synapses. Au chapitre 4, je démontre que les deux isoformes sont essentielles à la stabilisation des récepteurs aux synapses et j'ai mesuré des effets différentiels pour chaque isoforme ( $\alpha/\beta$ ) sur les rAMPA aux synapses dans l'activité basale et lors de protocoles de plasticité.

Je me suis aussi intéressé aux mécanismes reliant la CaMKII et l'apport de récepteurs à la membrane par exocytose (chapitre 5). Lors de la LTP, il est possible qu'une augmentation de la fréquence des événements d'exocytose des rAMPA à la membrane postsynaptique apporte un plus grand nombre de récepteurs disponibles aux synapses (Patterson, Szatmari et al. 2010). Pour évaluer le rôle de la CaMKII dans l'exocytose des rAMPA, j'ai utilisé un protocole d'imagerie développé par Yudowski et al. afin de résoudre directement les événements unitaires d'insertion des rAMPA à la surface des neurones (Yudowski, Puthenveedu et al. 2007). Nous avons mesuré que l'amplitude des événements unitaires d'exocytose de GluA1-SEP est plus basse en absence de l' $\alpha$ CaMKII. La CaMKII régule donc le nombre de récepteurs dans les vésicules ou une population de vésicules dans les neurones.

Dans les chapitres 6-7, je discuterai des conséquences de nos découvertes dans un contexte de transmission synaptique et de plasticité. Je discuterai de nouvelles techniques qui permettront d'approfondir notre connaissance au niveau moléculaire de l'apprentissage et de la mémoire.

Finalement, ce travail veut établir la notion que les rAMPA résident dans la membrane plasmique et dans les sites postsynaptiques avec un haut degré de mobilité (Borgdorff and Choquet 2002; Choquet and Triller 2003; Tardin, Cognet et al. 2003; Choquet 2010); que l'implication de l'enzyme CaMKII est cruciale dans la régulation de la diffusion des récepteurs aux synapses (Asrican et al., 2007, Hayashi et al., 2000, Lee et al., 2009, Lisman et al., 2002, Merrill et al., 2005); que la synapse doit être considérée comme un milieu statistique anisotrope et que tous les facteurs (chimiques, électriques) qui interfèrent avec la dynamique du récepteur vont avoir un impact sur le nombre de récepteurs aux synapses et ainsi modifier la force de la transmission synaptique excitatrice (Triller and Choquet 2008). Ceci est un mécanisme général dans la régulation de la transmission synaptique, l'apprentissage et la mémoire.

## **2 Suivi de molécules uniques : développement et applications aux récepteurs membranaires**

### **2.1 Introduction**

Le suivi de molécules uniques est une technique de microscopie optique qui mesure la position et le déplacement de molécules individuelles, donnant accès à la distribution complète du comportement des molécules. Cette technique permet de mesurer les dynamiques spatio-temporelles complexes d'une molécule donnée, celles-ci étant variables au fil du temps. Appliquée aux synapses, elle mesure la dynamique et les processus de régulation des récepteurs directement dans la fente synaptique. C'est donc un outil très puissant, mais l'information qui permet de bien comprendre son application est dispersée dans la littérature. Ce chapitre a pour but d'apporter un traitement concis sur cette méthode appliquée aux récepteurs synaptiques. En premier lieu, il décrira les types de marqueurs disponibles pour étiqueter les récepteurs, les méthodes appropriées du suivi de molécules uniques et les algorithmes nécessaires pour extraire les trajectoires synaptiques et extrasynaptiques d'une série d'images. Ensuite, les procédés mathématiques pour obtenir les paramètres de diffusion des trajectoires seront décrits ainsi que les analyses statistiques propres aux récepteurs membranaires.

### **2.2 Matériel et méthodes**

#### **2.2.1 Culture neuronale**

Les hippocampes de rats sont disséqués au jour post natal 0 (P0) jusqu'à P3 et les cellules sont dissociées mécaniquement (trituration à l'aide de pipettes Pasteur) et à l'aide d'enzymes. La solution de papaïne (12 U/ml; Worthington, Freehold, NJ) est constituée d'une solution HBSS sans  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , 0.42 mg/ml cystéine (Sigma), 250U/ml DNase1 (type IV; Sigma), 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , pénicilline (50 U/ml)/streptomycine (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 1 mM sodium pyruvate, et 1 mg/ml glucose (Invitrogen). Suite à la dissociation, les cellules sont lavées et centrifugées dans du Neurobasal contenant du BSA (2 mg/ml et 20 mg/ml,

respectivement), Pen/Strep, glucose, pyruvate, et DNase1 (type IV; Sigma); elles sont ensuite déposées sur des lamelles de microscope en verre ou en aclar enduites de poly-D-lysine avec une densité de  $\sim 75$  cellules/mm<sup>2</sup>. Le milieu de culture est du Neurobasal additionné de B27, de pénicilline/streptomycine (50 U/ml; 50 µg/ml) et 0.5 mM L-glutamax (Invitrogen), et 2% de FBS a été ajouté pour les jours 0-5. La cytosine <sup>β</sup>-D-arabinofuranoside (5 µM; Sigma) est ajoutée au milieu de culture au jour 5 après le dépôt sur lamelle pour réduire le nombre de cellules non neuronales. Après 4 jours en culture, la moitié du milieu de culture est changé par du milieu frais sans Ara-C, ainsi que par la suite, deux fois par semaine (Hudmon, Lebel et al. 2005).

### **2.2.2 Transfection de neurones**

Les neurones de 8-11 jours sont transfectés avec les plasmides appropriés, et la solution de transfection contient un mélange de 4 µl de Lipofectamine 2000 et de 1 µg d'ADN total dans 200 µl de Neurobasal. Le mélange est déposé sur les cellules pendant 2-4 heures et les cellules sont transférées dans du milieu frais. Les cellules peuvent être imagées entre 12 et 72 heures après la transfection.

### **2.2.3 Perfusion et imagerie**

Les lamelles de neurones en culture sont placées dans une chambre Warner RC-41LP sur un microscope inversé à épifluorescence (Axiovert 200M, Carl Zeiss International, Thornwood, NY, États-Unis). La température de la perfusion est maintenue à 35°C à l'aide d'une chambre Warner QE-1, d'un crayon chauffant SH-6 et d'un amplificateur à deux canaux (TC-344B). Les changements de solution sont effectués à l'aide d'un ALA-VM4 de Harvard Apparatus, et le contrôle des canaux est automatisé par ordinateur à l'aide d'un logiciel maison (RIG).

Les cellules sont imagées dans une chambre ouverte montée sur le microscope inversé équipé d'un objectif 63X à l'huile (NA 1,4). La fluorescence des QD, EGFP, Mitotracker rouge, Homer DsRed est détectée par un éclairage utilisant une lampe au xénon et des cubes de filtres. L'excitation et la détection des fluorophores ont été effectuées à l'aide des cubes Zeiss filter10 pour GFP, un ensemble Chroma QD655 de filtres pour les

points quantiques et Zeiss filter15 pour la fluorescence rouge. Pour l'imagerie QD, des échantillons sont éclairés pendant 50 ms. Le temps d'imagerie pour un film sur un neurone donné est habituellement de 20 secondes. Pour l'EGFP, le DsRed et le Mitotracker rouge, les images sont obtenues avec un temps d'intégration de 500-1000 ms. La fluorescence émise est détectée en utilisant une caméra CCD de type «*Electron Multiplying Charge Coupled Device*» (EMCCD) (Cascade 512B, Cascade 1K, Roper Scientific). Les QD-étiquetés sur les récepteurs sont suivis sur une sélection de régions dendritiques à travers la lamelle, qui contient des synapses étiquetées avec Mitotracker ou Homer-GFP. Plusieurs champs sont imagés sur chaque lamelle avec l'imagerie en temps total par lamelle allant de 10 à 30 min.

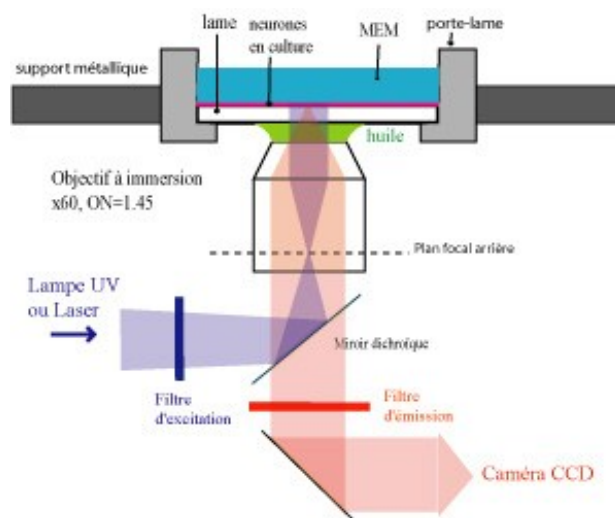


Figure 2.1 : Schéma expérimental. Microscope inverse avec un objectif à l'huile 63X, NA 1.4, Lampe au xénon utilisée avec des cubes de filtres et une caméra CCD (Adapté de D. Choquet web).

#### 2.2.4 Statistiques

Le test statistique de Wilcoxon a été utilisé pour comparer la médiane des différentes populations de récepteurs (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Le test de Kolmogorov–Smirnov a été utilisé pour comparer les différentes populations (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 2.3 La méthode de suivi de molécules uniques

Le suivi d'une particule (*single particle tracking* ou SPT) d'une seule molécule (*single molecule tracking* ou SMT) et de multiples particules se réfère à la procédure manuelle ou automatique de reconstitution de trajectoires. Les trajectoires nous permettent d'extraire les informations physiques sur les propriétés de diffusion de la particule ou les propriétés physiques du milieu environnant. Dans cette section, nous discuterons du marquage des molécules étudiées avec une étiquette, de la reconnaissance d'objet, de la localisation nanométrique des molécules et de l'extraction des trajectoires afin d'obtenir des informations quantitatives tels les courbes de déplacement moyen, les modes de diffusion et le coefficient de diffusion.

### 2.3.1 L'étiquette

Afin de mesurer la position d'une molécule, il est essentiel de coller une étiquette sur la protéine à étudier. L'étiquette est composée de deux principales sections, soit une sonde souvent fluorescente qui permet de faire l'imagerie et un ligand qui fait le lien entre la protéine et la sonde. Qu'elle soit organique ou inorganique, la sonde doit être liée à la protéine étudiée au moyen d'un ligand spécifique (figure 2.2). La spécificité du ligand peut être obtenue en utilisant des ligands naturels, des peptides, une liaison chimique covalente, de la biotine ou des anticorps. Ces liens peuvent être utilisés pour reconnaître les récepteurs endogènes non modifiés ou en ajoutant génétiquement et/ou chimiquement une balise cible sur des récepteurs modifiés.



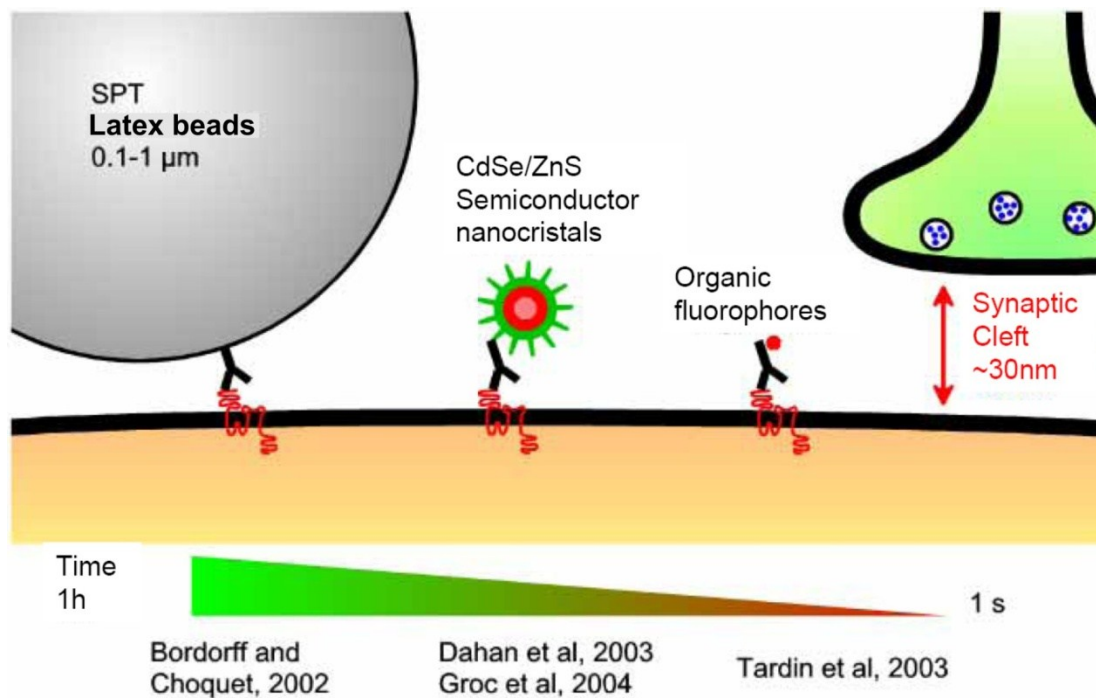


Figure 2.2 : Les différentes étiquettes utilisées dans le suivi de molécules uniques. Chronologiquement, les billes de latex, les fluorophores organiques et les points quantiques (adapté de Cognet, Groc, Choquet).

Les ligands adéquats entre les sondes et les molécules étudiées doivent au préalable remplir certaines conditions; ils doivent se lier aux domaines extracellulaires des récepteurs dans les cellules vivantes et ce, sans modifier leur fonction. L'affinité de liaison doit être dans la gamme nanomolaire pour assurer la stabilité du complexe récepteur-ligand. L'une des conditions les plus difficiles à respecter est le contrôle de la stœchiométrie, qui exige habituellement le contrôle non seulement du nombre de ligands sur la sonde, mais aussi le nombre de sites accepteurs sur la molécule étudiée.

Ces conditions requises sont remplies différemment pour les différents ligands. Pour les récepteurs à neurotransmetteur, il y a peu de ligands naturels (AMPA, glutamate) qui ne peuvent être utilisés principalement en raison de leurs trop faibles affinités. Dans la plupart des cas, seuls les anticorps sont disponibles pour la reconnaissance. L'étiquetage spécifique des récepteurs est mieux réalisé en utilisant des balises artificielles sur la protéine étudiée, ce qui permet l'utilisation d'excellents ligands. Diverses stratégies ont été utilisées avec succès : les balises épitopes (Meier, Vannier et al. 2001; Serge, Fourgeaud et al. 2003), les

balises biotines (Howarth, Takao et al. 2005) ou un site de liaison à une toxine (Sekine-Aizawa and Haganir 2004).

Il est aussi possible d'utiliser les protéines fluorescentes comme balises sur les récepteurs. Elles représentent un cas particulier dans lequel le fluorophore est génétiquement encodé directement sur la protéine étudiée. Le faible rapport signal-sur-bruit généré par ces fluorophores naturels les rend difficiles à utiliser pour l'imagerie de molécules uniques. Cependant, il est possible d'utiliser des ligands de type anticorps qui possèdent une très haute affinité pour les fluorophores naturels afin d'étudier la diffusion de ces molécules fluorescentes de fusion. L'étiquette peut être utilisée sur n'importe quels types de protéines membranaires et dans tous les types cellulaires. Regardons brièvement quelles sondes ont été développées et utilisées pour l'étude des récepteurs membranaires sur les neurones.

Tel que mentionné précédemment, la première sonde utilisée pour le suivi de récepteurs uniques sur les neurones est une bille micrométrique. Non fluorescentes, elles sont visibles en microscopie en lumière transmise et elles permettent l'acquisition de très longues trajectoires (Borgdorff and Choquet 2002). Évidemment, dû à sa taille micrométrique, la bille ne peut accéder aux zones synaptiques, excluant ainsi cette sonde des études de récepteurs aux synapses. Ensuite, des études utilisant des fluorophores organiques de très petite taille ont permis d'étudier la dynamique des récepteurs aux synapses (Tardin, Cognet et al. 2003). Malheureusement, la photostabilité de ces fluorophores est faible au régime de lumière nécessaire pour les détecter, limitant ainsi le suivi de molécules à quelques secondes au maximum. Ceci entrave l'acquisition de longues trajectoires empêchant d'obtenir de l'information à long terme sur le comportement des récepteurs et de mesurer la régulation des récepteurs lors de protocoles avec périodes d'activité synaptique accrue, précédés et suivis de périodes d'activité régulière.

Les points quantiques ou *quantum dots* (QD) sont des sondes fluorescentes inorganiques de taille intermédiaire aux billes et au fluorophore organique (figure 2.2). D'une taille approximative de 3-10 nm, ce sont des cristaux de semiconducteurs qui sont denses en électron et résistants au photoblanchiment (Wu, Liu et al. 2003). Cependant, ces

nanocristaux ne sont pas biocompatibles et on doit les fonctionnaliser pour rendre leur utilisation possible sur du tissu vivant; la fonctionnalisation augmente la taille du QD jusqu'à 10-30 nm (Pinaud, Clarke et al.). Alors, de par leur taille relativement petite et leur grande photostabilité, les QD représentent une excellente sonde pour l'étude de récepteurs aux synapses. Il est connu que les propriétés des QD permettent d'enregistrer la mobilité des molécules individuelles à la surface des neurones et ce, même dans les compartiments cellulaires confinés (Dahan, Levi et al. 2003; Bats, Groc et al. 2007; Petrini, Lu et al. 2009). Ils ont un spectre d'émission étroit et qui peut être accordé dans toute la plage de longueurs d'onde visibles (Dubertret, Skourides et al. 2002). Ils sont plus brillants que les fluorophores organiques permettant la mesure en haute résolution (Wu, Liu et al. 2003). Les QD ont la propriété de clignoter de façon aléatoire, et la mesure du clignotement permet d'identifier avec certitude les QD uniques (Nirmal, Dabbousi et al. 1996) (figure 2.3). De par leur nature cristalline, il est aussi possible de les visualiser au microscope électronique (Dahan, Levi et al. 2003). La capacité d'acquérir à la fois par fluorescence et en microscopie électronique des images avec les mêmes sondes et les mêmes procédures d'étiquetage permet d'accéder à deux types d'informations apparemment inconciliables : la dynamique temporelle et la haute résolution de la localisation cellulaire.

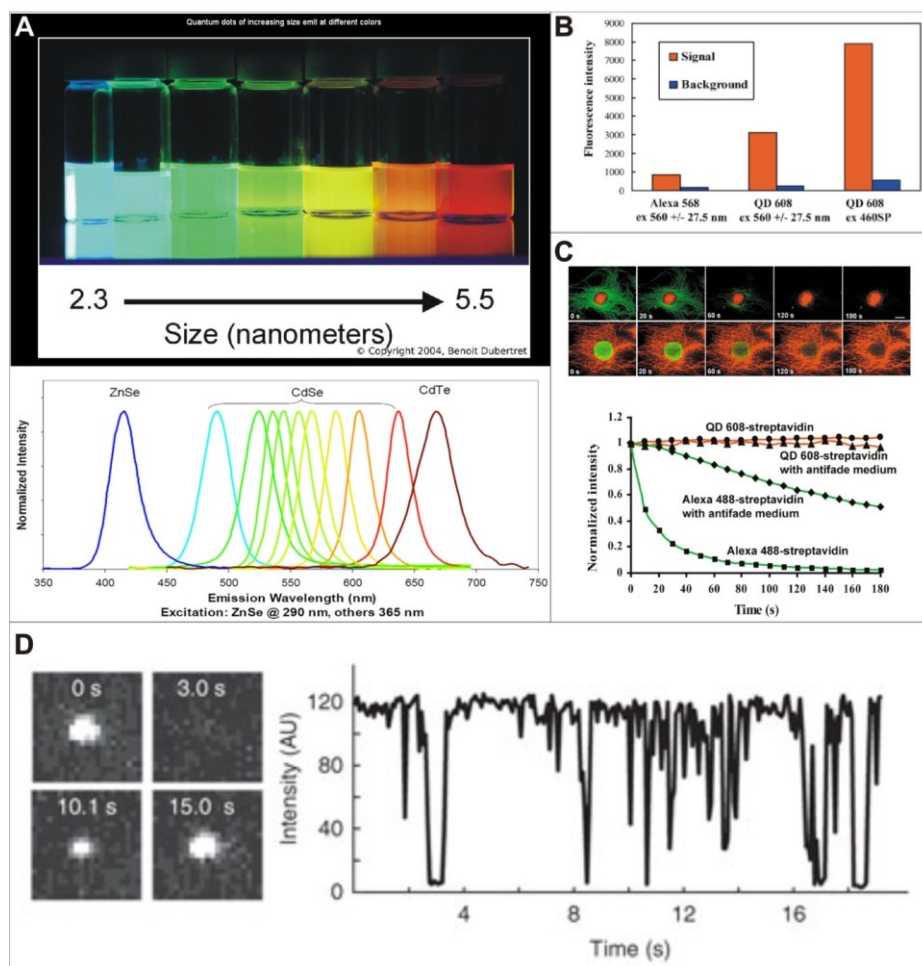


Figure 2.3 : Propriétés des points quantiques. **(A)** Fluorescence sur toutes les longueurs d'ondes (Dubertret 2004, qdots.com). **(B-C)** Émission intense et peu de photoblanchiment (Wu, Liu et al. 2003). **(D)** Clignotement (Nirmal, Dabbousi et al. 1996).

Les QD offrent donc un compromis favorable entre les fluorophores de petite taille et les billes micrométriques pour les expériences de type molécule unique dans les cellules vivantes et seront des outils précieux pour les études de la dynamique des processus cellulaires. L'application des QD aux rAMPA synaptiques a permis de dévoiler plusieurs processus moléculaires des interactions récepteurs-synapses (Groc, Heine et al. 2004; Bats, Groc et al. 2007; Ehlers, Heine et al. 2007; Groc, Choquet et al. 2008; Heine, Groc et al. 2008; Petri, Lu et al. 2009). Cependant, la taille du complexe QD-ligand est légèrement plus grande que le 20 nm de la taille de la fente répertoriée sur des tissus fixés en EM (Groc, Lafourcade et al. 2007). Il est donc important de quantifier l'effet de la taille de la sonde dans la diffusion des récepteurs synaptiques.

### 2.3.2 Effet de la taille de l'étiquette

À l'échelle des sondes de taille nanométrique, le mouvement des récepteurs extrasynaptiques à la membrane n'est pas régi par la masse ou la taille de la sonde, mais plutôt par le mouvement de la protéine membranaire. En effet, la viscosité des membranes est de 100 à 1000 fois supérieure à celle du milieu extracellulaire. Dans des environnements restreints, comme dans la fente synaptique, la taille et la valence de la sonde peuvent avoir un impact dans la diffusion des récepteurs. Dans leur étude, Groc et al. ont mesuré l'impact des différentes stratégies d'étiquetage en utilisant des fluorophores organiques et des QD, ils ont comparé leurs mesures dans la membrane extrasynaptique et dans les synapses étiquetées avec le Mitotracker (Groc, Lafourcade et al. 2007). Les cultures de neurones d'hippocampes ont été transfectées avec la sous-unité des rAMPA GluA2 fusionnés avec un site bungarotoxine (BBS) et une GFP sur la boucle extracellulaire. Les sous-unités BBS-GFP-GluA2 ont ensuite été suivies à la surface des neurones en utilisant trois différentes molécules uniques avec des complexes ayant des tailles (QD-Ab > Cy5-Ab > Cy5-BTX) et valences (QD-Ab/Cy5-Ab/Cy5-BTx: 2/2/1), où QD-Ab désigne un QD couplé à un anticorps anti-GFP, Cy5-Ab un Cy5 couplé à un anticorps anti-GFP, et Cy5-BTX un Cy5 couplé à bungarotoxine (BTX, 8 kDa). La comparaison de la diffusion des trois complexes dans la membrane extrasynaptique a révélé que les distributions cumulatives des coefficients de diffusion instantanée et les valeurs médianes des récepteurs totaux et mobiles ne sont pas significativement différentes (voir figure 2.4).

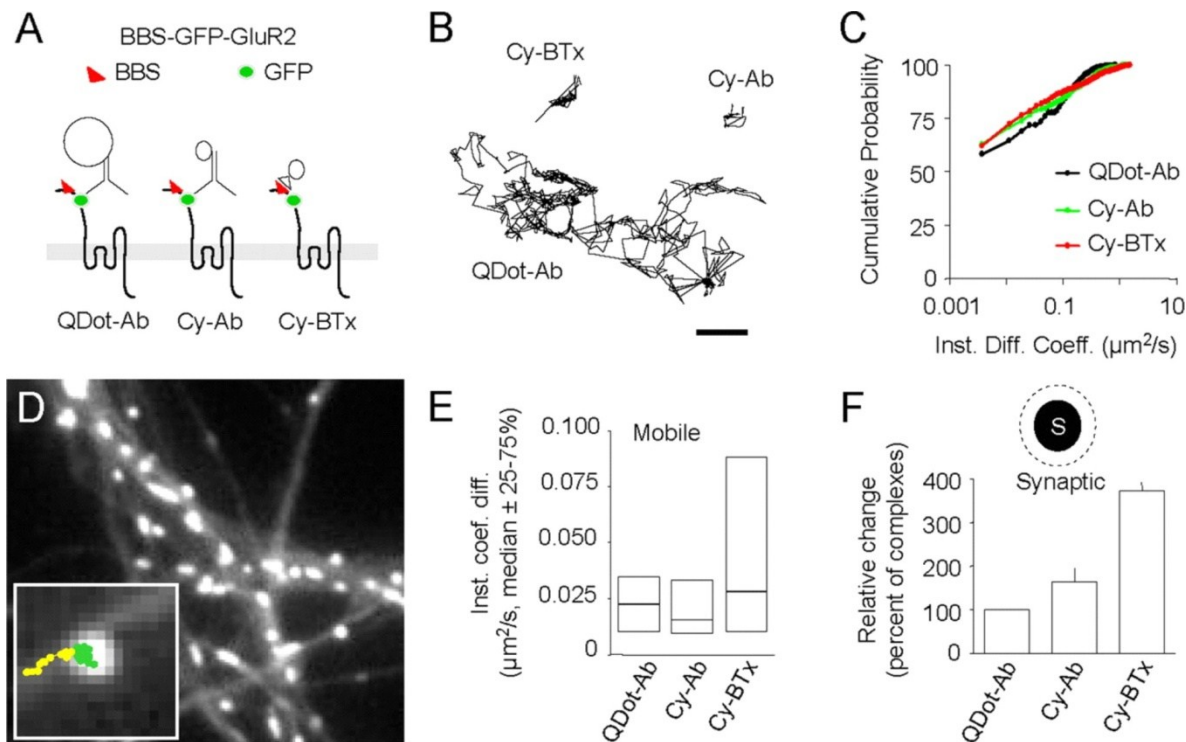


Figure 2.4 : Effet de la taille de l'étiquette (Groc, Lafourcade et al. 2007). **(A)** Les différentes sondes testées. **(B)** Trajectoires obtenues pour chaque fluorophore. **(C)** Fréquence cumulative de la diffusion des sondes. **(D)** Exemple de marquage présynaptique (mitochondrie) avec trajectoire synaptique. **(E)** Médiane des sondes. **(F)** Échange relatif des sondes aux synapses.

Dans les synapses, les valeurs médianes des coefficients de diffusion instantanée pour les trois complexes ne sont pas significativement différentes, le pourcentage de récepteurs immobiles non plus. Cependant, les distributions du coefficient de diffusion instantanée des récepteurs mobiles sont différentes : le plus petit complexe (Cy5-BTX) affiche une plus large gamme de diffusion que les QD-Ab et Cy5-Ab. Ensemble, ces résultats indiquent que les trois complexes à base d'anticorps fournissent des outils équivalents pour l'étude de la diffusion synaptique, bien que les petits complexes permettent la visualisation supplémentaire d'un sous-ensemble de récepteurs hautement diffusants. En conclusion, toutes les sondes examinées permettent le suivi des récepteurs synaptiques, mais il semble que plus la sonde est petite, mieux elle est appropriée pour le suivi de la diffusion rapide des récepteurs synaptiques. Ceci encourage donc le développement de sondes de très faible taille pour les environnements confinés. Malgré

tout, les QD seront la sonde sélectionnée dans ce projet de doctorat pour leur facilité d'utilisation et pour leur capacité d'imagerie à long terme.

### 2.3.3 Le marquage

Afin d'accéder à l'imagerie de molécules uniques, on doit marquer notre protéine cible à la membrane sur des cellules vivantes avec notre étiquette. Pour ce faire, le protocole de marquage est une procédure d'immuno-marquage et, puisque chaque complexe étiquette-protéine possède sa propre caractéristique de concentration et son propre temps d'incubation, je vais décrire la procédure pour les produits utilisés dans le présent projet de doctorat.

J'ai majoritairement utilisé la surexpression de récepteurs fusionnés avec une balise telle la GFP, la SEP ou l'HA avec une détection par anticorps. Pour les anticorps anti-GFP et anti-HA, il est possible de les coupler aux QD en produisant une solution totalisant 10  $\mu$ l de liquide composé de 1  $\mu$ l de QD, 0.2-0.4  $\mu$ g d'anticorps et de compléter avec une solution tampon saline de phosphate (PBS). Je mélange et j'incube le mélange sur glace pendant 30-45 min. Pour l'utilisation des QD comme sonde fluorescente, on doit bloquer les interactions non spécifiques directement sur le complexe anticorps-QD. Pour ce faire, j'ajoute 20  $\mu$ l de caséine 10X de Vector Lab à la solution QD-Ab et 170  $\mu$ l de solution d'imagerie standard. Finalement, j'incube la solution de QD sur glace pendant 5 minutes. Selon mon expérience, cette solution de QD-Ab-caséine est spécifique pour la protéine étudiée et reste compétente pendant 1 à 2 semaines si elle est toujours conservée à 4 °C. Ensuite, cette solution peut être utilisée pour marquer les cellules. Le protocole standard est de diluer de 1 à 5  $\mu$ l dans 200  $\mu$ l de solution d'imagerie, d'incuber pendant 2-5 min et de laver trois fois avec une solution d'imagerie. Quoique largement utilisé dans la littérature, le principal désavantage de ce protocole de marquage est qu'il peut y avoir un délai de 5-20 minutes entre le marquage des cellules et l'imagerie en molécule unique. Compte tenu de la durée de vie d'un récepteur à la membrane (10-30 min), spécialement dans le contexte de plasticité synaptique, il est avantageux de commencer l'imagerie presque au même moment où le complexe se lie à la protéine étudiée. Afin d'optimiser ce paramètre, j'ai développé une méthode qui permet d'imager les récepteurs 1-2 min suite au marquage. Pour optimiser

le temps entre le marquage des récepteurs et le début de l'imagerie, j'approche une pipette de verre remplie de QD-ab à environ 50  $\mu\text{m}$  du neurone choisi et je libère par pression d'air les QD-ab sur le neurone.

J'utilise une pipette de verre de type Warner avec un filament à l'intérieur qui permet de remplir le bout de la pipette par tension de surface (1B150F-4). On doit tirer la pipette avec un bout légèrement plus grand qu'une pipette utilisée en patch clamp, dont l'extrémité doit mesurer  $\sim 5 \mu\text{m}$ . Je remplis le bout de la pipette avec la solution de QD-AB-caséine non diluée, quelques microlitres suffisent largement. J'ai relié le bout de la pipette avec une pression d'air; dans notre cas, nous avons utilisé un appareil de type Picospitzer couplé à un manomètre. Sous le microscope avec perfusion, il suffit ensuite d'approcher la pipette à 50  $\mu\text{m}$  du neurone à imager (figure 2.5) et d'appliquer une pression d'air de 2-5 kPa pendant quelques secondes. La quantité de liquide qui sort de la pipette est de plusieurs femtolitres et se dilue rapidement sous la perfusion; il ne reste ensuite que les complexes QD-AB liés aux protéines étudiées. L'avantage de cette technique est qu'elle permet de démarrer l'imagerie quelques instants après le marquage, et de répéter la procédure jusqu'à l'obtention de la densité de marquage désirée; finalement, la faible quantité de solution requise permet l'utilisation d'anticorps qui sont très coûteux ou très rares. Un exemple vidéo de la technique d'immuno-marquage par pipette est disponible au : <http://www.youtube.com/watch?v=E8V31v2uPOw>.



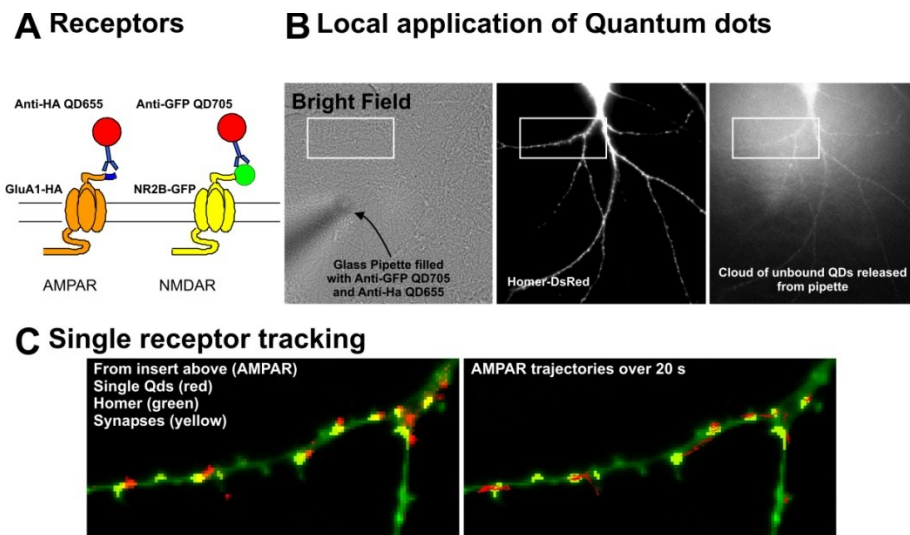


Figure 2.5 : Utilisation d'une pipette pour marquer les récepteurs. **(A)** Schéma des étiquettes utilisées. **(B)** Application des QD-anticorps sur les neurones. **(C)** Exemple de suivi de récepteurs sur les neurones.

Après l'immuno-marquage, l'imagerie des récepteurs couplés aux QD peut débuter. J'utilise des temps d'intégration de 50 ms par image et j'acquiers entre 200 et 1000 images consécutives par neurone. Après l'acquisition des images, il est possible d'obtenir les paramètres biophysiques des récepteurs, soit la position nanométrique des récepteurs, les coefficients de diffusion, les valeurs de confinement et la fraction de récepteurs immobiles. Dans ce projet, j'ai développé un algorithme qui permet d'extraire ces paramètres. Regardons les étapes à franchir pour y parvenir.

### 2.3.4 Les algorithmes de suivi de molécules uniques

L'écriture d'un code pour le suivi de particules est une tâche longue et difficile. Même pour les programmeurs expérimentés, les détails complexes concernant l'efficacité et la précision du suivi et de la localisation sont assez compliqués. Dans la recherche de ce qui a déjà été développé, on peut d'abord se tourner vers la dynamique des fluides ou de la vision par ordinateur, où de nombreux algorithmes de suivi de particules sont disponibles (Buchhave 1991; Cox 1993). Malheureusement, il s'avère que pratiquement aucune des approches ne peut être empruntée dans ce domaine car ces algorithmes supposent que les changements brusques de direction sont rares ou corrélés. Ces hypothèses ne tiennent pas pour l'étude des systèmes biologiques qui considèrent un mouvement aléatoire comme le

mouvement brownien. De plus, tous ne sont pas disponibles pour une utilisation généralisée.

Tout d'abord, il existe un ensemble de programmes écrits en langage IDL (Research Systems, Boulder, CO, États-Unis) développés par John Crocker, David Grier et Eric Weeks qui sont très rapides et précis (<http://www.physics.emory.edu/~weeks/idl/index.html>). Une traduction Matlab a été développée par Daniel Blair et Eric Dufresne. Cet algorithme est très similaire au programme que je vais décrire en détail dans ce chapitre. Il utilise une méthode de filtrage pour la localisation et la minimisation de la distance au carré total pour relier les trajectoires des particules.

Metamorph (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, Californie, États-Unis), Matrox Software Inspector (Matrox Inc, Dorval, Québec, Canada), Imaris et ImageJ sont des logiciels d'analyse d'image disponibles commercialement qui sont en mesure de tracer les trajectoires de particules. Cependant, au début de ce travail de doctorat, ces logiciels n'existaient pas ou traçaient la trajectoire que d'une particule à la fois. De plus, à ce jour, aucun logiciel ne permet de faire une régression linéaire de type gaussien sur la PSF afin d'obtenir une résolution nanométrique sur la position des molécules.

Une autre approche a été récemment démontrée par S. Bonneau et al. (Bonneau, Dahan et al. 2005) qui a développé un algorithme capable de suivre tout objet fluorescent et conçu spécifiquement pour le suivi des QD. Le processus d'appariement pris par Bonneau et al. est une approche non itérative, fondamentalement différente des autres algorithmes. Les chercheurs considèrent les images de fluorescence comme un volume spatio-temporel en trois dimensions (3-D). Dans cette représentation, les trajectoires moléculaires sont considérées comme des courbes 3-D, l'algorithme cherche à récupérer les trajectoires en utilisant une minimisation de l'énergie. Cette approche variationnelle s'avère plus robuste contre la fusion des particules, les ratés de détection des particules et les fausses détections. Cependant, cet algorithme n'existait pas au début du projet de doctorat. De plus, le laboratoire qui a produit le logiciel n'utilise pas cet algorithme car son utilisation est trop compliquée. Nous avons donc eu à développer un logiciel spécialisé pour le suivi de QD

uniques sur les neurones d'hippocampe. Le logiciel a été nommé SQDT pour Single Quantum Dot Tracking et sera disponible sur demande.

L'algorithme développé est schématisé à la figure 2.6, suite à l'acquisition des images, la première étape étant de filtrer afin de détecter les QD. Ensuite, on utilise une régression linéaire gaussienne sur chacun des QD afin de localiser précisément la position du QD et, finalement, on trace les trajectoires des points identifiés. Regardons étape par étape les algorithmes utilisés dans le logiciel.

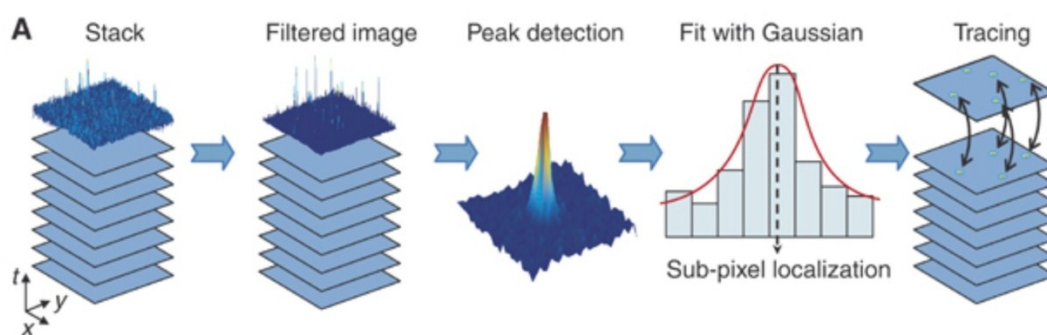


Figure 2.6 : Diagramme schématisé des étapes impliquées dans le SPT. (A) À partir des images acquises, les particules sont détectées dans chaque image. Les images brutes de tous les points identifiés sont régressées afin de déterminer avec précision la position des particules. Les trajectoires sont reconstruites en connectant toutes les positions d'une image à l'autre afin d'obtenir des trajectoires temps-espace (Marguet, Lenne et al. 2006).

### Détection des QD

Il existe plusieurs algorithmes qui permettent la détection des PSF, le plus simple consistant à soustraire une valeur seuil sur les images qui permet d'extraire les pixels les plus intenses. Malheureusement, lorsque l'on effectue l'imagerie sur des neurones vivants, une multitude de sources de bruits tels l'autofluorescence, le chevauchement de la fluorescence entre les filtres et les saletés peuvent compliquer la reconnaissance d'objets. À ce jour, il existe principalement trois types d'algorithmes qui permettent l'extraction des PSF dans les images, soit par l'analyse de Fourier, par l'analyse du « *Maximum likelihood estimator* » (MLE) et par l'analyse d'ondelettes (Smith, Joseph et al. 2010; Yu, Chen et al. 2011; Izeddin, Boulanger et al. 2012). Cependant, au début de ce projet, ces algorithmes n'étaient pas disponibles, alors j'ai développé une nouvelle méthode de détection de PSF en

jumelant le seuil adaptatif et l'analyse morphologique dont la partie seuil adaptatif a été inspirée par les algorithmes d'Antony Choo. Regardons les détails des algorithmes.

La détection des QD utilise le seuil adaptatif qui consiste à trouver la valeur d'intensité moyenne de chaque pixel en calculant la moyenne des pixels voisins. J'utilise une convolution d'un carré de «W» pixels dont la somme est égale à 1 avec l'image originale afin d'obtenir une image qui représente les moyennes locales pour chaque pixel (figure 2.7). Ensuite, il suffit de soustraire l'image originale à l'image moyenne, les QD uniques sont les points de l'image soustraite qui sont plus intenses que la moyenne additionnée d'une constante de la déviation standard ( $kSD$ ). J'extrais ensuite le centroïde de chaque agrégat et cette valeur sera utilisée comme valeur initiale dans la régression gaussienne. La figure 2.7 montre les lignes de l'algorithme en langage de programmation pseudo Matlab et une image de QD uniques sur un neurone avec un temps d'acquisition de 50 ms; l'image est relativement bruitée afin de démontrer la sensibilité de l'algorithme. Finalement, l'algorithme est couplé à une analyse morphologique qui conserve des objets ayant une taille et une forme précises. Alors, l'algorithme du seuil adaptatif couplé à l'analyse morphologique est très puissant et peut être utilisé dans une multitude de cas. Par exemple, en plus des QD, nous l'utilisons pour la détection des synapses sur les images utilisant des marqueurs synaptiques fluorescents.

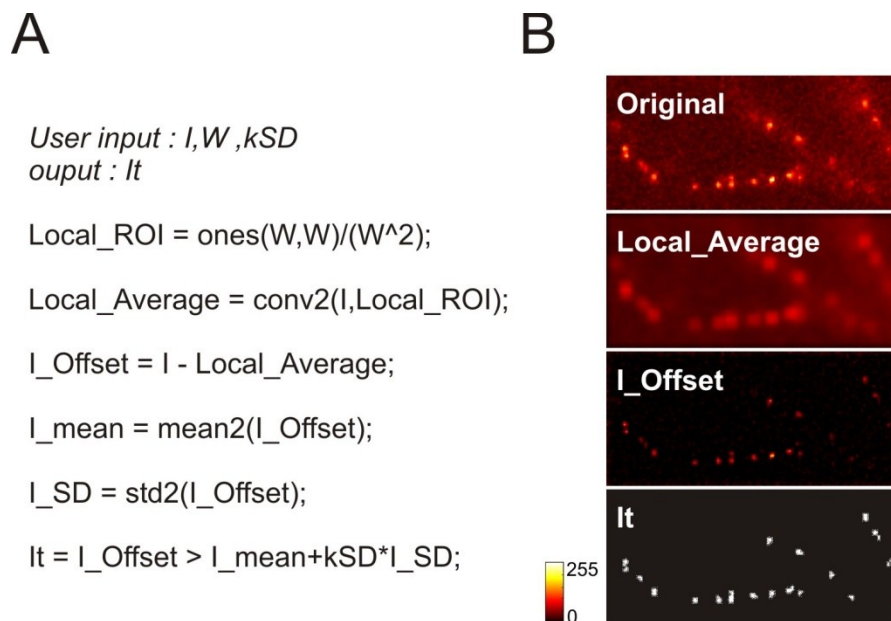


Figure 2.7 : Algorithme de détection des QD. **(A)** Procédure Matlab pour le seuil adaptatif. **(B)** Images correspondantes dans les étapes de l'algorithme.

### Localisation des QD

La résolution d'un microscope optique est environ de  $\lambda/2 \sim 250$  nm; l'image de tout objet de dimension plus petite que  $\lambda/2$  apparaît dans le microscope comme une tache limitée par la diffraction. Bien que les détails dans la tache ne peuvent être résolus, le centre de celle-ci, et donc l'emplacement de l'objet, peut être déterminé avec beaucoup plus de précision. Dans les cas où l'image considérée est une collection d'objets dispersés, il est possible de déterminer les positions relatives de ces objets avec une précision bien meilleure que la longueur d'onde de la lumière, permettant en un sens de dépasser des limitations sur la résolution.

Le calcul du centroïde des signaux de particules fluorescentes individuelles et des molécules permet leur localisation et leur suivi avec une précision d'environ un ordre de grandeur supérieur à la résolution du microscope optique. En effet, lorsque le marquage de la sonde est suffisamment dispersé pour permettre l'imagerie des fluorophores individuels, la tache obtenue par ces fluorophores correspond à la réponse impulsionnelle du système, en anglais *Point Spread Function* (PSF). Même si on était capable de réaliser une lentille parfaite, il y a toujours une limite à la résolution d'une image créée par cette lentille. En

raison de la diffraction, le plus petit point auquel une lentille ou un objectif peut focaliser un faisceau de lumière correspond à la tache d'Airy. Mathématiquement, la figure de diffraction d'une PSF est caractérisée par la longueur d'onde de la lumière ' $\lambda$ ', de l'indice de réfraction ' $n$ ' et de l'ouverture numérique de l'objectif ' $NA$ '. Le patron d'intensité de la PSF, ' $I$ ' est défini par un patron de diffraction de Fraunhofer d'une ouverture circulaire représentée par une fonction de Bessel, mais qui peut-être approximé par une fonction gaussienne en deux dimensions définie comme suit :

$$I = A + I_0 \exp\left(-\frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}{2\sigma^2}\right)$$

où ' $A$ ' est la constante DC, ' $I_0$ ' l'intensité, ' $x$ ' et ' $y$ ' sont les coordonnées de la PSF et ' $x_0$ ' et ' $y_0$ ' représentent la position réelle de l'objet. Aussi, ' $\sigma$ ', l'écart type de la gaussienne en fonction du f-number peut être approximé par :

$$\sigma = 0.44\lambda \frac{f}{D} = \frac{0.22 \lambda n}{NA}$$

L'imagerie de molécules prend ainsi tout son sens lorsque l'on utilise une régression gaussienne sur la PSF car il est possible d'obtenir les valeurs de  $(x_0, y_0)$  avec une précision de l'ordre du nanomètre. Pour ce faire, les régions des images sont extraites de l'image originale et ensuite transmises au programme de régression de courbe gaussienne. La taille de la région de l'image est un paramètre choisi qui doit être suffisamment grand pour intégrer toute la PSF, mais doit être suffisamment petite pour que les autres PSF n'interfèrent pas avec la régression. Pour obtenir les régions des images, l'algorithme va séquentiellement extraire une boîte carrée de taille ' $r$ ' de chaque côté pour chaque position trouvée par le programme de localisation grossière. Cette région de ' $r \times r$ ' pixels est ensuite transmise pour la régression gaussienne. Cette méthode trouve les paramètres d'amplitude de la gaussienne, de la constante DC, de l'écart-type  $\sigma$ , et la position de centre  $(x_0, y_0)$  dans la fonction de Gauss qui correspond le mieux au profil d'intensité du pic. La figure 2.8 montre un exemple de QD unique avec la régression linéaire sur le signal original.

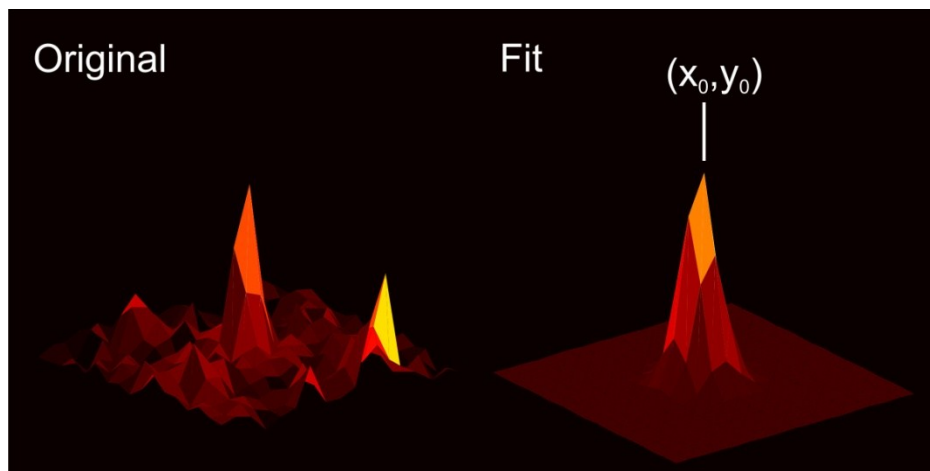


Figure 2.8 : Exemple de QD unique et régression gaussienne pour la localisation de la protéine associée.

Tel que mentionné précédemment, nous avons choisi de simplifier l'analyse par la régression d'une gaussienne au lieu d'une fonction d'Airy, car les images enregistrées en fluorescence ne sont pas assez précises pour distinguer entre ces deux alternatives.

### 2.3.4 Erreur sur la localisation

Il a été montré, que pour le cas de la localisation de molécules uniques, la régression gaussienne obtient la meilleure résolution sur la localisation comparée au centroïde, à la corrélation croisée et la différence de somme absolue (Cheezum, Walker et al. 2001). Aussi, la dépendance de la résolution sur le rapport signal-bruit est optimisée avec une régression gaussienne. Le rapport signal-bruit (S/N) est défini comme l'amplitude du signal ( $I_{particule}$ ) à laquelle on soustrait le bruit de fond ( $I_{background}$ ) sur un facteur bruit ( $\sigma$ ), souvent choisi comme la déviation standard du bruit de fond :

$$\frac{S}{N} = \frac{I_{particule} - I_{Background}}{\sigma}$$

Il a également été montré que la résolution sous-pixels est possible que lorsque le  $S/N > 4$  (Cheezum, Walker et al. 2001).

L'erreur sur la localisation ( $\Delta x$ ) est définie par l'erreur standard : la déviation standard de la PSF ( $s$ ) divisée par la racine du nombre de photons détectés ( $N$ ) :

$$\Delta x = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

Dans un cas idéal, le bruit est limité par les photons détectés et peut se produire lorsque le bruit dans chaque pixel est dominé par les photons provenant de la particule étant localisée. Cependant, sur les cellules vivantes, la localisation est généralement limitée par les photons détectés et les sources communes de bruit de fond. Ce bruit contient l'erreur de lecture, le courant noir, la fluorescence étrangère dans le microscope (causée par exemple par la poussière) et l'autofluorescence cellulaire. Ainsi, la résolution sur la localisation peut être déterminée en considérant le bruit et la pixelisation de la caméra (Thompson, Larson et al. 2002; Yildiz, Forkey et al. 2003). Alors, la résolution en deux dimensions est déterminée par la relation suivante :

$$\Delta x = \sqrt{\frac{s_i^2}{N} + \frac{a^2}{12} + \frac{8\pi s_i^4 b^2}{a^2 N^2}} \quad [2.1]$$

où ( $s_i$ ) est la déviation standard de chaque PSF, ( $a$ ) représente la taille de pixel de la caméra et ( $b$ ) la déviation standard du bruit (Thompson, Larson et al. 2002; Yildiz, Forkey et al. 2003). Afin de déterminer le nombre de photons détectés ( $N$ ), j'ai calibré la caméra en utilisant des QD monodispersés sur une lamelle de verre (figure 2.9). J'ai pris des films de 200 images à des temps d'intégration de 20, 30, 40, 50 et 60 ms. J'ai utilisé les paramètres de gain de caméra identiques à ceux utilisés en imagerie sur neurones vivants; en conséquence, une intégration de plus de 70 ms sature l'image dans ces conditions. Il faut ensuite calculer l'image moyenne pour chaque film aux différents temps d'intégration et construire le graphique de l'intensité moyenne en fonction de la variance pour chaque temps d'intégration afin de faire une régression linéaire sur la courbe et d'obtenir la pente qui définit notre facteur de conversion électrons/compte de la caméra. La figure 2.9A montre la courbe de calibration obtenue et le facteur de conversion pour la caméra amplifiée Cascade 1K binnée à 2 pixels, la valeur étant de 0.0053 é/compte.



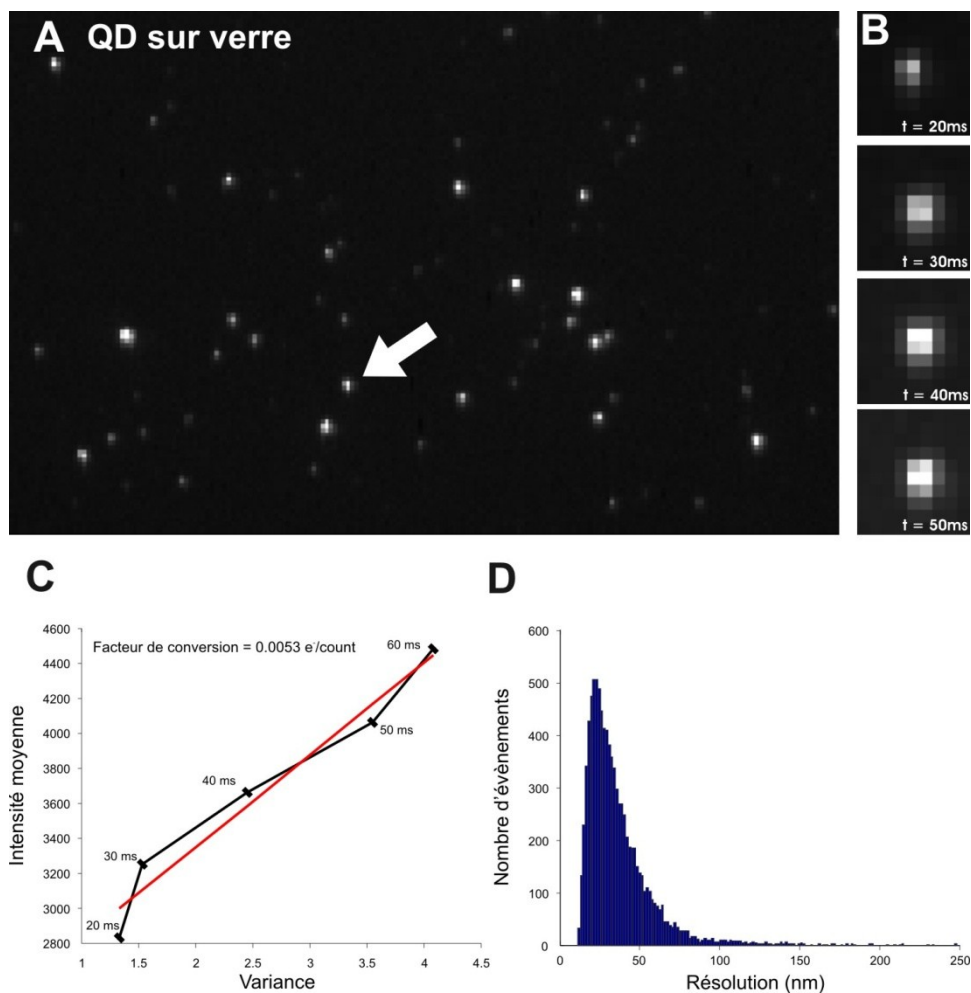


Figure 2.9 : Calibration et calcul de résolution sur la localisation des QD uniques sur cellules vivantes. **(A)** Image moyenne d'un film de 200 images prises à 50 ms. **(B)** Extrait d'un QD unique à différents temps d'acquisition. **(C)** Courbe de calibration de la caméra. **(D)** Calcul de la résolution de QD uniques attachés à des récepteurs sur neurones vivants.

J'ai donc utilisé la relation 2.1 pour calculer l'erreur sur la localisation avec les paramètres expérimentaux de QD sur des neurones vivants, la valeur obtenue étant au mieux de 11 nm et en moyenne de 40 nm. Les QD dont la résolution sur la localisation était plus grande que 75 nm ne sont pas considérés dans la reconstruction de trajectoires.

### 2.3.5 Trajectoires, modes et coefficients de diffusion

L'algorithme de détection de particules décrit ci-dessus génère un ensemble de positions pour chaque séquence d'images; il reste donc à relier ces positions en trajectoires. Cette étape est triviale quand une seule particule reste en vue en tout temps dans la

séquence d'images, mais il peut être difficile de résoudre la trajectoire pour une particule lorsque plusieurs autres sont à proximité et se déplacent de façon aléatoire. Par ailleurs, lorsque la densité est élevée et que les particules se déplacent rapidement, relier les trajectoires devient extrêmement difficile et souvent impossible.

Le processus de liaison est réalisé itérativement : la plupart des algorithmes existants considèrent les images par paires et décident quelles particules sont reliées jusqu'à ce que les trajectoires soient récupérées. En outre, les particules peuvent apparaître et disparaître en se déplaçant à l'intérieur et à l'extérieur du focus, de plus les QD clignotent avec des temps "off" beaucoup plus longs que pour des molécules fluorescentes (figure 2.3) (Nirmal, Dabbousi et al. 1996). Par conséquent, l'algorithme doit relier chaque particule d'une image donnée à une image suivante en tenant compte des autres particules et des particules perdues. Dans le programme de suivi de particules, le schéma utilisé pour choisir l'association appropriée consiste à minimiser la distance au carré. Nous utilisons l'algorithme fourni par Crocker et Grier, mais adapté pour Matlab par Daniel Blair et Eric Dufresne. La tâche de calculer les associations possibles des déplacements au carré est mathématiquement exigeante, mais elle peut être grandement simplifiée en imposant une limite supérieure sur le déplacement. L'utilisateur fournit le paramètre de déplacement maximal et le programme rejette automatiquement les trop grands déplacements. Ce déplacement maximal est généralement choisi pour être inférieur à la distance moyenne entre les particules. Aussi, la perte temporaire de particules est traitée en utilisant un paramètre de mémoire. Le nombre d'images pour lesquelles la particule perdue est maintenue dans la mémoire doit être défini par l'utilisateur. Enfin, un paramètre de longueur de trajectoire fourni par l'utilisateur est utile pour écarter les trajectoires trop courtes.



Figure 2.10: Exemples de trajectoires

De toute évidence, le processus de suivi va échouer à des densités de particules très élevées, où les trajectoires sont tellement alambiquées qu'il est impossible de les reconstruire. La limite de l'applicabilité de suivi de multiples particules est une fonction de la densité et de la mobilité des particules. Généralement, la distance maximale parcourue entre deux images doit être plus petite que la distance moyenne entre les particules. Suite à l'obtention des trajectoires, regardons les traitements analytiques à effectuer.

### 2.3.6 Courbes de MSD

Les trajectoires nous permettent de connaître les coordonnées d'une particule à chaque instant ' $r(t)$ ' pour une particule subissant la diffusion en deux dimensions. Dans le cas de particules qui subissent des déplacements dominés par le mouvement brownien, les données sont stochastiques, elles doivent être analysées statistiquement pour obtenir les valeurs de coefficient de diffusion et les modes de diffusion (Chandrasekhar 1943). Le déplacement carré moyen (*Mean Squared Displacement* ou MSD) de la trajectoire, traduit par  $MSD(t)$ , permet de quantifier de façon analytique le mouvement des particules (Saxton and Jacobson 1997) :

$$r(t) = [x(t), y(t)]$$

$$MSD(t) = \int |r(t-t') - r(t')|^2 dt'$$

Expérimentalement, les positions des particules sont enregistrées sous la forme d'une séquence temporelle avec un intervalle d'acquisition de temps donné. Alors, le  $MSD(t)$  et les coordonnées  $(x, y)$  sont exprimés comme une séquence de temps discret (Kusumi, Sako et al. 1993):

$$MSD(t) = \frac{1}{N-t} \sum_{i=1}^{N-t} [(x_{i+t} - x_i)^2 + (y_{i+t} - y_i)^2] \quad [2.2]$$

où (t) est le décalage dans le temps entre les images, (N) le nombre total d'images dans la série et (x<sub>i</sub>, y<sub>i</sub>) se réfèrent à la position en (x,y) mesurée de la particule dans la *i*ème image (Saxton 1993; Saxton and Jacobson 1997).

La force de l'analyse des MSD réside dans le fait que chaque mode de mouvement a une forme graphique caractéristique. En effet, il peut être démontré que la solution de l'équation de diffusion du MSD en fonction du temps pour la diffusion pure est linéaire, qu'elle est parabolique dans le transport actif et qu'elle se manifeste comme une croissance exponentielle qui sature à un plateau pour le mouvement confiné :

$$MSD(t) = 4Dt \quad [\text{Libre}]$$

$$MSD(t) = 4Dt + (vt)^2 \quad [\text{Actif}]$$

$$MSD(t) \approx 2L^2 \left(1 - e^{-2Dt/L^2}\right) \quad [\text{Confiné}]$$

Où 'D' est le coefficient de diffusion, 'v' est la composante vitesse, 'L' est lié à la moitié de la taille du compartiment de confinement. Afin d'obtenir la valeur du coefficient de diffusion instantané, on doit effectuer une régression linéaire sur les 4-6 premiers points de la courbe de MSD (figure 2.11c).

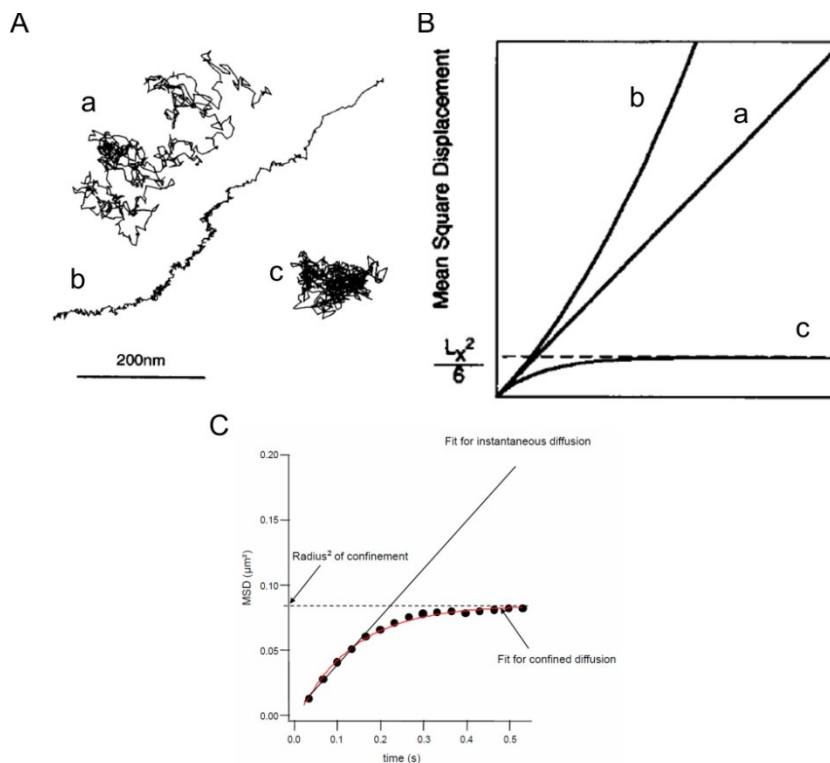


Figure 2.11 : Trajectoires et courbes de MSD. **(A)** Différents types de mouvements de molécules (a) brownien, (b) transport actif, (c) confiné (Kusumi, Sako et al. 1993). **(B)** Courbes de MSD typiques pour chaque type de diffusion. **(C)** Obtention du coefficient de diffusion instantané. Régression sur les 4-5 premiers points de la courbe de MSD. Le plateau de la courbe MSD nous informe sur la valeur du confinement (Heine, Groc et al. 2008).

### 2.3.7 Erreurs dans les courbes de MSD

D'un point de vue statistique, nous pouvons définir la résolution de la localisation sur les trajectoires en considérant la position mesurée de la particule, ' $x(t)$ ', soit la somme de la vraie position de la particule, ' $x_{réel}(t)$ ' plus une variable aléatoire ' $\varepsilon$ ' de valeur moyenne nulle et de déviation standard ' $\sigma$ ' pour tenir compte d'erreurs de localisation :

$$x(t) = x_{réel}(t) + \varepsilon ; y(t) = y_{réel}(t) + \varepsilon \quad [2.3]$$

La principale préoccupation de l'erreur sur la localisation est la façon dont elle va affecter la précision des mesures de coefficient de diffusion et de la taille de confinement. Pour les mesures faites avec le MSD(t), il a été montré que les erreurs aléatoires dans la localisation n'affectent pas l'estimation du coefficient de diffusion (Savin and Doyle 2005), mais

affectent uniquement l'ordonnée à l'origine des courbes de MSD(t). Le paramètre 'ε' est très important car il permet de juger la qualité d'une trajectoire. Une trajectoire peut être constituée de points à haute et de points à basse résolution; alors l'ordonnée à l'origine représente la moyenne de ces valeurs. C'est un critère important à déterminer pour chaque trajectoire car il sert de seuil afin de sélectionner les trajectoires de qualité. Pour déterminer la valeur de ce paramètre, j'utilise les équations 2.3 dans l'équation 2.2 de MSD(t) :

$$MSD(t) = \frac{1}{N-t} \sum_{i=1}^{N-t} [(x_{i+t} - x_i + 2\varepsilon)^2 + (y_{i+t} - y_i + 2\varepsilon)^2]$$

$$MSD(t) = \frac{1}{N-t} \sum_{i=1}^{N-t} [(x_{i+t} - x_i)^2 + 4\varepsilon(x_{i+t} - x_i) + 4\varepsilon^2 + (y_{i+t} - y_i)^2 + 4\varepsilon(y_{i+t} - y_i) + 4\varepsilon^2]$$

En évaluant le cas limite ou t=0, on obtient :

$$MSD(0) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [4\varepsilon^2 + 4\varepsilon^2]$$

Finalement, la résolution sur la trajectoire qui contient l'erreur moyenne sur la localisation de tous les points est défini par :

$$\varepsilon = \sqrt{\frac{MSD(0)}{8}} \quad [2.4]$$

La démonstration du critère de résolution 'ε' a été inspirée par Savin et al. mais, à ma connaissance, ce critère n'a jamais été démontré à partir de l'équation de MSD. Ce critère permet d'exclure des trajectoires qui sont trop bruitées ou les trajectoires erronées qui contiennent plus d'une particule car le déplacement entre deux images devient trop important, augmentant ainsi le bruit et en conséquence la valeur de ε. Il est toujours recommandé d'effectuer une expérience de contrôle où les particules immobilisées sont imagées et analysées pour mesurer le coefficient de diffusion minimum et l'erreur ε. Sur une lamelle de verre, nous avons monodispersé des QD. Nous avons effectué l'imagerie sur 40 QD uniques en gardant les mêmes paramètres d'acquisition que pour l'imagerie sur

neurones vivants. Le coefficient de diffusion minimale détecté est de  $0.000032 \text{ um}^2/\text{s}$ , et la résolution moyenne ( $\epsilon$ ) des trajectoires est de 33 nm.

## **2.4 Application aux récepteurs AMPA**

La méthode de marquage, les algorithmes et les programmes de suivi de molécules uniques ont été développés afin de suivre la dynamique et la régulation des récepteurs aux synapses. Dans cette section, je vais donner des exemples de marqueurs synaptiques et de l'extraction des régions synaptiques. Je vais discuter de l'analyse des trajectoires synaptiques et extrasynaptiques et, finalement, montrer des exemples typiques de diffusion de récepteurs sur les neurones.

### **2.4.1 Marqueur synaptique**

Étant donné que l'adressage des rAMPA à la synapse, via des déplacements latéraux dans la membrane suivis à l'aide de QD fluorescents, est le sujet à étude, il s'avère important d'utiliser des façons de marquer les synapses en fluorescence complémentaire. L'utilisation des marqueurs fluorescents ou d'une protéine de fusion fluorescente pour marquer des synapses, du côté pré ou post-synaptique, est courante. Il existe trois principales méthodes pour identifier un élément présynaptique sur neurones vivants, soit un marqueur de mitochondrie, un marqueur lipophile ou la surexpression d'une protéine couplée à un fluorophore (Borgdorff and Choquet 2002; Bats, Groc et al. 2007; Groc, Choquet et al. 2008). La figure 2.12b montre deux marqueurs présynaptiques utilisés sur les mêmes neurones, les mitochondries (Mitotracker) en vert dans un canal de fluorescence et les vésicules présynaptiques (FM4-64) en rouge.

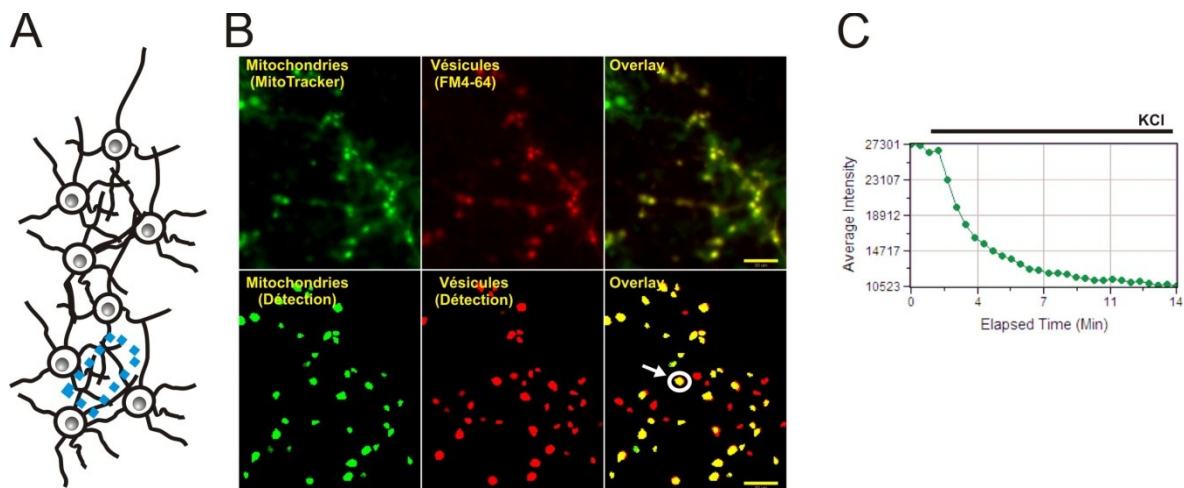


Figure 2.12: Marquage présynaptique de synapses. (A) Schéma de réseaux de neurones, la région typiquement imagée est encadrée en bleu. (B) Marqueur présynaptique. (C) Baisse de fluorescence du marquage FM4-64 suite à une dépolarisation au KCl, indiquant l'activité présynaptique.

L'identification des agrégats présynaptiques ainsi que la corrélation entre les deux canaux sont montrées. On peut noter que la plupart des agrégats de vésicules colocalisent avec les mitochondries. De plus, la fluorescence des agrégats de vésicules diminue lorsque l'on perfuse une solution de KCl, qui augmente l'activité neuronale (figure 2.12c). Cette diminution de fluorescence est représentative d'un relâchement de vésicules et donc d'activité synaptique. Les deux types de marqueurs sont appropriés pour identifier les synapses et ont été utilisés dans mon projet de doctorat. Ces marqueurs fluorescents sont très utiles sur les neurones en culture à bas âge ou à faible densité; cependant, ils ont le désavantage de marquer toutes les structures visées dans la culture. Ainsi, dans les régions denses en neurones, il devient très difficile de déterminer des zones synaptiques. Dans les cas de haute densité neuronale, un meilleur choix est alors la transfection de protéines fusionnées à des protéines fluorescentes, puisque le taux de transfection est très faible, favorisant le contraste pour identifier des synapses.

La figure 2.13 montre un cas de transfection de récepteurs GluA1 fusionnés à une SEP permettant de visualiser les récepteurs membranaires et la protéine postsynaptique Homer couplée au DsRed. Les régions considérées comme synaptiques sont les agrégats de Homer DsRed qui correspondent à des critères d'intensité et de taille fixés par l'utilisateur. Il est possible d'utiliser d'autres protéines postsynaptiques telles la PSD-95, la Shank ou la



CaMKII comme marqueurs synaptiques. Toutes les synapses sont identifiées à l'aide du même algorithme décrit à la section 2.3.4.

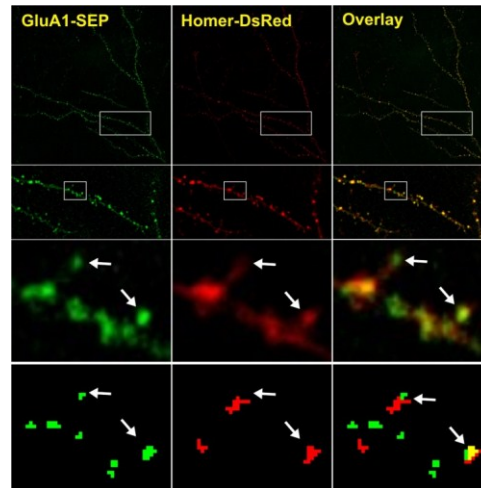


Figure 2.13: Marquage postsynaptique (Homer-DsRed).

#### 2.4.2 Récepteurs aux synapses

Dans cette section, nous allons montrer quelques exemples typiques de diffusion de récepteurs dans les synapses. Le premier exemple montre un neurone en culture qui exprime le marqueur de synapse Homer-GFP et des rAMPA biotinilisés. Après avoir marqué les récepteurs avec les QD, l'utilisateur doit prendre une image des synapses dans le canal GFP et regarder la spécificité du signal de QD. L'exemple à la figure 2.14 montre un neurone transfecté dans un réseau avec la projection maximale des QD superposée au marqueur synaptique qui colocalise fortement.

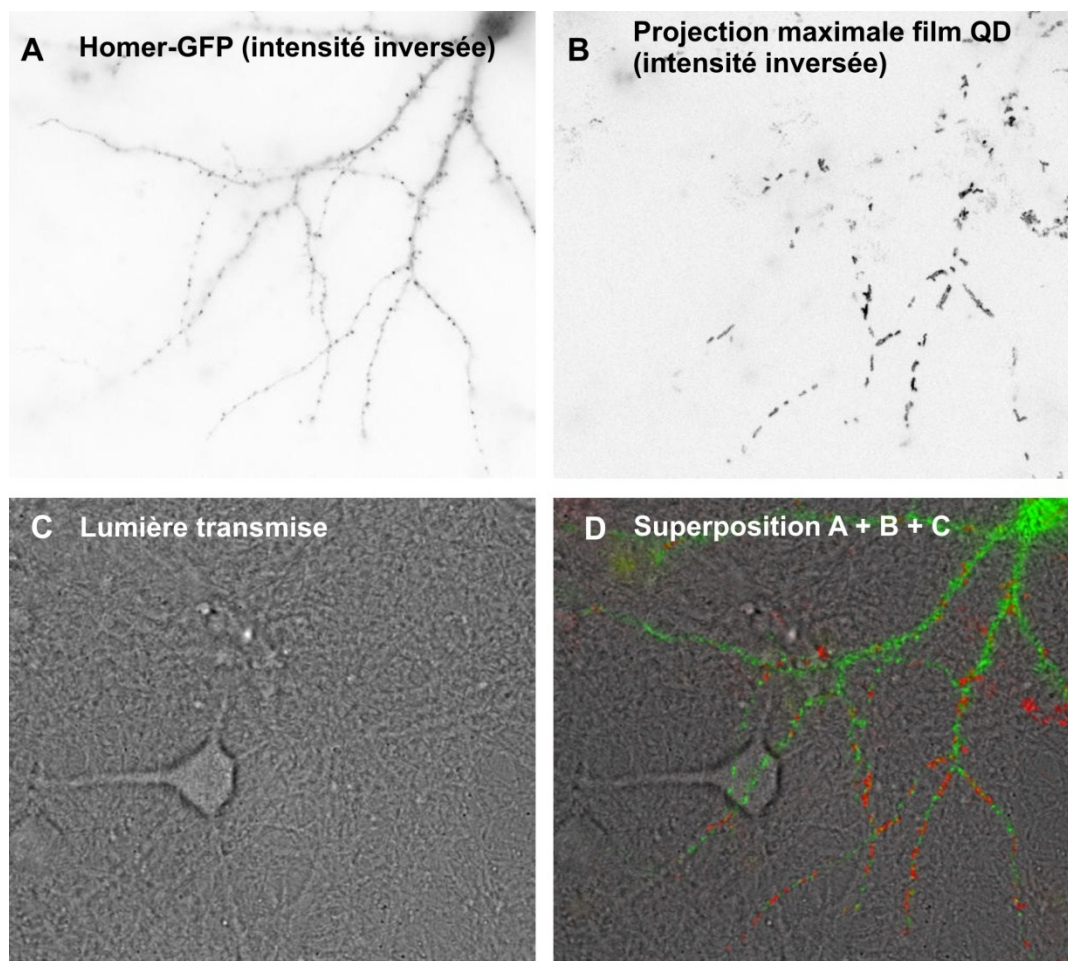


Figure 2.14: Spécificité du marquage. Exemple de neurone dans un réseau transfecté pour les synapses et marqué avec des QD (imagerie effectuée par Patrice Dionne).

L'algorithme développé permet de reconstruire les trajectoires de QD sur la membrane du neurone et d'analyser les comportements de diffusion de chacun de ces QD. L'exemple suivant montre une analyse typique du logiciel développé, ainsi qu'une dendrite exprimant le marqueur synaptique Homer, l'extraction des synapses et les trajectoires des QD-GluA1 obtenues sur cette dendrite (figure 2.15). J'ai extrait deux cas de récepteurs, un récepteur synaptique et un récepteur extrasynaptique. La courbe de MSD du récepteur extrasynaptique est linéaire, ce qui démontre une diffusion brownienne et un coefficient de diffusion élevé. Le récepteur synaptique est confiné à la zone synaptique car la courbe de MSD atteint un plateau; il semble quand même être en mesure d'entrer et de sortir de la synapse.

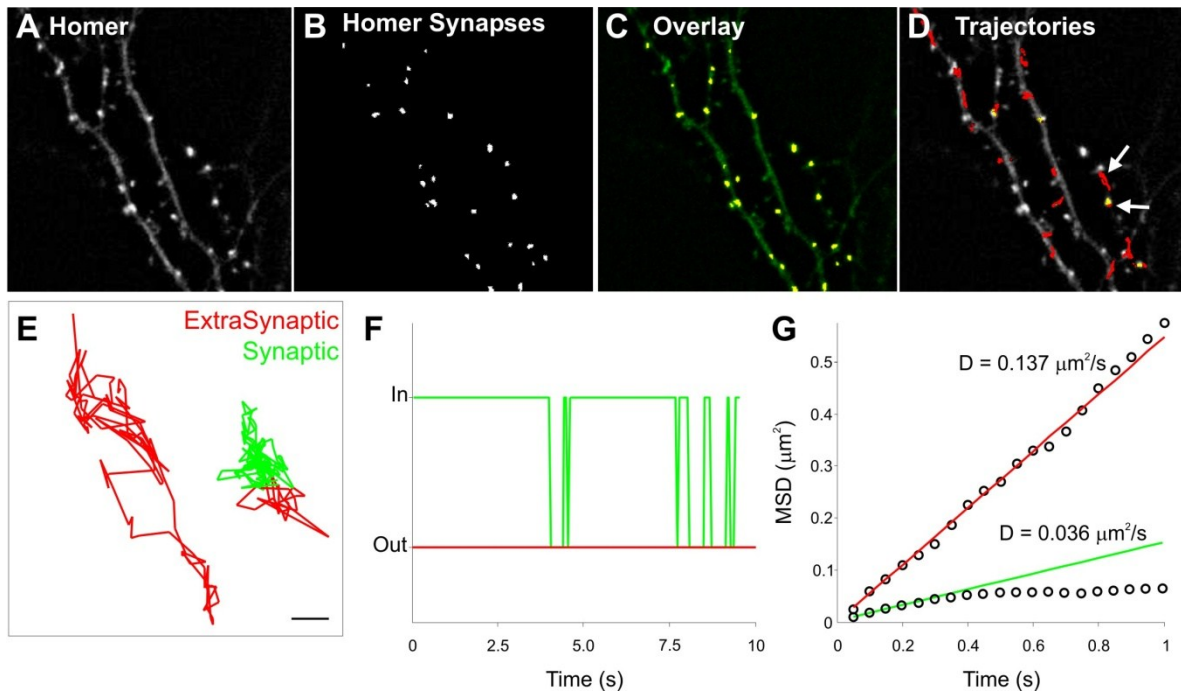


Figure 2.15 : Exemple d'analyse de QD. **(A)** Image du marqueur synaptique. **(B)** Extraction des zones synaptiques. **(C)** Superposition Marqueur+Synapses. **(D)** Superposition marqueur synaptique et trajectoires des récepteurs sur la membrane. **(E)** Exemples de trajectoires extrasynaptique et synaptique. **(F)** Courbe de localisation synaptique. **(G)** Courbe des MSD et régression linéaire sur les 4 premiers points de la courbe.

En étudiant la diffusion synaptique, il est possible de démontrer que les récepteurs présentent une vaste gamme de diffusion; certains sont immobiles, certains sont confinés dans la synapse, tandis que d'autres la traversent très rapidement (figure 2.16). On peut construire un histogramme de la distribution des coefficients de diffusion synaptique sur une échelle logarithmique. Il est ainsi possible de distinguer deux populations dans l'histogramme, une mobile et l'autre immobile. La limite inférieure du coefficient de diffusion mobile est fixée empiriquement à  $0.0075 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (Groc, Heine et al. 2004).

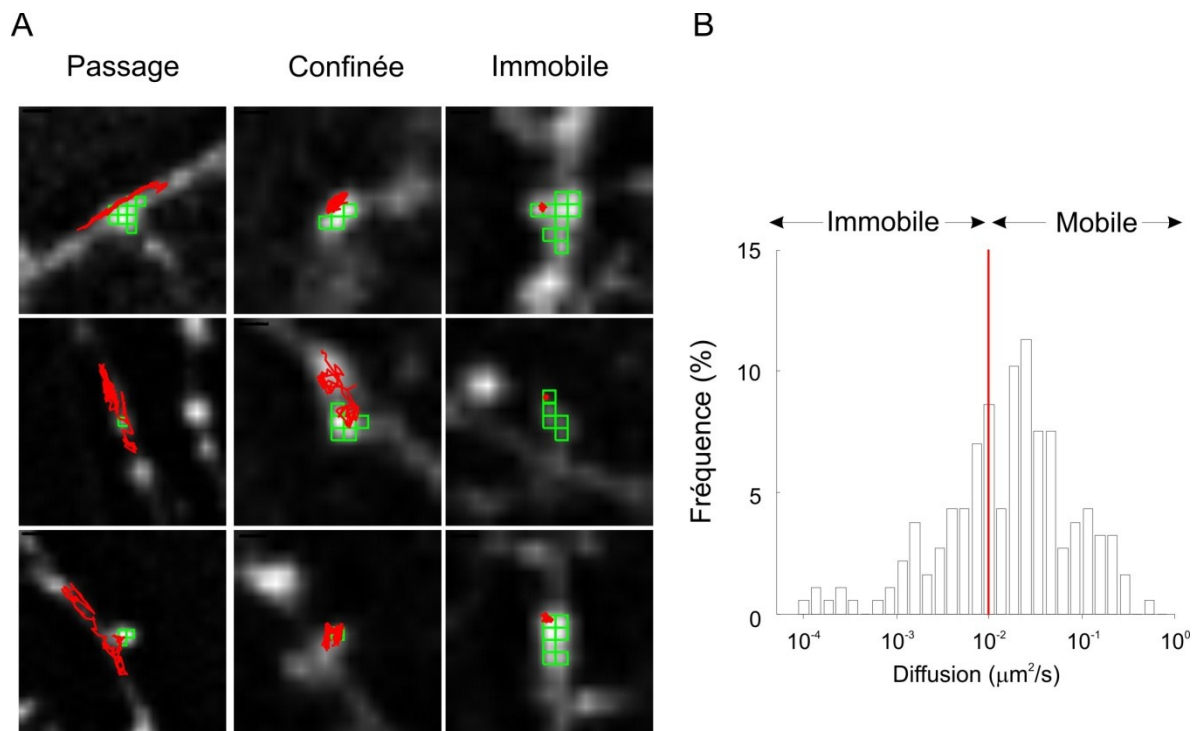


Figure 2.16 : La diffusion des récepteurs aux synapses. **(A)** Différents types de diffusion synaptique: de passage, confinée ou immobile. Superposition de l'image du marqueur synaptique et des trajectoires représentées en rouge. La détection des synapses est marquée en vert. **(B)** Histogramme des coefficients de diffusion.

## 2.5 Discussion

Malgré le succès des nombreuses expériences de SQDT dans les cellules vivantes, d'importantes questions méthodologiques doivent encore être abordées en termes d'imagerie optique, de synthèse de QD et de fonctionnalisation des sondes QD. Jusqu'ici, les expériences de SQDT collectent les données brutes en une série chronologique d'images en deux dimensions. Ceci est clairement une limitation dans de nombreuses situations dans lesquelles le suivi en trois dimensions est préférable, par exemple, lorsque l'on suit des QD sur les dendrites et même dans les synapses. De plus, le suivi en trois dimensions sera encore plus prometteur lorsque des expériences seront effectuées dans les tranches de cerveau. Globalement, le développement de méthodes précises pour localiser et suivre des fluorophores en trois dimensions est un objectif commun à de nombreuses applications d'imagerie en biologie, et plusieurs d'entre elles ont déjà été utilisées pour suivre les QD dans les cellules. Le suivi en trois dimensions peut être fait à l'aide d'un microscope en

épifluorescence et d'une lentille cylindrique. Dans ce cas, la position le long de l'axe z est obtenue avec une résolution de  $\sim 50$  nm (Henriques, Lelek et al. 2010). Cependant, l'utilisation de ces méthodes a été essentiellement limitée à une preuve de concept. Par ailleurs, la technique de lentille cylindrique obtient des profondeurs de champ qui ne dépassent pas quelques micromètres, ce qui n'est pas compatible avec la taille d'une cellule ( $\sim 10$ - $30$   $\mu\text{m}$ ). Beaucoup de travail reste donc nécessaire pour atteindre le suivi de QD multiples dans le volume cellulaire entier.

Réduire davantage la taille des QD avec de nouveaux matériaux est aussi un enjeu important. Bien que des progrès considérables en ingénierie chimique de surface ont permis de réduire la taille des QD composés de CdSe-ZnS (diamètre  $\sim 12$  nm, ce qui équivaut à un complexe de  $\sim 400$  kDa) (Choi, Liu et al. 2007), ces sondes sont encore assez grosses et peuvent quand même affecter l'activité ou la mobilité des protéines après l'étiquetage. Par expérience, pour en avoir testé de plusieurs sources, les plus petits QD développés dans les laboratoires sont moins spécifiques et moins stables dû à un contrôle préliminaire des propriétés photophysiques et de la surface des QD.

Le clignotement a toujours été un incontournable dans les propriétés de fluorescence de QD individuels. Du point de vue théorique, les origines du clignotement restent quelque peu controversées, bien que de nombreux modèles attribuent l'état fermé à la charge du QD. Des travaux ont démontré qu'il est possible de diminuer le clignotement; l'utilisation d'une concentration élevée ( $>50$  mM) de petites molécules de thiol sont suffisantes pour réduire le clignotement des QD (Hohng and Ha 2004), mais ces conditions sont impropres aux cellules vivantes. Depuis, deux publications ont montré qu'il est possible d'obtenir des QD qui clignent beaucoup moins en ayant un contrôle précis de la coquille inorganique (Chen, Vela et al. 2008; Mahler, Spicicelli et al. 2008). Cependant, le désavantage pour le SQDT avec ces QD à clignotement réduit est que le diamètre final de la matière inorganique est plus grand que celui des QD commerciaux. Très récemment, des QD complètement sans clignotement possédant un diamètre de 8 nm ont été synthétisés avec un noyau de CdSe et une coquille de ZnSe (Wang, Ren et al. 2009). Cependant, ces QD ont une émission de fluorescence à plusieurs longueurs d'onde maximales, ce qui est une

limitation pour des expériences multicolores. Malgré leurs inconvénients relatifs, le développement de ces nouveaux QD représente une option attrayante pour le SQDT car ils offrent la possibilité de suivre un complexe protéine-QD pendant plusieurs minutes, voire plusieurs heures.

Finalement, le SQDT des récepteurs membranaires sur neurones vivants avec des anticorps est sûrement biaisé pour un marquage qui favorise les récepteurs extrasynaptiques qui pénètrent subséquemment dans les synapses. Ceci est dû au fait que l'on dépose les anticorps sur la surface des neurones, marquant ainsi les récepteurs disponibles à la surface des neurones et ignorant probablement des récepteurs à l'intérieur des synapses. Ce type de marquage favorise sûrement une population des récepteurs qui échange entre les domaines synaptiques et extrasynaptiques. Les expériences de SQDT doivent donc être validées en utilisant des méthodes complémentaires telles que le FRAP.

## 2.6 Conclusion

Le SQDT est un outil puissant qui permet de mieux comprendre les propriétés de diffusion de nombreuses molécules et façonne notre compréhension de la régulation moléculaire dans les neurones. Un nombre croissant d'expériences utilisant les QD en suivi de molécule unique ont montré l'importance des paramètres de diffusion et des constantes d'association qui régissent les interactions moléculaires aux synapses. Ces observations concordent avec l'idée que les synapses ne sont pas des structures statiques mais sont en recyclage constant. Les prochaines étapes pour le suivi de molécules uniques en biologie sont le suivi simultané de plusieurs molécules et le développement de techniques qui permettent le suivi dans des systèmes plus complexes comme les tranches de cerveau et ultimement *in vivo*. Des méthodes de microscopie utilisant la photoconversion de fluorophores, appelées *stochastic optical reconstruction microscopy* (STORM) ou *photo-activated localization microscopy* (PALM), impliquent la reconstitution d'images de plusieurs milliers de molécules individuelles localisées. Des efforts de calcul considérables seront nécessaires pour intégrer ces données, mais l'imagerie en temps réel sur des échantillons vivants a déjà été appliquée à la dynamique de l'actine dans les épines (Frost, Shroff et al. 2010; Izeddin, Specht et al. 2011). Cette approche simultanée d'imagerie à

haute résolution couplée avec le suivi de molécules uniques pour visualiser la diffusion des récepteurs mènera à de nouvelles perspectives passionnantes dans la structure et la dynamique synaptique dans les neurones. Ensemble, ils devraient se révéler être un outil précieux pour décrypter les règles qui régissent l'architecture dynamique des cellules vivantes et, éventuellement, remodeler certaines idées conceptuelles importantes en biologie cellulaire.

## **3 La CaMKII immobilise les récepteurs AMPA aux synapses par la phosphorylation de stargazine**

### **3.1 Avant-propos**

La plasticité des synapses pendant les processus d'apprentissage et lors du développement nécessite l'orchestration d'une multitude de protéines. Dans les modèles cellulaires impliqués dans la mémoire (LTP), deux principales protéines sont dynamiquement recrutées aux sites postsynaptiques soit la  $Ca^{2+}$ /calmoduline-dépendante kinase II (CaMKII) et le récepteur du glutamate de type AMPA (rAMPA) (Hayashi, Shi et al. 2000; Lisman, Schulman et al. 2002). De nombreuses études ont montré que la CaMKII est impliquée dans le recrutement des rAMPA et que cette augmentation du nombre de rAMPA aux synapses dépend de l'activation du rNMDA (Lee, Escobedo-Lozoya et al. 2009; Lisman, Yasuda et al. 2012). Toutefois, il a été démontré que les rAMPA sont constamment en mouvement dans la membrane des neurones (Borgdorff and Choquet 2002). La diffusion membranaire des récepteurs leur permet d'échanger perpétuellement entre les domaines synaptiques et extrasynaptiques (Tardin, Cognet et al. 2003; Heine, Groc et al. 2008). Ainsi, la grande instabilité des récepteurs doit être conciliée avec l'augmentation du nombre de récepteurs aux synapses lors des procédés d'apprentissage. On ne sait pas encore comment la CaMKII augmente le nombre de récepteurs aux synapses lors des protocoles de LTP. Pour ce faire, j'ai développé une technique d'imagerie en fluorescence sur culture de neurones, permettant de mesurer le recrutement des rAMPA dans les synapses individuelles. J'ai développé une technique d'imagerie en molécule unique à l'aide de points quantiques jumelés aux rAMPA et j'ai corrélié l'augmentation des rAMPA aux synapses avec l'immobilisation des rAMPA aux synapses.

#### **3.1.1 Mesure directe de l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA suite à l'application d'un protocole de cLTP**

Afin de mesurer le recrutement des rAMPA aux synapses, j'ai utilisé l'imagerie de GluA1 fusionné avec une SEP. La construction GluA1-SEP permet la visualisation des récepteurs qui sont à la membrane sans imager les récepteurs intracellulaires. En couplant



l'imagerie des GluA1-SEP et d'un marqueur synaptique Homer Ds-Red, il a été possible de suivre la dynamique des rAMPA aux synapses lors de la plasticité. J'ai appliqué un protocole d'activité de type LTP (cLTP) sur les cultures en perfusant une solution sans  $Mg^{2+}$ , 200  $\mu M$  de glycine et 1  $\mu M$  de picrotoxine pendant 5 min ( $0Mg^{2+}/Gly$ ). La perfusion de cette solution permet d'enlever l'ion magnésium sur le rNMDA et la glycine prépare le récepteur à une arrivée de glutamate libéré par le terminal présynaptique. J'ai donc été en mesure de mesurer le recrutement des récepteurs aux synapses (figure 3.1).

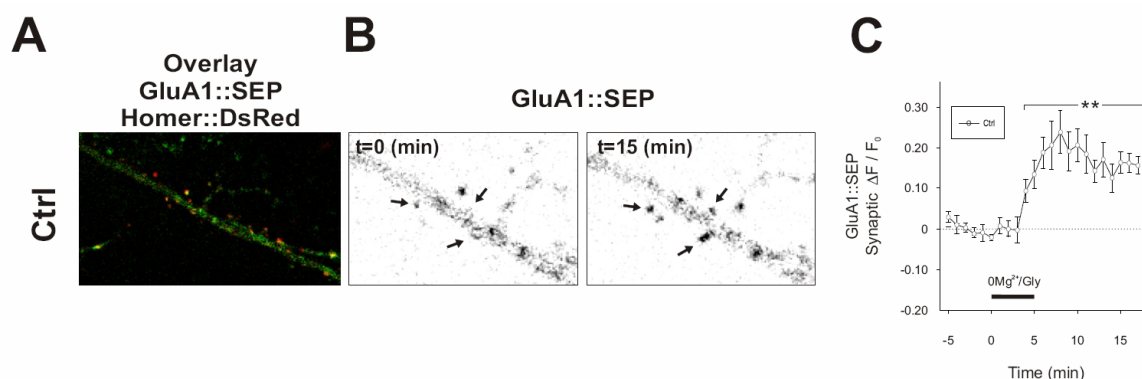


Figure 3.1 : La stimulation cLTP déclenche l'accumulation des rAMPA aux synapses. **(A)** Exemple de neurone hippocampique exprimant GluA1-SEP (superécliptique pHluorin) et Homer:: DsRed. La barre d'échelle est de 5  $\mu m$ . **(B)** Images inversées de grossissement plus élevé de synapses dans **(A)** avant et 10 min après la stimulation cLTP ( $0Mg^{2+}/Gly$  pour 5 min en solution extracellulaire). Notez que GluA1-SEP augmente seulement dans les synapses (flèches). La barre d'échelle est de 5  $\mu m$ . **(C)**  $\Delta F/F_0$  des GluA1-SEP dans les synapses  $\pm$  SEM. A t = 15 min; contrôle  $\Delta F/F_0 = 0,163 \pm 0,026$  (N = 5 neurones; n = 218 synapses).

L'augmentation du nombre de récepteurs aux synapses peut être expliquée par deux mécanismes distincts. Premièrement, il est possible qu'une augmentation de l'exocytose des récepteurs à la membrane bonifie le nombre de récepteurs dans la membrane, menant éventuellement à un plus grand nombre de récepteurs aux synapses par diffusion latérale. Il est aussi possible que les récepteurs déjà présents dans la membrane soient immobilisés dans les synapses par un mécanisme dépendant de l'activité. Dans ce projet, nous avons étudié cette l'hypothèse de l'immobilisation synaptique.

### 3.1.2 Corrélation entre l'augmentation du nombre de récepteurs et l'immobilisation de récepteur aux synapses pendant la cLTP

Pour évaluer si les récepteurs s'immobilisent aux synapses suite à une stimulation du type LTP, nous avons combiné l'imagerie de molécules uniques à l'imagerie de GluA1-SEP et des synapses marquées par Homer-DsRed. Une séquence d'images et de films a été réalisée, soit une image du marqueur synaptique, une image des récepteurs membranaires et un film de récepteur-QD. La séquence a été répétée trois fois au début, pendant la stimulation et 5 min après la stimulation. Il a été possible de montrer que l'augmentation du nombre de récepteurs aux synapses est corrélée avec une immobilisation des récepteurs aux synapses.

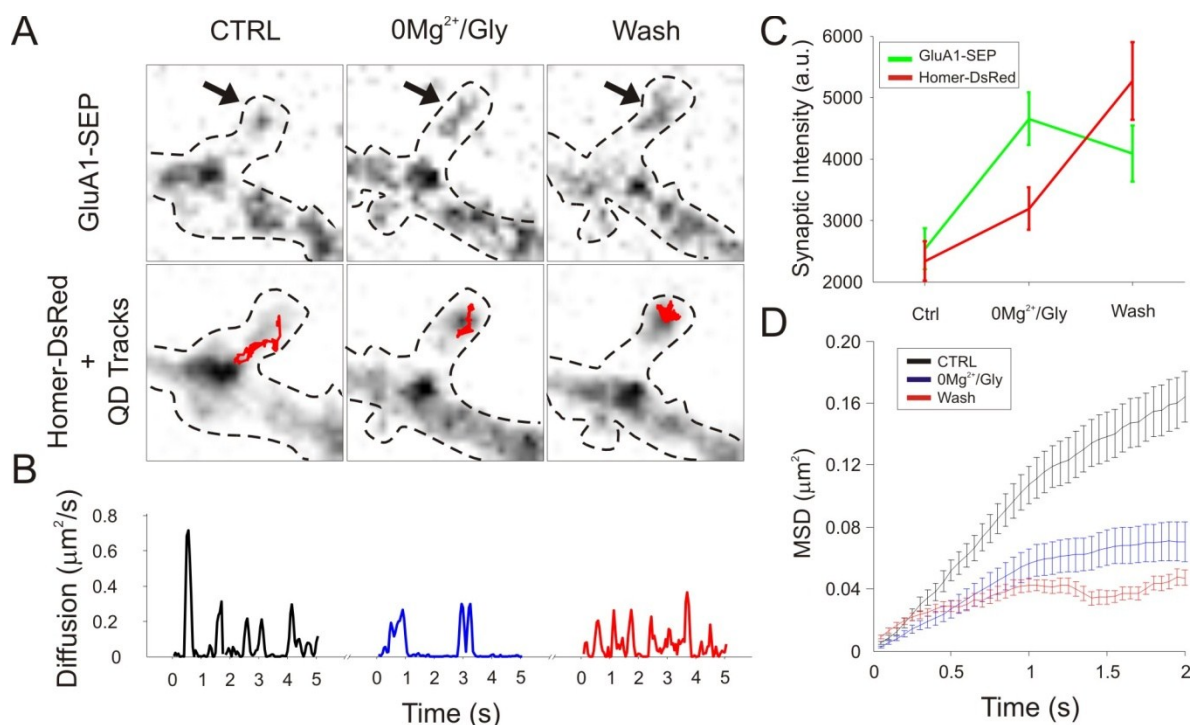


Figure 3.2 : Corrélation entre l'augmentation de la fluorescence de GluA1-SEP aux synapses et l'immobilisation d'un récepteur suite à la cLTP. **(A)** Fluorescence d'une synapse en GluA1-SEP. Notez l'augmentation de fluorescence dans l'épine. La trajectoire du récepteur superposée au marquage synaptique (Homer) en rouge est confinée à la tête de l'épine après la stimulation. **(B)** Le coefficient de diffusion instantané du rAMPA est près de zéro pendant la stimulation. **(C)** Quantification du signal de fluorescence dans l'épine. **(D)** Courbes de MSD du récepteur. Notez le plus faible coefficient de diffusion et un plus grand confinement après la cLTP.

Aussi, pour l'ensemble de la population des récepteurs synaptiques, on remarque que la diffusion synaptique diminue après le protocole d'induction de LTP (figure 3.3). L'histogramme des coefficients de diffusion synaptique montre une augmentation de la population immobile aux synapses. La valeur médiane des coefficients de diffusion est significativement plus faible après l'induction de la LTP et le temps de résidence aux synapses augmente, impliquant une immobilisation des récepteurs aux synapses suite à la stimulation de cLTP.

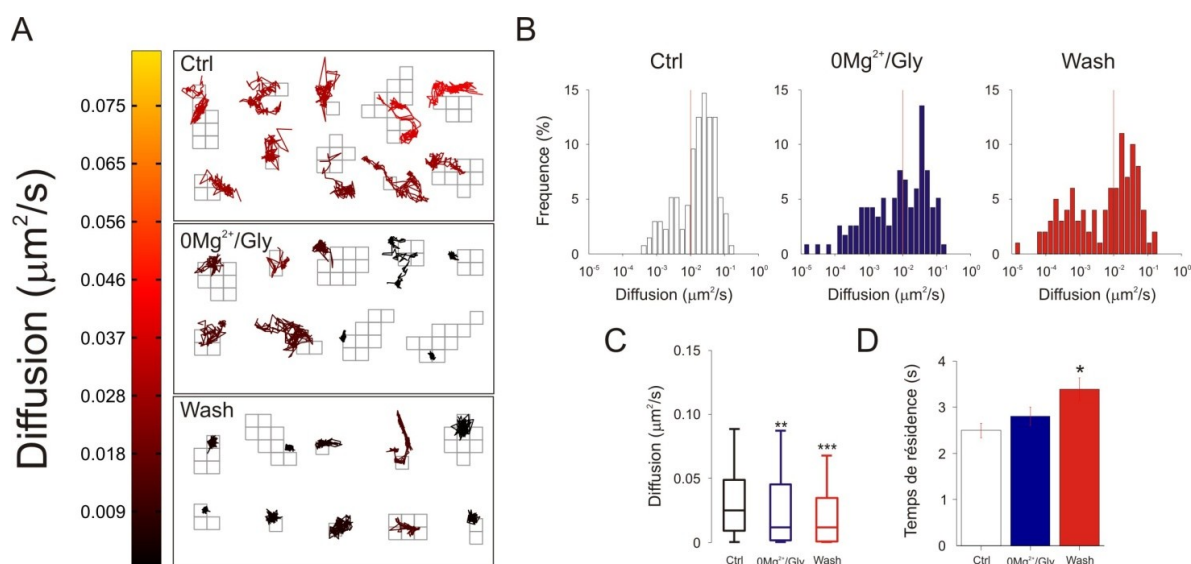


Figure 3.3 : Exemple de plusieurs trajectoires synaptiques des rAMPA avant, pendant et après la cLTP. **(A)** La valeur du coefficient de diffusion des trajectoires est représentée par un code de couleur et les trajectoires montrées possèdent la valeur médiane de chaque population. **(B)** Histogramme de la population des récepteurs synaptiques. Notez l'augmentation de la population immobile suite à la cLTP. **(C)** La valeur médiane du coefficient de diffusion diminue significativement après cLTP. **(D)** Le temps de résidence aux synapses augmente significativement après la cLTP.

Ces résultats démontrent que l'activité permet d'immobiliser les récepteurs aux synapses, mais ne démontrent pas l'implication de la CaMKII dans ces mécanismes. Dans l'article suivant, nous avons utilisé le suivi de points quantiques uniques couplés aux rAMPA afin de mesurer si l'activation et la translocation de la CaMKII postsynaptique peuvent recruter les rAMPA au niveau des synapses en piégeant les récepteurs libres qui diffusent dans la membrane plasmique. Nos résultats indiquent que l'activation de la CaMKII immobilise les rAMPA de surface aux sites synaptiques. Par ailleurs, nous

montrons que cette nouvelle fonction de la CaMKII est médiée par la phosphorylation de stargazine sur la partie C-terminale. Enfin, nous montrons que ce piègeage des rAMPA aux sites synaptiques dépendant de la CaMKII a un fort impact sur la dépression pairée, une forme de plasticité à court terme qui dépend fortement de la mobilité latérale des rAMPA. Ces expériences ont mis en lumière l'interaction dynamique entre les deux composantes clés des synapses excitatrices.

L'article suivant est né d'une collaboration entre le groupe de Daniel Choquet de Bordeaux et de Paul De Koninck à Québec. En 2006, j'ai entrepris l'étude de l'interaction entre la CaMKII et les rAMPA, après avoir développé un protocole permettant de stimuler chimiquement les neurones, afin d'induire de la plasticité synaptique, tout en suivant les récepteurs de surface synaptiques couplés aux points quantiques. J'avais obtenu des résultats préliminaires montrant que les rAMPA s'immobilisent aux synapses lors de ce protocole de stimulation. De plus, j'avais démontré l'impact de l'inhibiteur des CaM kinases, le KN93, sur l'augmentation de la diffusion des récepteurs aux synapses et une perte d'immobilisation pendant les protocoles de stimulation. Ces premiers résultats prometteurs ont été montrés dans des conférences et des affiches et remarqués par Daniel Choquet qui avait entamé un projet de recherche sur le même sujet. Le chercheur postdoctorant Patricio Opazo avait des résultats démontrant que l'expression d'une CaMKII constitutivement active (tCaMKII) immobilise les rAMPA aux synapses. Les deux laboratoires intéressés à élucider le mécanisme d'immobilisation des rAMPA par la CaMKII se sont divisé la tâche. J'ai donc étudié l'effet de l'inhibition de la CaMKII sur la diffusion des rAMPA en utilisant une drogue spécifique à la CaMKII, le CN21. J'ai aussi testé plusieurs versions de plasmides de shRNA dirigés contre la CaMKII car les premières versions étaient inefficaces ou léthales pour les neurones. De leur côté, le groupe de Bordeaux a étudié l'effet des différents sites de phosphorylation de la CaMKII sur les rAMPA et la stargazine. De plus, ils ont étudié l'impact de la CaMKII dans la dépression pairée. L'écriture de l'article a été réalisée principalement par Opazo, De Koninck et Choquet. Spécifiquement dans cet article, j'ai fourni la figure 3.6A-C d'inhibition par le KN93, la figure 3.5 le CN21 et les shRNA  $\alpha$ CaMKII ainsi que la figure supplémentaire S2 démontrant la corrélation entre l'augmentation de la fluorescence des rAMPA aux synapses

lors de la cLTP et l'immobilisation des rAMPA dépendant de la CaMKII. Les résultats obtenus indépendamment reliés aux figures 3.4 et 3.7 étaient redondant avec ceux obtenus par l'équipe de Bordeaux. En conséquence, ils n'ont pas été insérés dans ce chapitre. J'ai rédigé ma section des résultats, des méthodes et j'ai participé aux révisions des figures et du texte qui ont été publiés dans la revue *Neuron*.

## **CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin**

Patricio Opazo<sup>1</sup>, Simon Labrecque<sup>2†</sup>, Cezar M Tigaret<sup>1†</sup>, Arnaud Frouin<sup>1</sup>, Paul W Wiseman<sup>3</sup>, Paul De Koninck<sup>2\*</sup>, Daniel Choquet<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>UMR 5091 CNRS, Université de Bordeaux, Bordeaux, France, <sup>2</sup>Centre de Recherche Université Laval Robert-Giffard, Québec, Canada G1J 2G3, <sup>3</sup>Departments of Physics and Chemistry, Mc Gill University, Montréal, QC, Canada H3A

†These authors equally contributed to this work

\*E-mail: paul.dekoninck@crulrg.ulaval.ca \*\*E-mail: dchoquet@u-bordeaux2.fr

### **3.2 Summary**

The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is critically required for the synaptic recruitment of AMPA-type glutamate receptors (AMPARs) during both development and plasticity. However, the underlying mechanism is unknown. Using single-particle tracking of AMPARs, we show that CaMKII activation and postsynaptic translocation induce the synaptic trapping of AMPARs diffusing in the membrane. AMPAR immobilization requires both phosphorylation of the auxiliary subunit Stargazin and its binding to PDZ domain scaffolds. It does not depend on the PDZ binding domain of GluA1 AMPAR subunit nor its phosphorylation at Ser831. Finally, CaMKII-dependent AMPAR immobilization regulates short-term plasticity. Thus, NMDA-dependent Ca<sup>2+</sup> influx in the post-synapse triggers a CaMKII- and Stargazin-dependent decrease in AMPAR diffusional exchange at synapses that controls synaptic function.

### **3.3 Introduction**

The development and plasticity of synapses involve the timely recruitment of a plethora of proteins on both pre- and postsynaptic sides through ill-defined mechanisms. At excitatory synapses, two of the major proteins that are dynamically recruited postsynaptically are the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) and the AMPA-

type glutamate receptor (AMPA). Numerous studies have shown that CaMKII is involved in the activity and NMDA receptor (NMDAR)-dependent recruitment of AMPARs both during synaptic development and synaptic plasticity (Asrican et al., 2007, Hayashi et al., 2000, Lee et al., 2009, Lisman et al., 2002, Merrill et al., 2005, Pettit et al., 1994, Poncer et al., 2002, Rongo and Kaplan, 1999, Sanhueza et al., 2007 and Zhang et al., 2008). However, it is unknown how CaMKII increases the number of AMPARs at synapses. Two principal recruitment mechanisms can be anticipated: CaMKII might promote the exocytosis of AMPAR-containing vesicles and/or the trapping at the postsynaptic density (PSD) of laterally diffusing AMPARs. While the evidence linking CaMKII activation and AMPAR recruitment at synapses has been interpreted via the exocytosis mechanism (Maletic-Savatic et al., 1998), the hypothesis that CaMKII can recruit AMPARs by diffusional trapping has not been examined, even though a number of findings indirectly support it (Lisman and Zhabotinsky, 2001). First, NMDAR activation causes the rapid translocation of CaMKII from dendritic compartments to activated synapses (Hudmon et al., 2005, Shen and Meyer, 1999 and Strack et al., 1997). Second, following NMDAR activation, CaMKII can remain at postsynaptic sites for prolonged periods of time, through binding to several PSD proteins, including the NMDAR (Bayer et al., 2006, Lisman et al., 2002 and Otmakhov et al., 2004). Third, CaMKII bound to the NMDAR remains active independent of  $Ca^{2+}/CaM$  (Bayer et al., 2001), which should allow it to phosphorylate incoming membrane-bound proteins. Fourth, AMPARs are highly mobile at the neuronal surface, rapidly switching between extrasynaptic and synaptic sites (Bats et al., 2007, Borgdorff and Choquet, 2002, Heine et al., 2008 and Tardin et al., 2003). Fifth, NMDAR stimulation, high-frequency stimulation, or increases in intracellular  $Ca^{2+}$  (Borgdorff and Choquet, 2002, Heine et al., 2008, Makino and Malinow, 2009 and Petrini et al., 2009) all promote the rapid immobilization of AMPARs. Taken together, these findings suggest a scenario in which AMPARs are intrinsically mobile at the neuronal surface and can be “trapped” at activated synapses in a CaMKII-dependent manner.

In this study, we assess directly whether CaMKII activation and postsynaptic translocation can recruit AMPARs at synapses by trapping the freely diffusing receptors in

the plasma membrane. To this end, we either activated or inhibited CaMKII using a number of genetic, pharmacological, and physiological approaches while simultaneously tracking the mobility of surface AMPARs imaged via luminescent semiconductor quantum dots (QDs) precoupled to specific antibodies against AMPAR subunits (GluA1 or GluA2, corresponding to GluR1 and GluR2 (Collingridge et al., 2009)). Our results indicate that CaMKII activation stops the diffusion of surface AMPARs at synaptic sites. Furthermore, we show that this novel function of CaMKII is mediated by phosphorylation of stargazin and binding of its C terminus to PDZ domain scaffold proteins such as PSD95. Finally, we show that this CaMKII-dependent trapping of AMPARs to synaptic sites has a strong impact on paired-pulse depression, a form of short-term plasticity strongly dependent on the lateral mobility of AMPARs. Our experiments shine new light into the dynamic interaction between two key components of excitatory synapses and their fine tuning of synaptic transmission.

## **3.4 Experimental Procedures**

### **3.4.1 Primary Neuronal Cultures, Transfection, and Drug Treatments**

Cultures of Sprague-Dawley rat hippocampal neurons, prepared by two different protocols, were used in this study: (1) hippocampal cells from E18 rats were plated at a density of 75 cells/mm<sup>2</sup> on poly-lysine-coated glass coverslips and maintained essentially as described (Bats et al., 2007); (2) hippocampal cells from P0 rats were plated at a density of 75 cells/mm<sup>2</sup> on poly-lysine-coated aclar coverslips and maintained essentially as described in Hudmon et al. (2005). Except for shRNA experiments, neurons (10–12 DIV) were transfected using Effectene as described (Bats et al., 2007) or Lipofectamine 2000 as described (Hudmon et al., 2005) and imaged within 16–48 hr after transfection. For shRNA experiments, neurons were transfected at 8 DIV and kept for 4 days before live imaging or fixation for immunocytochemistry. For the measurements of  $\alpha$ CaMKII::GFP postsynaptic translocation, neurons were preincubated with the NMDAR blocker AP-5 (50  $\mu$ M) after transfection to prevent spontaneous translocation of the kinase (Bayer et al., 2006).



The CN21 (YGRKKRRQRRRKRPPLGQIGRSKRVIEDDR) and scramble (YGRKKRRQRRRVKEPRIDGKPVRLRGQKSDRI) peptides were synthesized with a TAT sequence by 21st Century Biochemicals. KN92 and KN93 were purchased from Calbiochem. shRNA against  $\alpha$ CaMKII was kindly provided by S. Lee (Okamoto et al., 2007) with the following target sequence: 5'-CCACTACCTTATCTTCGAT-3'. For rescue experiments, we made the following silent mutations on the  $\alpha$ CaMKII::GFP plasmid: 5'-TCATTATCTCATATTTGAC-3'. Control shRNA was directed against luciferase.

### 3.4.2 Antibodies

We used the polyclonal antibodies against the N-terminal epitope of the GluA1-subunit (Mammen et al., 1997 and Richmond et al., 1996) and Shank-2 (Boeckers et al., 1999). Commercial monoclonal antibodies were used against GluA2 (Chemicon MAB387), HA epitope (3F10, Roche), GFP (Invitrogen),  $\alpha$ CaMKII (Cba2 Zymed),  $\beta$ CaMKII (Cb $\beta$ 1 Zymed), and PSD95 (K28/43 NeuroMab).

### 3.4.3 AMPA Receptor Labeling and Synaptic Live Staining

Quantum dots (QDs) 655 Goat F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit IgG conjugate (H+L) highly cross absorbed were bought from Invitrogen Corporation. GluA1, GluA1-HA, and GluA1::SEP were immunolabeled by using QD precoated with the anti-GluA1, anti-HA, or anti-GFP antibodies, respectively. QDs (0.1  $\mu$ M) were incubated with 1  $\mu$ g AB in 10  $\mu$ l PBS for 30 min. Unspecific binding was blocked by adding casein to the precoated QDs 15min before use. Neurons were incubated 10 min at 37°C in culture medium with precoated QDs (final dilution 0.1 nM). This incubation was followed by four washing steps, 30 s each. All incubations and washes were performed in conditioned MEM medium without phenol red and with addition of HEPES buffer (10 mM). GluA2 labeling was performed in two steps; first GluA2 antibody (1/200) was incubated for 10 min on the neurons. After three washing steps, QD655 (0.1–0.5 nM) preblocked with casein were incubated on cells for 2 min. Synapses were labeled using (1) 50–100 nM Mitotracker Green FM or Mitotracker deep Red (Invitrogen) (2 min incubation); (2) transfection with Homer1C::GFP or

Homer1C::DsRed. All incubations and washes were performed in high  $Mg^{2+}$ -containing extracellular solution at 37°C.

#### 3.4.4 Single-Molecule Optical Microscopy

Cells were imaged at 35°C–37°C in an open perfusion (0.2–0.5 ml/min) chamber (Warner Instruments) mounted onto an inverted microscope equipped with a 63× objective (NA = 1.4) or 100× objective (NA = 1.3). QDs, Homer1C::DsRed and  $\alpha$ CaMKII::GFP signals were detected by using a mercury lamp (For QDs: excitation filter 560RDF55 or 460BP40 and emission filters 655WB20 or 655WB40). Fluorescent images from QDs were obtained with an integration time of 50 ms with up to 1200 consecutive frames. Signals were recorded with a back-illuminated thinned CCD97 camera (Photometrics Cascade 512B, Roper Scientific). QD-labeled GluAs were imaged on randomly selected dendritic regions over up to 30 min total experimental time. An acquisition of the synaptic labeling before and after QD recording as well as QDs fixed on the coverslip allowed us to compensate mechanical drifts of the stage, which would have lead to a false interpretation of receptor location.

#### 3.4.5 Receptor Tracking and Analysis

The tracking of single QDs was performed with homemade software based on Matlab (Mathworks Inc., Natick, USA). Single QDs were identified by their blinking fluorescent emission and their diffraction limited signals. Owing to the random blinking events of the QDs, the trajectory of a QD tagged receptor could not be tracked continuously. Subtrajectories of the same receptor were reconnected when the positions before and after the dark period were compatible with borders set for maximal position changes between consecutive frames and blinking rates. The values were determined empirically: 2–3 pixels (0.32–0.48  $\mu$ m) for maximal position change between two frames and maximal dark periods of 25 frames (1.25 s). MSD curves were calculated for reconnected trajectories of at least 75 frames. The QDs were considered synaptic if colocalized with Mitotracker puncta or Homer dendritic clusters for at least five frames. Diffusion coefficients were calculated by a linear fit of the first 4–8 points of the mean

square displacement (MSD) plots versus time depending on the length of the trajectory within a certain compartment. The resolution limit for diffusion was  $0.0075 \mu\text{m}^2/\text{s}$  as determined by Groc et al. (2004). Despite a higher precision of QD tracked trajectories, we used this value to compare diffusion values and immobile fractions with previous data obtained by using single molecule tracking (Groc et al., 2004 and Tardin et al., 2003). The resolution precision was  $\sim 40 \text{ nm}$ .

### 3.4.6 Statistics

Statistical values are given as mean  $\pm$  SEM or medians  $\pm$  25%/75% interval, if not stated otherwise. Statistical significances were performed by using GraphPad Prism software or Matlab Statistical Toolbox. Non-Gaussian distributed data sets were tested by Mann-Whitney U test or Wilcoxon test for paired observations. Indications of significance correspond to p values  $< 0.05$  (\*),  $p < 0.005$  (\*\*), and  $p < 0.0005$  (\*\*\*)

### 3.4.7 Electrophysiology

The extracellular recording solution contained in mM concentration: 145 NaCl, 2.5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, and 10 D-Glucose, pH 7.4. In order to block GABA-A-receptors, 50  $\mu\text{M}$  Picrotoxin was added to solution. The bath temperature was kept at  $33^\circ\text{C}$ – $35^\circ\text{C}$ . Patch-clamp microelectrodes (4–6 M $\Omega$  resistance) were pulled from borosilicate capillaries on a P-97 model puller (Sutter Instruments Inc., <http://www.sutter.com>). Recordings in voltage- and current-clamp mode were performed with an EPC 10 double patch-clamp amplifier (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Germany). Data were sampled at 20 kHz and low-pass filtered at 2.9 kHz, using PatchMaster v 2.0 software (HEKA Elektronik GmbH). Data analysis was performed with Matlab (The MathWorks, Inc., <http://www.mathworks.com>). Whole-cell patch-clamps were obtained on pairs of cells located within the same microscope field ( $\sim 20$ – $40 \mu\text{m}$  apart). To test for monosynaptic transmission, one cell was stimulated in current-clamp mode, by injecting a 1 ms current pulse, while the other was recorded in voltage-clamp mode ( $-70 \text{ mV}$  holding potential). Neuron pairs for which the latency between the peak of the

presynaptic action potential and the peak of the evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) was smaller than 4 ms were retained as monosynaptically coupled (Medina et al., 1999). The pairs were rejected when either the presynaptic neuron resting membrane potential exceeded  $-55$  mV or when the series resistance in both cells was above  $30$  M $\Omega$ .

### **3.4.8 Extracellular Field Stimulation**

Restricted fields of neurons (1–1.5 mm between electrodes) were stimulated at 50 Hz. We used thin platinum wires isolated down to the tip and held within a theta-glass electrode. In total we applied 900 stimuli for each frequency in a regular pattern (1 s stimulus followed by 1 s pause). The length of a single stimulus was 1 ms and the stimulus current was varied between 2 and 5 mA. The stimulation electrode was connected to an isolation unit triggered by the patch amplifier.

## **3.5 Results**

### **3.5.1 Postsynaptic Translocation of CaMKII Promotes the Diffusional Trapping of AMPARs at Synapses**

Previous studies have shown that NMDAR activation triggers a rapid translocation of CaMKII to synapses (Otmakhov et al., 2004, Hudmon et al., 2005, Shen and Meyer, 1999 and Strack et al., 1997). To directly examine whether CaMKII translocation promotes the trapping of AMPARs, we tracked the lateral mobility of individual AMPARs before and after CaMKII translocation. Using fluorescence microscopy on cultured hippocampal neurons and NMDAR stimulation with glutamate and glycine (Glu/Gly), we simultaneously monitored (1) the translocation of  $\alpha$ CaMKII::GFP (2) and the surface mobility of AMPARs using quantum dots precoupled to a GluA1 antibody (QD-GluA1) (Richmond et al., 1996).

As previously shown, NMDAR activation promoted the rapid translocation of  $\alpha$ CaMKII::GFP to synaptic sites (marked by Homer1C::DsRed) (Figure 3.4A). Concurrently, we observed that the mobility of AMPARs, normally undergoing rapid

exchange between extrasynaptic and synaptic sites, was strongly reduced at synapses with translocated  $\alpha$ CaMKII::GFP (Figure 3.4C). In most cases, AMPARs were completely immobilized during the 1 min posttranslocation recording period (Figure 3.4A). Mean square displacement (MSD) versus time plots of AMPARs before translocation showed an almost linear relationship characteristic of free diffusive molecules. In contrast, a flat MSD curve typical of immobile receptors was observed after translocation (Figure 3.4B). AMPAR immobilization was only observed at synapses where CaMKII translocated; they were not diffusionally trapped either at extrasynaptic sites (Figure 3.4D) or synapses without translocated CaMKII (Figure S1). We observed a similar correlation for the mobility of GluA2 tagged with QDs through a GluA2-specific antibody (data not shown, but see below). To examine the specificity of this effect, we analyzed the mobility of the neural cell adhesion molecule (NCAM) labeled with QD precoupled to antibodies against NCAM (QD-NCAM). Figure 3.4E shows no synaptic trapping of QD-NCAM after CaMKII translocation.

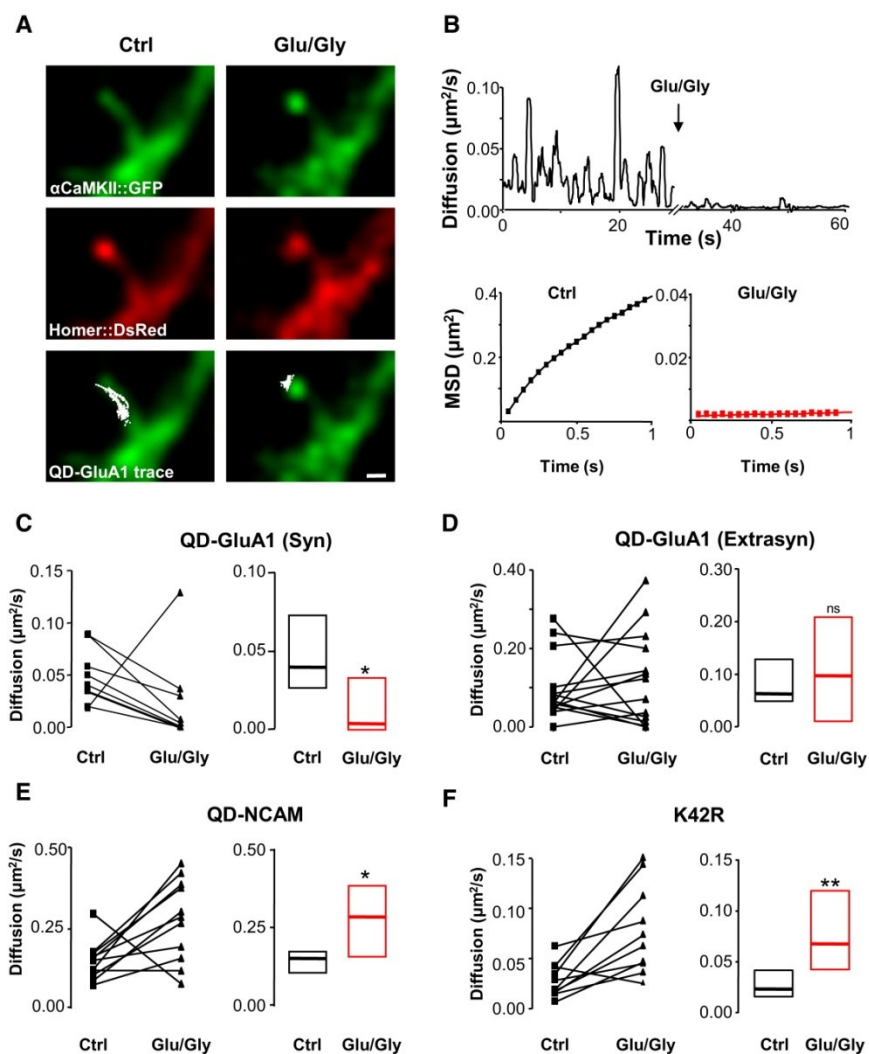


Figure 3.4 : CaMKII Translocation Promotes the Diffusional Trapping of AMPARs **(A)** Sample images of a single spine containing WT  $\alpha$ CaMKII::GFP before and after activation of NMDARs with glutamate/glycine (Glu/Gly). (Top row) Diffuse  $\alpha$ CaMKII::GFP fluorescence before NMDAR activation (left) becomes clustered in spine head 2–3 min after NMDAR activation (right). (Middle row) Synaptic marker Homer::DsRed before (left) and after (right) Glu/Gly. Note the lack of redistribution of Homer::DsRed after treatment. (Bottom row) Overlay of a QD-GluA1 trajectory (30 s) before NMDAR activation (left) or after  $\alpha$ CaMKII::GFP translocation (right). Scale bar, 1 $\mu\text{m}$ . **(B)** (Top) Diffusion over time plot for the trajectory represented in (A). The first 30 s were sampled before  $\alpha$ CaMKII::GFP translocation; the last 30 s after translocation. The arrow indicates Glu/Gly application (2 min). (Bottom) Mean square displacement (MSD) versus time plots for the pre- and poststimulation periods. The MSD calculated before stimulation is linear, which is characteristic of free diffusion, whereas the MSD calculated after stimulation exhibits a zero-flat curve typical of immobile receptors. **(C)** (Left) Single QD-GluA1 synaptic diffusion coefficients decrease after NMDAR activation. (Right) Median diffusion ( $\pm 20\%$ –75% IQR) of the data from left ( $n = 9$  QDs, paired

t test,  $p < 0.05$ ). **(D)** (Left) Single QD-GluA1 diffusion coefficients tend to increase at extrasynaptic sites after NMDAR activation. (Right) Median diffusion of the data from left ( $n = 14$  QDs, paired t test,  $p = 0.095$ ). **(E)** (Left) Single QD-NCAM synaptic diffusion coefficients increase after NMDAR activation. (Right) Median diffusion of the data from left ( $n = 11$  QDs, paired t test,  $p < 0.05$ ). **(F)** (Left) Single QD-GluA1 synaptic diffusion coefficients increase after NMDAR activation despite  $\alpha$ CaMKII::GFP K42R translocation. (Right) Median diffusion of the data from left ( $n = 10$  QDs, paired t test,  $p = 0.005$ ).

While these results indicate a correlation between CaMKII translocation and AMPAR immobilization at synaptic sites, they do not reveal a causal relationship. To investigate whether AMPAR immobilization was a direct consequence of CaMKII postsynaptic translocation, we first overexpressed  $\alpha$ CaMKII::GFP carrying a mutation (CaMKII::GFP I205K) that suppresses its ability to translocate postsynaptically by disrupting its binding to the NMDAR (Bayer et al., 2001 and Bayer et al., 2006). The Glu/Gly treatment promoted neither CaMKII::GFP I205K translocation nor synaptic immobilization of AMPARs (median diffusion coefficient in  $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ : before Glu/Gly 0.039; after 0.069;  $p = 0.124$ ,  $n = 13$ ).

Next, we investigated whether the catalytic activity of CaMKII is required for the synaptic trapping of AMPARs. We overexpressed  $\alpha$ CaMKII::GFP carrying a mutation known to disrupt its kinase activity but not its ability to translocate to synapses (CaMKII::GFP K42R) (Shen and Meyer, 1999 and Yamagata et al., 2009). Although the Glu/Gly treatment caused the synaptic translocation of CaMKII::GFP K42R (data not shown), AMPARs were not trapped at synapses enriched with this catalytically inactive mutant (Figure 3.4F). Altogether, these findings suggest that CaMKII translocation promotes the diffusional trapping of AMPARs by the phosphorylation of specific targets in the PSD.

### 3.5.2 Endogenous CaMKII Activation Triggers AMPAR Surface Immobilization

We have previously observed that cultured hippocampal neurons present spontaneous activity that drives a significant fraction of CaMKII to postsynaptic sites via

NMDAR activity (Bayer et al., 2006) and reduces the mobility of AMPARs at synapses (Ehlers et al., 2007). To determine whether basal activity is sufficient to trigger AMPAR immobilization through a CaMKII signaling cascade, we incubated neurons with the membrane-permeable CaMKII peptide inhibitor CN21, derived from the CaMKII natural inhibitor CaM-KIIN (amino acids 43–63) (Vest et al., 2007), and tracked AMPAR mobility (QD-GluA2). We found that the basal mobility of AMPARs was increased by the CaMKII inhibitory peptide (Figure 3.5A–2C) but not by a scrambled version. To examine whether further activation of endogenous CaMKII can promote additional AMPAR immobilization, we activated NMDARs with Glu/Gly and simultaneously tracked QD-labeled AMPARs. We found that indeed NMDAR activation promoted a strong immobilization of synaptic AMPARs (Figure 3.5D). More importantly, NMDAR activation had no significant effect on synaptic AMPAR mobility when delivered in the presence of CN21 (Figure 3.5E).



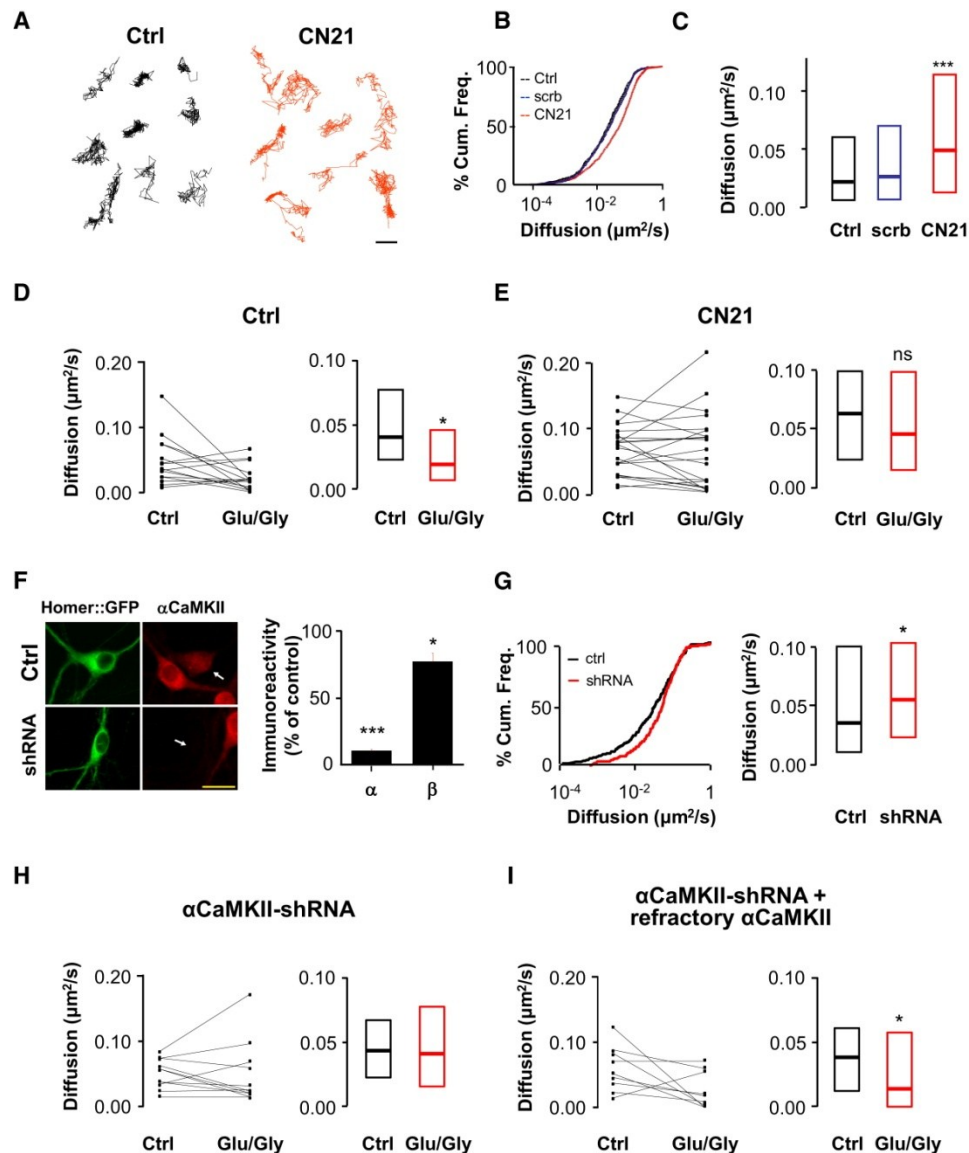


Figure 3.5 : Endogenous CaMKII Activation Triggers AMPAR Surface Immobilization. **(A)** Representative trajectories of QD-GluA2 membrane diffusion in control conditions or with the CaMKII inhibitory peptide CN21 (1  $\mu$ M). Scale bar, 1  $\mu$ m. **(B)** Cumulative distribution of the diffusion coefficient of synaptic QD-GluA2 in neurons treated with vehicle (control), scrambled, or CN21 peptide. **(C)** Median diffusion ( $\pm 20\%$ –75% IQR) of GluA2 in neurons treated with either vehicle (control, n = 881 QDs), scrambled (n = 530 QDs), or CN21 peptide (n = 1451 QDs). Note that CN21 significantly increased the basal mobility of synaptic receptors (Wilcoxon rank sum test,  $p < 0.0005$ ). **(D)** (Left) Single QD-GluA2 synaptic diffusion coefficients decrease after Glu/Gly stimulation. (Right) Median diffusion of the data from left (n = 28 QDs, Wilcoxon rank sum test,  $p < 0.05$ ). **(E)** (Left) CN21 blocks the NMDAR-dependent decrease in QD-GluA2 synaptic diffusion coefficient. (Right) Median diffusion of the data from left (n = 68 QDs, Wilcoxon rank sum test,  $p = 0.30$ ). **(F)** shRNA knockdown of endogenous  $\alpha$ CaMKII. (Left) Sample images of control- and  $\alpha$ CaMKII-

shRNA-transfected neurons (cotransfected with Homer::GFP). Arrows point to transfected cells. Scale bar, 25  $\mu\text{m}$ . (Right) Ratio of fluorescence intensity for  $\alpha\text{CaMKII}$  or  $\beta\text{CaMKII}$  immunoreactivity between shRNA-transfected and nearby nontransfected neurons. The shRNA directed against  $\alpha\text{CaMKII}$  knocked down  $\alpha\text{CaMKII}$  efficiently ( $\sim 10\%$  of control,  $n = 34$ ,  $p < 0.0005$ ), with a small effect on  $\beta\text{CaMKII}$  ( $\sim 80\%$  of control,  $n = 17$ ,  $p < 0.05$ ). **(G)** (Left) Cumulative distribution of the diffusion coefficient of QD-GluA2 in neurons treated with control ( $n = 145$  QDs) or  $\alpha\text{CaMKII}$ -shRNA ( $n = 164$  QDs). (Right) Knocking down  $\alpha\text{CaMKII}$  levels increase the median diffusion of QD-GluA2. **(H and I)**  $\alpha\text{CaMKII}$ -shRNA prevents the NMDAR-dependent decrease in GluA1 mobility. (Left panels) Single QD-GluA1 synaptic diffusion coefficients before and after Glu/Gly stimulation. (Right panels) Median diffusion of the data from left ( $n = 127$  QDs,  $p < 0.05$  H,  $n = 57$ ,  $p < 0.04$  I, Wilcoxon rank sum tests). Note that  $\alpha\text{CaMKII}$  knockdown blocks the NMDAR-dependent decrease of GluA1 synaptic diffusion coefficient (H), an effect rescued by the overexpression of an  $\alpha\text{CaMKII}$  mutant refractory to silencing (I). For these experiments, recombinant GluA1::SEP was tracked with anti-GFP labeled QDs (see Figure S2). Similar results were obtained for endogenous GluA2 (data not shown).

To confirm these pharmacological studies, we used an shRNA approach to downregulate endogenous  $\alpha\text{CaMKII}$ . An shRNA directed against an  $\alpha\text{CaMKII}$  sequence that very effectively downregulated the expression of  $\alpha\text{CaMKII}$  subunit (but not  $\beta\text{CaMKII}$ ; Figure 2F) also triggered a significant increase in basal AMPAR mobility (Figure 2G). Notably, further activation of NMDARs had no effect on AMPAR mobility in shRNA- $\alpha\text{CaMKII}$ -transfected cells (Figure 2H). In contrast, NMDAR activation promoted a strong immobilization of AMPARs in neurons transfected with either a control shRNA (data not shown) or with shRNA- $\alpha\text{CaMKII}$  plus a form of  $\alpha\text{CaMKII}$  refractory to silencing (Figure 2I).

We further investigated whether activation of NMDARs using a different pharmacological protocol (“chemical” LTP or cLTP) also induces the diffusional trapping of AMPARs (Petrini et al., 2009). We found that cLTP triggers the simultaneous immobilization and accumulation of AMPARs at synapses. More importantly, both AMPAR immobilization and accumulation were blocked when cLTP was induced in the presence of the CaMK inhibitor KN93 (Figure S2).

Taken together, these results strongly suggest that activation and postsynaptic translocation of CaMKII (whether endogenous or recombinant) promote the diffusional trapping of AMPARs at synapses.

### **3.5.3 High-Frequency Stimulation Promotes AMPAR Immobilization through CaMKII Activation**

We previously showed that high-frequency neuronal stimulation (HFS; 50 Hz) induces a rapid NMDAR and Ca<sup>2+</sup>-dependent AMPAR immobilization (Heine et al., 2008). We examined whether this process depended on CaMKII activation by stimulating a small population of neurons using a field bipolar electrode (Figure 3.6D) in the absence or presence of KN93. We first determined whether KN93 alone could increase basal AMPAR mobility (QD-GluA2). Consistent with the results observed with the peptide inhibitor CN21, application of KN93 increased the basal mobility of AMPARs (Figures 3A–3C). More importantly, KN93 also prevented the HFS-dependent immobilization of AMPARs (Figures 3H and 3I). In contrast, HFS stimulation induced a strong immobilization of AMPARs in neurons treated with either the vehicle or the inactive analog KN92 (Figures 3E–3G). As a measure of CaMKII activation, we found that HFS also promoted a strong synaptic translocation of CaMKII (Figure S3). Thus, patterns of synaptic activity (spontaneous or HFS-mediated) necessary for the activation of NMDARs and CaMKII induced the immobilization of AMPARs.

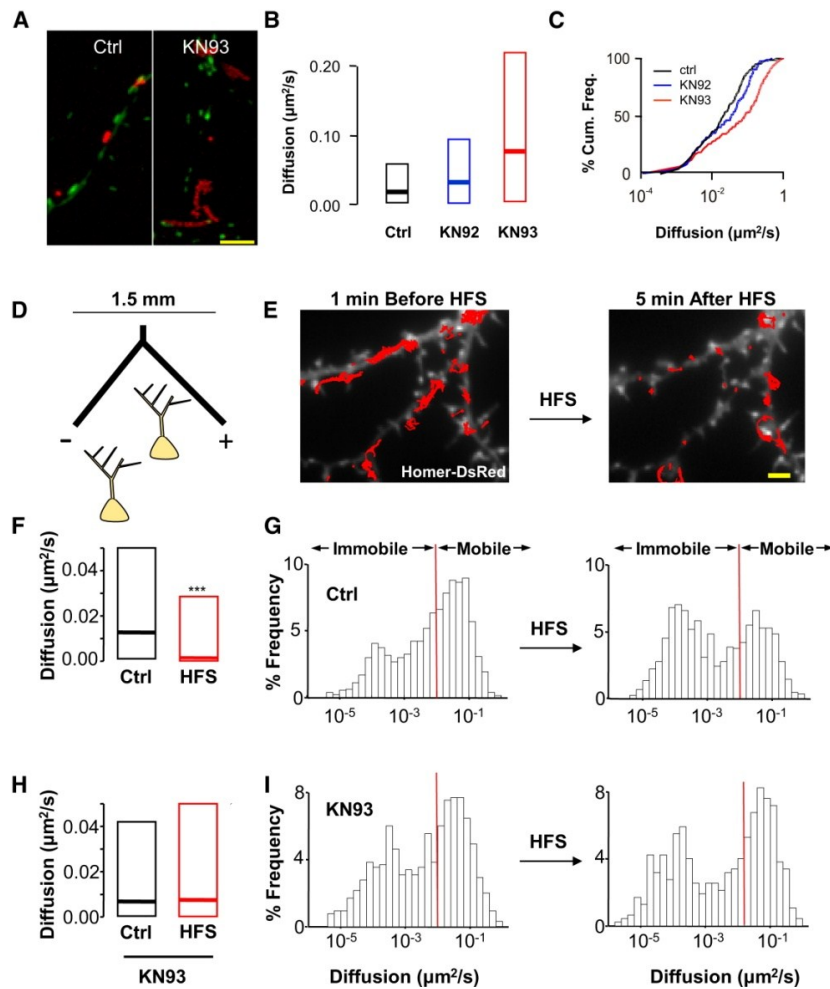


Figure 3.6 : CaMKII Mediates the Activity-Dependent Immobilization of AMPARs. **(A)** Overlay trajectories (red) of QD-GluA2 during 20 s and the synaptic marker Mitotracker (green) in cultured neurons in the absence or presence of the CaMK inhibitor KN93. Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ . **(B)** KN93 increases the median diffusion ( $\pm 20\%$ – $75\%$  IQR) of GluA2 in neurons treated with either vehicle (ctrl,  $n = 195$ ), KN92 ( $n = 86$ ), or KN93 ( $n = 193$ ). Wilcoxon rank sum test,  $p < 0.0005$ . **(C)** Cumulative distribution of the diffusion coefficient of synaptic QD-GluA2 in neurons treated with either vehicle (ctrl), KN92, or KN93. **(D)** Schematic diagram representing the high-frequency stimulation (HFS; 50 Hz) of neurons using a bipolar electrode. **(E)** Overlay trajectories (red) of QD-GluA2 during 60 s and the synaptic marker Homer1C::DsRed before and after HFS. Note that the surface explored by QD-GluA2 is dramatically decreased after HFS. Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ . **(F)** The median diffusion ( $\pm 20\%$ – $75\%$  IQR) of GluA2 is significantly decreased by HFS (control  $n = 247$  QDs, HFS  $n = 183$  QDs; Mann-Whitney test,  $***p < 0.0001$ ). **(G)** Frequency distributions of the diffusion coefficients calculated from the trajectories of QD-GluA2 shown in (F) before and after HFS in vehicle and inactive analog KN92 (pooled data). Note that HFS increased the immobile population ( $D_{\text{inst.coeff.}} < 1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). **(H and I)** The CaMK inhibitor KN93 prevents the HFS-dependent decrease in the median diffusion

(H) of GluA2 (ctrl n = 130 QDs, HFS n = 95 QDs; Mann-Whitney test,  $p = 0.783$ ) and the frequency distributions (I) of their diffusion coefficients.

### **3.5.4 Constitutively Active CaMKII Promotes a Strong Immobilization of AMPARs**

If CaMKII indeed mediates the immobilization of AMPARs at activated synapses, one might expect that a constitutively active form of CaMKII (tCaMKII) could by itself immobilize AMPARs at synapses. We thus tracked the mobility of endogenous GluA1-containing AMPARs, 16–24 hr after transfection of tCaMKII::GFP. We found that tCaMKII produced a strong reduction in the diffusion of both synaptic and extrasynaptic AMPARs (Figures 4A–4C). Although it is unclear why AMPARs are immobilized at extrasynaptic sites in presence of tCaMKII, it is likely that scaffolding proteins present at extrasynaptic sites might be mediating these effects (Figure S4; see below) (Aoki et al., 2001). Though to a lesser extent, tCaMKII also promoted the immobilization of AMPARs containing the GluA2 subunit (Figures 4D–4F). In contrast, tCaMKII overexpression had no effect on the surface mobility of GABAA receptors (Figures S5A–S5D).

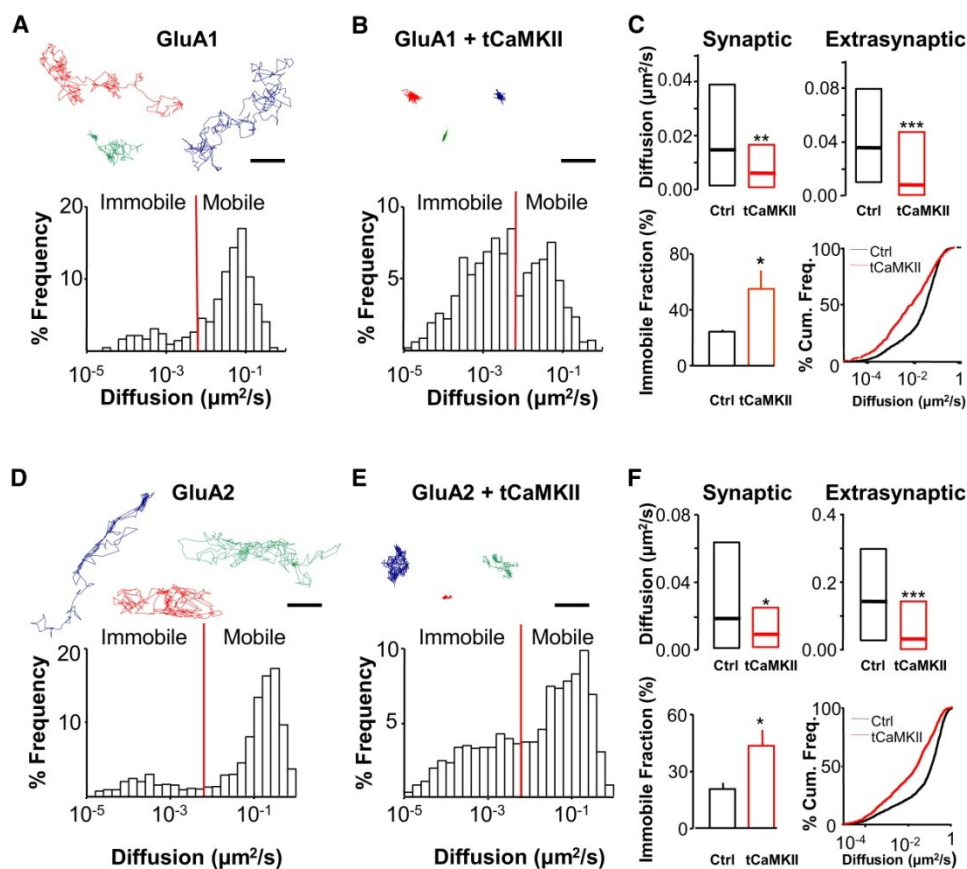


Figure 3.7 : Overexpression of Constitutively Active CaMKII Promotes the Immobilization of AMPARs Containing the GluA1 and GluA2 Subunits. **(A and B)** (Top) Sample trajectories of GluA1-coupled QDs in untransfected (A) or tCaMKII::GFP-transfected neurons (B). Scale bar, 0.5  $\mu\text{m}$ . (Bottom) Frequency distributions of the diffusion coefficients calculated from such trajectories. Note that they are distributed in two populations: One with  $1 \times 10^{-2} < \text{Dinst.coeff.} < 5 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$  (mobile receptors) and one with  $\text{Dinst.coeff.} < 1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$  (slowly moving and immobile receptors falling in the immobile fraction). The fraction of immobile receptors is dramatically increased in cells expressing tCaMKII::GFP compared to controls. **(C)** (Top) Median diffusion ( $\pm 20\% - 75\%$  IQR) of QD-GluA1 at synaptic (left) and extrasynaptic sites (right). Note that tCaMKII::GFP overexpression significantly decreased the diffusion of QD-GluA1 as compared to control untransfected neurons (control  $n = 680$  QDs; tCaMKII  $n = 136$  QDs; Mann-Whitney test: synaptic  $p < 0.001$ , extrasynaptic  $p < 0.0001$ ). (Bottom left) Mean ( $\pm \text{SEM}$ ) proportion of immobile receptors. (Bottom right) Cumulative distribution of the diffusion coefficient of QD-GluA1 (pooled synaptic and extrasynaptic) in untransfected and tCaMKII-transfected neurons. **(D-F)** The distribution of GluA2 diffusion coefficient is similar to that of GluA1 (A-C), and tCaMKII overexpression also promoted a decrease in their median diffusion ( $\pm 20\% - 75\%$  IQR) (control  $n = 354$  QDs; tCaMKII  $n = 332$  QDs; Mann-Whitney test: synaptic  $p < 0.05$ , extrasynaptic  $p < 0.0001$ ) and an increase in their mean immobile fraction ( $\pm \text{SEM}$ ), when compared to untransfected controls (t test,  $p < 0.05$ ). Scale bar, 0.5  $\mu\text{m}$ .

Because tCaMKII is a truncated, monomeric form of active CaMKII, we verified whether the full-length, multimeric, and constitutively active form of CaMKII (carrying a phosphomimetic mutation at the autophosphorylation site Thr286;  $\alpha$ CaMKII::GFP T286D) could produce the same effect. We found that indeed  $\alpha$ CaMKII::GFP T286D promoted a strong immobilization of AMPARs (QD-GluA1; Figures S5E–S5H).

Thus, bypassing NMDAR activation by directly overexpressing a constitutively active form of CaMKII also leads to the diffusional trapping of AMPARs. This strongly supports the notion that CaMKII is a negative regulator of AMPAR lateral mobility.

### **3.5.5 CaMKII Phosphorylation of AMPARs Is Not Necessary for Immobilization**

What is the mechanism by which CaMKII causes the immobilization of AMPARs? Since CaMKII phosphorylates GluA1 at Ser831 (Barria et al., 1997 and Mammen et al., 1997), we first tested whether this phosphorylation is necessary to modulate AMPAR mobility. We cotransfected tCaMKII either with WT GluA1 or GluA1 S831A. To track exclusively the mobility of recombinant receptors, we tagged the GluA1 subunit with an extracellular HA epitope and used QDs precoupled to an antibody against HA (QD-HA). We found that tCaMKII induced a significant immobilization of HA-GluA1, although to a lesser extent than that observed for endogenous GluA1-containing receptors (compare Figures 4C and 5B). We found that tCaMKII equally promoted the immobilization of HA-GluA1 S831A, suggesting that CaMKII regulates AMPAR mobility by phosphorylating substrates other than GluA1.

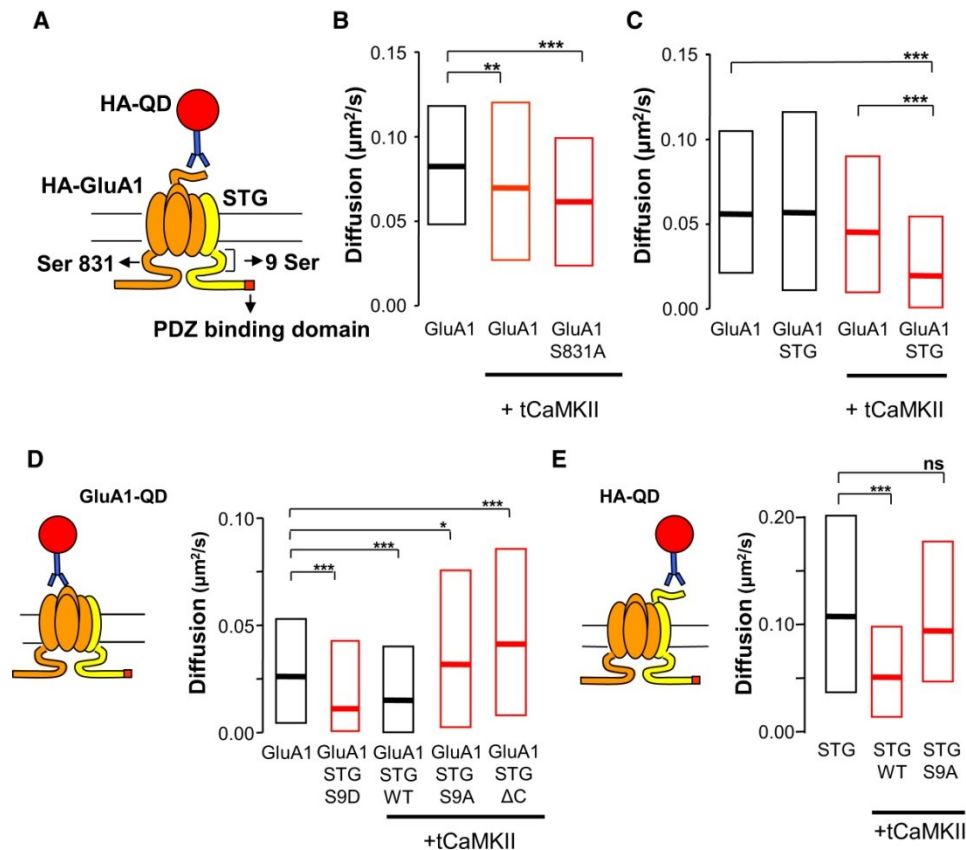


Figure 3.8 : CaMKII Immobilizes AMPARs through Stargazin. **(A)** Diagram representing the labeling strategy and targeted sites for manipulation on recombinant HA-GluA1 and Stargazin (STG). HA-GluA1 was tracked using QD-coupled to HA antibodies. **(B)** tCaMKII::GFP overexpression significantly decreased the median diffusion ( $\pm 20\%$ – $75\%$  IQR) of HA-GluA1 (GluA1  $n = 68$  QDs, GluA1+ tCaMKII  $n = 137$  QDs, Mann-Whitney test  $p < 0.001$ ) as well as HA-GluA1 carrying a mutation at Ser831 (GluA1 S831A  $n = 131$  QDs, Mann-Whitney test,  $p < 0.0001$ ). **(C)** Stargazin coexpression further decreased the median diffusion of HA-GluA1 mediated by tCaMKII::GFP (GluA1  $n = 372$  QDs, STG  $n = 246$  QDs, GluA1+ tCaMKII  $n = 376$  QDs, GluA1+ tCaMKII + STG  $n = 376$  QDs, Mann-Whitney test,  $p < 0.0001$ ). **(D)** (Left) Diagram showing the labeling strategy of endogenous GluA1-containing AMPARs (with QDs coupled to GluA1 antibodies) accompanied with recombinant forms of Stargazin. (Right) tCaMKII::GFP overexpression did not reduce the median diffusion of QD-GluA1 when coexpressed with Stargazin-mCherry carrying mutations either at the CaMKII/PKC phosphorylation sites (control  $n = 136$  QDs, tCaMKII + STG S9A  $n = 80$  QDs; Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ) nor when lacking the PDZ-binding domain (Stargazin  $\Delta\text{C}$   $n = 202$  QDs; Mann-Whitney test,  $p < 0.0001$ ). In contrast, Stargazin phosphomimetic STG S9D triggered GluA1 immobilization without tCaMKII::GFP (STG S9D  $n = 144$ , Mann-Whitney test,  $p < 0.0001$ ). **(E)** (Left) Diagram showing the labeling strategy of recombinant HA-Stargazin (tracked using QD-coupled to HA antibodies). (Right) tCaMKII::GFP overexpression decreased the median diffusion of HA-STG but not HA-STG S9A (STG  $n = 313$  QDs; STG +



tCaMKII n = 223 QDs, Mann-Whitney test,  $p < 0.001$ ; STG S9A + tCaMKII n = 256 QDs, Mann-Whitney test,  $p > 0.05$ ).

Another important CaMKII substrate is SAP97, a scaffolding protein known to interact with GluA1 and to be recruited to synapses upon phosphorylation (Mauceri et al., 2004). To explore whether GluA1 binding to SAP97 was necessary for AMPAR immobilization, we coexpressed tCaMKII with HA-GluA1 lacking the PDZ-binding domain (HA-GluA1 $\Delta$ 7). We found that HA-GluA1 $\Delta$ 7 mobility was still strongly reduced by tCaMKII (median diffusion coefficient in  $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ : HA-GluA1 0.1371 n = 157 QDs; HA-GluA1  $\Delta$ 7 + tCaMKII 0.010 n = 307 QDs,  $p < 0.0001$ ). These results suggest that the interaction between GluA1 and SAP97 is not necessary for CaMKII-dependent immobilization of AMPARs.

### 3.5.6 Stargazin Mediates the Effects of CaMKII on AMPAR Mobility

Recent studies have identified members of the transmembrane AMPAR regulatory proteins (TARP) family, such as Stargazin, as important targets of CaMKII (Tomita et al., 2005b and Tsui and Malenka, 2006). Since we recently showed that Stargazin is essential for the transient diffusional trapping of AMPARs at synapses via interactions with PSD95 (Bats et al., 2007), we examined the role of Stargazin and its phosphorylation in mediating CaMKII-dependent immobilization of AMPARs. We hypothesized that the implication of Stargazin could explain why CaMKII promoted a weaker immobilization of recombinant, as opposed to endogenous, AMPARs (Figure 3.6C versus 5B). Overexpression of AMPARs alone might have favored the expression of Stargazin-lacking AMPARs. To correct this possible bias and to try to enhance the immobilization-effect of tCaMKII on recombinant AMPARs, we carried out triple transfections with HA-GluA1, tCaMKII, and WT Stargazin. Expression of WT Stargazin increased the CaMKII-mediated immobilization of recombinant HA-GluA1 to levels similar to those observed with endogenous AMPARs (Figure 3.8C) and increased the immobile fraction of AMPARs to significant levels. As previously reported (Bats et al., 2007), we found that Stargazin itself had no effect on AMPAR diffusion (Figure 3.8C). Also, we found that tCaMKII had no

effect on the mobility of recombinant GluA2 either in the absence or presence of Stargazin (Figure S6) suggesting a subunit-specific effect of CaMKII.

To investigate the possible implication of Stargazin phosphorylation, we coexpressed tCaMKII with Stargazin Ser9Ala, a mutated form of Stargazin carrying point mutations at the nine putative CaMKII/PKC phosphorylation sites (Tomita et al., 2005b). We tracked the mobility of endogenous AMPARs (QD-GluA1) and found that tCaMKII was no longer able to immobilize them. On the contrary, AMPAR mobility was significantly increased when tCaMKII and Stargazin S9A were coexpressed (Figure 3.8D). In addition, Stargazin S9A had no significant effect on AMPAR mobility when expressed alone, though there was a tendency to increase receptor mobility (data not shown).

To examine whether the interaction between Stargazin and PDZ domain-containing proteins such as PSD95 was necessary for the effects of tCaMKII, we coexpressed tCaMKII and Stargazin  $\Delta$ C, a mutant lacking the PDZ binding site (last four residues of the C terminus). We found that tCaMKII was again unable to immobilize endogenous AMPARs (QD-GluA1) when coexpressed with Stargazin  $\Delta$ C (even though the phosphorylation sites were intact). As with Stargazin S9A, we found that AMPAR mobility was significantly increased when tCaMKII and Stargazin  $\Delta$ C were coexpressed (Figure 3.8D). To determine whether Stargazin phosphorylation was sufficient to immobilize AMPARs, we overexpressed a Stargazin phosphomimetic mutant (STG S9D) alone and found that it promoted a strong immobilization of AMPARs (Figure 3.8D).

Since our results suggest that CaMKII is directly stabilizing Stargazin (and only indirectly AMPARs), a prediction is that tCaMKII should promote the diffusional trapping of Stargazin itself. To test this hypothesis, we coexpressed tCaMKII and Stargazin tagged extracellularly with HA (HA-Stargazin), and tracked the surface mobility of HA-Stargazin using QD-HA. We found that tCaMKII caused a robust immobilization of HA-Stargazin, but not of HA-Stargazin S9A, confirming the critical role of CaMKII phosphorylation in the diffusional trapping of Stargazin (Figure 3.8E).

### 3.5.7 Functional Implication of CaMKII-Mediated Immobilization of AMPARs

Does CaMKII-mediated immobilization of AMPARs have a functional impact on synaptic transmission? We have previously shown that AMPAR lateral mobility ensures high-frequency synaptic transmission (<50 ms pulse interval) by allowing the rapid exchange of desensitized receptors with neighboring functional ones (Heine et al., 2008). We showed that manipulations that increased AMPAR immobilization, such as antibody-mediated AMPAR cross-linking or tetanic stimulation, disrupt this dynamic exchange and increase paired-pulse depression (PPD). Conversely, the removal of the extracellular matrix, a manipulation that increases mobility of AMPARs, results in a decreased PPD (Frischknecht et al., 2009). Based on these observations, we hypothesized that CaMKII could accentuate PPD by restricting the exchange of desensitized AMPARs. In order to test this hypothesis, we performed whole-cell recordings from pairs of connected cultured hippocampal neurons. We applied a pair of depolarizing pulses at the presynaptic neuron (50 ms interval) and recorded EPCs from a postsynaptic neuron overexpressing WT or constitutively active CaMKII (Figure 3.9A). As shown in Figure 3.9B, active CaMKII strongly increased PPD. To determine whether this effect was due to the inability of desensitized AMPARs to escape and be replaced by functional receptors, we repeated the experiment in the presence of the desensitization blocker cyclothiazide (CTZ) (Trussell et al., 1993 and Yamada and Tang, 1993). CTZ completely rescued the effect of tCaMKII on PPD by unmasking the population of immobilized/desensitized AMPARs. CTZ had no effect on a pair of untransfected neurons (Figure 3.9E). To ascertain that the effect of CaMKII was due to AMPAR immobilization through Stargazin phosphorylation, we coexpressed CaMKII T286D with Stargazin S9A, a mutant shown above to prevent the effects of CaMKII on AMPAR mobility. Stargazin S9A completely blocked the effect of CaMKII on PPD (Figures 6F and 6G). To verify that the rescue was due to the phosphomutations and not to other regions of Stargazin known to alter the intrinsic desensitization properties of AMPARs (Tomita et al., 2005a), we examined whether WT Stargazin could also block the effect of CaMKII T286D. In the presence of coexpressed WT Stargazin, CaMKII T286D could still strongly increase PPD (Figure 3.9G). Taken together, these results indicate that immobilization of AMPARs mediated by active

CaMKII has a strong impact on rapid synaptic transmission by disrupting the normal diffusional exchange of desensitized receptors.

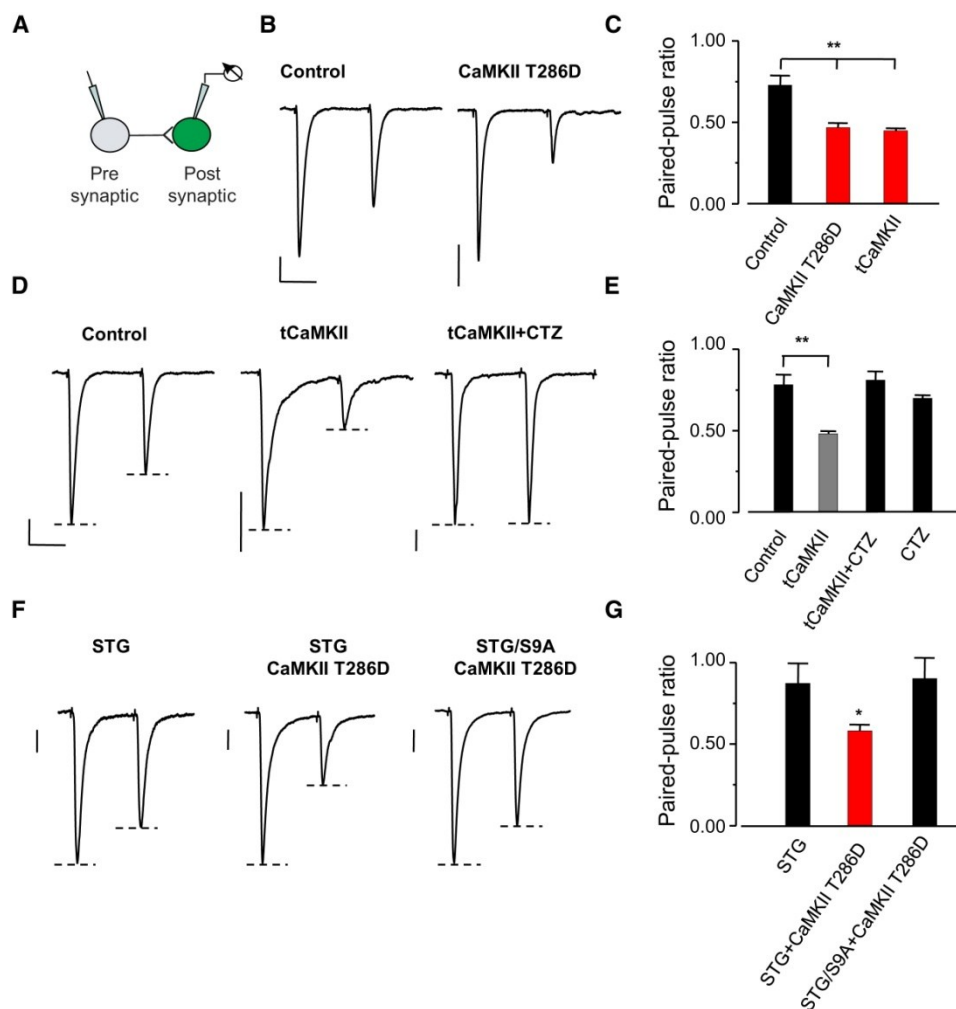


Figure 3.9 : CaMKII Modulation of Paired-Pulse Depression of EPSCs in Monosynaptically Connected Cultured Hippocampal Neurons. **(A)** Schematic representation of dual patch-clamp configuration. A pair of depolarizing pulses was applied to the presynaptic neuron (50 ms interval) and EPSCs recorded from a postsynaptic neuron overexpressing active CaMKII. **(B)** Representative EPSC traces evoked in untransfected and CaMKII T286D overexpressing neurons. Vertical and horizontal scales are 50 pA and 25 ms, respectively. **(C)** Mean ( $\pm$ SEM) paired-pulse (second-to-first EPSC) ratios from data as in (B). Control,  $n = 18$ ; CaMKII T286D,  $n = 5$ ; tCaMKII,  $n = 9$ .  $p < 0.01$ , one-tailed Mann-Whitney U test. **(D)** Representative EPSC traces evoked in untransfected or tCaMKII ( $\pm 100 \mu\text{M}$  cyclothiazide, CTZ). Vertical and horizontal scales are 50 pA and 25 ms, respectively. **(E)** Mean ( $\pm$ SEM) paired-pulse (second-to-first EPSC) ratios from untransfected cells and neurons transfected with tCaMKII (same as in (C)) either in the absence or presence of 100  $\mu\text{M}$  cyclothiazide (CTZ) (\*\* $p < 0.01$ , one-tail). **(F)** Representative EPSC traces evoked in neurons coexpressing CaMKII T286D either with WT Stargazin (STG) or Stargazin Ser9Ala (STG/S9A). Vertical and

horizontal scales are 50 pA and 25 ms, respectively. (G) Mean ( $\pm$ SEM) paired-pulse (second-to-first EPSC) ratios from data as in (F). STG,  $n = 4$ ; CaMKII T286D + STG,  $n = 5$ ; STG/S9A,  $n = 5$ .  $p < 0.05$ , one-tailed Mann-Whitney U test.

### 3.6 Discussion

Our study reveals a function of CaMKII as a regulator of AMPAR diffusional trapping at the synaptic surface and short-term synaptic plasticity. As shown in the model (Figure 3.10), we uncovered the molecular mechanisms underlying the  $Ca^{2+}$ -dependent AMPAR trapping at synapses which involves the postsynaptic translocation of CaMKII and the direct phosphorylation of the AMPAR auxiliary subunit Stargazin.

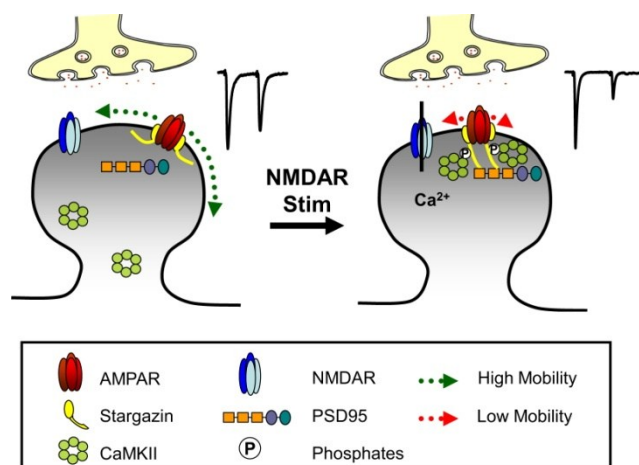


Figure 3.10 : Model of NMDA Receptor-Dependent Trapping of Laterally Diffusing AMPARs. At basal state, AMPARs are highly mobile at the neuronal surface, rapidly exchanging between extrasynaptic and synaptic sites, while CaMKII is not enriched in the PSD. Upon NMDAR activation,  $Ca^{2+}$ /CaM activates CaMKII and induces its postsynaptic translocation. In the PSD, CaMKII phosphorylates the AMPAR auxiliary protein Stargazin, facilitating its binding to PSD95 and synaptic retention, thereby indirectly stabilizing AMPARs at synapses. At the functional level, the synaptic immobilization of AMPARs accentuates paired-pulse depression by preventing the exchange between desensitized and naive receptors.

#### 3.6.1 Role of CaMKII in the Synaptic Recruitment of AMPARs

Numerous studies have found a critical role for CaMKII in the activity-dependent recruitment of AMPARs observed during synaptic development and plasticity (Asrican et al., 2007, Correia et al., 2008, Hayashi et al., 2000, Lee et al., 2009, Lisman et al., 2002, Merrill et al., 2005, Pettit et al., 1994, Rongo and Kaplan, 1999 and Sanhueza et al., 2007).

It has been suggested that CaMKII functions by inducing either (1) the exocytosis of AMPAR-containing vesicles or (2) the retention of receptors in the postsynaptic density (Lisman et al., 2002). On the one hand, CaMKII has been shown to mediate a form of dendritic exocytosis (Maletic-Savatic et al., 1998), and recent studies have shown that a target for CaMKII, Myosin V (Costa et al., 1999 and Karcher et al., 2001), plays an important role in the NMDAR-dependent exocytosis of AMPARs (Correia et al., 2008 and Wang et al., 2008). On the other hand, CaMKII might recruit AMPARs by organizing new anchoring sites for them at the synapse (Lisman et al., 2002 and Lisman and Zhabotinsky, 2001). In fact, a number of CaMKII substrates and interacting proteins in the PSD, including Stargazin, PSD95 and actin have been shown to regulate the lateral mobility of AMPARs at synapses (Bats et al., 2007).

We now propose that activity-dependent synaptic recruitment of AMPARs involves both modes of operation in a two step process involving AMPAR exocytosis and synaptic AMPAR trapping as a result of CaMKII postsynaptic translocation and Stargazin phosphorylation. First, we and others have recently showed that NMDAR stimulation simultaneously triggers AMPAR exocytosis and immobilization of AMPARs (Makino and Malinow, 2009 and Petrini et al., 2009). Second, a number of studies indicate that the activity-dependent insertion of AMPARs might occur at perisynaptic sites (Lin et al., 2009, Passafaro et al., 2001, Yang et al., 2008 and Yudowski et al., 2007). Together with our new data, this strongly suggests that newly inserted AMPARs at extrasynaptic sites, which are highly diffusing in the membrane (Petrini et al., 2009), are retained via a CaMKII-dependent mechanism into active synaptic areas. The requirement of an NMDAR-dependent diffusional trap is consistent with reports showing that promoting the exocytosis of AMPARs in a NMDAR-independent manner (which probably does not result in CaMKII activation) are not paralleled by increases in synaptic transmission (Oh et al., 2006 and Schnell et al., 2002).

### **3.6.2 The Enzymatic Activity of CaMKII Is Critical for AMPAR Trapping**

A “structural” model has been proposed in which CaMKII stabilizes AMPARs into the synaptic area by functioning as a scaffolding protein (Lisman and Zhabotinsky, 2001). While CaMKII does not bind directly to AMPARs (Kennedy, 2000 and Lisman et al., 2002), it might bridge postsynaptic elements such as NMDAR, SAP97, 4.1N, and the actin cytoskeleton to ultimately stabilize synaptic AMPARs. Since CaMKII is a dodecameric and self-associating enzyme, it can potentially bind several components simultaneously and provide additional anchoring sites for AMPARs (Hudmon et al., 2005, Robison et al., 2005 and Rosenberg et al., 2005). A hallmark of this hypothesis is that CaMKII organizes new anchoring sites exclusively through protein-protein interactions independent of its kinase activity. On the contrary, our findings establish that the enzymatic activity of CaMKII is essential for trapping AMPARs at synapses. First, translocation of a mutated form of CaMKII lacking enzymatic activity was unable to trap AMPARs. Second, CaMKII phosphorylation of Stargazin is critical for the diffusional trapping of both AMPARs and Stargazin. Third, the fact that the monomeric, constitutively active tCaMKII was able to promote the diffusional trapping of AMPARs, even though it lacks important protein-protein interaction domains, suggests that the kinase activity, rather than its structure, is the primary mechanism underlying CaMKII-dependent retention of AMPARs at synapses. This hypothesis is further reinforced by recent data showing that kinase-dead CaMKII knockin mice exhibit profound deficit in LTP and learning (Yamagata et al., 2009).

### **3.6.3 Role of Stargazin in the CaMKII-Mediated AMPAR Trapping**

A paramount finding of this study is the critical role of Stargazin in mediating the CaMKII-dependent stabilization of AMPARs at synapses. Although it was originally proposed that the interaction between AMPARs and the scaffold protein SAP97 was essential for AMPAR stabilization, our data indicate that AMPARs are indirectly stabilized through the interaction between Stargazin and PDZ-domain containing proteins such as PSD95 (Bats et al., 2007 and Chen et al., 2000). We found that recombinant GluA1  $\Delta$ C (lacking the SAP97-binding site) was still immobilized by CaMKII. In contrast, CaMKII

was unable to immobilize AMPARs when coexpressed with Stargazin  $\Delta$ C (lacking the PSD95-binding site).

An intriguing finding of our study is that active CaMKII promotes the immobilization of both synaptic and extrasynaptic AMPARs. Although still unclear, we believe that extrasynaptic immobilization is a consequence of the overexpression of active CaMKII that is not specifically targeted to synapses. Since recombinant CaMKII is also distributed extrasynaptically, it could potentially promote the immobilization of AMPAR/Stargazin by binding to extrasynaptic PSD95 (Figure S4) (Aoki et al., 2001). However, when CaMKII is targeted exclusively to synapses (during NMDAR activation and CaMKII synaptic translocation), we observed AMPAR immobilization exclusively at synaptic sites.

The exact mechanism by which Stargazin phosphorylation decreases the mobility of AMPARs remains to be determined. It is particularly puzzling that the CaMKII phosphorylation sites on Stargazin are remote from its C terminus responsible for interaction with PSD95 (Tomita et al., 2005b). It is possible that phosphorylation triggers a conformational change in Stargazin that increases either the binding affinity or the accessibility to PSD95. The change in charge associated with Stargazin phosphorylation might for example decrease its electrostatic interaction with the inner leaflet of the plasma membrane, and thus facilitate interaction of the extreme C terminus with PSD95 as previously proposed (Tomita et al., 2005b). Interestingly, it is possible that the number of phosphorylated serines (from one to nine) could act cooperatively to provide an incremental binding to PSD95 in a rheostat-like fashion. In fact, although Stargazin is phosphorylated at various degrees in neuronal extracts, only highly phosphorylated Stargazin exist at the PSD (Tomita et al., 2005b and Tsui and Malenka, 2006).

An intriguing finding of our study is the apparent GluA1 subunit-specific effect of CaMKII. Although CaMKII triggers the immobilization of both GluA1 and GluA2 containing endogenous AMPARs, it immobilizes recombinant GluA1 but not GluA2 homomeric AMPARs. Thus, it is likely that CaMKII immobilized the GluA1/GluA2



subpopulation of endogenous AMPARs but not the GluA2/GluA3 subpopulation. Although this finding is consistent with the specific role of GluA1 in the activity-dependent recruitment of AMPARs (Hayashi et al., 2000 and Shi et al., 2001), it is at odd with the fact that Stargazin can bind all subunits (Chen et al., 2000). Further studies are necessary to elucidate the exact mechanism; it is possible that phosphorylation triggers a conformational change on Stargazin that lead to stabilization of the Stargazin-GluA1 complex and/or destabilization and dissociation of the Stargazin-GluA2 complex. Along this line, recent studies have demonstrated that the interaction between Stargazin and AMPARs can be dynamically regulated by activity (Morimoto-Tomita et al., 2009 and Tomita et al., 2004).

### **3.6.4 Physiological Consequences of AMPAR Synaptic Trapping**

Although numerous studies have demonstrated a critical role of CaMKII in the synaptic recruitment of AMPARs during LTP, the underlying mechanisms remain unknown (Derkach et al., 2007, Hayashi et al., 2000 and Lisman et al., 2002). Our findings suggest that during LTP, CaMKII recruits AMPARs simply by trapping them as they diffuse through the synaptic area, whether they were pre-existing or newly inserted on the extrasynaptic membrane. This mechanism is consistent with numerous studies stressing the essential roles of CaMKII, Stargazin, and PSD95 in the induction of LTP (Ehrlich and Malinow, 2004, Lisman et al., 2002, Rouach et al., 2005, Stein et al., 2003 and Tomita et al., 2005b). It remains to be determined whether the pool of laterally diffusing AMPARs does in fact provide the additional receptors in synapses that have undergone LTP. If so, this newly uncovered function of CaMKII in trapping AMPARs diffusing on the neuronal membrane might account for the critical role of that enzyme in LTP. Consistent with this hypothesis, we found that a “chemical” LTP protocol triggered both AMPAR immobilization and accumulation at synapses in a CaMKII-dependent manner.

It is unlikely that the CaMKII-mediated immobilization of AMPARs corresponds to a universal mechanism for LTP. For instance, LTP at the dentate gyrus is independent of CaMKII activity (Wu et al., 2006). Also, CaMKII activity is not necessary for LTP early in development at the CA1 region (Yasuda et al., 2003). Further studies will be necessary to

determine whether other kinases known to be important for LTP induction, such as PKA, PI3-K, PKC, and MAPK, also trigger AMPAR immobilization.

Our experiments reveal a function of CaMKII as a depressor of high-frequency synaptic transmission, in addition to its traditional role in the potentiation of low-frequency synaptic transmission or LTP (test pulses at 20 Hz versus 0.05 Hz, respectively). Since the lateral mobility of AMPARs ensures high-frequency synaptic transmission (Heine et al., 2008) by allowing the rapid exchange between synaptic desensitized receptor with extrasynaptic naive AMPARs, it is likely that CaMKII-induced immobilization of AMPARs in the synapse prevents this dynamic exchange. As with cross-linking-induced AMPAR immobilization (Heine et al., 2008), CaMKII-induced immobilization accentuated PPD (50 ms pulse interval).

Our findings thus raise the possibility that during LTP, CaMKII activation triggers both classical LTP and PPD. It is interesting to note that LTP is frequently accompanied by a decrease in paired-pulse facilitation (PPF) (Christie and Abraham, 1994, Markram and Tsodyks, 1996 and Schulz et al., 1995). While changes in PPF have traditionally been ascribed to presynaptic mechanisms, it will be interesting to determine whether postsynaptic CaMKII contributes to this effect. Studies by Wang and Kelly have in fact shown that postsynaptic injection of CaMKII inhibitors blocked both LTP and the decrease in PPF (Wang and Kelly, 1996 and Wang and Kelly, 1997). Although our studies strongly support a role of  $\alpha$ CaMKII in the regulation of PPF, our findings are at odds with studies carried out in the  $\alpha$ CaMKII knockout animal. Rather than an increased in PPF (as expected from reduced CaMKII activity and increased AMPAR mobility), the  $\alpha$ CaMKII knockout presented a diminished PPF (Silva et al., 1992). The reasons for this difference are unclear, but the fact that presynaptic CaMKII, which is known to regulate vesicle release (Chapman et al., 1995), is absent in  $\alpha$ CaMKII<sup>-/-</sup> mice, makes it difficult to compare these findings. Indeed our results on CaMKII regulation of short-term plasticity were limited to the postsynaptic side. Future work is needed to dissect the differential roles of pre- and postsynaptic CaMKII in short-term plasticity.

What is the physiological role of this seemingly “paradoxical” depression effect on high-frequency synaptic transmission? It may serve a homeostatic role to avoid a run up in synaptic transmission by preventing the potentiation of already potentiated synapses. Thus, high-frequency trains of synaptic transmission (50–100 Hz) should induce LTP in naive synapses by providing the depolarization necessary to activate NMDARs and trigger the CaMKII-dependent recruitment of additional AMPARs. However, an eventual depression of high-frequency synaptic transmission in “potentiated” synapses might set a ceiling on the ability to activate NMDARs and further induce potentiation.

It has indeed remained elusive how the potentiation of synapses can reach saturation; a homeostatic mechanism such as the one described here provides an appealing complement to CaMKII function in LTP and thus suggests that the enzyme has a dual role in tuning the strength of synaptic transmission: (1) increasing synaptic strength by retaining more AMPARs in the synapse, while (2) capping the strength of transmission by slowing exchange of desensitized AMPARs.

### 3.7 References

- Aoki, C., I. Miko, et al. (2001). "Electron microscopic immunocytochemical detection of PSD-95, PSD-93, SAP-102, and SAP-97 at postsynaptic, presynaptic, and nonsynaptic sites of adult and neonatal rat visual cortex." *Synapse* 40(4): 239-57.
- Asrican, B., J. Lisman, et al. (2007). "Synaptic strength of individual spines correlates with bound Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent kinase II." *J Neurosci* 27(51): 14007-11.
- Barria, A., V. Derkach, et al. (1997). "Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor." *J Biol Chem* 272(52): 32727-30.
- Bats, C., L. Groc, et al. (2007). "The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking." *Neuron* 53(5): 719-34.
- Bayer, K. U., P. De Koninck, et al. (2001). "Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation." *Nature* 411(6839): 801-5.
- Bayer, K. U., E. LeBel, et al. (2006). "Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B." *J Neurosci* 26(4): 1164-74.

- Boeckers, T. M., C. Winter, et al. (1999). "Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family." *Biochem Biophys Res Commun* 264(1): 247-52.
- Borgdorff, A. J. and D. Choquet (2002). "Regulation of AMPA receptor lateral movements." *Nature* 417(6889): 649-53.
- Chapman, P. F., B. G. Frenguelli, et al. (1995). "The alpha-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II: a bidirectional modulator of presynaptic plasticity." *Neuron* 14(3): 591-7.
- Chen, L., D. M. Chetkovich, et al. (2000). "Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms." *Nature* 408(6815): 936-43.
- Christie, B. R. and W. C. Abraham (1994). "Differential regulation of paired-pulse plasticity following LTP in the dentate gyrus." *Neuroreport* 5(4): 385-8.
- Collingridge, G. L., R. W. Olsen, et al. (2009). "A nomenclature for ligand-gated ion channels." *Neuropharmacology* 56(1): 2-5.
- Correia, S. S., S. Bassani, et al. (2008). "Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation." *Nat Neurosci* 11(4): 457-66.
- Costa, M. C., F. Mani, et al. (1999). "Brain myosin-V, a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity." *J Biol Chem* 274(22): 15811-9.
- Derkach, V. A., M. C. Oh, et al. (2007). "Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci* 8(2): 101-13.
- Ehlers, M. D., M. Heine, et al. (2007). "Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity." *Neuron* 54(3): 447-60.
- Ehrlich, I. and R. Malinow (2004). "Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity." *J Neurosci* 24(4): 916-27.
- Frischknecht, R., M. Heine, et al. (2009). "Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity." *Nat Neurosci* 12(7): 897-904.
- Groc, L., M. Heine, et al. (2004). "Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors." *Nat Neurosci* 7(7): 695-6.
- Hayashi, Y., S. H. Shi, et al. (2000). "Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction." *Science* 287(5461): 2262-7.
- Heine, M., L. Groc, et al. (2008). "Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission." *Science* 320(5873): 201-5.

- Hudmon, A., E. Lebel, et al. (2005). "A mechanism for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association." *J Neurosci* 25(30): 6971-83.
- Karcher, R. L., J. T. Roland, et al. (2001). "Cell cycle regulation of myosin-V by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." *Science* 293(5533): 1317-20.
- Kennedy, M. B. (2000). "Signal-processing machines at the postsynaptic density." *Science* 290(5492): 750-4.
- Lee, S. J., Y. Escobedo-Lozoya, et al. (2009). "Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation." *Nature* 458(7236): 299-304.
- Lin, D. T., Y. Makino, et al. (2009). "Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation." *Nat Neurosci* 12(7): 879-87.
- Lisman, J. E. and A. M. Zhabotinsky (2001). "A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly." *Neuron* 31(2): 191-201.
- Lisman, J., H. Schulman, et al. (2002). "The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory." *Nat Rev Neurosci* 3(3): 175-90.
- Makino, H. and R. Malinow (2009). "AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis." *Neuron* 64(3): 381-90.
- Maletic-Savatic, M., T. Koothan, et al. (1998). "Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured hippocampal neurons. Part II: mediation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." *J Neurosci* 18(17): 6814-21.
- Mammen, A. L., K. Kameyama, et al. (1997). "Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II." *J Biol Chem* 272(51): 32528-33.
- Markram, H. and M. Tsodyks (1996). "Redistribution of synaptic efficacy: a mechanism to generate infinite synaptic input diversity from a homogeneous population of neurons without changing absolute synaptic efficacies." *J Physiol Paris* 90(3-4): 229-32.
- Mauceri, D., F. Cattabeni, et al. (2004). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation drives synapse-associated protein 97 into spines." *J Biol Chem* 279(22): 23813-21.
- Medina, I., X. Leinekugel, et al. (1999). "Calcium-dependent inactivation of the monosynaptic NMDA EPSCs in rat hippocampal neurons in culture." *Eur J Neurosci* 11(7): 2422-30.

- Merrill, M. A., Y. Chen, et al. (2005). "Activity-driven postsynaptic translocation of CaMKII." *Trends Pharmacol Sci* 26(12): 645-53.
- Morimoto-Tomita, M., W. Zhang, et al. (2009). "Autoinactivation of neuronal AMPA receptors via glutamate-regulated TARP interaction." *Neuron* 61(1): 101-12.
- Oh, M. C., V. A. Derkach, et al. (2006). "Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation." *J Biol Chem* 281(2): 752-8.
- Okamoto, K., R. Narayanan, et al. (2007). "The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(15): 6418-23.
- Otmakhov, N., J. H. Tao-Cheng, et al. (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* 24(42): 9324-31.
- Passafaro, M., V. Piech, et al. (2001). "Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons." *Nat Neurosci* 4(9): 917-26.
- Petrini, E. M., J. Lu, et al. (2009). "Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation." *Neuron* 63(1): 92-105.
- Pettit, D. L., S. Perlman, et al. (1994). "Potentiated transmission and prevention of further LTP by increased CaMKII activity in postsynaptic hippocampal slice neurons." *Science* 266(5192): 1881-5.
- Poncer, J. C., J. A. Esteban, et al. (2002). "Multiple mechanisms for the potentiation of AMPA receptor-mediated transmission by alpha-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II." *J Neurosci* 22(11): 4406-11.
- Richmond, S. A., A. J. Irving, et al. (1996). "Localization of the glutamate receptor subunit GluR1 on the surface of living and within cultured hippocampal neurons." *Neuroscience* 75(1): 69-82.
- Robison, A. J., M. A. Bass, et al. (2005). "Multivalent interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with the postsynaptic density proteins NR2B, densin-180, and alpha-actinin-2." *J Biol Chem* 280(42): 35329-36.
- Rongo, C. and J. M. Kaplan (1999). "CaMKII regulates the density of central glutamatergic synapses in vivo." *Nature* 402(6758): 195-9.
- Rosenberg, O. S., S. Deindl, et al. (2005). "Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme." *Cell* 123(5): 849-60.

- Rouach, N., K. Byrd, et al. (2005). "TARP gamma-8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity." *Nat Neurosci* 8(11): 1525-33.
- Sanhueza, M., C. C. McIntyre, et al. (2007). "Reversal of synaptic memory by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor." *J Neurosci* 27(19): 5190-9.
- Schnell, E., M. Sizemore, et al. (2002). "Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13902-7.
- Schulz, P. E., E. P. Cook, et al. (1995). "Using paired-pulse facilitation to probe the mechanisms for long-term potentiation (LTP)." *J Physiol Paris* 89(1): 3-9.
- Shen, K. and T. Meyer (1999). "Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation." *Science* 284(5411): 162-6.
- Shi, S., Y. Hayashi, et al. (2001). "Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons." *Cell* 105(3): 331-43.
- Silva, A. J., C. F. Stevens, et al. (1992). "Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice." *Science* 257(5067): 201-6.
- Stein, V., D. R. House, et al. (2003). "Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression." *J Neurosci* 23(13): 5503-6.
- Strack, S., S. Choi, et al. (1997). "Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density." *J Biol Chem* 272(21): 13467-70.
- Tardin, C., L. Cognet, et al. (2003). "Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses." *Embo J* 22(18): 4656-65.
- Tomita, S., M. Fukata, et al. (2004). "Dynamic interaction of stargazin-like TARPs with cycling AMPA receptors at synapses." *Science* 303(5663): 1508-11.
- Tomita, S., H. Adesnik, et al. (2005). "Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains." *Nature* 435(7045): 1052-8.
- Tomita, S., V. Stein, et al. (2005). "Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs." *Neuron* 45(2): 269-77.
- Trussell, L. O., S. Zhang, et al. (1993). "Desensitization of AMPA receptors upon multiquantal neurotransmitter release." *Neuron* 10(6): 1185-96.
- Tsui, J. and R. C. Malenka (2006). "Substrate localization creates specificity in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II signaling at synapses." *J Biol Chem* 281(19): 13794-804.

- Vest, R. S., K. D. Davies, et al. (2007). "Dual mechanism of a natural CaMKII inhibitor." *Mol Biol Cell* 18(12): 5024-33.
- Wang, J. H. and P. T. Kelly (1996). "The balance between postsynaptic Ca(2+)-dependent protein kinase and phosphatase activities controlling synaptic strength." *Learn Mem* 3(2-3): 170-81.
- Wang, J. H. and P. T. Kelly (1997). "Attenuation of paired-pulse facilitation associated with synaptic potentiation mediated by postsynaptic mechanisms." *J Neurophysiol* 78(5): 2707-16.
- Wang, Z., J. G. Edwards, et al. (2008). "Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity." *Cell* 135(3): 535-48.
- Wu, J., M. J. Rowan, et al. (2006). "Long-term potentiation is mediated by multiple kinase cascades involving CaMKII or either PKA or p42/44 MAPK in the adult rat dentate gyrus in vitro." *J Neurophysiol* 95(6): 3519-27.
- Yamada, K. A. and C. M. Tang (1993). "Benzothiadiazides inhibit rapid glutamate receptor desensitization and enhance glutamatergic synaptic currents." *J Neurosci* 13(9): 3904-15.
- Yamagata, Y., S. Kobayashi, et al. (2009). "Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of kinase activity of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha in dendritic spine enlargement, long-term potentiation, and learning." *J Neurosci* 29(23): 7607-18.
- Yang, Y., X. B. Wang, et al. (2008). "Delivery of AMPA receptors to perisynaptic sites precedes the full expression of long-term potentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(32): 11388-93.
- Yasuda, H., A. L. Barth, et al. (2003). "A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction." *Nat Neurosci* 6(1): 15-6.
- Yudowski, G. A., M. A. Puthenveedu, et al. (2007). "Real-time imaging of discrete exocytic events mediating surface delivery of AMPA receptors." *J Neurosci* 27(41): 11112-21.
- Zhang, Y. P., N. Holbro, et al. (2008). "Optical induction of plasticity at single synapses reveals input-specific accumulation of alphaCaMKII." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(33): 12039-44.



## 3.8 Supplemental Material

### 3.8.1 Rationale for supplementary material

**Figure S1: AMPARs are not trapped at synapses with failed  $\alpha$ CaMKII::GFP translocation.** Related to Figure 3.4. We show in Figure 3.4 that CaMKII translocation triggers the immobilization of diffusing AMPARs. Is AMPAR immobilization due to CaMKII translocation or other events triggered by the Glu/Gly treatment? In Figure S1, we show that synapses where CaMKII failed to translocate are unable to trap AMPARs even though they have received the Glu/Gly treatment. This result reinforces the correlation between CaMKII translocation and AMPAR immobilization at synapses.

**Figure S2: cLTP stimulation triggers the simultaneous immobilisation and accumulation of AMPARs at synapses.** Related to Figure 3.4&2. We show in Figure 3.4 and 2 that activation of NMDAR with Glu/Gly triggers the diffusional trapping of AMPARs. Given the potential role of this mechanism for LTP, we activated NMDARs using a chemical LTP (cLTP) protocol and examined whether AMPAR accumulation was accompanied by AMPAR trapping. In Figure S2, we demonstrate that cLTP triggered simultaneously the diffusional trapping and the synaptic accumulation of AMPARs in a CaMKII-dependent manner.

**Figure S3: High Frequency Stimulation (HFS) promotes the synaptic translocation of  $\alpha$ CaMKII::GFP.** Related to Figure 3.6. We show in Figure 3.6 that HFS triggers the CaMKII-dependent immobilization of AMPARs. In Figure S3, we demonstrate that HFS also triggers the synaptic translocation of CaMKII.

**Figure S4: Endogenous PSD95 is present at both extrasynaptic and synaptic sites.** In Figure 3.6, we show that constitutively active CaMKII triggers the immobilization of AMPARs at both synaptic and extrasynaptic sites. How do AMPARs stop at extrasynaptic sites? In Figure S4, we show that endogenous PSD95 is also enriched at extrasynaptic sites and thus might mediate the extrasynaptic immobilization of AMPARs.

**Figure S5: Over expression of constitutively active CaMKII has no effect on recombinant GluA2-AMPA receptors.** Related to Figure 3.8. In Figure 3.8, we show that active CaMKII triggers the immobilization of recombinant GluA1-AMPA receptors in a Stargazin-dependent manner. In Figure S6, we demonstrate that this effect is specific for GluA1 since active CaMKII is unable to immobilize recombinant GluA2-AMPA receptors.

**Figure S6: Over expression of constitutively active CaMKII immobilizes AMPARs but not GABA receptors.** Related to Figure 3.6&5. In Figure 3.6, we show that constitutively active CaMKII triggers the immobilization of AMPARs. To control for the specificity of this effect, we determined whether active CaMKII could also immobilize GABA receptors. In Figure S5 A-D we show that active CaMKII has no effect on GABA receptors consistent with a specific effect on AMPARs. In Figure 3.6 and 5, we used a truncated and monomeric form of active CaMKII (tCaMKII) to immobilize AMPARs. In Figure S5 E-H, we demonstrated

that a full-length and multimeric form of active CaMKII (CaMKII T286D) also triggers AMPAR immobilization. Thus, the catalytic activity of CaMKII rather than its structural role *per se* triggers AMPAR immobilization.

## 3.8.2 Supplementary Figures

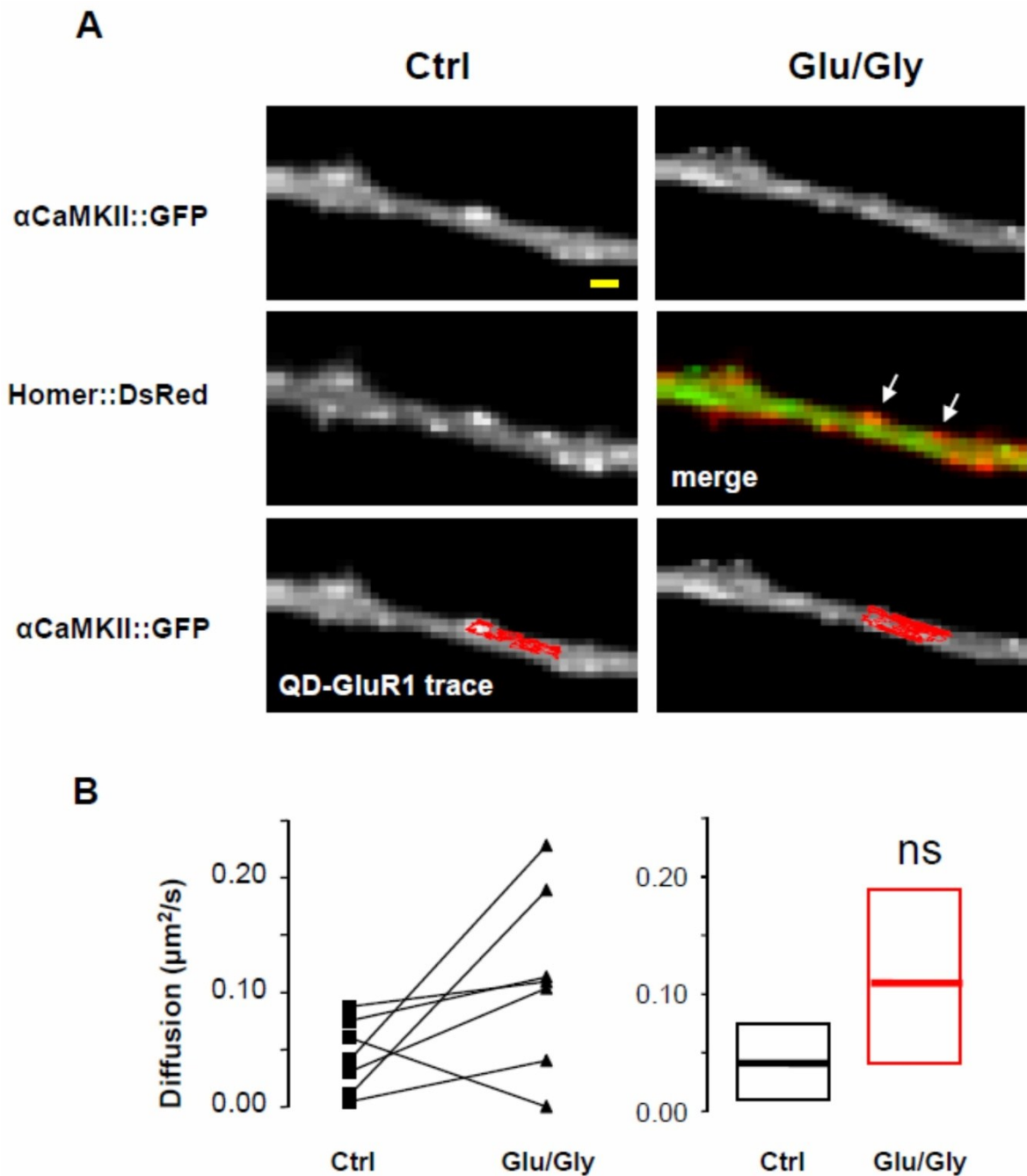


Figure 3.11 (S1) : AMPARs are not trapped at synapses with failed  $\alpha\text{CaMKII}::\text{GFP}$  translocation. (A) Top: Sample images of a dendrite overexpressing WT  $\alpha\text{CaMKII}::\text{GFP}$  before and after activation of NMDARs with glutamate/glycine (Glu/Gly). Note that Glu/Gly failed to promote  $\alpha\text{CaMKII}::\text{GFP}$  translocation. Middle left: Same dendrite co-expressing the synaptic marker Homer::DsRed. Middle right: Merge image between  $\alpha\text{CaMKII}::\text{GFP}$  and Homer- DsRed after treatment. Note that the lack of colocalization indicates that

$\alpha$ CaMKII::GFP failed to translocate to synapses (white arrows). Bottom: Overlay of a QD-GluA1 trajectory (60 sec) before and after NMDAR activation. Note QD-GluA1 is not immobilized at synapses with failed  $\alpha$ CaMKII::GFP translocation (white arrows in top panel). Scale bar 1  $\mu$ m. **(B)** Left: Single QD-GluA1 synaptic diffusion coefficients are not significantly altered at synapses with failed  $\alpha$ CaMKII::GFP translocation. Right: Median diffusion ( $\pm 20\%$ -75% IQR) of the data from left (n=7 QDs, paired t-test, p=0.089).

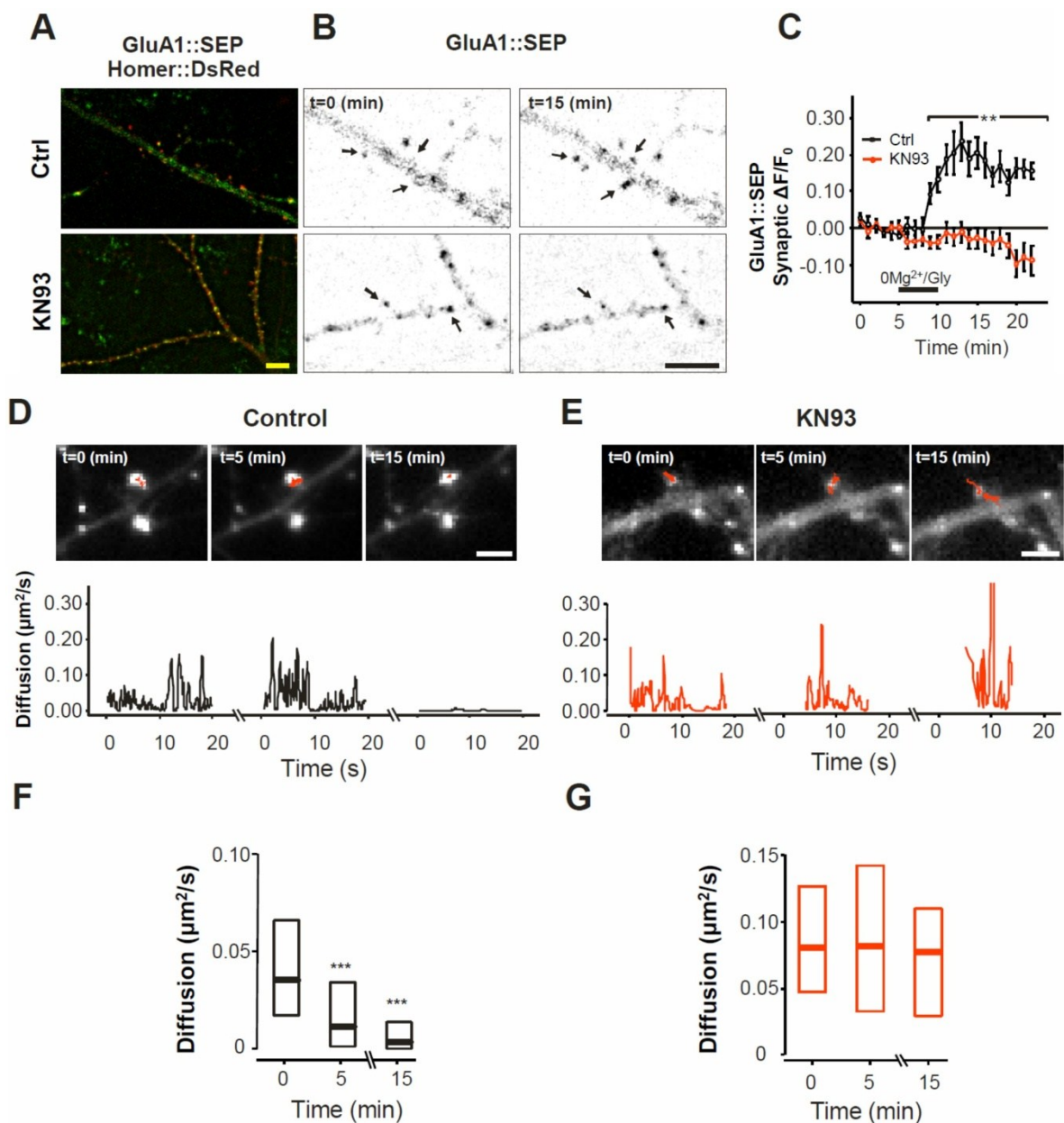


Figure 3.12 (S2) : cLTP stimulation triggers the simultaneous immobilisation and accumulation of AMPARs at synapses. **(A)** Sample images of hippocampal neuron expressing GluA1::SEP (super-ecliptic pFluorin) and Homer::DsRed. Top panel: control condition. Bottom panel: 1h pre-incubation with KN93 (5  $\mu$ M). Scale bar 5  $\mu$ m. **(B)** Inverted and higher magnification images of synapses in **(A)** before and 10 min after cLTP stimulation (0Mg<sup>2+</sup>/Gly-containing extracellular solution for 5min). Note that GluA1::SEP only increase in synapses (arrows) in control conditions. Scale bar 5  $\mu$ m. **(C)**  $\Delta F/F_0$  of GluA1::SEP in synapses  $\pm$  SEM. At t=15 min; Control  $\Delta F/F_0 = 0.163 \pm 0.026$  (N=5 neurons; n=218 synapses); KN92  $\Delta F/F_0 = 0.1546 \pm 0.0417$  (N=11 neurons; n=716 synapses) (not shown); KN93  $\Delta F/F_0 = -0.0971 \pm 0.0369$  (N=11 neurons; n=579 synapses). **(D-E)** Top panels: overlay of Homer::DsRed and QD tracking (in red) before, during and after 0

Mg<sup>2+</sup>/Gly stimulation, in absence (D) or presence (E) of KN93. Bottom Panel: Instantaneous coefficient diffusion over time of a QD coupled to anti-GFP bound to GluA1::SEP in a synapse. Scale bar 5  $\mu$ m. **(F-G)**

Time course of GluA1::SEP-QD median synaptic diffusion ( $\pm 20\%$ -75% IQR) after cLTP in control conditions (F) and in the presence of KN93 (G). In control conditions: before stimulation (n=117, D = 0.0349  $\mu$ m<sup>2</sup>/s); immediately after stimulation (n=59, D=0.0113  $\mu$ m<sup>2</sup>/s); 10 min after stimulation (n=43, D=0.0039  $\mu$ m<sup>2</sup>/s). Note that 0Mg<sup>2+</sup>/Gly significantly decreased the mobility of synaptic receptors (Wilcoxon rank sum test, p<0.0005). KN92 conditions: before stimulation (n=175, D = 0.0295  $\mu$ m<sup>2</sup>/s); after stimulation (n=104, D=0.0397  $\mu$ m<sup>2</sup>/s); 10 min after stimulation (n=43, D=0.0115  $\mu$ m<sup>2</sup>/s). Note that 0Mg<sup>2+</sup>/Gly decreased the mobility of synaptic receptors (Wilcoxon rank sum test, p<0.05) (not shown). KN93 conditions: before stimulation (n=210, D = 0.0814  $\mu$ m<sup>2</sup>/s); after stimulation (n=149, D=0.0818  $\mu$ m<sup>2</sup>/s); 10 min after stimulation (n=119, D=0.0775  $\mu$ m<sup>2</sup>/s). Note that 0Mg<sup>2+</sup>/Gly does not decrease the mobility of synaptic receptors.

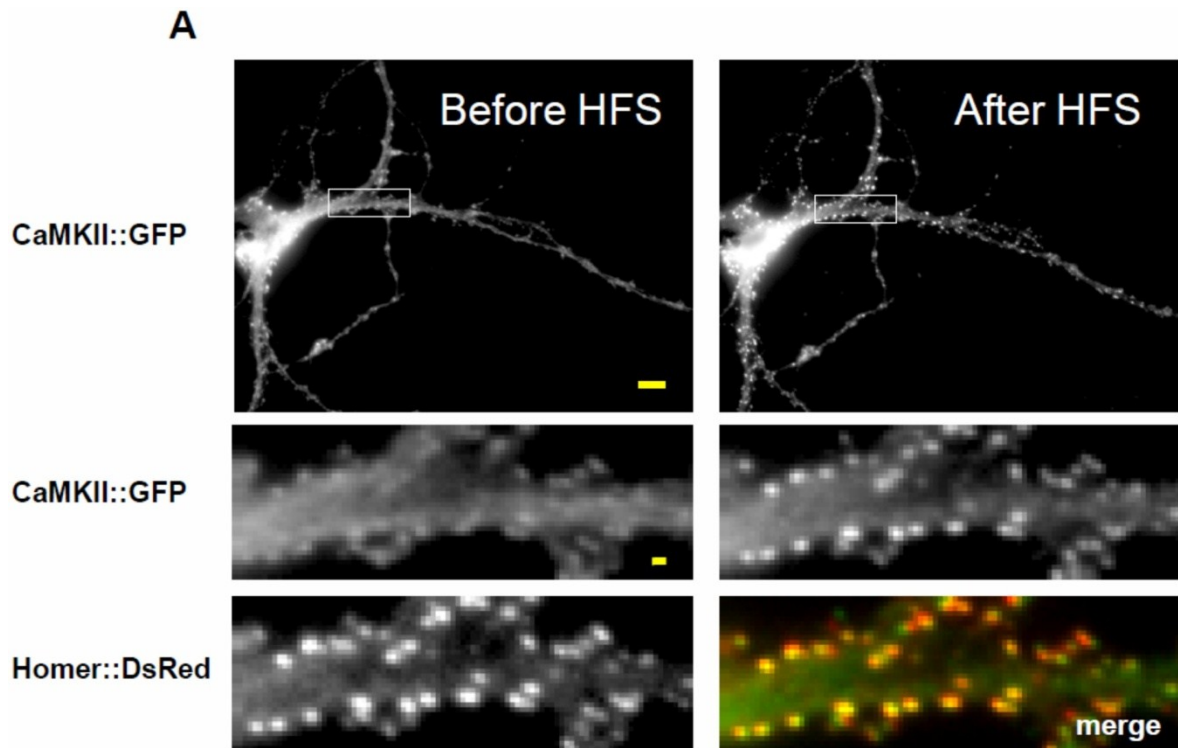


Figure 3.13 (S3) : High Frequency Stimulation (HFS) promotes the synaptic translocation of  $\alpha$ CaMKII::GFP. (A) Sample images of a neuron overexpressing WT  $\alpha$ CaMKII::GFP before and after activation of NMDARs with glutamate/glycine (Glu/Gly). Top left: Diffuse  $\alpha$ CaMKII::GFP fluorescence before NMDAR activation.

Top right: Clustered CaMKII::GFP fluorescence 2-3 minutes after NMDAR activation. Scale bar 10  $\mu$ m.

Middle: Higher magnification image of the area indicated by the white box in top panels. Scale bar 1  $\mu$ m.

Bottom: The synaptic marker Homer::DsRed before Glu/Gly co-localized with translocated  $\alpha$ CaMKII::GFP.

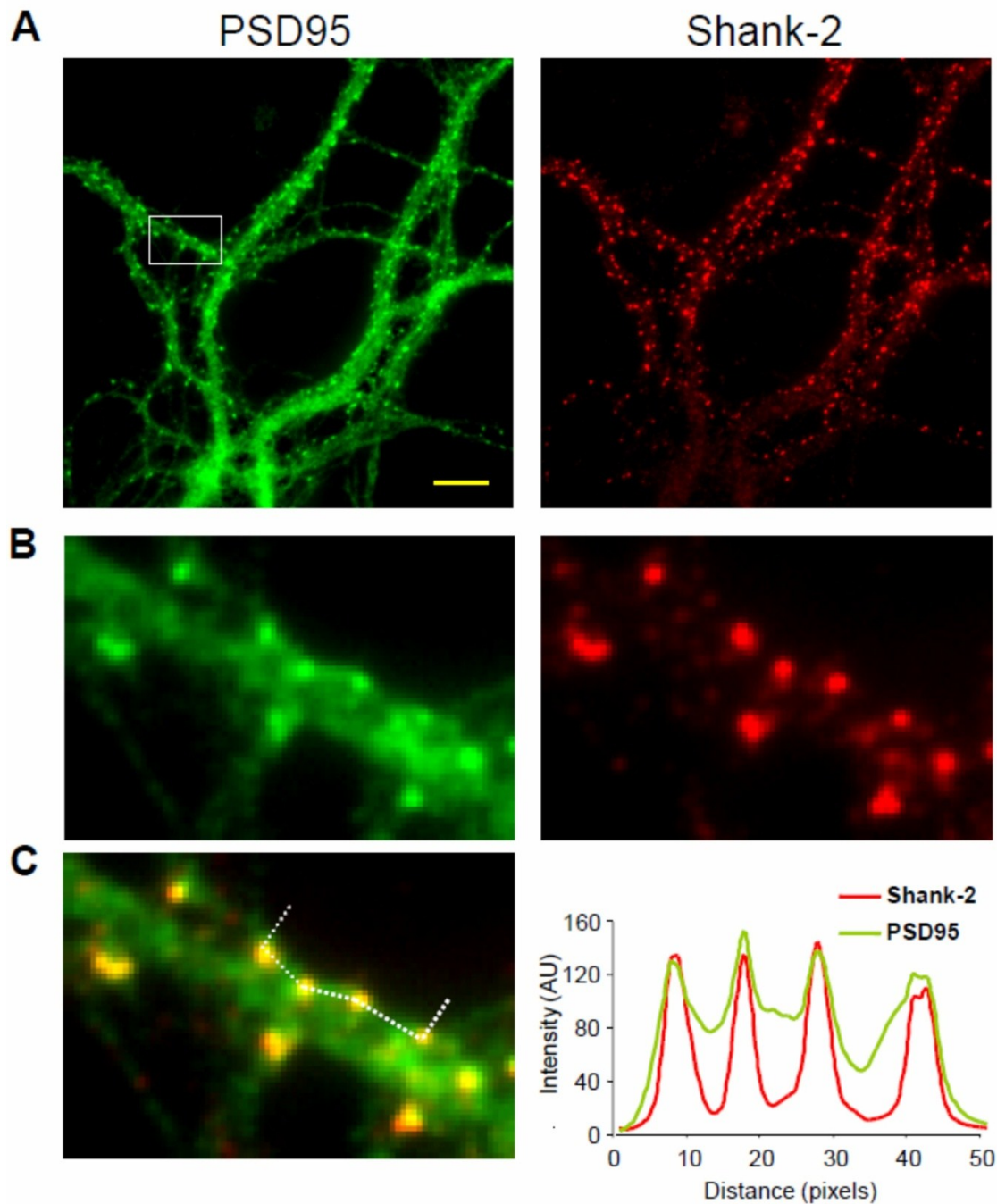


Figure 3.14 (S4) : Endogenous PSD95 is present at both extrasynaptic and synaptic sites. **(A)** Sample image of a neuron immunostained for endogenous PSD95 and Shank-2 at DIV14. Scale bar 10  $\mu$ m. Note that Shank-2 is exclusively clustered at synapses whereas PSD95 is also present at extrasynaptic sites. **(B)** Higher magnification image of the area indicated by the white box in top panels. **(C)** Left: Merge image between PSD95 (green) and Shank-2 (red) from the top panels. Note that PSD95 and Shank-2 only colocalize with Shank-2 at synaptic sites. Right: Linescans of the merged image (white line). Similar results were obtained by testing series dilutions of both antibodies.



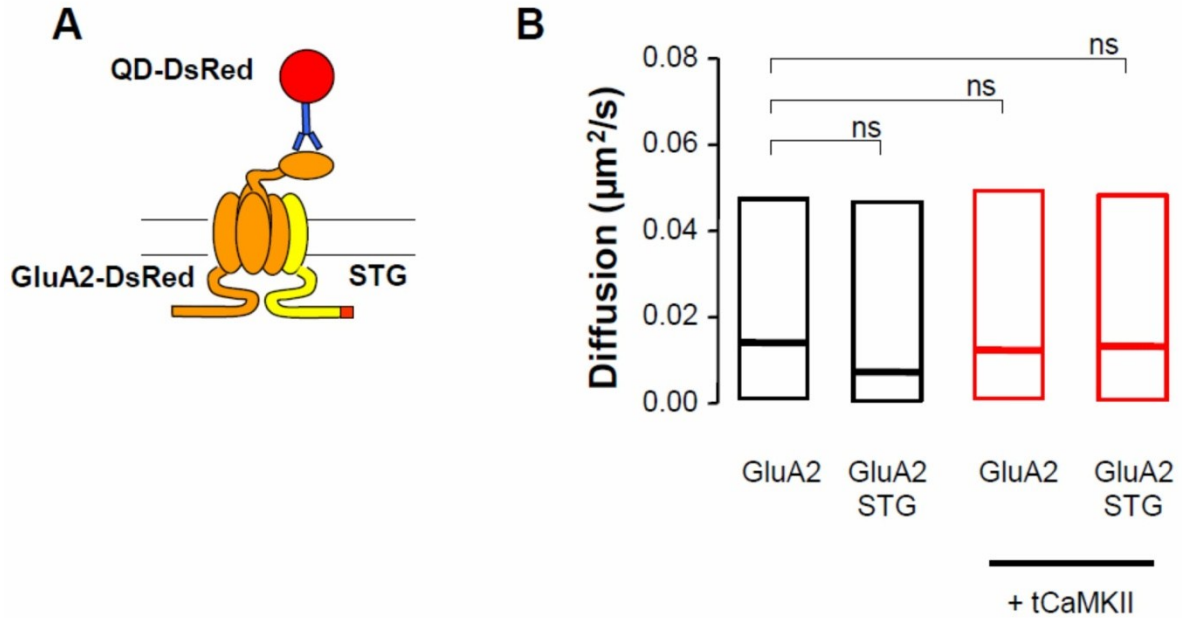


Figure 3.15 (S5) : Over expression of constitutively active CaMKII has no effect on recombinant GluA2-AMPA receptors. **(A)** Diagram representing the labelling strategy and constructs combination. Recombinant DsRed-GluA2 receptors were exclusively tracked using QD-coupled to DsRed antibodies. **(B)** Median diffusion ( $\pm 20\%$ -75% IQR) of GluA2 receptors. Note that tCaMKII::GFP over expression has no effect on the diffusion of DsRed-GluA2 receptors either in the absence or presence of Stargazin (GluA2 n=133 QDs, GluA2+ tCaMKII n=91 QDs, GluA2+ tCaMKII + Stargazin n=76 QDs).

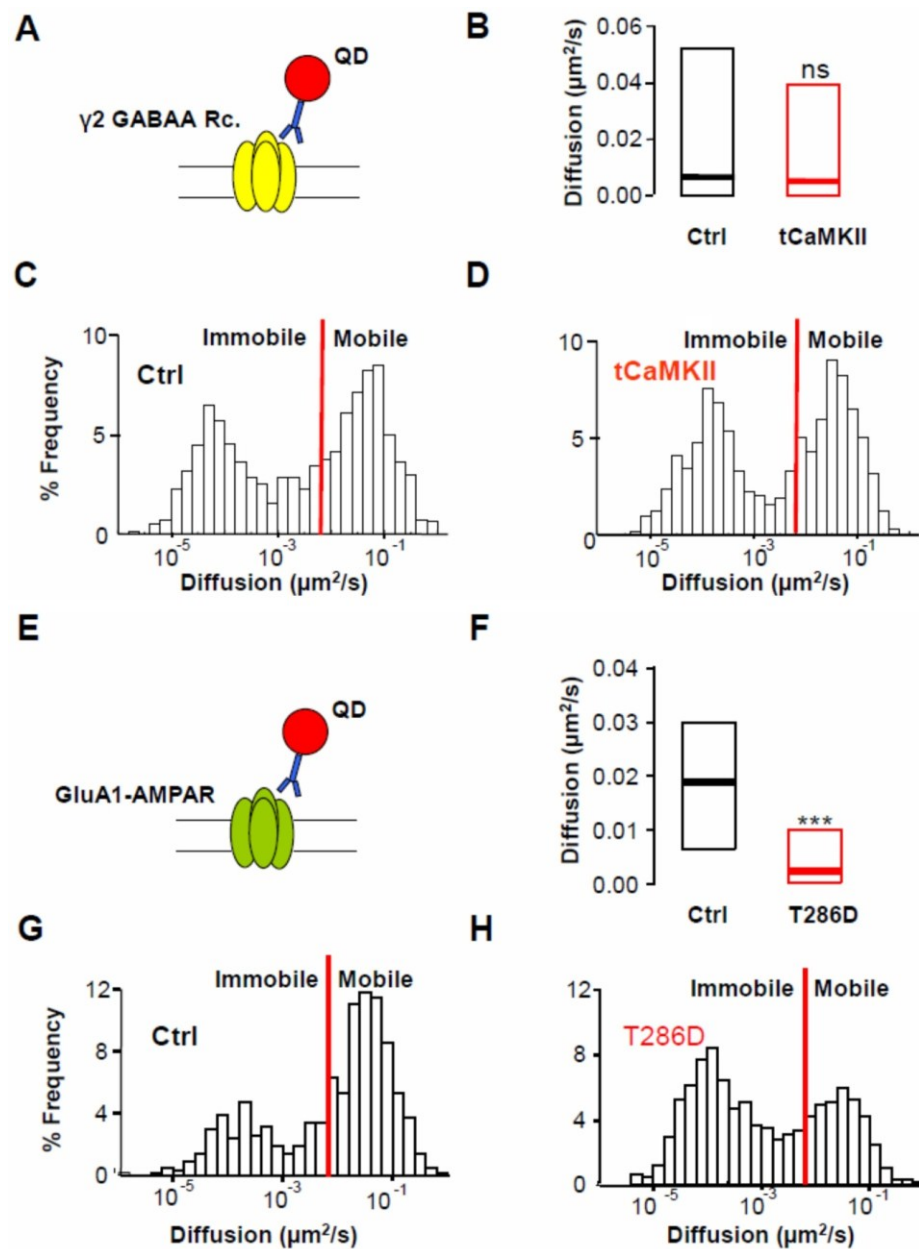


Figure 3.16 (S6) : Over expression of constitutively active CaMKII immobilizes AMPARs but not GABA Rs  
**(A)** Diagram representing the labelling strategy of endogenous GABAA receptors tracked using QDs coupled to antibodies against the  $\gamma 2$  subunit. **(B)** Median diffusion ( $\pm 20\%$ -75% IQR) of GABAA receptors (Ctrl n=198 QDs, tCaMKII n=126 QDs Mann-Whitney test, p=0.413). **(C-D)** Frequency distributions of the diffusion coefficients calculated from the trajectories of GABAA receptors in control (C) or tCaMKII-transfected neurons (D). Note that they are distributed in two populations: one with  $1 \times 10^{-2} < \text{Dinst.coeff.} < 5 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$  that corresponds to mobile receptors and one with  $\text{Dinst.coeff.} < 1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$  that corresponds to slowly moving and immobile receptors (immobile fraction). Note that tCaMKII overexpression does not significantly affect the distribution of the mobile and immobile populations of

GABAA receptors. **(E)** Diagram representing the labelling strategy of endogenous AMPARs tracked using QDs coupled to antibodies against the GluA1 subunit. **(F)** Median diffusion ( $\pm 20\%$ -75% IQR) of QD-GluA1 receptors at synaptic sites. Note that active  $\alpha$ CaMKII::GFP T286D over expression significantly decreased the diffusion of QDGluA1 as compared to control neurons (control n=82 QDs;  $\alpha$ CaMKII::GFP T286D n=78 QDs; Mann-Whitney test  $p < 0.0001$ ). **(G-H)** Frequency distributions of the diffusion coefficients calculated from the trajectories of GluA1-coupled QDs in control and  $\alpha$ CaMKII::GFP T286D transfected neurons. GluA1-QDs diffusion is distributed in two populations: One with  $1 \times 10^{-2} < \text{Dinst.coeff.} < 5 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$  that corresponds to mobile receptors and one with  $\text{Dinst.coeff.} < 1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$  that corresponds to slowly moving and immobile receptors (immobile fraction). Note that  $\alpha$ CaMKII::GFP T286D overexpression shifted the population toward the immobile fraction.

### 3.8.3 Supplemental Experimental Procedures

#### Primary neuronal cultures, transfection and drug treatments

Cultures of Sprague-Dawley rat hippocampal neurons, prepared by two different protocols, were used in this study: i) hippocampal cells from E18 rats were plated at a density of 75 cells/mm<sup>2</sup> on poly-lysine coated glass coverslips and maintained essentially as described (Bats et al., 2007); ii) hippocampal cells from P0 rats were plated at a density of 75 cells/mm<sup>2</sup> on poly-lysine coated aclar coverslips and maintained essentially as described in Hudmon et al, 2005. Except for shRNA experiments, neurons (10-12 DIV) were transfected using Effectene as described (Bats et al., 2007) or Lipofectamine 2000 as described (Hudmon et al, 2005) and imaged within 16-48 hours after transfection. For shRNA experiments, neurons were transfected at 8 DIV and kept for 4 days before live imaging or fixation for immunocytochemistry. For the measurements of  $\alpha$ CaMKII::GFP post-synaptic translocation, neurons were pre-incubated with the NMDAR blocker AP-5 (50  $\mu\text{M}$ ) after transfection to prevent spontaneous translocation of the kinase (Bayer et al., 2006). The CN21 (YGRKKRRQRRRKRPPKLGQIGRSKRVIEDDR) and scramble (YGRKKRRQRRRVKEPRIDGKPVRLRGQKSDRI) peptides were synthesized with a TAT sequence by 21<sup>st</sup> Century Biochemicals. KN92 and KN93 were purchased from Calbiochem. shRNA against  $\alpha$ CaMKII was kindly provided by S. Lee (Okamoto K, Narayanan R, Lee SH, Murata K, Hayashi Y., PNAS 2007) with the following target sequence: 5'-CCACTACCTTATCTTCGAT-3'. For rescue experiments, we made the

following silent mutations on the  $\alpha$ CaMKII::GFP plasmid: 5'-TCATTATCTCATATTTGAC-3'. Control shRNA was directed against luciferase.

### **Antibodies**

We used the polyclonal antibodies against the N-terminal epitope of the GluA1-subunit (Mammen et al., 1997a; Richmond et al., 1996) and Shank-2 (Boeckers et al., 1999). Commercial monoclonal antibodies were used against GluA2 (Chemicon MAB387), GFP (Invitrogen), HA epitope (3F10, Roche),  $\alpha$ CaMKII (Cb $\alpha$ 2 Zymed),  $\beta$ CaMKII (Cb $\beta$ 1 Zymed) and PSD95 (K28/43 NeuroMab).

### **AMPA receptor labelling and synaptic live staining**

Quantum dots (QDs) 655 Goat F(ab')<sub>2</sub> anti-Rabbit IgG Conjugate (H+L) highly crossadsorbed were bought from Invitrogen Corporation. GluA1, GluA1-HA, and GluA1::SEP were immunolabelled by using QDs pre-coated with the anti-GluA1, anti-HA or anti-GFP antibodies, respectively. QDs (0.1  $\mu$ M) were incubated with 1  $\mu$ g AB in 10  $\mu$ l PBS for 30 min. Unspecific binding was blocked by adding casein to the pre-coated QDs 15 min before use. Neurons were incubated 10 min at 37°C in culture medium with precoated QDs (final dilution 0.1 nM). This incubation was followed by 4 washing steps, 30 s each. All incubations and washes were performed in conditioned MEM medium without phenol red and with addition of HEPES buffer (10 mM). GluA2 labeling was performed in two steps; first GluA2 antibody (1/200) was incubated for 10 min on the neurons. After three washing steps, QD655 (0.1-0.5 nM) preblocked with casein were incubated on cells for 2min. Synapses were labelled using i) 50-100 nM Mitotracker Green FM or Mitotracker deep Red (Invitrogen) (2 min incubation); ii) transfection with Homer1C::GFP or Homer1C::DsRed. All incubations and washes were performed in high Mg<sup>2+</sup>-containing extracellular solution at 37°C.

### **Single molecule optical microscopy**

Cells were imaged at 35-37°C in an open perfusion (0.2-0.5 ml/min) chamber (Warner Instruments) mounted onto an inverted microscope equipped with a 60x objective (NA = 1.35) or 100x objective (NA = 1.3). QDs, Homer1C::DsRed and

$\alpha$ CaMKII::GFP signals were detected by using a mercury lamp (For QDs: excitation filter 560RDF55 or 460BP40 and emission filters 655 WB20 or 655WB40). Fluorescent images from QDs were obtained with an integration time of 50 ms with up to 1200 consecutive frames. Signals were recorded with a back-illuminated thinned CCD97 camera (Photometrics Cascade 512B, Roper Scientific). QD-labelled GluAs were imaged on randomly selected dendritic regions over up to 30 min total experimental time. An acquisition of the synaptic labelling before and after QD recording as well as QDs fixed on the cover slip allowed us to compensate mechanical drifts of the stage, which would have lead to a false interpretation of receptor location.

### **Receptor tracking and analysis**

The tracking of single QDs was performed with homemade software based on Matlab (Mathworks Inc., Natick, USA). Single QDs were identified by their blinking fluorescent emission and their diffraction limited signals. Owing to the random blinking events of the QDs, the trajectory of a QD tagged receptor could not be tracked continuously. Subtrajectories of the same receptor were reconnected when the positions before and after the dark period were compatible with borders set for maximal position changes between consecutive frames and blinking rates. The values were determined empirically: 2-3 pixels (0.32-0.48  $\mu\text{m}$ ) for maximal position change between two frames and maximal dark periods of 25 frames (1.25s). MSD curves were calculated for reconnected trajectories of at least 75 frames. The QDs were considered synaptic if colocalized with Mitotracker puncta or Homer dendritic clusters for at least five frames. Diffusion coefficients were calculated by a linear fit of the first 4-8 points of the mean square displacement (MSD) plots versus time depending on the length of the trajectory within a certain compartment. The resolution limit for diffusion was 0.0075  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  as determined by Groc (Groc et al., 2004). Despite a higher precision of QD tracked trajectories, we used this value to compare diffusion values and immobile fractions with previous data obtained by using single molecule tracking (Groc et al., 2004; Tardin et al., 2003). The resolution precision was  $\sim 40$  nm.

## Statistics

Statistical values are given as mean  $\pm$  SEM or medians  $\pm$  25% / 75% interval, if not stated otherwise. Statistical significances were performed by using GraphPad Prism software or Matlab Statistical Toolbox. Non-Gaussian distributed data sets were tested by Mann-Whitney t-test or Wilcoxon test for paired observations. Indications of significance correspond to pvalues  $< 0.05$  (\*),  $p < 0.005$  (\*\*) and  $p < 0.0005$  (\*\*\*)).

## Electrophysiology

The extracellular recording solution contained in mM concentration: 145 NaCl, 2.5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES and 10 D-Glucose, pH 7.4. In order to block GABA-A-receptors, 50  $\mu$ M Picrotoxin was added to solution. The bath temperature was kept at 33-35°C. Patch clamp microelectrodes (4-6 M $\Omega$  resistance) were pulled from borosilicate capillaries on a P- 97 model puller (Sutter Instruments Inc. (<http://www.sutter.com>)). Recordings in voltage and current clamp mode were performed with an EPC 10 double patch-clamp amplifier (HEKA Elektronik GmbH, Lambrecht, Germany). Data were sampled at 20 kHz and low-pass filtered at 2.9 kHz, using PatchPaster v 2.0 software (HEKA Elektronik GmbH). Data analysis was performed with Matlab (The MathWorks Inc., <http://www.mathworks.com>). Whole-cell patch-clamps were obtained on pairs of cells located within the same microscope field (~20-40  $\mu$ m apart). To test for monosynaptic transmission, one cell was stimulated in current clamp mode, by injecting a 1 ms current pulse, while the other was recorded in voltage clamp mode (-70mV holding potential). Neuron pairs for which the latency between the peak of the presynaptic action potential and the peak of the evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) was smaller than 4 ms were retained as monosynaptically coupled (Medina et al., 1999). The pairs were rejected when either the presynaptic neuron resting membrane potential exceeded -55 mV, or when the series resistance in both cells was above 30 M $\Omega$ .

## Extracellular field stimulation

Restricted fields of neurons (1-1.5 mm between electrodes) were stimulated at 50 Hz. We used thin platinum wires isolated down to the tip and held within a theta-glass electrode. In total we applied 900 stimuli for each frequency in a regular pattern (1 s

stimulus followed by 1 s pause). The length of a single stimulus was 1 ms and the stimulus current was varied between 2-5 mA. The stimulation electrode was connected to an isolation unit triggered by the patch amplifier.

### 3.8.4 Supplemental references

Boeckers, T. M., C. Winter, et al. (1999). "Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family." *Biochem Biophys Res Commun* 264(1): 247-52.

Groc, L., M. Heine, et al. (2004). "Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors." *Nat Neurosci* 7(7): 695-6.

Medina, I., X. Leinekugel, et al. (1999). "Calcium-dependent inactivation of the monosynaptic NMDA EPSCs in rat hippocampal neurons in culture." *Eur J Neurosci* 11(7): 2422-30.

Okamoto, K., R. Narayanan, et al. (2007). "The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(15): 6418-23.

## **4 Le rôle différentiel de la $\alpha$ CaMKII et de la $\beta$ CaMKII dans l'adressage des récepteurs AMPA aux synapses durant la plasticité synaptique**

### **4.1 Introduction**

Les synapses chimiques excitatrices sont des structures hautement organisées et dynamiques dont la force peut être modulée en fonction de l'activité synaptique. La force des synapses est directement reliée au nombre de rAMPA dans la zone active (Heine, Groc et al. 2008). Paradoxalement, la majorité des rAMPA diffusent dans la membrane synaptique et l'ancrage de ces récepteurs aux synapses est dépendant de l'activité (Ehlers, Heine et al. 2007). En effet, lors d'une forte activité synaptique, le calcium qui entre par le rNMDA active la CaMKII, ce qui permet la liaison entre ces deux protéines (Bayer, De Koninck et al. 2001). Cette liaison place la CaMKII à proximité de la partie c-terminale des rAMPA, facilitant la phosphorylation du canal et la phosphorylation de la protéine associée aux rAMPA, la stargazine (Mammen, Kameyama et al. 1997; Tomita, Stein et al. 2005). Ces deux phosphorylations permettent respectivement d'augmenter la conductance du canal et l'ancrage des rAMPA aux synapses (Derkach, Barria et al. 1999; Tomita, Stein et al. 2005; Opazo, Labrecque et al. 2010). Bien que les fonctions de l' $\alpha$ CaMKII aient largement été étudiées dans le recrutement des récepteurs aux synapses, le rôle de l'isoforme  $\beta$ CaMKII n'a été que très peu examiné dans la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire. Dans cette étude, je vais tenter de discriminer le rôle des isoformes  $\alpha$ CaMKII et  $\beta$ CaMKII sur la diffusion synaptique des rAMPA.

Dans l'hippocampe, l' $\alpha$ CaMKII et la  $\beta$ CaMKII forment une holoenzyme composée de ~12 sous-unités dans un rapport moyen de 2:1 (Brocke, Chiang et al. 1999). L' $\alpha$ CaMKII et la  $\beta$ CaMKII sont très homologues, mais sont encodées par deux gènes distincts, *Camk2a* et *Camk2b* respectivement (Hudmon and Schulman 2002). La différence la plus notable entre ces isoformes est que la  $\beta$ CaMKII est capable de se lier à la F-actine de manière contrôlée par l'activité, liaison possible par son domaine supplémentaire dans la région variable (Shen, Teruel et al. 1998; Shen and Meyer 1999). Principalement en raison de



leurs différentes propriétés de regroupement de l'actine, l' $\alpha$ CaMKII et la  $\beta$ CaMKII ont des effets opposés sur la force synaptique dans les neurones en culture (Thiagarajan, Piedras-Renteria et al. 2002). Fait intéressant, non seulement la  $\beta$ CaMKII lie à l'actine, mais est également capable de regrouper l'actine de façon indépendante de son activité (O'Leary, Lasda et al. 2006; Okamoto, Narayanan et al. 2007; Sanabria, Swulius et al. 2009).

Les études sur le rôle de la  $\beta$ CaMKII dans la plasticité synaptique et l'apprentissage n'ont que récemment été lancées. La surexpression inductible de la  $\beta$ CaMKII dans le gyrus denté n'a pas d'incidence sur l'acquisition de l'apprentissage de l'hippocampe, et ne touche pas la consolidation à long terme des souvenirs (Cho, Cao et al. 2007). De plus, il a été démontré que l'absence de la  $\beta$ CaMKII inverse la polarité de la plasticité des synapses du cervelet sur les synapses des fibres parallèles avec les cellules de Purkinje et provoque d'importants déficits d'apprentissage cérébelleux (van Woerden, Hoebeek et al. 2009).

Dans les souris knock-out, il a été constaté que l'absence de la  $\beta$ CaMKII cause une mauvaise localisation de l' $\alpha$ CaMKII aux synapses, qu'elle induit une altération de la plasticité synaptique de l'hippocampe et qu'elle cause une altération de l'apprentissage dépendant de l'hippocampe (Borgesius, van Woerden et al. 2011). En revanche, ces phénotypes n'étaient pas présents dans les mutants Camk2bA303R qui perdent leurs activités enzymatiques, mais conservent la liaison avec l'actine. Ceci appuie l'hypothèse que la  $\beta$ CaMKII régit un aspect majeur dans la fonction synaptique en regroupant et en contraignant l'actine aux synapses. Ces résultats suggèrent fortement un rôle essentiel mais non enzymatique de la  $\beta$ CaMKII dans la plasticité de l'hippocampe.

Dans cette étude, j'ai étudié l'impact de l' $\alpha$ CaMKII et de la  $\beta$ CaMKII sur la diffusion membranaire des rAMPA et leur implication sur l'immobilisation des récepteurs aux synapses dans la plasticité. De par sa fonction kinase, l' $\alpha$ CaMKII joue un rôle important dans la régulation des récepteurs à la membrane (Opazo, Labrecque et al. 2011); cependant, la  $\beta$ CaMKII régule l'actine (Okamoto, Narayanan et al. 2007; Borgesius, van Woerden et al. 2011), qui agit comme une barrière de diffusion dans les synapses pour les protéines membranaires (Rust, Gurniak et al. 2010). La CaMKII pourrait ainsi posséder deux rôles importants dans la régulation des récepteurs synaptiques, soit un de kinase et un

de régulateur de filaments d'actine. Cependant, ces rôles distincts n'ont pour le moment jamais été dissociés.

Mes expériences vont aborder, de façon préliminaire, ces rôles respectifs des isoformes  $\alpha/\beta$ CaMKII dans la plasticité synaptique des rAMPA dans les neurones de cultures d'hippocampe. En utilisant le suivi de molécules uniques et des méthodes de remplacement de gènes par combinaison de shRNA et de sur-expression de sous-unités CaMKII, je montre que la diminution de l' $\alpha$ CaMKII ou de la  $\beta$ CaMKII augmente la diffusion des rAMPA aux synapses. Je montre que la surexpression de la  $\beta$ CaMKII n'est pas suffisante pour immobiliser les récepteurs GluA1 aux synapses, mais la surexpression de l' $\alpha$ CaMKII est en mesure de compenser la diminution de la  $\beta$ CaMKII,

Inversement, lors des protocoles de cLTP, la présence de la  $\beta$ CaMKII s'avère importante, car en absence de la  $\beta$ CaMKII, les rAMPA diffusent davantage suite à la stimulation cLTP, processus que l' $\alpha$ CaMKII ne peut empêcher. Enfin, la  $\beta$ CaMKII est en mesure de promouvoir l'immobilisation des rAMPA en l'absence d' $\alpha$ CaMKII suite à cette stimulation. Ces travaux démontrent des rôles spécifiques pour chaque isoforme de la CaMKII dans des conditions de niveaux d'activité synaptique différents.

## **4.2 Matériel et méthodes**

### **4.2.1 Cultures neuronales**

Les cultures de neurones de rat Sprague-Dawley hippocampe ont été préparées en utilisant le protocole suivant : des cellules hippocampiques de rats P0 ont été étalées à une densité de 75 cellules/mm<sup>2</sup> sur des lamelles de verre enduites de poly-D-lysine et maintenues essentiellement comme décrit dans Hudmon et al. (2005). Pour les expériences de shRNA, les neurones ont été transfectées à 8 DIV avec de la Lipofectamine 2000 tel que décrit dans Hudmon (Hudmon, Lebel et al. 2005) et conservées pendant 4 jours avant l'imagerie en direct ou la fixation pour l'immunocytochimie.

#### 4.2.2 Anticorps

Nous avons utilisé l'anticorps monoclonal contre GluA2 (Chemicon MAB387), l'épitope HA (3F10, Roche), la GFP (A-11120, Invitrogen), l' $\alpha$ CaMKII (Cb $\alpha$ 2 Zymed) et la  $\beta$ CaMKII (Cb $\beta$ 1 Zymed).

#### 4.2.3 Marquage de récepteurs et de synapses

Les quantum dots (QD) 655 F(ab')<sup>2</sup> anti-IgG de lapin conjugué (H + L) purifiés ont été achetés chez Invitrogen Corporation. Les récepteurs GluA1-SEP ont été immunomarqués en utilisant des QD pré-revêtus d'anticorps anti-GFP. Les QD (0.1  $\mu$ M) ont été incubés avec 1  $\mu$ g d'anticorps dans 10  $\mu$ l de PBS pendant 30 min. Les liaisons non spécifiques ont été bloquées par addition de caséine aux QD conjugués 15 min avant l'utilisation. Les neurones transfectés GluA1-SEP ont été marqués à l'aide de l'application de cette solution concentrée de QD à partir d'une pipette de type patch-clamp approchée à 50  $\mu$ m de la dendrite à marquer. Les QD-GFP ont été relâchés dans le milieu extracellulaire par pression d'air. Les QD n'ayant pas lié de récepteurs à la surface ont été lavés par perfusion. L'étiquetage de GluA2 a été réalisé en deux étapes, d'abord l'anti-GluA2 (1/200) a été incubé pendant 10 min sur les neurones. Après trois étapes de lavage, les QD655 (0.1-0.5 nM), pré-blockés avec de la caséine, ont été incubés sur les cellules pendant 2 min. Les synapses ont été marquées (1) en utilisant 50-100 nM de Mitotracker Vert FM ou Mitotracker Deep Red (Invitrogen) (2 minutes d'incubation), (2) en transfection avec Homer1C-GFP ou Homer1C-DsRed. Toutes les incubations et tous les lavages ont été effectués à l'aide d'une solution extracellulaire contenant 5 mM Mg<sup>2+</sup> (pour réduire l'activité NMDA) à 37 °C.

#### 4.2.4 Imagerie en molécules uniques des récepteurs AMPA

Les cellules ont été imagées à 35°C-37°C avec une perfusion dans une chambre ouverte (0,2-0,5 ml/min) (Warner Instruments) montée sur un microscope inversé et équipé d'un objectif de 63X (NA = 1.4). Les signaux de QD, d'Homer1C-DsRed et de CaMKII-GFP ont été détectés en utilisant une lampe au xénon (pour QD: filtre d'excitation ou de 460BP40 et des filtres d'émission ou de 655PB40). Les images fluorescentes de QD ont été obtenues avec un temps d'intégration de 50 ms avec un maximum de 400 images

consécutives. Les signaux ont été enregistrés avec un CCD rétro-éclairé et aminci (Photometrics Cascade 512B, Roper Scientific). Les GluA étiquetés avec les QD ont été imagés sur les régions dendritiques choisies au hasard au cours des 30 min de temps d'expérimentation. Une acquisition des marqueurs synaptiques avant et après l'enregistrement nous a permis de compenser les dérives mécaniques, ce qui aurait conduit à une fausse interprétation de la localisation des récepteurs.

#### **4.3.5 Analyse de trajectoires de molécules uniques**

Le suivi des QD uniques a été réalisé avec le logiciel maison basé sur Matlab (Mathworks Inc, Natick, États-Unis). Les QD uniques ont été identifiés par leur émission de fluorescence de clignotement et leurs signaux limités par la diffraction. Les trajectoires du même récepteur ont été reconnectées lorsque les positions avant et après la période sombre étaient compatibles avec les frontières fixées pour les changements de position maximale entre les images consécutives et les taux de clignotement. Les valeurs ont été déterminées à l'aide de données expérimentales : 2-3 pixels (0.32 à 0.48  $\mu\text{m}$ ) pour les déplacements maximaux entre deux images et des périodes sombres maximales de 10 images (0.5 s). Les courbes de MSD ont été calculées pour des trajectoires d'au moins 100 images. Les points quantiques sont considérés synaptiques s'ils sont colocalisés avec le marqueur synaptique pendant au moins cinq images. Les coefficients de diffusion ont été calculés par une régression linéaire des quatre premiers points du déplacement carré moyen (MSD). La limite de résolution pour la diffusion a été de 0,00001  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  tel que déterminé par imagerie de points quantiques fixés sur du verre. Les points quantiques uniques ayant une précision sur la localisation plus grande que 75 nm n'ont pas été considérés dans l'analyse.

#### **4.3.6 Fixation et immunocytochimie**

Les neurones ont été fixés dans une solution de 4 % de paraformaldéhyde (0.1 M PB, pH 7.4, 4% sucrose) pendant 10 min, lavés deux fois avec du PBS et incubés pendant 30 min dans une solution de blocage contenant 2% de NGS et 0.05% de Triton X-100. Les cellules ont été incubées pendant deux heures avec les anticorps  $\alpha\text{CaMKII}$  (Cb $\alpha$ 2 Zymed) ou  $\beta\text{CaMKII}$  (Cb $\beta$ 1 Zymed). Après deux lavages avec la solution de blocage, les

anticorps secondaires ont été incubés à 1/500 à 1/100 pendant 45 min et lavés trois fois avec du PBS avant le montage sur lame. Les lamelles ont été montées sur une lame de microscope avec du Prolong Gold AntiFade (Molecular Probes) et imagées 12-24 heures après le montage.

#### **4.3.7 Imagerie confocale**

Les images ont été prises sur un microscope confocal Zeiss (Thornwood, NY) LSM510 META-Axioskop FS2 Plus en utilisant un objectif à l'huile de 63X, d'ouverture numérique de 1.4. Les tranches optiques de 0.5  $\mu$ m ont été prises afin d'imager toute l'arborisation du neurone transfecté. La GFP a été excitée avec la ligne 488 nm du laser argon et détectée avec un filtre passe-bande de 505-550 nm. Les DsRed/alexa546 ont été excitées avec un laser He-Ne à 546 nm et détecté avec un filtre passe-bande de 565-615 nm. L'Alexa633 quant à lui a été excité avec un laser He-Ne à 633 nm détecté avec un filtre passe bande de 650-710 nm.

#### **4.3.8 Statistiques**

Les valeurs statistiques sont données en moyenne  $\pm$  SEM ou médianes  $\pm$  25% / 75% d'intervalle. Les significations statistiques ont été réalisées en utilisant le *Matlab Statistic Toolbox*. Les distributions non normales ont été testées par le Mann-Whitney U test ou un test de Wilcoxon pour observations appariées. Les indications de signification correspondent à des valeurs  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.005$  (\*\*), et  $p < 0.0005$  (\*\*\*)

### **4.3 Résultats**

#### **4.3.1 La réduction du nombre d' $\alpha$ CaMKII et de $\beta$ CamkII augmente la diffusion membranaire des récepteurs AMPA aux synapses**

Afin d'examiner les rôles respectifs de l' $\alpha$ CaMKII et de la  $\beta$ CaMKII dans la diffusion synaptique des rAMPA, j'ai mis au point une stratégie de remplacement génétique pour chacune des sous-unités dans les neurones en culture. Pour réduire l'expression de l' $\alpha$ CaMKII ou de la  $\beta$ CaMKII, j'ai utilisé un shRNA spécifiquement ciblé contre l'une ou l'autre des sous-unités. Pour remplacer la sous-unité réprimée, j'ai co-transfecté un plasmide

codant pour l'autre sous-unité, alors qu'en condition contrôle, j'ai remis la même sous-unité via la co-transfection d'un plasmide de sauvetage résistant au shRNA (plasmide « *rescue* »). Afin de visualiser les synapses durant les mesures de déplacement des rAMPA, j'ai co-transfecté la protéine synaptique Homer-DsRed. Enfin, j'ai aussi transfecté la sous-unité du rAMPA la GluA1-SEP, que j'ai suivie via la liaison de QD-antiGFP.

Quatre jours après la transfection, j'ai procédé au suivi de QD couplés à GluA1-SEP à l'intérieur des zones synaptiques (positive pour Homer-DsRed). Après chaque expérience, j'ai fixé les neurones imagés, afin de vérifier l'efficacité de la stratégie de remplacement génétique (baisse d'expression par le shRNA et expression du plasmide de secours). La figure 4.1 montre l'efficacité de la stratégie pour chaque condition qui a été testée et dont l'impact sur la diffusion des rAMPA est présenté par la suite. Cette figure démontre que la diminution de la forme endogène de l' $\alpha$ CaMKII est d'un facteur 5 alors que pour la  $\beta$ CaMKII, elle est d'un facteur 4. Dans chaque cas, le plasmide de sauvetage fut en mesure de remonter les niveaux de l'enzyme au niveau de base ou même plus.

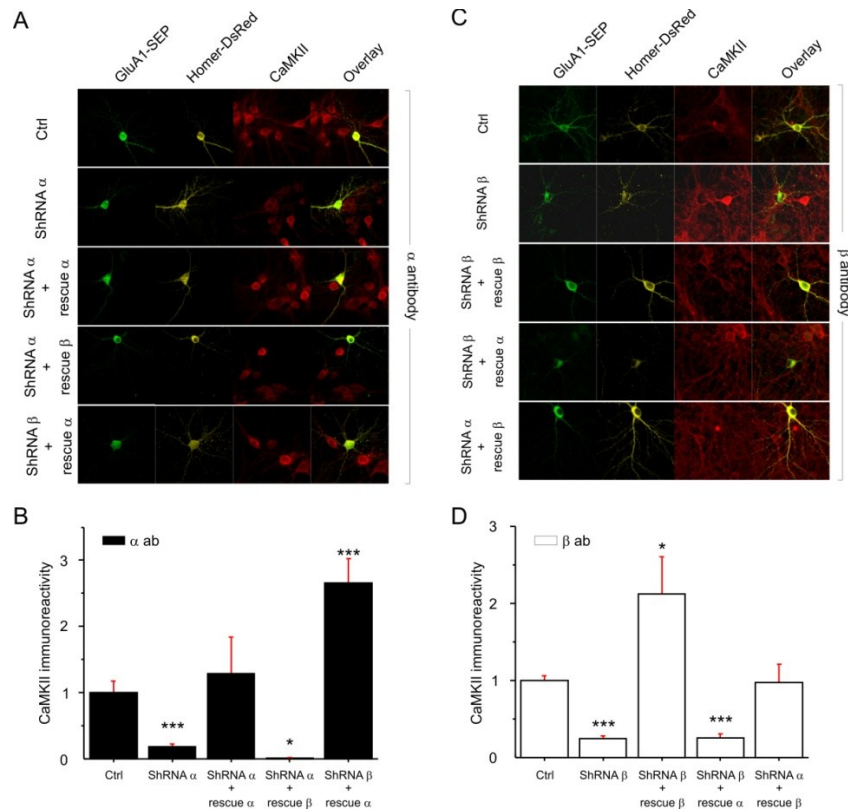


Figure 4. 1: Efficacité des shRNA et des rescues. **(A)** Exemple de neurones transfectés par GluA1-SEP, Homer-DsRed, shRNA et immunomarqués pour l'αCaMKII. **(B)** Valeurs des ratios pour l'αCaMKII :  $R_{Ctrl}=1.0$   $n=9$ ;  $R_{\alpha}=0.18$   $n=11$   $p<0.001$ .  $R_{shRNA\alpha\ rescue\alpha}=1.29$   $n=10$ .  $R_{shRNA\alpha\ rescue\beta}=0.01$   $n=3$   $p<0.01$ .  $R_{shRNA\beta\ rescue\alpha}=2.65$   $n=7$   $p<0.001$ . **(C)** Exemple de neurones transfectés par GluA1-SEP, Homer-DsRed, shRNA et immunomarqués pour la βCaMKII. **(D)** Valeurs des ratios pour la βCaMKII :  $R_{Ctrl}=1.0$   $n=12$ ;  $R_{shRNA\beta}=0.24$   $n=12$   $p<0.001$ ;  $R_{shRNA\beta\ rescue\beta}=2.13$   $n=13$   $p<0.05$ ;  $R_{shRNA\beta\ rescue\alpha}=0.26$   $n=13$   $p<0.001$ ;  $R_{shRNA\alpha\ rescue\beta}=0.97$   $n=6$ .

En suivant les QD-GluA1-SEP, j'ai tout d'abord observé que la diminution des niveaux d'αCaMKII ou de βCaMKII dans les neurones augmente  $\sim 1.5$  fois la valeur médiane des coefficients de diffusions membranaires des récepteurs GluA1-SEP dans les compartiments synaptiques (figure 4.2). La co-expression du rescue de l'αCaMKII ou de la βCaMKII dans les conditions de shRNA αCaMKII ou shRNA βCaMKII, respectivement, a permis le retour aux valeurs de diffusion contrôle de SEP-GluA1, validant ainsi la spécificité de l'effet des shRNA.

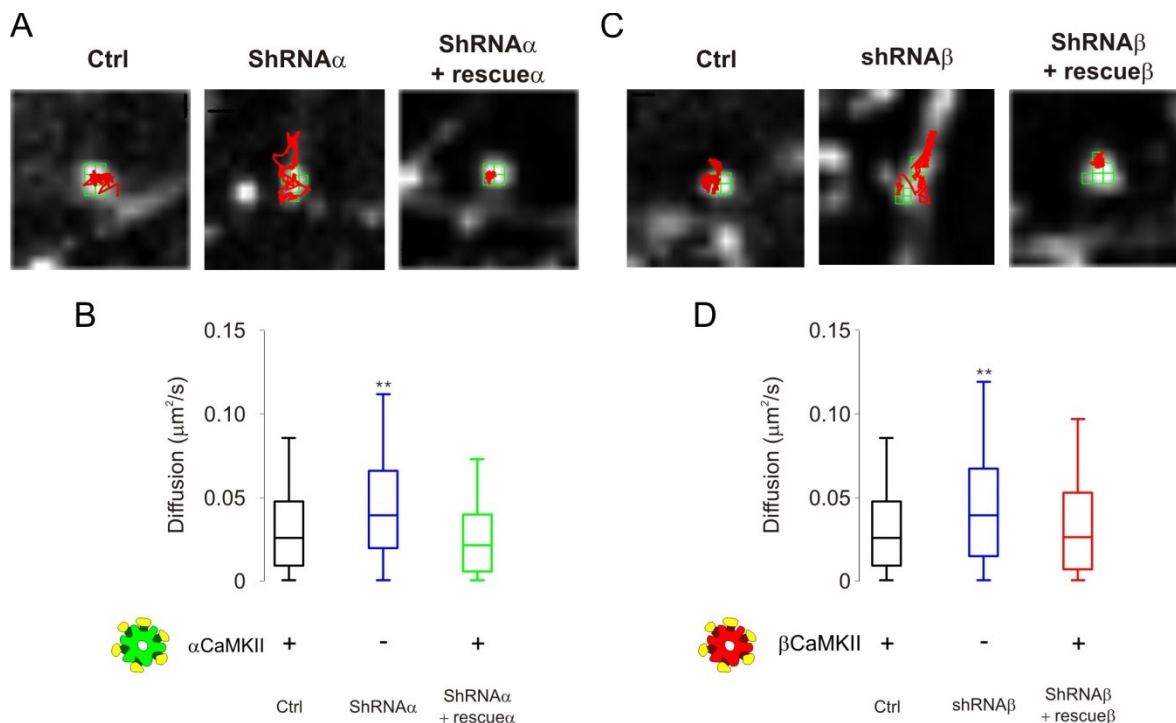


Figure 4.2: Différents effets des isoformes  $\alpha/\beta$  sur la diffusion synaptique des rAMPA. (A) Exemples de diffusion synaptique en condition contrôlée, en diminuant la quantité d' $\alpha$ CaMKII et en la secourant (rescue). (B) Valeur des coefficients de diffusion montrés en IQR (25%-75%). Notez l'augmentation significative de la diffusion synaptique de GluA1-SEP lors de la diminution de la quantité d' $\alpha$ CaMKII.  $D_{Ctrl} = 0.0258$ ,  $n=331$ ;  $D_{shRNA\alpha} = 0.0394$ ,  $n=209$ ,  $p<0.001$ ;  $D_{shRNA\alpha\_ra} = 0.0214$ ,  $n=138$ . (C) Exemples de diffusion synaptique en condition contrôlée, en diminuant la quantité de  $\beta$ CaMKII et en secourant la  $\beta$ CaMKII. (D) Valeurs des coefficients de diffusion montrés en IQR (25%-75%). Notez l'augmentation significative de la diffusion synaptique de GluA1-SEP lors de la diminution de la quantité de  $\beta$ CaMKII.  $D_{shRNA\beta} = 0.0391$ ,  $n=243$ ,  $P<0.001$ ;  $D_{shRNA\beta\_r\beta} = 0.0259$ ,  $n=238$ .

#### 4.3.2 La $\beta$ CaMKII n'est pas suffisante pour immobiliser les récepteurs aux synapses

La figure 4.2 montre que la diminution du nombre d' $\alpha$ CaMKII ou de  $\beta$ CaMKII provoque une augmentation du coefficient de diffusion des rAMPA aux synapses. Cet effet peut indiquer que, malgré leurs différences, les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  ont des effets semblables dans la régulation de la mobilité des rAMPA. Ainsi, la baisse de l'une ou l'autre par shRNA, abaissant la quantité totale de CaMKII dans le neurone, aurait le même impact. Alternativement, les deux sous-unités pourraient réguler la mobilité des rAMPA via des



mécanismes différents. Pour examiner cette seconde possibilité, j'ai remplacé une sous-unité par l'autre en combinant les shRNA et la sur-expression de l'autre sous-unité.

Lorsque j'ai réduit la  $\beta$ CaMKII et remplacé par l' $\alpha$ CaMKII dans les neurones, les récepteurs GluA1-SEP synaptiques ont montré une diffusion synaptique réduite à 0.7 fois des valeurs contrôles (figure 4.2). A l'inverse, lorsque j'ai réduit l' $\alpha$ CaMKII et remplacé par la  $\beta$ CaMKII, la diffusion synaptique des récepteurs fut 1.4 fois plus élevée que les valeurs contrôles (figure 4.2). Ces résultats suggèrent que l' $\alpha$ CaMKII favorise davantage l'immobilisation des récepteurs à l'intérieur des synapses comparé à la  $\beta$ . Ainsi, cette dernière n'est pas en mesure de remplacer l' $\alpha$ CaMKII pour réduire la mobilité des récepteurs dans la synapse.

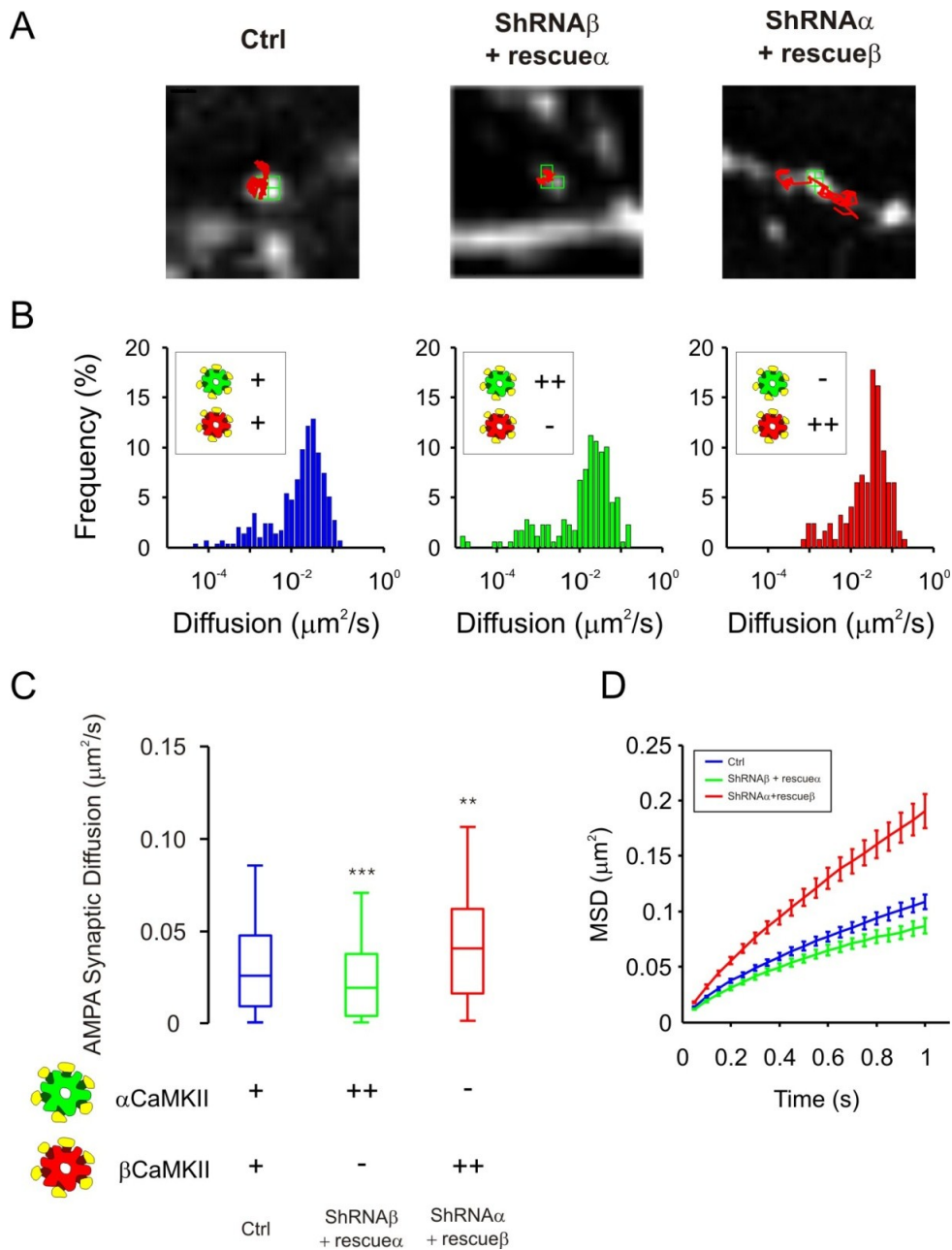


Figure 4.3: Effets différentiels d' $\alpha$ CaMKII et  $\beta$ CaMKII sur la diffusion synaptique des rAMPA. **(A)** Exemples de diffusion synaptique. **(B)** Histogramme des coefficients de diffusion des GluA1-SEP synaptiques. Notez la perte de récepteurs immobiles aux synapses lorsque la CaMKII est composée majoritairement de l'isoforme  $\beta$  (histogramme rouge). **(C)** Valeur de diffusion médiane  $\pm$ IQR. Les coefficients de diffusion synaptique des GluA1-SEP sont plus faibles en présence d' $\alpha$ CaMKII; inversement, ils sont plus élevés en présence de la  $\beta$ CaMKII.  $D_{\text{Ctrl}} = 0.0311$ ,  $n=307$ ;  $D_{\text{ShRNA}\beta + \text{rescue}\alpha} = 0.0217$ ,  $n=161$ ,  $p < 0.0001$ ;  $D_{\text{ShRNA}\alpha + \text{rescue}\beta} = 0.0444$ ,  $n=162$ ,  $p < 0.001$ . **(D)** Courbes de MSD pour les différentes CaMKII.

### 4.3.3 La $\beta$ CaMKII est requise pour l'immobilisation des récepteurs AMPA aux synapses suite à un protocole de plasticité de type cLTP

L'activation du rNMDA déclenche une translocation rapide de la CaMKII aux synapses (Shen and Meyer 1999; Otmakhov, Tao-Cheng et al. 2004; Hudmon, Lebel et al. 2005) menant à l'immobilisation des rAMPA aux synapses (Opazo, Labrecque et al. 2010). Nous avons déjà démontré que la diminution du nombre d' $\alpha$ CaMKII empêche l'immobilisation des rAMPA aux synapses suite à l'activation de rNMDA, mais le rôle de la  $\beta$ CaMKII dans ce contexte n'est pas connu.

Bien que les résultats ci-dessus suggèrent que la  $\beta$ CaMKII n'a pas la même capacité que l' $\alpha$ CaMKII à retenir les rAMPA aux synapses, il est connu que cette première régule les filaments d'actine en fonction de l'activité (Okamoto, Narayanan et al. 2007) et que l'actine joue un rôle dans la mobilité des rAMPA (Rust, Gurniak et al. 2010) et la plasticité synaptique (Honkura, Matsuzaki et al. 2008). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la  $\beta$ CaMKII doit détenir un rôle régulateur de la diffusion en stabilisant les filaments d'actine après l'induction de la cLTP. Pour évaluer cette proposition, j'ai appliqué un protocole de cLTP sur des cultures de neurones d'hippocampes exprimant GluA1-SEP, Homer-DsRed et le shRNA dirigé contre la  $\beta$ CaMKII. Tel que je l'ai montré auparavant (chapitre 3), les GluA1 s'immobilisent aux synapses durant la cLTP en condition contrôle. Or, lorsque la quantité de  $\beta$ CaMKII est diminuée par le shRNA, l'application du protocole de cLTP augmente significativement la diffusion synaptique des rAMPA (figure 4.3). Par contre, la co-transfection de la  $\beta$ CaMKII "rescue" annule l'effet du shRNA  $\beta$ CaMKII, permettant au protocole cLTP d'induire l'immobilisation des rAMPA. Ces résultats contrastent avec ceux recueillis auparavant en enlevant l' $\alpha$ CaMKII à l'aide du shRNA, qui empêchait alors l'immobilisation des rAMPA durant le cLTP (figure 3.5, chapitre 3), mais ne causait pas une augmentation de leur mobilité comme on le voit maintenant lors du retrait de la  $\beta$ CaMKII. Ceci soutient davantage l'hypothèse que la régulation de la mobilité synaptique des rAMPA par ces deux isoformes se produit par des mécanismes différents.

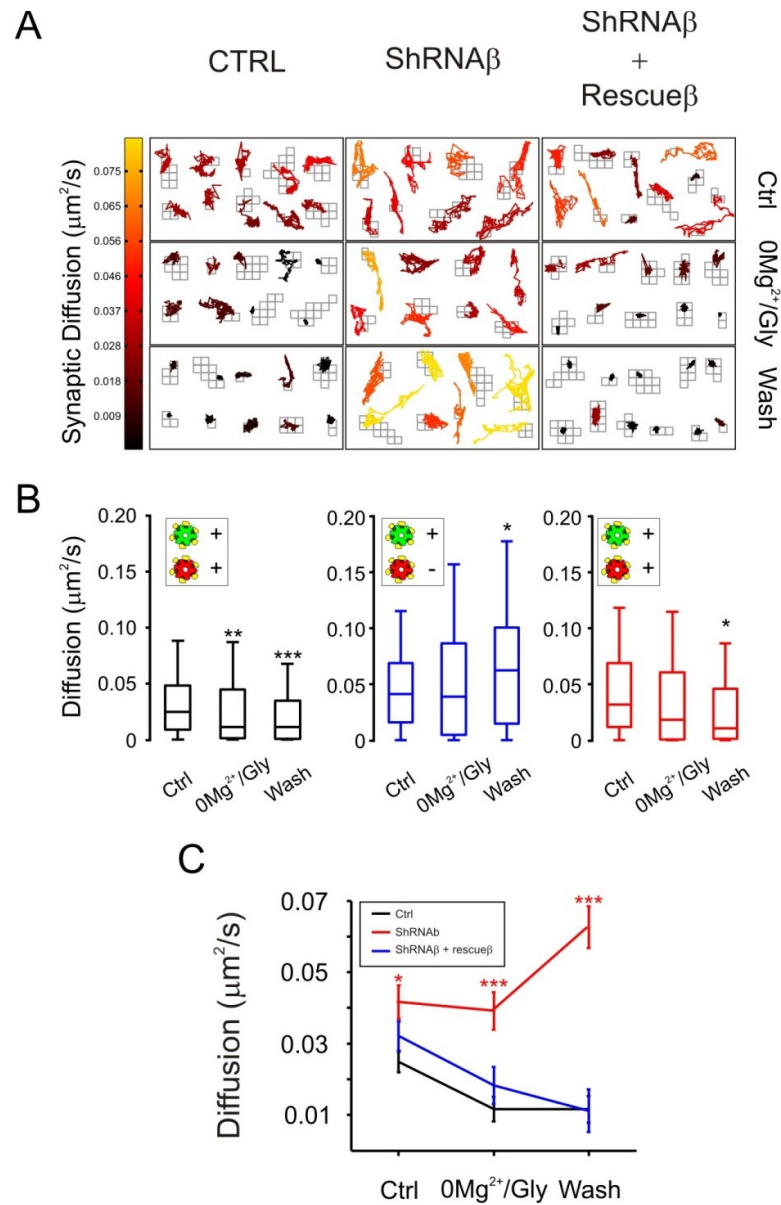


Figure 4.4: La  $\beta\text{CaMKII}$  est requise pour l'immobilisation des rAMPA aux synapses. **(A)** Exemples de diffusion des rAMPA aux synapses, avant, pendant et après l'application du protocole de cLTP. La valeur du coefficient de diffusion de chaque trace est représentée par un code de couleur. **(B)** Valeur médiane  $\pm$  IQR des coefficients de diffusion synaptique dans différentes conditions. Notez l'augmentation de la diffusion synaptique dans la condition sans  $\beta\text{CaMKII}$ . CTRL :  $D_{\text{Ctrl}}=0.0249$   $n=136$ ;  $D_{0\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}}=0.0117$   $n=118$ ,  $p<0.01$ ;  $D_{\text{Wash}}=0.0116$ ,  $n=100$ ,  $p<0.001$ ). ShRNA $\beta$  :  $D_{\text{Ctrl}}=0.0416$   $n=85$ ,  $D_{0\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}}=0.0391$   $n=107$ ,  $D_{\text{Wash}}=0.0626$   $n=117$ ,  $p<0.05$ . ShRNA $\beta$ \_rescue $\beta$  :  $D_{\text{Ctrl}}=0.0321$   $n=90$ ,  $D_{0\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}}=0.0183$   $n=96$ ,  $D_{\text{Wash}}=0.0112$   $n=117$ ,  $p<0.05$ . **(C)** Médiane  $\pm$  sem de la diffusion synaptique en ctrl (noir), sans  $\beta\text{CaMKII}$  (rouge) et en rescue  $\beta\text{CaMKII}$  (bleu). Notez l'augmentation de la diffusion synaptique après la cLTP sans  $\beta\text{CaMKII}$  (\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ ).

Afin de confirmer cette interprétation, j'ai ensuite rajouté de l' $\alpha$ CaMKII en présence de shRNA contre la  $\beta$ CaMKII et répété le protocole de cLTP sur ces neurones. Dans cette condition, le surplus d'  $\alpha$ CaMKII n'est pas en mesure d'immobiliser les rAMPA aux synapses suite à la stimulation (figure 4.4b-c, en vert). Ainsi, la  $\beta$ CaMKII régule la mobilité des rAMPA durant la cLTP par un mécanisme distinct de l' $\alpha$ CaMKII.

Si en l'absence de la  $\beta$ CaMKII, l' $\alpha$ CaMKII n'est pas en mesure de promouvoir l'immobilisation des rAMPA durant la cLTP, est-ce que la  $\beta$ CaMKII serait en mesure de le faire en l'absence d' $\alpha$ CaMKII? Pour répondre à cette question, j'ai utilisé la même stratégie inverse (shRNA contre  $\alpha$ CaMKII avec sur-expression de  $\beta$ CaMKII). Dans ces conditions, la diffusion des récepteurs aux synapses diminue significativement après l'application de la cLTP (figure 4.4b-c, en rouge). Ces résultats suggèrent que la  $\beta$ CaMKII joue un rôle essentiel pour l'immobilisation des rAMPA durant la cLTP et peut même remplacer celui de l' $\alpha$ CaMKII.

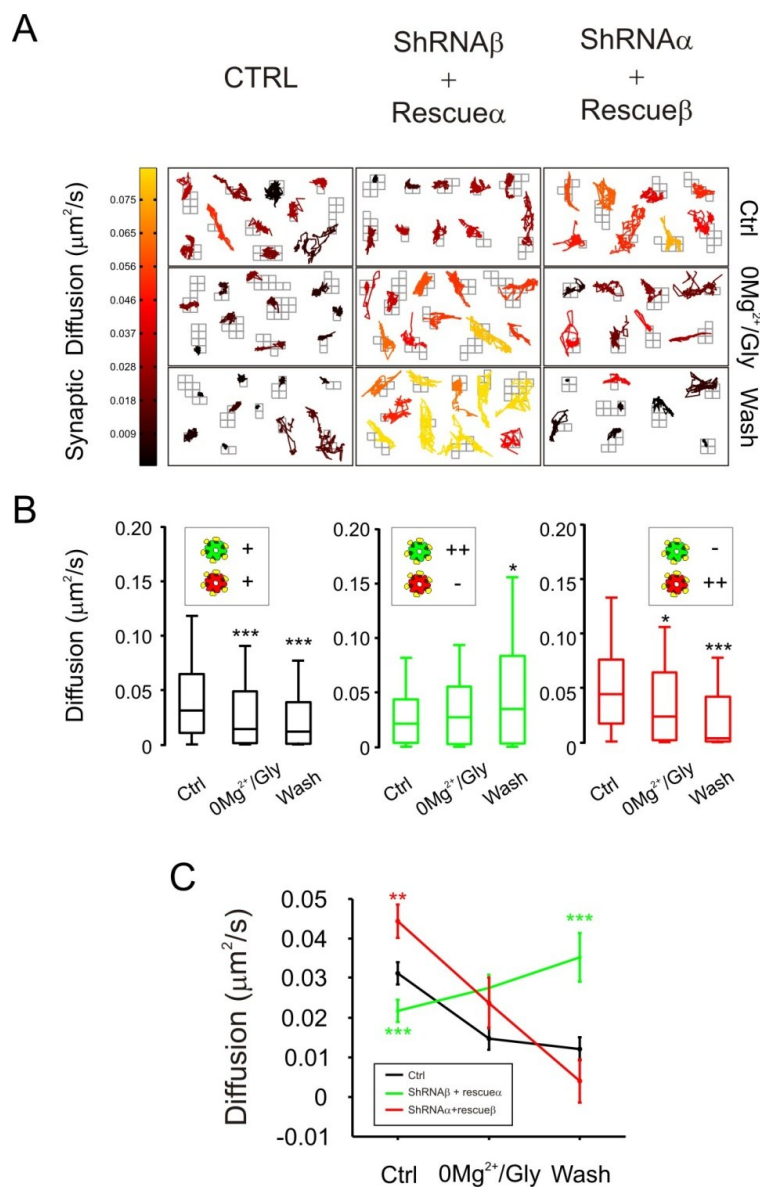


Figure 4.5: Effet différentiel des isoformes  $\alpha/\beta$  de la CaMKII sur la mobilité des rAMPA aux synapses. La  $\beta$ CaMKII est requise pour l'immobilisation des rAMPA aux synapses. **(A)** Exemples de diffusion de rAMPA aux synapses, avant, pendant et après l'application du protocole de cLTP. La valeur du coefficient de diffusion de chaque trace est représentée par un code de couleur. **(B)** Valeur médiane  $\pm$  IQR des coefficients de diffusion synaptique dans différentes conditions. Notez l'augmentation de la diffusion synaptique dans la condition sans  $\beta$ CaMKII. CTRL :  $D_{\text{Ctrl}}=0.0311$   $n=307$ ;  $D_{0\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}}=0.0147$   $n=174$ ,  $p<0.001$ ;  $D_{\text{Wash}}=0.0120$   $n=136$ ,  $p<0.001$ . ShRNA $\beta$ \_rescue $\alpha$  :  $D_{\text{Ctrl}}=0.0217$   $n=161$ ;  $D_{0\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}}=0.0275$   $n=102$ ;  $D_{\text{Wash}}=0.0352$   $n=95$ ,  $p<0.01$ . ShRNA $\alpha$ \_rescue $\beta$  :  $D_{\text{Ctrl}}=0.0444$   $n=162$ ;  $D_{0\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}}=0.0236$   $n=40$ ,  $p<0.01$ ;  $D_{\text{Wash}}=0.0039$   $n=25$ ,  $p<0.001$ . **(C)** Comparaison entre les différents isoformes de CaMKII dans la plasticité, médiane  $\pm$  sem. (\*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ ).

#### **4.3.4 La CaMKII est requise pour l'immobilisation des récepteurs GluA2 endogènes aux synapses**

La surexpression d'une protéine de fusion telle la GluA1-SEP peut changer le niveau d'expression des protéines et la fusion d'un fluorophore peut causer des changements dans le comportement de la protéine étudiée. Alors pour valider mes résultats obtenus avec la GluA1-SEP, j'ai étudié la sous-unité GluA2 endogène couplée à un anticorps-QD aux synapses identifiées par Homer-GFP. J'ai utilisé des shRNA spécifiques pour l' $\alpha$ CaMKII et la  $\beta$ CaMKII afin de discerner leurs rôles dans l'activité basale et dans l'activité. Pour activer la CaMKII, j'ai appliqué un protocole stimulant les rNMDA (Glu/Gly, 2 min) afin d'induire l'activation et une forte translocalisation de la CaMKII aux synapses (Hudmon, Lebel et al. 2005). Durant l'activité synaptique spontanée, la mobilité des récepteurs GluA2 est augmentée lorsque l'on réduit l'expression de l'une ou l'autre sous-unité (figure 4.6a-b). Lors du protocole d'activité (Glu/Gly), les GluA2 s'immobilisent aux synapses pendant l'application de la solution. Cependant, dans la condition sans  $\alpha$ CaMKII, la médiane des coefficients de diffusion reste la même. Aussi, tel que montré pour la GluA1-SEP, lorsqu'on diminue la quantité de  $\beta$ CaMKII dans les neurones, la médiane du coefficient de diffusion des GluA2 augmente de 2.45 fois lors d'une forte stimulation des rNMDA (figure 4.6c).

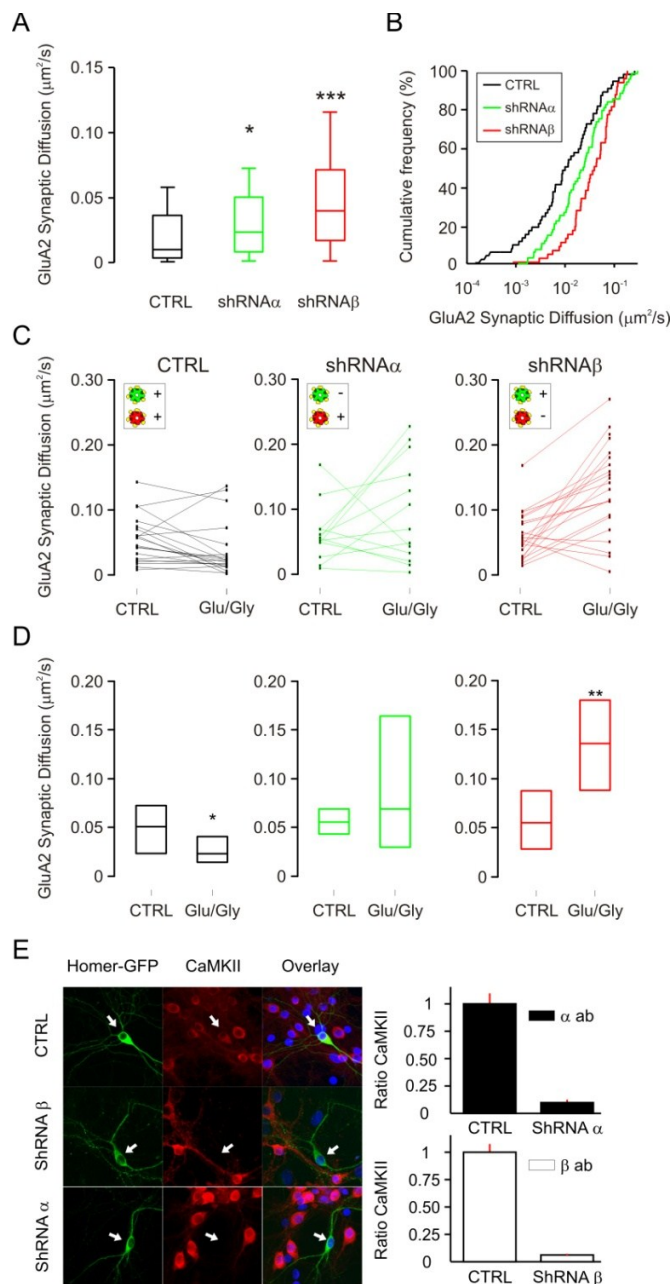


Figure 4.6: La CaMKII est requise pour l'immobilisation des récepteurs aux synapses. (A) La diminution de la quantité de CaMKII augmente la diffusion des GluA2 aux synapses :  $D_{CTRL}=0.0099$ ,  $n=55$ .

$D_{shRNA\alpha}=0.232$ ,  $n=69$ ,  $p<0.05$ .  $D_{shRNA\beta}=0.0394$ ,  $n=49$ ,  $p<0.001$ . (B) Fréquence cumulative des coefficients de diffusion de GluA2 aux synapses sous les différentes conditions indiquées. (C) Exemple de variation des coefficients de diffusion avant et après la stimulation. (D) Valeur médiane  $\pm$  IQR des coefficients de diffusion synaptique dans les conditions indiquées. Notez l'augmentation de la diffusion synaptique dans la condition sans  $\beta$ CaMKII. (E) Efficacité des shRNA. Ratios pour l' $\alpha$ CaMKII

$R_{shRNA\alpha}=0.10$ . Ratios pour la  $\beta$ CaMKII  $R_{shRNA\beta}=0.06$ .



#### **4.3.5 La réduction du nombre de $\beta$ CamkII provoque la désorganisation des protrusions dendritiques dépendantes de l'actine**

La  $\beta$ CaMKII a la capacité de se lier et de regrouper l'actine de façon dépendante de l'activité, ce qui lui confère un rôle important dans la maturation et la stabilisation des synapses (Shen, Teruel et al. 1998; Okamoto, Narayanan et al. 2007). Or, les filaments d'actine jouent aussi un rôle important dans la régulation du déplacement des rAMPA (Blanpied, Kerr et al. 2008; Rust, Gurniak et al. 2010). Dans la recherche d'un mécanisme qui permet d'expliquer le rôle de la  $\beta$ CaMKII sur la diffusion synaptique des rAMPA, j'ai évalué l'impact de la  $\beta$ CaMKII sur le réseau d'actine. J'ai utilisé la transfection du marqueur d'actine LifeAct-GFP, un marqueur synaptique Homer-DsRed et un shRNA dirigé contre la sous-unité  $\beta$ CaMKII. La figure 4.7 montre que la diminution de la  $\beta$ CaMKII désorganise les prolongements émanant des dendrites. L'évaluation de la longueur de ces prolongements remplis d'actine révèle qu'en condition de diminution de la  $\beta$ CaMKII, ils sont significativement plus longs qu'en condition contrôle (figure 4.7). Ces observations sont cohérentes avec l'hypothèse voulant qu'une régulation de l'actine dans les épines par la  $\beta$ CaMKII pourrait avoir un rôle dans la diffusion des rAMPA. Des travaux à venir s'attarderont davantage sur le lien  $\beta$ CaMKII-F-actin dans la régulation de l'adressage synaptique des rAMPA durant la plasticité synaptique.

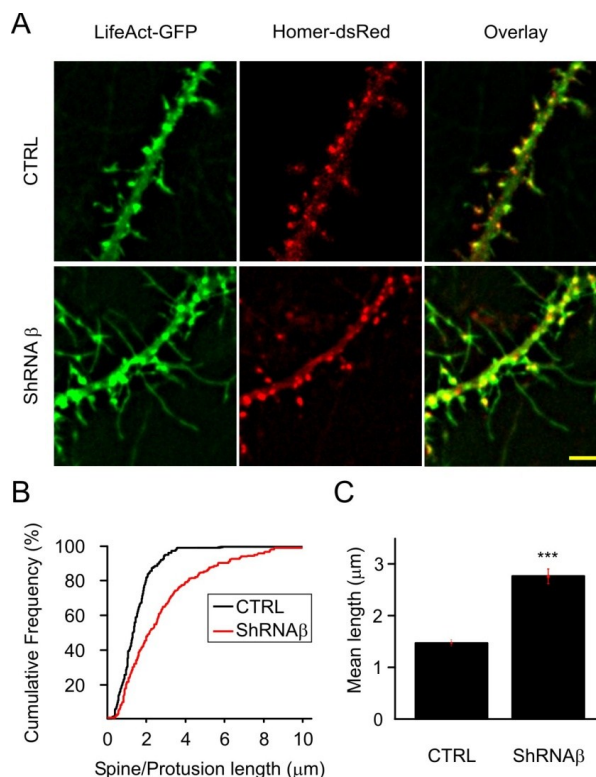


Figure 4.7 : La réduction du nombre de  $\beta$ CaMKII réduit la maturation des épines dendritiques et augmente la longueur des protrusions filopodiales. **(A)** Images de dendrites avec et sans  $\beta$ CaMKII. **(B)** Fréquence cumulative de la longueur des épines/protrusions. **(C)** Longueur moyenne des épines/protrusions (Ctrl=1.47 $\mu\text{m}$ , N=8 neurones, n= 175 synapses; shRNA  $\beta$ CaMKII = 2.77 $\mu\text{m}$ , N=6 neurones, n= 217 synapses).

#### 4.4 Discussion

En utilisant le suivi de points quantiques uniques sur la sous-unité GluA1 des rAMPA dans les neurones de culture, j'ai montré un rôle différentiel de l' $\alpha$ CaMKII et de la  $\beta$ CaMKII sur leur diffusion membranaire. De plus, ce rôle différentiel varie selon le niveau d'activité synaptique. Durant l'activité synaptique spontanée, la mobilité des récepteurs GluA1-SEP est augmentée lorsque l'on réduit l'expression de l'une ou l'autre sous-unité. Cependant, alors que la surexpression de l' $\alpha$ CaMKII est en mesure de compenser la diminution de la  $\beta$ CaMKII, l'inverse n'est pas vrai. En effet, la surexpression de  $\beta$ CaMKII ne peut promouvoir l'immobilisation des rAMPA aux synapses en l'absence d' $\alpha$ CaMKII, dans ces conditions.

La situation change complètement lorsque l'activité des rNMDA synaptiques est accrue durant le protocole de cLTP. Dans ce cas, c'est la présence de la  $\beta$ CaMKII qui s'avère la plus importante, de sorte qu'en son absence, les rAMPA se mettent à diffuser davantage suite à la stimulation cLTP, processus que l' $\alpha$ CaMKII ne peut empêcher. Enfin, la  $\beta$ CaMKII est en mesure de promouvoir l'immobilisation des rAMPA en l'absence de l' $\alpha$ CaMKII suite à cette stimulation. Ces travaux démontrent des rôles spécifiques pour chaque isoforme de la CaMKII dans des conditions de niveaux d'activité synaptique différents.

### **La réduction du nombre d' $\alpha$ CaMKII et de $\beta$ CaMKII augmente la diffusion membranaire des récepteurs AMPA aux synapses**

L' $\alpha$ CaMKII est impliquée dans l'augmentation du nombre de récepteurs aux synapses lors de la LTP (Hayashi, Shi et al. 2000; Kopec, Real et al. 2007). Nous avons déjà démontré que la présence d' $\alpha$ CaMKII est essentielle pour augmenter la rétention synaptique des récepteurs par son rôle de phosphorylation de la stargazine (Opazo, Labrecque et al. 2010). Les résultats obtenus ci-dessus reproduisent ces données publiées précédemment.

Le rôle de la  $\beta$ CaMKII sur la diffusion synaptique des rAMPA n'avait jamais été étudié. Cependant, il a été démontré que la diminution du nombre de  $\beta$ CaMKII dans les neurones de l'hippocampe a un impact négatif sur le nombre de synapses et le développement des dendrites (Nomura, Kumatoriya et al. 1997; Fink, Bayer et al. 2003). De plus, la  $\beta$ CaMKII a la capacité de se lier et de regrouper l'actine de façon dépendante de l'activité, lui accordant un rôle important dans la maturation et la stabilisation des synapses (Okamoto, Narayanan et al. 2007). Aussi, des outils pharmacologiques nous ont appris que le réseau d'actine régule la diffusion des récepteurs (Rust, Gurniak et al. 2010). Mes résultats appuient ces modèles en montrant qu'en diminuant la quantité de  $\beta$ CaMKII, le réseau d'actine aux synapses est désorganisé (figure 4.7) et que les rAMPA sont significativement plus mobiles aux synapses (figure 4.1).

### **Effet différentiel de l' $\alpha$ CaMKII et de la $\beta$ CaMKII sur les récepteurs AMPA aux synapses.**

Les résultats démontrent qu'en activité basale les holoenzymes de la  $\beta$ CaMKII ne peuvent immobiliser les rAMPA aux synapses (figure 4.3). Ceci pourrait peut-être s'expliquer par le fait que la  $\beta$ CaMKII est liée et localisée aux filaments d'actine (Shen and Meyer 1999; Okamoto, Narayanan et al. 2007). Cette liaison  $\beta$ CaMKII-F-actine n'est rompue que lorsque la  $\beta$ CaMKII est activée (Shen and Meyer 1999). Dans les conditions d'activité basale, il est possible que les sous-unités de  $\beta$ CaMKII ne soient pas suffisamment activées et demeurent en grande partie liées aux filaments d'actine. Ceci leur conférerait donc un accès limité à la queue c-terminale de la stargazine située à la membrane, empêchant ainsi sa phosphorylation, ce qui déclenche l'immobilisation des rAMPA (chapitre 3). En revanche, puisque l' $\alpha$ CaMKII ne lie pas l'actine, cette dernière pourrait accéder les récepteurs dans la PSD plus efficacement durant l'activité synaptique spontanée. Cette interprétation est soutenue par les travaux de Shen et al, (Shen and Meyer 1999) qui ont montré que l' $\alpha$ CaMKII translocalise plus rapidement à la PSD que la  $\beta$ CaMKII, suite à l'activation des rNMDA.

Il a été démontré que la surexpression de l' $\alpha$ CaMKII augmente l'amplitude des mEPSC, suggérant un plus grand nombre de récepteurs dans les synapses (Thiagarajan, Piedras-Renteria et al. 2002). Ceci concorde avec notre résultat qui montre plus de récepteurs immobilisés aux synapses en condition de surexpression d' $\alpha$ CaMKII (figure 4.2c). En contrepartie, la surexpression de  $\beta$ CaMKII augmente la fréquence des mEPSC (Thiagarajan, Piedras-Renteria et al. 2002; Groth, Lindskog et al. 2011). Cet effet de fréquence est souvent attribué à une plus grande probabilité de relâche de glutamate synaptique. Cependant, les travaux de Heine et al. ont démontré que la diffusion latérale des rAMPA permet un échange rapide des récepteurs désensibilisés avec des récepteurs fonctionnels dans ou à proximité de la densité postsynaptique (Heine, Groc et al. 2008). L'échange de récepteurs naïfs (non désensibilisés) permettrait de garder une haute fidélité de la transmission synaptique. Ainsi, dans les conditions où la sous-unité  $\beta$ CaMKII est majoritaire (figure 4.2c), l'augmentation de la fréquence des mEPSC reportée par

Thiagarajan et al. pourrait être due en partie à une augmentation de l'apport de récepteurs naïfs à la synapse, par le biais d'une diffusion accrue aux synapses.

### **L'immobilisation des récepteurs AMPA aux synapses pendant la plasticité est dépendante de la $\beta$ CaMKII**

Il a été montré que l'induction de la LTP dans les tranches d'hippocampe de la souris knock-out de  $\beta$ CaMKII est altérée (Borgesius, van Woerden et al. 2011). Mes résultats montrent que lorsque la  $\beta$ CaMKII est absente dans les neurones, les rAMPA ont une mobilité accrue après l'induction de la cLTP (figure 4.3-4.4). Cette perte d'immobilisation des rAMPA aux synapses peut être interprétée comme une impossibilité d'induire la LTP, ce qui correspond au modèle de souris knock-out de  $\beta$ CaMKII.

L' $\alpha$ CaMKII et la  $\beta$ CaMKII peuvent former des hétéromultimers. Sans la  $\beta$ CaMKII, l' $\alpha$ CaMKII est moins abondante dans les épines (Borgesius, van Woerden et al. 2011). Ainsi, la contribution de la diffusion accrue des rAMPA aux synapses sans la  $\beta$ CaMKII pourrait s'expliquer par le manque de localisation d' $\alpha$ CaMKII aux synapses. De plus, l'absence de la  $\beta$ CaMKII diminue la stabilisation des filaments d'actine, ce qui nuit probablement à la plasticité synaptique. En effet, Okamoto et al. a montré que la  $\beta$ CaMKII regroupe l'actine aux synapses, qu'elle quitte ces filaments pendant l'activité synaptique accrue et les regroupe après l'induction de la LTP (Okamoto, Narayanan et al. 2007). De plus, la plasticité structurelle des synapses a été démontrée comme dépendante de l'actine et de la CaMKII (Cingolani and Goda 2008; Honkura, Matsuzaki et al. 2008). Mes résultats s'inscrivent dans cette optique, montrant que la mobilité des rAMPA est dépendante de la  $\beta$ CaMKII, ce qui pourrait contribuer à son rôle dans la potentiation synaptique.

Aussi, la PSD95 est la principale protéine d'ancrage des rAMPA et son remodelage dynamique est contrôlé par la polymérisation de l'actine (Blanpied, Kerr et al. 2008). De par son rôle structurel, la  $\beta$ CaMKII doit avoir une implication dans la régulation des rAMPA aux synapses par la PSD95. Dans nos conditions de shRNA dirigé contre la  $\beta$ CaMKII, les récepteurs ne peuvent plus être confinés aux synapses. Mon hypothèse est que la matrice du cytosquelette postsynaptique subit une perte d'organisation et de stabilisation avant et après les protocoles de cLTP. De plus, ce rôle de la  $\beta$ CaMKII est

spécifique à cet isoforme, car on ne peut secourir son absence en sur-exprimant l' $\alpha$ CaMKII. Ces résultats démontrent donc un rôle potentiel structurel crucial de la  $\beta$ CaMKII dans la transmission et la plasticité synaptique. À la figure 4.8, je montre un modèle de travail selon lequel l' $\alpha$ CaMKII est plus près des récepteurs membranaires permettant la phosphorylation de stargazine et la  $\beta$ CaMKII qui joue un rôle structurel en régulant l'actine.

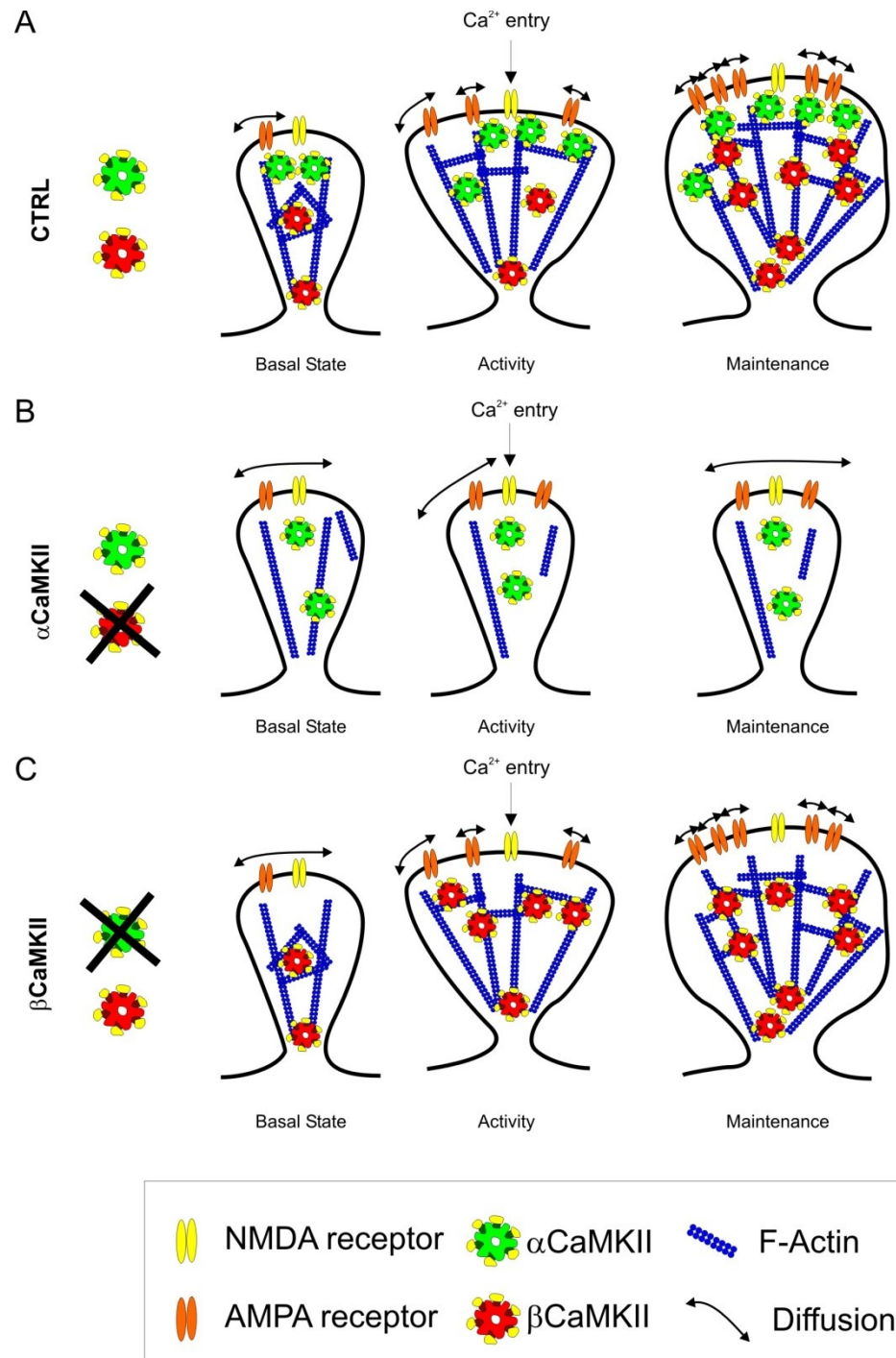


Figure 4.8: Modèle des différents modes d'action de l' $\alpha$ CaMKII et de la  $\beta$ CaMKII. **(A)** Au niveau basal, l' $\alpha$ CaMKII accède plus facilement aux protéines membranaires que la  $\beta$ CaMKII. Lors de l'activité, la  $\beta$ CaMKII quitte l'actine et y retourne ensuite. **(B)** Sans  $\beta$ CaMKII, l'actine n'est plus régulée aux synapses, ce qui augmente la diffusion synaptique des rAMPA. **(C)** Sans l' $\alpha$ CaMKII, les rAMPA diffusent plus rapidement aux synapses, mais la  $\beta$ CaMKII parvient à les immobiliser lors de la plasticité.

Je me rends compte cependant que cette étude a ses limites. Premièrement, afin de valider nos modèles de plasticité, il est important de démontrer que nos protocoles de plasticité induisent un changement fonctionnel dans les neurones de culture. Il est nécessaire de coupler l'imagerie de la GluA1-SEP avec des mesures électrophysiologiques lors de l'induction de la cLTP. Je m'attends à ce qu'une augmentation de la fluorescence de GluA1-SEP aux synapses soit corrélée à une plus grande amplitude des courants miniatures.

Deuxièmement, une expérience essentielle à réaliser consiste à discerner le rôle structurel de la CaMKII de son rôle enzymatique. Pour ce faire, il est possible de surexprimer une  $\beta$ CaMKII active, mais sans fonction de liaison à l'actine, la  $\beta$ eCaMKII, (Fink, Bayer et al. 2003) ou une  $\beta$ CaMKII non active qui lie l'actine, la  $\beta$ CaMKII-A303R, (Shen and Meyer 1999). On peut supposer que les effets du mutant  $\beta$ eCaMKII seront semblables à la diminution du nombre de  $\beta$ CaMKII, c.-à-d. une augmentation de la valeur médiane du coefficient de diffusion synaptique. Le mutant  $\beta$ CaMKII-A303R ne devrait pas immobiliser les rAMPA aux synapses lors de la cLTP.

Troisièmement, nous avons publié précédemment que la phosphorylation de la stargazine par l' $\alpha$ CaMKII est importante pour l'immobilisation des récepteurs aux synapses (Opazo, Labrecque et al. 2011). Il est possible d'exprimer des mutants de la stargazine, imitant un état de phosphorylation (S9D) ou de non-phosphorylation (S9A), combiné avec les outils de shRNA  $\beta$ CaMKII permettant d'évaluer le rôle structurel de la  $\beta$ CaMKII par rapport à son rôle enzymatique. Ces expériences pourront nous guider sur l'importance du rôle de la  $\beta$ CaMKII comme protéine structurelle à la synapse.

Finalement, la réelle stœchiométrie de la CaMKII n'est pas révélée par nos techniques d'imagerie. Je propose d'utiliser la technique d'immunoprécipitation sur nos plasmides de secours des CaMKII qui sont fusionnés à une GFP. En précipitant les CaMKII fusionnés à la GFP et faisant migrer les protéines précipitées sur un gel, il est possible de révéler les CaMKII associées à la GFP avec un anticorps panCaMKII disponible commercialement. L' $\alpha$ CaMKII et la  $\beta$ CaMKII n'ont pas le même poids moléculaire, il sera



donc possible d'utiliser les ratios de ces bandes pour mesurer la stoechiométrie des CaMKII.

## 4.5 Conclusion

Dans cette étude, j'ai mis en lumière l'importance de l'isoforme  $\beta$ CaMKII sur la mobilité des rAMPA dans des conditions de transmission basale et de plasticité. Nous avons aussi mis en évidence les contributions de deux différents isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  de la CaMKII. Le ratio  $\alpha/\beta$  des holoenzymes est régulé par l'activité synaptique (Thiagarajan, Piedras-Renteria et al. 2002) et va grandement influencer le rôle de la CaMKII dans la plasticité et le développement. La démonstration d'un rôle différent pour chaque isomère de la CaMKII va donc avoir un impact sur notre compréhension de la régulation des synapses. Cependant, cette étude est incomplète et demande des expériences supplémentaires afin d'identifier le rôle fondamental de chaque isoforme de CaMKII sur la régulation des rAMPA dans la plasticité synaptique.

## 4.6 Bibliographie

- Bayer, K. U., P. De Koninck, et al. (2001). "Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation." Nature **411**(6839): 801-5.
- Blanpied, T. A., J. M. Kerr, et al. (2008). "Structural plasticity with preserved topology in the postsynaptic protein network." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(34): 12587-92.
- Borgesius, N. Z., G. M. van Woerden, et al. (2011). "betaCaMKII plays a nonenzymatic role in hippocampal synaptic plasticity and learning by targeting alphaCaMKII to synapses." J Neurosci **31**(28): 10141-8.
- Brocke, L., L. W. Chiang, et al. (1999). "Functional implications of the subunit composition of neuronal CaM kinase II." J Biol Chem **274**(32): 22713-22.
- Cho, M. H., X. Cao, et al. (2007). "Dentate gyrus-specific manipulation of beta-Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II disrupts memory consolidation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(41): 16317-22.
- Choquet, D. (2010). "Fast AMPAR trafficking for a high-frequency synaptic transmission." Eur J Neurosci **32**(2): 250-60.
- Cingolani, L. A. and Y. Goda (2008). "Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy." Nat Rev Neurosci **9**(5): 344-56.
- De Koninck, P. and H. Schulman (1998). "Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations." Science **279**(5348): 227-30.

- Derkach, V., A. Barria, et al. (1999). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3269-74.
- Ehlers, M. D., M. Heine, et al. (2007). "Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity." Neuron **54**(3): 447-60.
- Fink, C. C., K. U. Bayer, et al. (2003). "Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII." Neuron **39**(2): 283-97.
- Groth, R. D., M. Lindskog, et al. "Beta Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent kinase type II triggers upregulation of GluA1 to coordinate adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(2): 828-33.
- Hayashi, Y., S. H. Shi, et al. (2000). "Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction." Science **287**(5461): 2262-7.
- Heine, M., L. Groc, et al. (2008). "Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission." Science **320**(5873): 201-5.
- Honkura, N., M. Matsuzaki, et al. (2008). "The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines." Neuron **57**(5): 719-29.
- Hudmon, A., E. Lebel, et al. (2005). "A mechanism for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association." J Neurosci **25**(30): 6971-83.
- Hudmon, A. and H. Schulman (2002). "Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II." Biochem J **364**(Pt 3): 593-611.
- Kopec, C. D., E. Real, et al. (2007). "GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses." J Neurosci **27**(50): 13706-18.
- Mammen, A. L., K. Kameyama, et al. (1997). "Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II." J Biol Chem **272**(51): 32528-33.
- Mondin, M., V. Labrousse, et al. (2011). "Neurexin-neuroigin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds." J Neurosci **31**(38): 13500-15.
- Nomura, T., K. Kumatoriya, et al. (1997). "Overexpression of alpha and beta isoforms of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in neuroblastoma cells -- H-7 promotes neurite outgrowth." Brain Res **766**(1-2): 129-41.
- Okamoto, K., R. Narayanan, et al. (2007). "The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(15): 6418-23.
- O'Leary, H., E. Lasda, et al. (2006). "CaMKIIbeta association with the actin cytoskeleton is regulated by alternative splicing." Mol Biol Cell **17**(11): 4656-65.
- Opazo, P., S. Labrecque, et al. (2010). "CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin." Neuron **67**(2): 239-52.
- Otmakhov, N., J. H. Tao-Cheng, et al. (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 **24**(42): 9324-31.

- Petrini, E. M., J. Lu, et al. (2009). "Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation." Neuron **63**(1): 92-105.
- Rust, M. B., C. B. Gurniak, et al. (2010). "Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics." Embo J **29**(11): 1889-902.
- Sanabria, H., M. T. Swulius, et al. (2009). " $\beta$ CaMKII regulates actin assembly and structure." J Biol Chem **284**(15): 9770-80.
- Shen, K. and T. Meyer (1999). "Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation." Science **284**(5411): 162-6.
- Shen, K., M. N. Teruel, et al. (1998). "CaMKII $\beta$  functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKII $\alpha$ / $\beta$  heterooligomers to dendritic spines." Neuron **21**(3): 593-606.
- Thiagarajan, T. C., E. S. Piedras-Renteria, et al. (2002). " $\alpha$ - and  $\beta$ CaMKII. Inverse regulation by neuronal activity and opposing effects on synaptic strength." Neuron **36**(6): 1103-14.
- Tomita, S., V. Stein, et al. (2005). "Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs." Neuron **45**(2): 269-77.
- van Woerden, G. M., F. E. Hoebeek, et al. (2009). " $\beta$ CaMKII controls the direction of plasticity at parallel fiber-Purkinje cell synapses." Nat Neurosci **12**(7): 823-5.

## 5 Étude du rôle de la CaMKII dans l'exocytose des récepteurs AMPA

### 5.1 Avant-propos

Dans ce chapitre, je vais présenter des expériences qui tentent d'élucider le rôle de la CaMKII au niveau des dendrites, pour soutenir la plasticité synaptique, dite « *input-specific* », via son contrôle de la livraison des rAMPA aux synapses. La première section comporte des données obtenues en collaboration avec ma collègue Mado Lemieux en vue d'un article sur cette thématique (Lemieux, Labrecque et al., resoumission #201202058, JCB). Ensuite, j'introduis une méthode et des données préliminaires sur la mesure d'exocytose des rAMPA afin d'évaluer l'implication de la CaMKII dans l'exocytose des GluA1 aux dendrites.

### 5.2 Introduction

Une propriété fondamentale de la LTP est sa spécificité en lien avec son input (« *input-specific* »), i.e qu'une fois induite, la LTP à une synapse donnée ne se propage pas aux synapses adjacentes (Nicoll, Kauer et al. 1988). Peu de choses sont connues sur les signaux qui peuvent mener à une contribution spécifique du recrutement des éléments synaptiques. L'hypothèse de l'étiquette synaptique et de la capture proposée par Morris et ses collègues postule que les modifications dans la synapse activée conduisent à une étiquette qui peut alors capturer le matériel spécifique parmi ce qui est livré le long des arbres dendritiques (Frey and Morris 1998; Redondo, Okuno et al. 2011). Toutefois, pour assurer la livraison adéquate de matériel aux synapses activées, il manque un mécanisme pour guider le matériel de la dendrite à la synapse. Comment cela pourrait-il être régulé? Une possibilité consisterait en un signal résultant à la base de l'épine active au sein de l'arbre dendritique, qui aurait un impact sur la production locale et/ou la relocalisation de protéines pour sa translocation subséquente aux épines actives pour la capture.

Un exemple de matériel relocalisé localement à la synapse activée est le rAMPA. En effet, il existe deux possibilités pour expliquer l'augmentation du nombre de rAMPA

aux synapses suite à un protocole de cLTP. Tel que démontré au chapitre 3, l'immobilisation des rAMPA diffusant dans la membrane synaptique est un mécanisme pour augmenter le nombre de rAMPA synaptiques (Opazo, Labrecque et al. 2010). Aussi, il est possible qu'il y ait une augmentation de la fréquence des événements d'exocytose de rAMPA à la membrane postsynaptique, apportant ainsi un plus grand nombre de récepteurs disponibles aux synapses (Patterson, Szatmari et al. 2010). Alors, lorsque la CaMKII est translocalisée aux sites dendritiques, elle est dans un endroit idéal pour réguler le transport de matériel le long des microtubules et la livraison spécifique de récepteurs aux synapses. En effet, il a été montré que l'enzyme est responsable de l'exocytose dendritique (Maletic-Savatic, Koothan et al. 1998) et qu'elle phosphoryle des sous-types de kinésines et myosines qui conduisent des cargos de récepteurs sur les microtubules dans les dendrites (Guillaud, Setou et al. 2003). De plus, la libération du cargo contenant les rAMPA et les rNMDA est liée à la phosphorylation des kinésines et myosines (Correia, Bassani et al. 2008; Guillaud, Wong et al. 2008). Alors, nous nous sommes aussi demandé si la CaMKII a une implication dans l'exocytose des rAMPA aux dendrites.

## **5.3 Matériel et méthodes**

### **5.3.1 Culture neuronale et transfections**

La culture neuronale et les transfections ont été effectuées tel que décrit dans le chapitre 4.

### **5.3.2 Imagerie**

Les lamelles de neurones transfectées mCherry-CaMKII ont été placées dans une chambre de microscope (Instruments SD, Grants Pass, OR) sur un Axioskop FS2 microscope avec un objectif 63X «Achromat» à immersion à l'eau (Zeiss, Göttingen, Allemagne) équipé d'un système de perfusion (PTR-2000; ALA-scientifique, Westbury, NY). Les images ont été acquises avec une caméra CCD (CoolSnap-HQ; Photometrics, Tuscon, AZ), contrôlée par le logiciel MetaMorph (Molecular Devices, Downingtown, PA).

L'imagerie en time-lapse des neurones transfectés GluA1-SEP et mCherry-CaMKII a été réalisée dans une chambre de microscope Warner RC-41 sur un microscope Zeiss Axiovert 200M avec un objectif 63X à l'huile NA 1.4; à chaque minute un z-stack de 7-10 images (0,5  $\mu\text{m}$  étape, 50-100 ms de temps d'intégration par image) a été acquis. La stimulation synaptique consiste à appliquer d'une solution extracellulaire sans  $\text{Mg}^{2+}$  et avec glycine 200  $\mu\text{M}$   $0\text{Mg}^{2+}/\text{gly}$  pendant 5 minutes.

L'imagerie de l'exocytose de GluA1-SEP a été réalisée dans une chambre de microscope Warner RC-41 avec un microscope Olympus IX71 muni d'un objectif 100X à l'huile NA 1.49; le photoblanchiment des GluA1-SEP présents à la surface a été effectué à l'aide du laser 488 nm pendant 100 s; les films d'exocytose ont été acquis à 100 ms par image pendant 100 s.

### 5.3.3 Statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le *Matlab Statistic Toolbox*. Les distributions normales ont été testées à l'aide d'un Student t-test, les distributions non normales ont été testées à l'aide d'un Mann-Whitney U test ou un test de Wilcoxon pour observations appariées. Les différences significatives sont indiquées ainsi :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.001$  (\*\*), et  $p < 0.0001$  (\*\*\*)

## 5.4 Résultats

### 5.4.1 La stimulation synaptique conduit à l'accumulation locale de la CaMKII aux domaines dendritiques

Des travaux effectués dans notre laboratoire par Mado Lemieux à l'aide de l'imagerie en time-lapse d'une mGFP-CaMKII ont montré que la stimulation  $0\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}$  peut déclencher une translocation de la CaMKII, dépendante de l'activité des rNMDA, à des domaines dendritiques, distincts et généralement à proximité des sites postsynaptiques actifs (figure 5.1). Cette accumulation de la CaMKII dendritique coïncide spatialement et temporellement avec des élévations transitoires de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lemieux, Labrecque et al., resoumission #201202058, JCB). De plus, cette élévation transitoire de la CaMKII aux dendrites sous les synapses actives nécessite l'activation de la CaMKII et une

interaction avec des éléments microtubulaires (Lemieux, Labrecque et al., resoumission #201202058, JCB). Ce processus dynamique, qui n'avait jamais été observé auparavant, suggère que la CaMKII joue un rôle dans ces régions dendritiques, en lien avec l'activité synaptique locale. Une hypothèse que nous avons voulu tester est que ce processus pourrait permettre à la CaMKII de réguler l'apport des rAMPA aux synapses environnantes, afin de soutenir l'augmentation de la force de ces synapses, suite à leur activation prononcée.

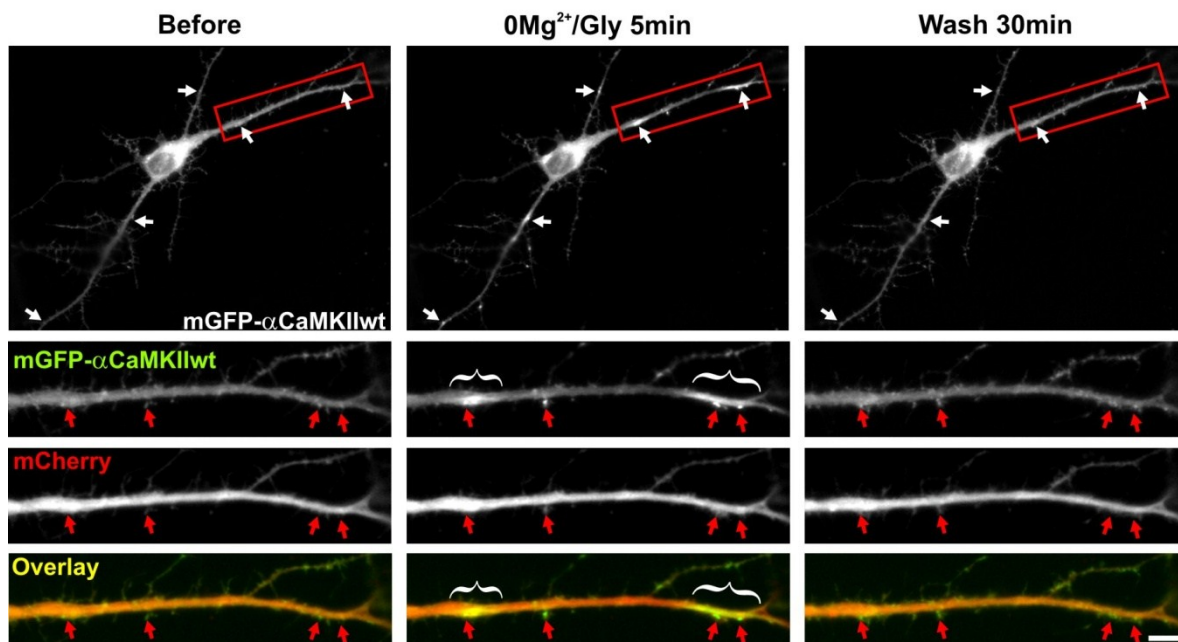


Figure 5.1 : Translocation de l' $\alpha$ CaMKII à des sites dendritiques près de synapses dépendant de l'activité. Neurone hippocampique (12 DIV) exprimant l' $\alpha$ CaMKII-mGFP et mCherry imagé avant, pendant et après stimulation par  $0\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}$  pendant 5 minutes.

#### 5.4.2 La translocation dendritique de l' $\alpha$ CaMKII est corrélée avec une augmentation des récepteurs AMPA dans les synapses environnantes

Pour tester cette hypothèse, j'ai imagé en time-lapse (1 image/min), sur des neurones d'hippocampe en culture, la sous-unité GluA1 fusionnée avec une Super-Ecliptic pHluorin (GluA1-SEP), co-transfectée avec une mcherry- $\alpha$ CaMKII. Le récepteur fusionné avec la SEP permettait la visualisation des récepteurs à la membrane (figure 5.4a), et la mcherry- $\alpha$ CaMKII l'identification des régions de translocation dendritique de la CaMKII. L'objectif était de visualiser le recrutement des rAMPA aux synapses pendant la stimulation  $0\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}$  et de déterminer si ce recrutement est ou non davantage prononcé aux régions

de translocalisation dendritiques de la CaMKII. En utilisant l'algorithme de seuil adaptatif et d'analyse morphologique, j'ai extrait les agrégats de GluA1-SEP et j'ai utilisé l'algorithme de suivi de molécules uniques pour obtenir des trajectoires afin d'extraire l'intensité des synapses. J'ai sélectionné les synapses dans les régions de translocalisation CaMKII synaptique (S+/S-) et de translocalisation dendritique de la CaMKII (D+) et je les ai comparées aux régions sans translocalisation dendritique (D-).

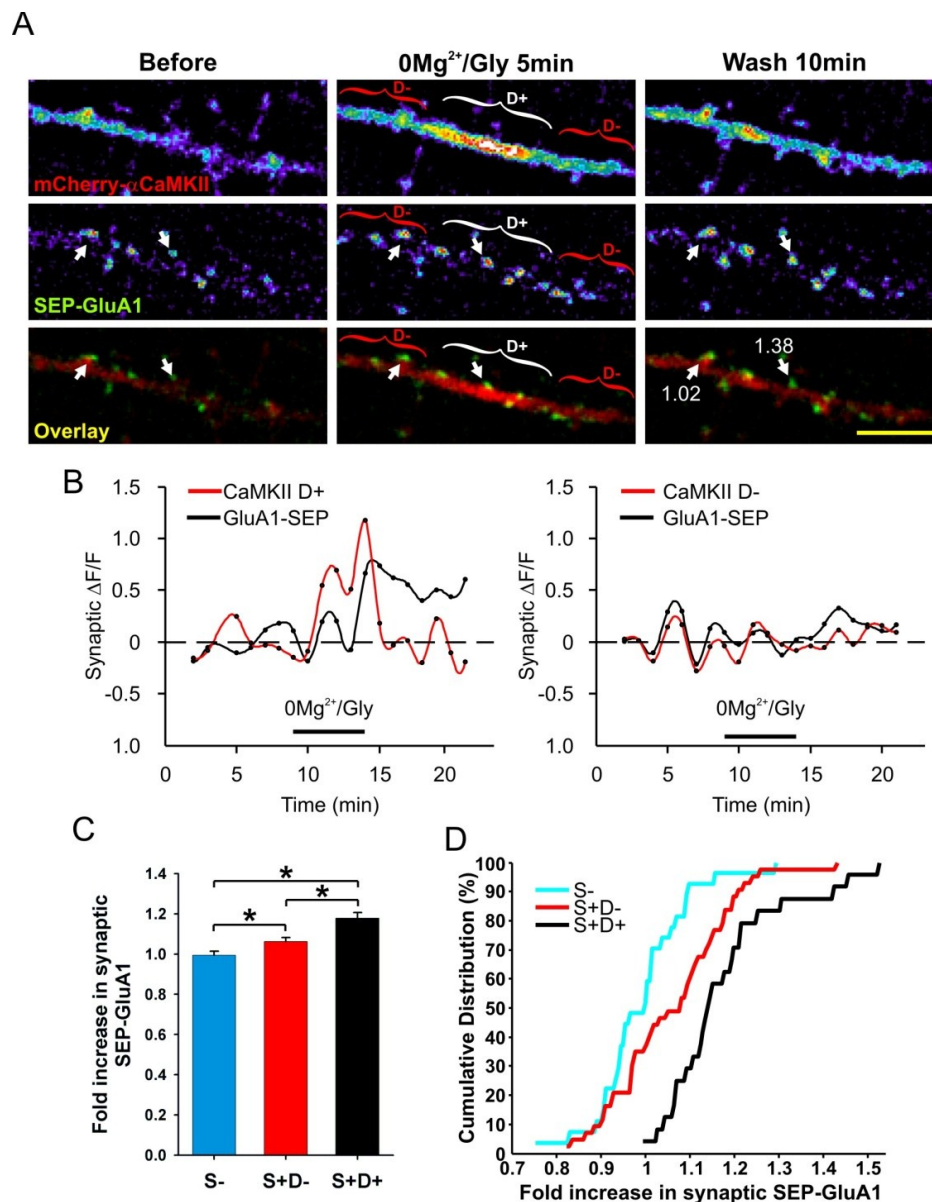


Figure 5.2 : La translocation dendritique de l' $\alpha$ CaMKII est corrélée avec une augmentation de GluA1 de surface aux sites postsynaptiques. **(A)** Dendrite co-exprimant mCherry- $\alpha$ CaMKII et SEP-GluA1 stimulée avec  $0\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}$  pendant 5 min. **(B)** Exemples de variation de fluorescence de GluA1-SEP (noir) et CaMKII



(rouge) pour des synapses individuelles (flèches sous D+ et D-, panneau du centre). **(C)** Histogramme et **(D)** fréquence cumulative de l'augmentation de GluA1-SEP pour les synapses sans (bleu, S-) ou avec (S+) translocation CaMKII synaptique, qui sont à proximité (noir, S+, D+) ou éloigné (rouge, S+, D-) d'un endroit de translocation dendritique de la CaMKII. Les parenthèses indiquent la translocation dendritique de CaMKII (D+, blanc) ou la région dendritique adjacente (D-, rouge). (N = 7 neurones, synapses 24-43 par groupe).

Barre d'échelle : 5  $\mu$ m.

Lors de la stimulation, je n'ai observé aucune insertion significative de rAMPA aux synapses situées dans les régions ne montrant pas d'accumulation synaptique de mCherry-CaMKII (S-) (figure 5.2c-d). En revanche, les synapses présentant une accumulation de CaMKII (S+) ont démontré une augmentation de la fluorescence de GluA1-SEP. Toutefois, au sein de cette catégorie de synapses mCherry-CaMKII-positives, j'ai observé une augmentation de GluA1-SEP significativement plus élevée dans les synapses à proximité de régions dendritiques où la mCherry-CaMKII s'est accumulée (S+/D+), par rapport aux régions dendritiques sans augmentation (S+/D-) (figure 5.2c-d). Ces résultats sont cohérents avec un rôle pour la translocation dendritique de la CaMKII dans la promotion du recrutement de rAMPA au niveau des synapses.

#### **5.4.3 Le remplacement de l' $\alpha$ CaMKII par l' $\alpha$ CaMKII-E96K bloque l'apport accru de récepteurs AMPA aux synapses**

Pour démontrer la causalité entre la translocation dendritique de la CaMKII et l'apport accru des rAMPA, il fallait trouver une stratégie isolant le processus de translocalisation dendritique de la CaMKII de sa translocalisation postsynaptique. Grâce à l'identification, par ma collègue M. Lemieux, d'un mutant de la CaMKII (E96K) qui ne peut présenter cette translocation dendritique (ne liant pas les microtubules), mais qui conserve son activité catalytique et la capacité de translocation postsynaptique, nous avons trouvé un outil (Lemieux, Labrecque et al., resoumission #201202058, JCB). J'ai donc testé l'impact du remplacement de l' $\alpha$ CaMKII endogène avec ce mutant, par l'utilisation de shRNA combinée à la co-transfection du mutant E96K (résistant aux shRNA), sur le recrutement synaptique de SEP-GluA1. La figure 5.3 montre qu'à la suite d'une stimulation synaptique les neurones exprimant mCherry- $\alpha$ CaMKII-E96K présentent nettement moins

d'insertion de GluA1-SEP à la surface des synapses par rapport aux neurones exprimant mCherry- $\alpha$ CaMKII-WT.

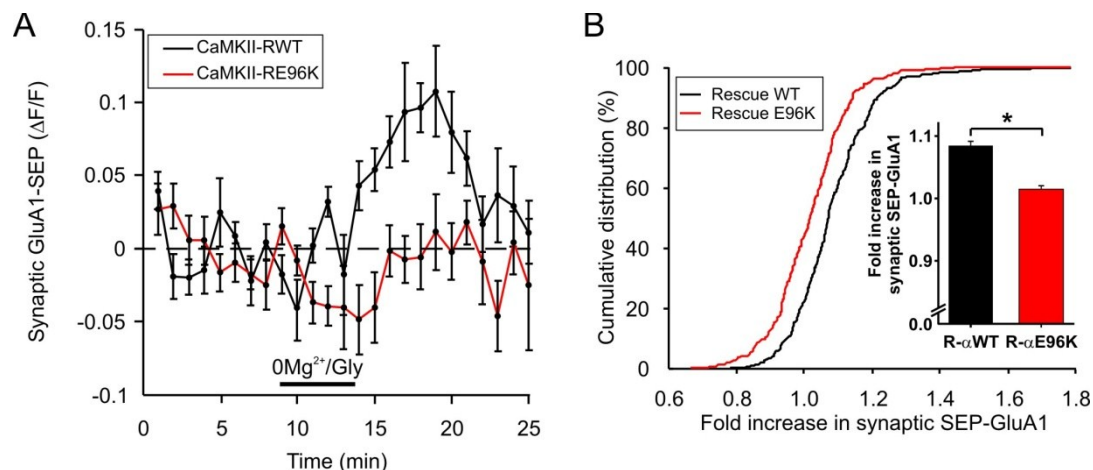


Figure 5.3 : Le remplacement de l' $\alpha$ CaMKII par le mutant E96K empêche l'augmentation de l'insertion de GluA1 de surface aux synapses pendant l'activité synaptique. **(A)** Découpe temporelle de la mesure de la fluorescence synaptique de GluA1-SEP. Notez l'augmentation de la fluorescence de GluA1-SEP aux synapses qui n'est pas reproduite lors du remplacement de la CaMKII-WT par la CaMKII-E96K. **(B)** Histogramme et fréquence cumulative de la distribution de l'augmentation de GluA1-SEP dans les synapses des neurones montrant une translocation synaptique (S+) de mCherry- $\alpha$ CaMKII WT ou mCherry- $\alpha$ CaMKII E96K rescue, en présence du shRNA contre  $\alpha$ CaMKII, pendant la stimulation avec 0Mg<sup>2+</sup>/Gly pendant 5 minutes. (N=8 neurones, 272-300 synapses par groupe).

#### 5.4.4 Développement d'une méthode d'imagerie des événements d'insertion de récepteurs AMPA à la surface des neurones

Les résultats ci-dessus montrent un apport accru de récepteurs aux synapses lors de la translocation dendritiques de la CaMKII, mais ne démontrent pas l'implication de l'exocytose des rAMPA à ces synapses. Alors, pour évaluer le rôle de la CaMKII dans l'exocytose des rAMPA, j'ai utilisé un protocole d'imagerie développé par Yudowski et al. afin de résoudre directement les événements unitaires d'insertion des rAMPA à la surface des neurones (Yudowski, Puthenveedu et al. 2007). Le principe consiste à photoblanchir les GluA1-SEP à la surface des neurones à l'aide d'un laser 488 nm, pour ensuite acquérir des séquences d'images à haute vitesse (10 images/sec). Les événements d'insertion de rAMPA à la surface des neurones vont survenir entre 2 images comme des petites taches de

fluorescence (Figure 5.4). Les expériences ont été effectuées sur un microscope inversé couplé avec des lasers et une caméra EMCCD.

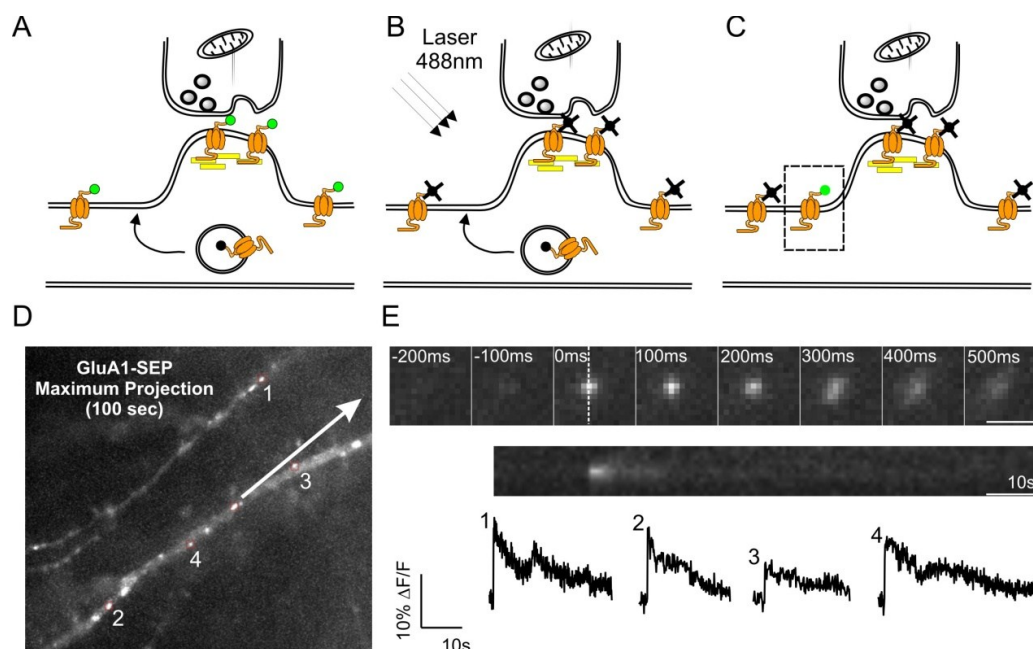


Figure 5.4 : Principe et exemples d'exocytose de GluA1-SEP aux dendrites de neurones. (A) L'expression de GluA1-SEP permet la visualisation des récepteurs à la membrane, les GluA1-SEP dans les vésicules n'étant pas fluorescentes. (B) Le photoblanchiment des GluA1-SEP à la membrane est effectué à l'aide d'un laser 488 nm sur toute la surface du neurone. (C) Les événements d'exocytose à la membrane apparaissent comme une tache de fluorescence. (D) Exemple de dendrites exprimant GluA1-SEP. L'image correspond à la projection maximale du film de 1000 images. (E) Exemple d'événements d'exocytose, barre d'échelle = 1.6  $\mu$ m. Kymographe de l'événement et exemples de courbe de fluorescences montrées en  $\Delta F/F$ .

L'acquisition des films d'exocytose à haute vitesse génère énormément de données; il est facile de produire plus de 20 Go de données en une journée de travail. L'analyse manuelle des films et la détection des événements d'exocytose s'avèrent une tâche extrêmement longue. Aussi, de plus en plus de laboratoires commencent à utiliser le GluA1-SEP pour étudier l'exocytose (Yudowski, Puthenveedu et al. 2007; Makino and Malinow 2009; Kennedy, Davison et al. 2010; Patterson, Szatmari et al. 2010; Ahmad, Polepalli et al. 2012) et aucun laboratoire n'a encore développé une méthode automatique pour détecter les événements d'exocytose. Après avoir fait l'évaluation de la quantité gigantesque de données à traiter et établi un besoin potentiel d'un algorithme efficace

d'analyse d'exocytose, j'ai entrepris la tâche de développer un algorithme qui détecte automatiquement les événements permettant ainsi de caractériser rapidement la fréquence de l'exocytose, l'amplitude et le taux de décroissance de chaque insertion membranaire.

Pour ce faire, je me suis inspiré d'un algorithme de gSHRImP qui détecte les événements de photoblanchiment ou de photoactivation entre deux images consécutives (Simonson, Rothenberg et al. 2011). L'algorithme de gSHRImP est un algorithme de super résolution et a été conçu pour identifier des événements de photoblanchiment en une étape. J'ai adapté l'algorithme pour les événements d'exocytose qui sont très semblables aux événements de photoactivation, mais qui contiennent plus de pixels et possèdent différentes dynamiques suite à l'apparition des rAMPA à la membrane. L'algorithme de détection de l'exocytose est schématisé à la Figure 5.5. La première opération consiste à soustraire l'image  $n+1$  de l'image  $n$ ; cette image sera nommée  $S_n$ . Alors, les objets qui apparaissent dans cette image sont les événements d'apparition à l'image  $n+1$ . Cette stratégie de soustraction fonctionne efficacement dans les images sans bruit; cependant, ce n'est pas notre cas pour l'imagerie de neurones vivants. Pour palier au bruit et pour identifier le pixel d'apparition maximum, je dilate l'image  $S_n$  par un kernel de  $3 \times 3$ , créant l'image  $D_n$ . Les événements d'exocytose correspondent aux pixels inchangés de la soustraction  $D_n - S_n$ . Ceci permet d'obtenir les maximums locaux des apparitions à l'image  $n+1$ ; la valeur numérique de chaque pixel restant correspond à la variation en intensité des images  $n+1$  et  $n$ . Il suffit de poser une valeur seuil pour les événements d'exocytose et d'extraire le temps et les positions de chaque événement. Notez qu'il est possible d'identifier les événements de photoblanchiment en utilisant les minimums locaux de  $D_n - S_n$ .

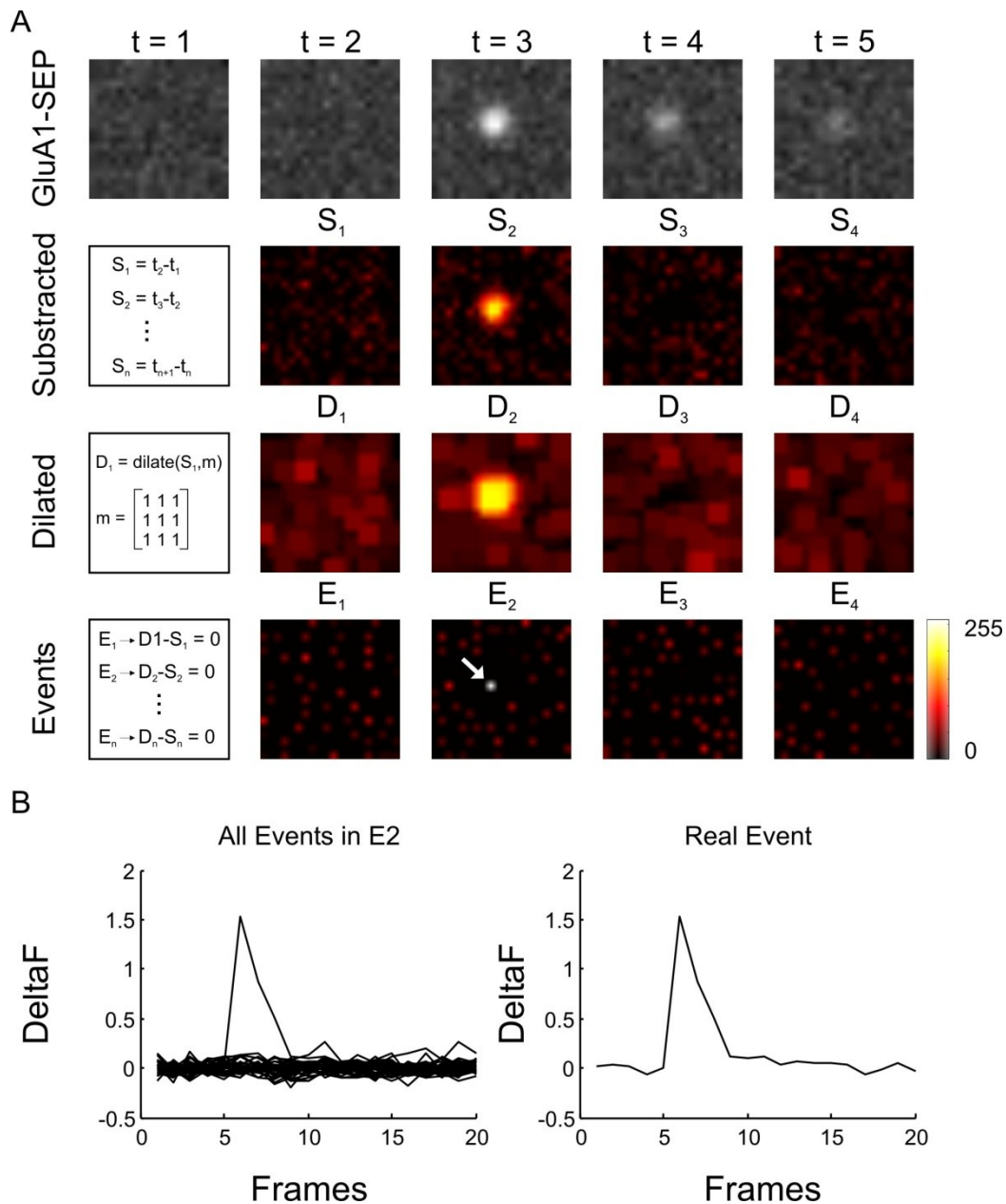


Figure 5.5 : Schéma de l'algorithme de détection de l'exocytose. **(A)** Simulation d'un événement d'exocytose avec bruit et diffusion de l'agrégat. Soustraction des images  $n+1-n$ . Dilatation des images et images des événements d'apparition locale de fluorescence. **(B)** Tous les événements retrouvés en E2 ont été reportés en  $\Delta F/F$  dans le temps. L'événement réel est facilement identifiable par l'amplitude plus élevée que le bruit ambiant.

Pour une séquence de 1000 images sur un ordinateur de table, l'algorithme prend environ 2.25 minutes afin d'identifier tous les points qui apparaissent dans la séquence d'image. Par exemple, pour un film donné (figure 5.4d) le nombre de cas d'augmentation

détectée s'élève à plus de 50 000 points. En utilisant une valeur d'intensité seuil, l'algorithme identifie 12 points possibles dans ce même exemple. J'ai aussi ajouté au logiciel une section semi-automatisée qui permet de visualiser chacun des événements sélectionnés, afin de m'assurer de la validité de chaque cas. Cette analyse semi-automatique prend 2-5 minutes par film.

#### **5.4.5 La CaMKII a un impact sur l'exocytose des GluA1 aux dendrites**

Afin de déterminer l'implication de la CaMKII dans l'exocytose des rAMPA aux dendrites, j'ai transfecté le GluA1-SEP dans les neurones et j'ai évalué trois conditions. Premièrement, j'ai enlevé l' $\alpha$ CaMKII endogène par l'utilisation d'un shRNA et je l'ai remplacé par un plasmide  $\alpha$ CaMKII-WT résistant au shRNA (situation contrôle WT). Deuxièmement, pour évaluer l'effet de la diminution du nombre d' $\alpha$ CaMKII, j'ai utilisé un shRNA dirigé contre l' $\alpha$ CaMKII. Troisièmement, pour tester le rôle du mutant E96K, j'ai co-transfecté le shRNA contre l' $\alpha$ CaMKII et j'ai exprimé le mutant E96K résistant aux shRNA. J'ai ensuite comparé les événements d'exocytose de SEP-GluA1 dans les trois conditions durant l'activité neuronale basale. J'ai analysé trois paramètres des événements d'exocytose: la fréquence normalisée par la longueur des dendrites, l'amplitude maximale de la fluorescence en  $\Delta F/F$  et le taux de décroissance de la fluorescence (temps pris pour atteindre 50% de la fluorescence initiale).

La fréquence des événements d'exocytose est  $\sim 1.75$  et  $\sim 1.5$  fois plus élevée en condition WT que pour le shRNA  $\alpha$ CaMKII et pour le mutant E96K respectivement. Cependant, la différence entre la fréquence pour chaque condition n'est pas significative  $p=0.2$  (shRNA) et  $p=0.35$  (E96K). L'amplitude maximale des événements d'exocytose est, en revanche, significativement plus élevée en condition WT que pour les autres conditions. Finalement, le taux de décroissance tend vers une valeur plus basse en condition de shRNA qu'en condition WT (0.75 fois plus bas  $p=0.08$ ) et le taux de décroissance en condition E96K est plus élevé (1.4 fois), mais varie beaucoup d'un neurone à l'autre.

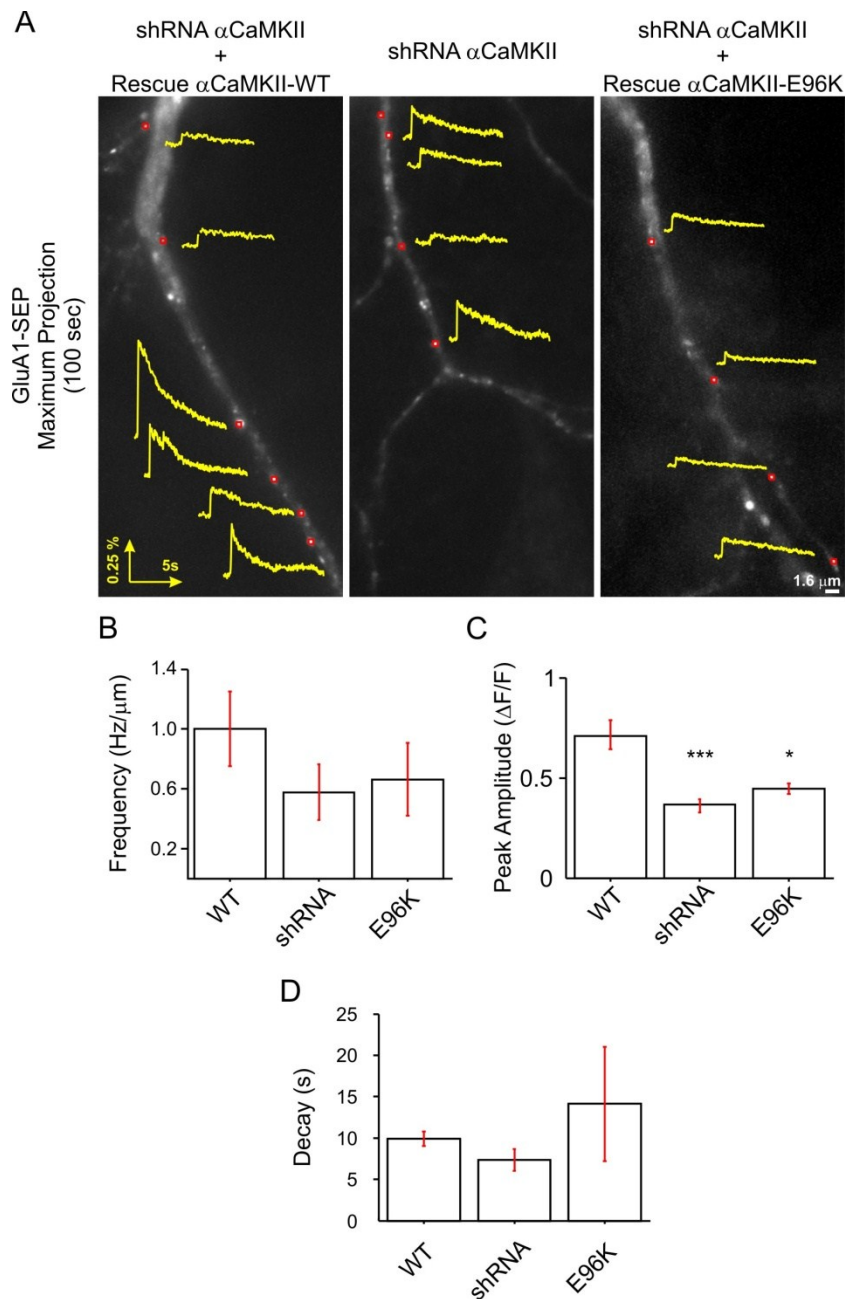


Figure 5.6 : Régulation de l'exocytose GluA1-SEP par la CaMKII. **(A)** Exemples d'événements d'exocytose de GluA1-SEP aux dendrites. Les événements individuels sont identifiés par un carré rouge; la trace de fluorescence correspondante à l'événement est en jaune. **(B)** Fréquence de l'exocytose.  $f_{WT}=1.0 \pm 0.25, n=10$  neurones;  $f_{shRNA}=0.58 \pm 0.18, n=9$  neurones  $p=0.2$ ;  $f_{E96K}=0.66 \pm 0.24, n=10$  neurones,  $p=0.35$ . **(C)** Amplitude maximale  $A_{WT}=0.64 \pm 0.05, n=110$  événements;  $A_{shRNA}=0.48 \pm 0.04, n=73$  événements,  $p<0.001$ ;  $A_{E96K}=0.43 \pm 0.03, n=111$  événements,  $p<0.05$ . **(D)** Taux de décroissance de la fluorescence des événements d'exocytose  $\tau_{WT}=9.39 \pm 0.9$  (s),  $n=110$  événements;  $\tau_{shRNA}=7.3 \pm 1.3, n=73$  événements  $p=0.08$ ;  $\tau_{E96K}=14.1 \pm 6.9, n=111$  événements.

## 5.5 Discussion

Dans la première section de ce chapitre, nous avons examiné une caractéristique spécifique du remodelage synaptique: le recrutement des rAMPA. Les résultats montrent une accumulation accrue de GluA1 au niveau des synapses ayant une accumulation synaptique de CaMKII et aussi aux synapses situées à proximité de la translocation dendritique de CaMKII. Cet enrichissement des récepteurs pourrait être, entre autre, dû à une immobilisation des récepteurs à la synapse. L'activation de la CaMKII peut mener à la phosphorylation de la queue c-terminale de la stargazine associée aux rAMPA par la CaMKII (Opazo, Labrecque et al. 2010). Alors, les complexes rAMPA-stargazine pourraient être phosphorylés dans les régions de translocation dendritique de la CaMKII pour ensuite diffuser vers la synapse et finalement être immobilisés augmentant ainsi le nombre de récepteurs à ces synapses. Aussi, il est possible qu'il y ait une exocytose accrue dans la région de la translocation dendritique de la CaMKII. Maletic-Savatic et al. (1998) ont en effet montré que l'exocytose dendritique a été renforcée par l'activité de la CaMKII (Maletic-Savatic, Koothan et al. 1998). Récemment, toutefois, il a été démontré que l'exocytose dépendante de l'activité des rAMPA, évoquée par le désencagement de glutamate, est dépendante de la voie Ras-ERK, indépendante de la CaMKII (Patterson, Szatmari et al. 2010). En théorie, la présence de TTX, utilisé dans ce protocole de désencagement réduit l'élévation de  $Ca^{2+}$  et l'activité de la CaMKII dans la dendrite, permettant ainsi de masquer une éventuelle contribution de l'enzyme dans l'exocytose de GluA1. Nous avons donc mis en place une méthode décrite précédemment pour évaluer le rôle de la CaMKII dans l'exocytose des GluA1 aux dendrites.

L'analyse des trois paramètres des événements d'insertion de GluA1-SEP fournit trois différentes informations sur les mécanismes d'exocytose. La fréquence d'exocytose est liée aux protéines qui régulent la fusion des vésicules intracellulaires à la membrane des neurones. Mes résultats montrent une tendance à la baisse de la fréquence d'exocytose dans les conditions de diminution du nombre de CaMKII et du mutant E96K, ce qui suggère que la CaMKII et sa liaison au microtubule peuvent agir comme transducteurs de la fusion de vésicules de GluA1-SEP. Plus d'expériences sont cependant nécessaires pour identifier la protéine cible régulée par la CaMKII dans l'exocytose des rAMPA. L'amplitude maximale



de chaque insertion synaptique peut être liée au nombre de récepteurs par vésicule insérée à la membrane. Alors, il est possible que la CaMKII régule le nombre de rAMPA dans les vésicules et/ou que la CaMKII régule la fusion spécifique d'un type de vésicule qui contient plusieurs récepteurs. Le taux de décroissance peut être associé à la diffusion membranaire des GluA1-SEP nouvellement insérés à la membrane et au photoblanchiment des GluA1-SEP par le laser d'excitation. Le taux de décroissance plus rapide obtenu en shRNA  $\alpha$ CaMKII peut être corrélé à des données de diffusion membranaire obtenues pour le chapitre 3 avec des QD, mais qui n'ont pas été montrées. Ces résultats montrent une augmentation de la diffusion membranaire des récepteurs GluA1-SEP lors de la diminution du nombre d' $\alpha$ CaMKII. Les résultats obtenus pour le taux de décroissance avec le mutant E96K sont difficiles à interpréter vu la grande variance entre les neurones. Je crois que cela peut être expliqué par une variabilité dans l'expression du mutant. Dans les expériences futures, il serait utile de quantifier les niveaux d'expression de la CaMKII en utilisant l'immunohistochimie sur les neurones imagés.

## 5.6 Conclusion

Les résultats décrivent un mécanisme potentiel pour le soutien de la spécificité de la plasticité synaptique. En provoquant une accumulation de CaMKII à la base des épines, les synapses excitatrices actives pourraient alors influencer la livraison du matériel transporté dans les dendritiques vers la synapse. Ce mécanisme complète en partie l'hypothèse de l'étiquette synaptique et de capture dans laquelle la CaMKII pourrait jouer un rôle clé (Frey and Morris 1998; Redondo, Okuno et al. 2011).

Les résultats sur l'exocytose sont au stade préliminaire. Les résultats obtenus avec les mutants de la CaMKII doivent être répétés et vérifiés. Il manque une analyse sur les coordonnées spatiales de l'exocytose, i.e si les événements apparaissent dans les zones synaptiques ou dans les dendrites. Il reste aussi à combiner ces mesures avec celles de dynamique spatiale de la CaMKII pour évaluer s'il y a une corrélation spatiale et temporelle entre la translocation dendritique de la CaMKII et les événements d'exocytose des rAMPA.

## 6 Discussion générale

Dans ce projet de doctorat, j'ai étudié les mécanismes moléculaires de la plasticité des synapses excitatrices dans les neurones en culture. Je me suis intéressé aux récepteurs au glutamate de type AMPA (rAMPA), car la variation du nombre des rAMPA synaptique, dépendante de l'activité neuronale, est connue comme une forme de plasticité synaptique et pourrait être un mécanisme moléculaire de la mémoire (Martin, Grimwood et al. 2000). Le nombre de rAMPA à une synapse donnée n'est pas fixe, mais varie en fonction d'un certain nombre de facteurs, comme le développement et l'activité synaptique (Collingridge, Isaac et al. 2004). Le trafic des rAMPA est un processus très dynamique. Ils échangent en permanence entre les sites synaptiques, les réserves extrasynaptiques et les réserves intracellulaires pour permettre l'état d'équilibre dans les synapses (Choquet and Triller 2003; Newpher and Ehlers 2008; Triller and Choquet 2008). Les rAMPA sont recrutés aux synapses soit à partir de vésicules intracellulaires via l'exocytose ou par diffusion latérale dans la membrane des récepteurs extrasynaptiques (Triller and Choquet 2008). Je me suis spécifiquement intéressé à la régulation de la diffusion latérale des rAMPA, car les mécanismes de régulation de la diffusion des rAMPA aux synapses étaient peu connus.

Pour élucider ces mécanismes, on doit utiliser des techniques qui permettent de visualiser les récepteurs dans les synapses ainsi que leur régulation. Par conséquent, ces techniques doivent posséder une haute résolution spatiale et temporelle; les méthodes de microscopie optique de suivi de molécules uniques semblent indiquées pour ce type d'études (Kim, Sanabria et al. 2010). Au chapitre 2, j'ai décrit l'élaboration d'une technique optique en molécule unique. Il existe cependant d'autres techniques qui peuvent apporter beaucoup d'information sur la dynamique des rAMPA aux synapses. La figure 6.1 présente quatre techniques optiques qui permettent de mesurer la diffusion des protéines dans un substrat biologique.

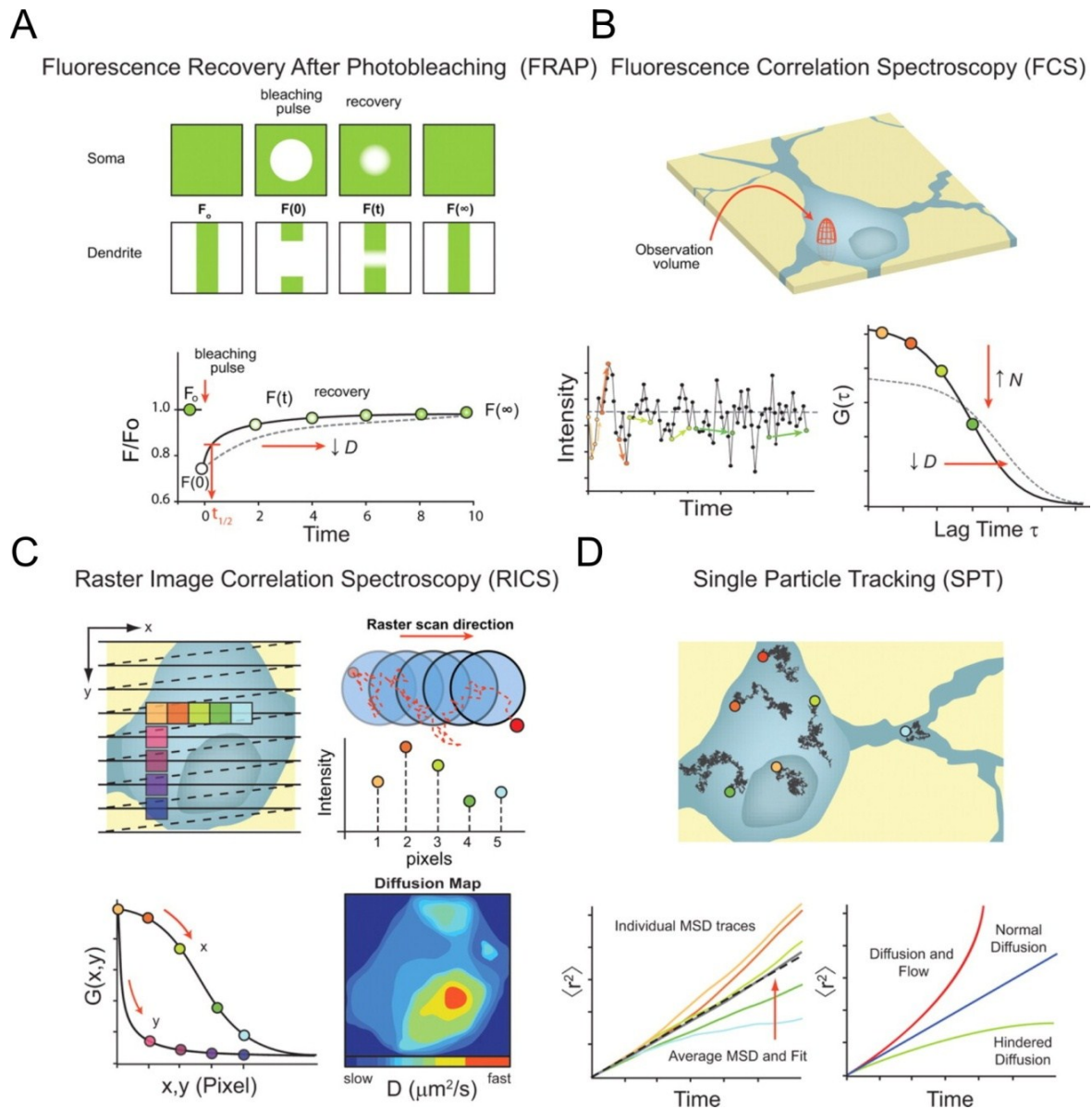


Figure 6.1 : Comparaison des méthodes optiques utilisées pour quantifier la mobilité des protéines dans les neurones (Kim, Sanabria et al. 2010).

La méthode optique la plus fréquemment utilisée pour étudier l'échange dynamique des protéines est le FRAP (figure 6.1a) car elle est facilement mise en œuvre (Svoboda, Tank et al. 1996; Majewska, Tashiro et al. 2000; Bats, Groc et al. 2007; Petrini, Lu et al. 2009). Les molécules étudiées sont généralement marquées par une protéine fluorescente comme la GFP ou la SEP (Ashby, De La Rue et al. 2004; Ashby, Maier et al. 2006). Le FRAP fournit une mesure de la diffusion des protéines et permet la mesure de la fraction

immobile (Axelrod, Ravdin et al. 1976). L'approche du FRAP présente deux inconvénients : le FRAP accède à des valeurs de coefficients de diffusion globale en moyennant une population entière et sa précision spatiale est limitée par la diffraction (200-300 nm). La technique de FRAP impose beaucoup de limitations spatio-temporelles pour l'étude de l'équilibre des récepteurs aux synapses (Triller and Choquet 2008). Malgré tout, le FRAP sur la SEP couplés aux rAMPA (SEP-rAMPA) a permis de démontrer que la diffusion latérale permet l'échange constitutif des rAMPA dans épines dendritiques et qu'elle est régulée par la morphologie de l'épine (Ashby, Maier et al. 2006). Aussi, il a permis de faire l'importante démonstration que les rAMPA diffusent dans la membrane plasmique des neurones dans des tranches de cerveau organotypiques à des taux comparables à ceux observés dans les neurones de culture (Heine, Thoumine et al. 2008; Makino and Malinow 2009). De plus, l'utilisation des récepteurs GluA1-SEP dans des tranches organotypiques d'hippocampe de rat a permis de démontrer que la majorité des rAMPA incorporés dans les synapses pendant la LTP provient de la diffusion latérale des récepteurs de surface (Makino and Malinow 2009; Patterson, Szatmari et al. 2010).

Une étude qui utilise le FRAP sur les microdomaines des synapses semble contester les résultats de mobilité synaptique des rAMPA démontré dans les chapitres 3 et 4 (Kerr and Blanpied 2012). Pour distinguer les mécanismes de diffusion latérale et l'effet du remodelage de la matrice des synapses (Blanpied, Kerr et al. 2008), les chercheurs ont évalué la mobilité des récepteurs intrasynaptiques en mesurant le FRAP sur les SEP-GluA1. Ils ont utilisé des neurones de culture d'hippocampe âgés de 21-27 jours qui ont été imagés par microscopie confocale en time-lapse. Les chercheurs ont comparé le retour de fluorescence au niveau des synapses qui ont été entièrement photoblanchies à celles dans lesquelles un sous-domaine (environ la moitié) a été blanchi. Cette approche a été appelée le photoblanchiment partiel de synapses. Le photoblanchiment partiel de synapses fournit une mesure de mobilité intrasynaptique, puisque la sous-région blanchie récupère la fluorescence par échange de récepteurs dans la synapse et avec des régions extrasynaptiques. Tandis que le retour de fluorescence des synapses complètement photoblanchies correspond au retour par diffusion latérale des récepteurs extrasynaptiques. Des travaux antérieurs suggèrent que le photoblanchiment complet des synapses révèle

l'échange substantiel de la population des rAMPA en moins de 10 min (Sharma, Fong et al. 2006; Heine, Groc et al. 2008; Frischknecht, Heine et al. 2009). En revanche, la modélisation prédit que si les récepteurs sont mobiles, ils vont se disperser dans la synapse en quelques centaines de millisecondes (Blanpied, Kerr et al. 2008; Heine, Groc et al. 2008). Ainsi, Kerr et Blanpied ont examiné le retour de fluorescence 10 s après photoblanchiment, mais également à 10 min après le photoblanchiment dans les mêmes expériences. Ils ont constaté que le retour de fluorescence pour les synapses complètement photoblanchies après 10 s est très faible suggérant une faible portion de récepteurs mobiles aux synapses. Aussi, ils ont démontré que l'intensité de fluorescence des synapses complètement et partiellement photoblanchies n'est pas significativement différente après 10 s et aussi non significative après 10 min. Ce qui démontre que la plupart des rAMPA ne diffusent pas librement dans la synapse, indiquant qu'ils sont stabilisés dans une matrice qui détermine leur position dans les microdomaines synaptiques. De plus, en utilisant la microscopie en time-lapse, ils ont démontré que la position des rAMPA dans les microdomaines synaptiques est régulé par le remodelage du cytosquelette d'actine plutôt que par la diffusion latérale.

Ces résultats contrastent fortement avec les résultats obtenus par d'autres laboratoires ainsi qu'avec mes propres résultats. Nous démontrons une grande mobilité des rAMPA aux synapses tandis que Kerr et Blanpied montrent des rAMPA extrêmement stables aux synapses. Je crois que ces différences peuvent s'expliquer par le fait que mes travaux et ceux de Kerr et Blanpied mesurent la mobilité de deux différentes populations de rAMPA. L'étude de ces derniers mesure une population de récepteurs synaptiques stabilisés dans la synapse tandis que mes travaux accèdent à une population extrasynaptique qui s'incorpore à la synapse. En effet, d'un point de vue méthodologique, les données en FRAP accèdent à une mesure de diffusion globale, il est ainsi possible que Kerr et Blanpied ne puissent mesurer le coefficient de diffusion d'une petite fraction des récepteurs individuels qui diffuse rapidement dans la synapse. D'un autre côté, le suivi de molécules uniques favorise le marquage des récepteurs extrasynaptiques, ce qui biaise sûrement les données vers une population de récepteurs plus mobiles. De plus, il est aussi possible que l'étiquette (anticorps-sonde) nuise à l'incorporation des récepteurs dans

certains microdomaines de la synapse où les récepteurs sont plus stables. Finalement, dans leurs protocoles expérimentaux, Kerr et Blanpied ont utilisé des cultures considérablement plus âgées que celles utilisées dans mes expériences 21-27 jours au lieu de 11-14 jours. Durant dans le développement in vitro, la diffusion de surface des rAMPA situés dans la zone synaptique diminue de façon marquée avec l'âge (~70% entre 10 et 15 jours en culture) (Groc, Gustafsson et al. 2006). Cette diminution dans le développement peut être expliquée par plusieurs facteurs, tels que le développement de la matrice extracellulaire autour de la synapse, la formation d'un anneau de molécules d'adhésion autour de la fente synaptique et/ou les changements développementaux dans la forme de l'épine synaptique (Groc, Gustafsson et al. 2006). Finalement, je crois que les récepteurs extrasynaptiques sont mobiles dans les domaines extrasynaptiques, qu'ils peuvent être immobilisés à la synapse lors des protocoles de plasticité, que certains récepteurs vont se lier aux protéines d'ancrage synaptique avec une faible constante d'association, tandis que d'autres pourront être insérés avec une grande constante d'association. La différence entre un récepteur stable et de passage à la synapse va s'exprimer par le type de phosphorylation de sa queue c-terminale et de la phosphorylation de ces TARPs, de l'encombrement moléculaire dans la synapse et par la maturité de la synapse.

D'autres techniques optiques permettent de mesurer les coefficients de diffusion dans les tissus vivants tels le *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (FCS) (Magde, Webb et al. 1972) et le *Raster Image Correlation Spectroscopy* (RICS) (Digman, Brown et al. 2005). Elles utilisent des protéines marquées par un fluorophore et un faisceau laser focalisé sur une section de la cellule (figure 5.1b-c). Les analyses de fluctuation d'intensité de fluorescence à travers le point focal (FCS) ou d'une région imagée (RISC) révèlent la diffusion des molécules (Magde, Webb et al. 1972; Digman, Brown et al. 2005). Dans les deux cas, les fluctuations de la fluorescence mesurées sont comparées à la fluorescence moyenne sous la forme d'une fonction d'autocorrélation, la  $G(\tau)$ . L'intérêt des mesures de corrélation est qu'elles peuvent simultanément accéder à un large éventail de paramètres (Kim, Sanabria et al. 2010). La mobilité des molécules peut être dérivée de la courbe d'autocorrélation expérimentale car la  $G(\tau)$  peut être directement liée au coefficient de diffusion ( $D$ ). En plus de la mobilité, l'évaluation directe de la concentration des molécules

est possible et le nombre de fluorophores ( $N$ ) dans le volume focal est inversement proportionnel à l'amplitude de  $G(\tau)$ . Le FCS est extrêmement sensible et fournit un accès rapide et temporel avec une haute résolution spatiale. Le principal avantage du RICS est qu'il permet d'obtenir des cartes de diffusion sur la cellule, mais avec une faible résolution spatiale.

Le désavantage commun des techniques de corrélation est qu'elles fonctionnent pour des sondes à faibles concentrations dans la gamme nanomolaire et que celles-ci doivent absolument être mobiles (Kim, Sanabria et al. 2010). Une concentration trop élevée de molécules dans le volume focal augmente la moyenne de fluorescence, diminuant les contributions relatives de chaque molécule. Aussi, les molécules doivent nécessairement être mobiles dans les mesures de FCS et la gamme de coefficients est limitée pour les valeurs faibles ( $D$  de  $\sim 500$  à  $0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). La gamme de diffusion pour le RICS est plus appropriée pour la biologie ( $D$  de  $\sim 100$  à  $0,001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Cependant la résolution spatiale pour calculer les cartes de diffusion est limitée à  $0.8 \mu\text{m}$  par  $0.8 \mu\text{m}$ , ce qui est trop grand pour l'étude des synapses (Kim, Sanabria et al. 2010). Alors, ces techniques limitent l'étude des récepteurs aux synapses car ceux-ci sont fonctionnellement concentrés à ces endroits de petites dimensions et la fraction des récepteurs immobilisés aux synapses est directement impliquée dans la force synaptique. Afin d'évaluer la mobilité et les mécanismes d'immobilisation des récepteurs aux synapses, j'ai eu besoin d'une technique qui possède une haute résolution spatiale et temporelle et qui donne accès à toute la gamme de diffusion des molécules aux synapses.

Le suivi de molécules uniques remplit toutes les conditions pour l'étude de la régulation des récepteurs dans un environnement confiné telle la synapse mais son application en laboratoire n'est pas simple. Le chapitre 2 décrit la mise en œuvre d'une telle technique dans un laboratoire. Le suivi de particules ou de molécules uniques (SPT) consiste à suivre les mouvements de récepteurs individuels à la membrane des neurones (figure 6.1d). Les récepteurs doivent être liés à une étiquette spécifique détectable en imagerie optique soit par une bille de latex, un fluorophore ou à l'aide d'un point quantique (QD) (Borgdorff and Choquet 2002; Tardin, Cognet et al. 2003; Groc, Heine et al. 2004).

Le SPT demande une analyse plus complexe que le FRAP ou le FCS, mais il fournit des informations sur l'hétérogénéité de la population, ainsi que sur le comportement de diffusion des molécules individuelles (Kusumi, Sako et al. 1993). L'interprétation des données de SPT prend généralement en compte plusieurs paramètres tels que le coefficient de diffusion (zone explorée par unité de temps), le comportement de diffusion (libre, confiné, etc.) ou le temps de résidence dans un compartiment membranaire. Le principal désavantage de cette technique est que la taille de la particule attachée peut influencer la capacité des molécules à entrer dans des espaces confinés comme la fente synaptique (Groc, Lafourcade et al. 2007). Un second désavantage est que la technique de marquage des récepteurs favorise les récepteurs extrasynaptiques sélectionnant potentiellement ainsi une population de récepteurs plus mobiles à la membrane.

Une façon de contourner ces problèmes est l'utilisation du spt-PALM qui permet de suivre les molécules uniques à l'aide de petits fluorophores (Manley, Gillette et al. 2008). Les protéines sont étiquetées par fusion d'un fluorophore photo-activable; il est ainsi possible d'allumer une faible proportion des protéines par photoconversion et d'identifier les protéines uniques avec une résolution nanométrique (Betzig, Patterson et al. 2006). En combinant la technique de suivi de molécules uniques et le PALM, il est facile d'obtenir un très grand nombre de trajectoires (figure 6.2). L'avantage de cette technique est que les étiquettes sont très petites et l'accès aux synapses n'est pas ou que très peu altéré. Aussi, la photoconversion n'est pas dépendante de la localisation spatiale des récepteurs, permettant l'étude de toute la population de récepteurs et ne devrait pas favoriser le suivi d'une population mobile. Cependant, la fusion des fluorophores aux protéines pourrait conduire à des problèmes, car on doit absolument utiliser la surexpression, alors les niveaux d'expression élevés et la fusion de l'étiquette pourraient causer des changements dans le comportement de la protéine étudiée. Aussi, les trajectoires obtenues sont courtes, au mieux de quelques secondes (Manley, Gillette et al. 2008). De plus, à moins d'utiliser des protéines fluorescentes photoactivables et sensibles au pH, qui ne sont pas encore disponibles, il n'est pas possible de distinguer une protéine membranaire d'une protéine intracellulaire. Cette technique est cependant très puissante pour cartographier la mobilité des protéines intracellulaires.



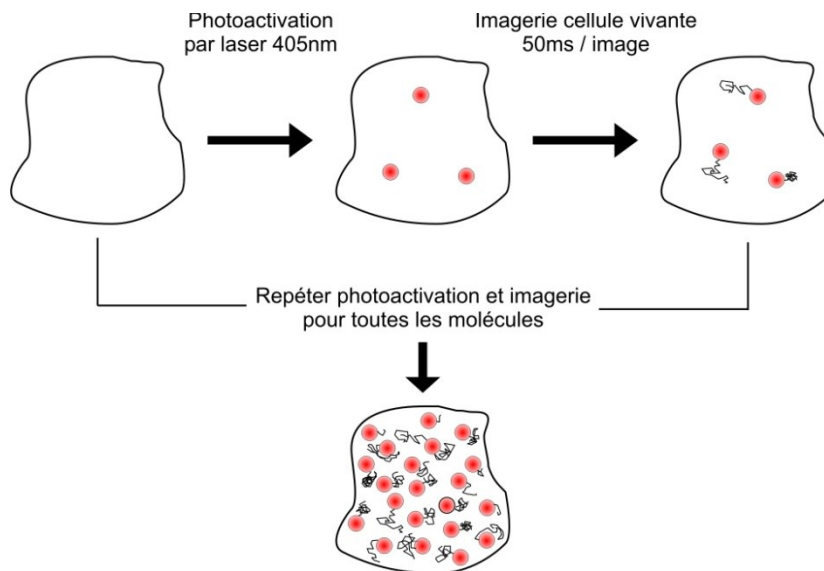


Figure 6.2 : Le spt-PALM combine la technique du PALM et de suivi de molécules uniques pour obtenir des trajectoires de protéines fusionnées avec des protéines photoconvertibles. Chaque molécule photoactivée est localisée avec résolution nanométrique et l'imagerie de celle-ci permet l'obtention de trajectoires permettant de calculer les coefficients de diffusion, le confinement et le temps de résidence.

Au lieu de s'appuyer sur la photoactivation stochastique d'une étiquette fusionnée à la protéine étudiée, il est possible d'utiliser l'étiquetage en temps réel des protéines endogènes de surface avec des anticorps attachés à des fluorophores (Giannone, Hosity et al. 2010). Cette approche nommée uPAINT utilise un marquage en continu en exposant constamment et sans lavage les cellules aux étiquettes fluorescentes en solution. Le uPAINT utilise la microscopie en éclairage oblique de sorte que seules des sondes fluorescentes à proximité de la surface de la cellule sont excitées et imagées. Non seulement ceci permet de résoudre les problèmes potentiels de la fusion de protéine, mais l'utilisation de fluorophores permet de suivre les récepteurs membranaires pendant quelques dizaines de secondes, beaucoup plus longtemps qu'avec le spt-PALM. Il est possible d'acquérir des données provenant de milliers de molécules pour une seule cellule, ce qui permet une cartographie détaillée des cellules. Il est ainsi possible de comparer les différences dans le comportement de diffusion des rAMPA endogènes dans les neurones de l'hippocampe.

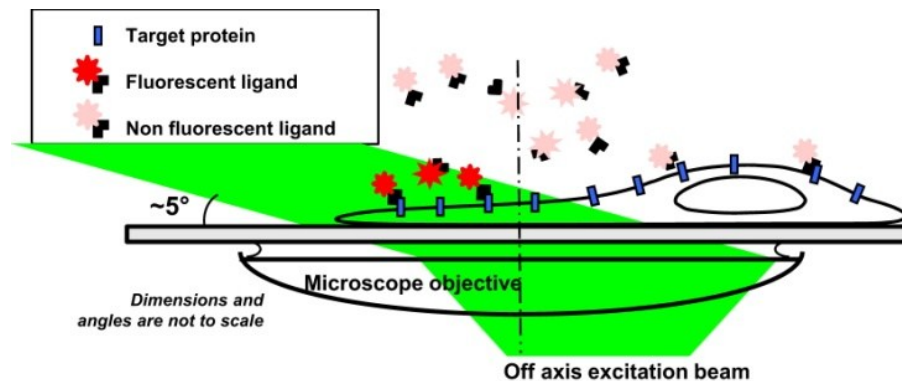


Figure 6.3 : Schéma de l'installation expérimentale pour le uPaint. Une faible concentration de ligands fluorescents est introduite dans le milieu extracellulaire. L'éclairage oblique sur l'échantillon est utilisé pour exciter les ligands fluorescents qui se sont liés à la surface de la cellule, ignorant les molécules dans la solution au-dessus (Giannone, Hosy et al. 2010).

Peu importe la modalité d'imagerie choisie, les techniques de suivi de molécules uniques ont permis de mettre en évidence la mobilité des rAMPA aux synapses. En effet, les rAMPA peuvent traverser une zone active en quelques millisecondes seulement par diffusion latérale (Heine, Groc et al. 2008) et peuvent être immobilisés à la densité postsynaptique (PSD) via les protéines d'échafaudage et les éléments du cytosquelette (Lisman and Raghavachari 2006; Newpher and Ehlers 2008). Cette hétérogénéité de la diffusion synaptique est régulée entre autres par l'activité synaptique qui peut modifier l'équilibre entre les compartiments synaptiques, extrasynaptiques et intracellulaires afin de favoriser le recrutement des rAMPA synaptiques (Ehlers, Heine et al. 2007).

Aussi, plusieurs études montrent l'implication de la CaMKII dans la plasticité synaptique (Asrican et al., 2007, Hayashi et al., 2000, Lee et al., 2009, Lisman et al., 2002, Merrill et al., 2005, Pettit et al., 1994, Poncer et al., 2002, Rongo and Kaplan, 1999, Sanhueza et al., 2007 et Zhang et al., 2008), et son activation par le rNMDA déclenche une augmentation du nombre de rAMPA aux synapses (Hayashi, Shi et al. 2000). Au début de ce projet de doctorat, les mécanismes qui relient la régulation de la diffusion des rAMPA et leur augmentation aux synapses par la CaMKII n'étaient pas connus.

Au chapitre 3, nous avons directement évalué si l'activation et la translocation postsynaptique de la CaMKII peuvent recruter les rAMPA au niveau des synapses en piégeant les récepteurs qui diffusent librement dans la membrane plasmique. À cette fin, nous avons soit activé ou inhibé la CaMKII en utilisant un certain nombre d'outils génétiques, des approches pharmacologiques et physiologiques. Nos résultats indiquent que l'activation de la CaMKII immobilise les rAMPA de surface dans les sites synaptiques. De plus, nous avons montré que cette nouvelle fonction de la CaMKII est médiée par la phosphorylation de stargazine et la liaison de son extrémité c-terminale aux protéines d'échafaudage de domaines PDZ, comme la PSD95. Enfin, nous avons montré que le piégeage de rAMPA dépendant de la CaMKII aux sites synaptiques a un fort impact sur la dépression paillée, une forme de plasticité à court terme qui dépend fortement de la mobilité latérale des rAMPA. Nos expériences ont mis en lumière un nouveau mécanisme de l'interaction dynamique entre deux éléments clés de la synapse excitatrice et le réglage fin de la transmission synaptique.

Parue un mois avant à la publication de notre article, une seconde étude a démontré l'importance de la phosphorylation de stargazine dans la transmission synaptique (Sumioka, Yan et al. 2010). Sumioka et al. ont muté la stargazine et ont trouvé que la phosphorylation de stargazine régule l'activité synaptique des rAMPA *in vivo*. Ils ont également constaté que la stargazine interagit avec la membrane chargée négativement d'une manière dépendante de la phosphorylation. La phosphorylation de stargazine éloigne la queue c-terminale de la membrane et permet l'interaction entre la stargazine et la protéine d'ancrage des rAMPA aux synapses, la PSD-95 (figure 6.4). Ces résultats combinés à notre étude suggèrent donc qu'au niveau basal la stargazine non phosphorylée peut diffuser dans les synapses car la liaison à la PSD-95 est physiquement impossible. Lors des processus de plasticité, l'activation de la CaMKII augmente la phosphorylation de la stargazine, éloignant la queue c-terminale de la membrane, et les complexes rAMPA-stargazine peuvent être capturés aux synapses par la liaison maintenant possible sur la PSD-95.

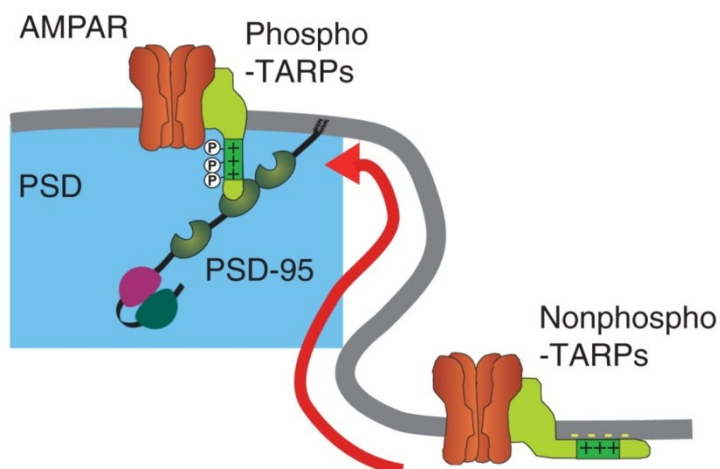


Figure 6.4 : Modèle pour la phosphorylation des TARP (stargazine) qui régule les rAMPA aux synapses via les bicouches lipidiques. L'interaction de bicouches lipidiques chargées négativement avec la stargazine inhibe la liaison de la stargazine à la PSD-95. La dissociation des lipides de la stargazine phosphorylée conduit à sa liaison avec la PSD-95 au niveau des synapses.

À l'aide de ces études sur la dynamique des rAMPA, il est possible d'élaborer un modèle d'insertion aux synapses en trois étapes (Opazo and Choquet 2010), la première étape étant l'exocytose des vésicules de rAMPA à la membrane extrasynaptique, la deuxième la diffusion des récepteurs extrasynaptiques aux synapses, la troisième l'immobilisation des rAMPA aux synapses (figure 6.5).

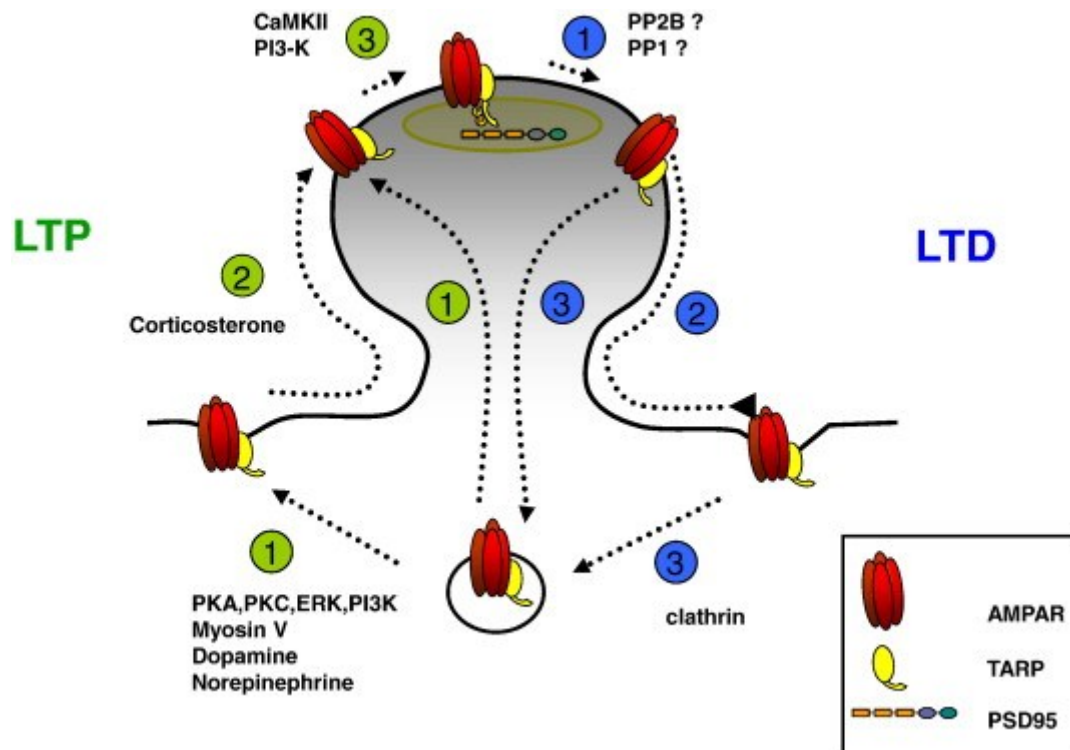


Figure 6.5 : Régulation des rAMPA pendant la plasticité synaptique. Pendant la LTP (en vert), les rAMPA sont insérés dans la dendrite ou dans l'épine près de la PSD (ellipse verte) par la myosine V et/ou par l'intermédiaire d'événements de phosphorylation (étape 1). Les rAMPA nouvellement insérés (ou pré-existants) diffusent rapidement vers des sites synaptiques (étape 2) où ils sont pris au piège par la phosphorylation déclenchée par la CaMKII avec la stargazine, ce qui augmente l'affinité de PSD95 (étape 3). Pendant la LTD (en bleu), l'ordre inverse des événements est susceptible d'avoir lieu. Les rAMPA pourraient être déstabilisés par l'intermédiaire de la déphosphorylation par PP1 et PP2B (étape 1). Les rAMPA diffusent à l'extérieur des synapses (étape 2) où ils subissent l'endocytose par la clathrine (étape 3) (Opazo and Choquet 2010).

Le modèle en trois étapes repose sur le fait que l'exocytose des rAMPA se produit sur les sites extrasynaptiques dans les régions dendritiques (Yudowski, Puthenveedu et al. 2007; Lin, Makino et al. 2009; Makino and Malinow 2009) ou sur des sites pérисynaptiques dans les épines dans les domaines riches en syntaxine-4 (Kennedy, Davison et al. 2010). L'insertion hors synapses peut aider à préserver l'intégrité topologique de la densité post-synaptique, elle occupe environ 15% de la surface de l'épine (Harris and Kater 1994). Une insertion directe de vésicules à la PSD pourrait perturber les structures de la PSD. De plus, les rAMPA ont une faible affinité de liaison pour le glutamate et doivent être regroupés en opposition directe avec les sites de libération présynaptique afin de détecter la

concentration de glutamate en millimolaires pour ouvrir le canal (Lisman and Raghavachari 2006; MacGillavry, Kerr et al. 2011). Une exocytose située directement à la PSD pourrait modifier l'alignement synaptique et altérer la fonction synaptique. Aussi, l'exocytose des rAMPA (étape 1) et la diffusion latérale des récepteurs (étape 2) ne sont pas suffisants pour le recrutement de rAMPA synaptiques, alors une étape d'immobilisation (étape 3) est nécessaire pour l'accumulation synaptique des rAMPA (Opazo and Choquet 2010).

La vue d'ensemble décrite ci-dessus soulève plus de questions qu'elle n'apporte de réponses (Opazo, Sainlos et al. 2011). Au niveau moléculaire, il sera nécessaire d'identifier la stœchiométrie exacte du complexe PSD-95-rAMPA-stargazine et sa régulation durant la LTP. Au niveau cellulaire, il sera essentiel d'examiner si d'autres MAGUK ou des membres du TARP peuvent prendre en charge l'immobilisation des rAMPA. En outre, il sera essentiel d'évaluer si la LTD peut être induite par une déphosphorylation de stargazine et/ou par la coupure de la queue c-terminale de stargazine par la calpaïne (Yu, Rostamiani et al. 2011), permettant la libération du complexe AMPA-stargazine des synapses. Au niveau physiologique, il sera essentiel de déterminer si l'immobilisation synaptique des rAMPA est une exigence absolue pour la LTP. L'étude de la régulation de la diffusion latérale des rAMPA a ouvert de nouvelles voies pour la compréhension du mécanisme moléculaire qui sous-tend la plasticité synaptique et la mémoire.

Au chapitre 4, en utilisant le suivi de points quantiques uniques et des outils de shRNA, j'ai évalué l'impact des sous-unités  $\alpha/\beta$  de la CaMKII sur la diffusion membranaire des rAMPA dans les synapses. Une différence importante entre les sous-unités qui n'a pas été relevée au chapitre 4 est que l'ARN de l' $\alpha$ CaMKII peut être traduite localement sous les synapses en fonction de l'activité (Miller, Yasuda et al. 2002). La traduction locale d' $\alpha$ CaMKII permet d'en augmenter le nombre et de changer les ratios  $\alpha/\beta$  CaMKII dans les neurones. C'est pourquoi il est important de bien comprendre les contributions relatives de chaque sous-unité dans la plasticité synaptique.

Aussi, une lacune de l'étude est que l'on ne connaît pas la stœchiométrie des CaMKII dans nos conditions de shRNA. Les techniques d'immunoprécipitation permettent

de mesurer ce ratio, mais en moyennant plusieurs CaMKII. Il serait réellement intéressant de pouvoir mesurer les ratios  $\alpha/\beta$ CaMKII directement dans une synapse. Je crois qu'il serait possible de mesurer le ratio  $\alpha/\beta$  sur une enzyme unique *in situ* en utilisant la technique de PALM combinée au photoblanchiment en une étape. Premièrement, on doit fusionner chaque isomère avec une protéine photoactivable ayant des spectres d'émissions différents en les surexprimant dans les neurones. Deuxièmement, sur tissus fixés, il est possible d'identifier une CaMKII unique avec la photoconversion et de mesurer le ratio de photoblanchiment en une étape pour chacun des canaux. Le nombre d'étapes de photoblanchiment nous donnera l'information sur le nombre de monomères de CaMKII dans l'enzyme. En comptant ces événements, il sera possible d'obtenir les ratios  $\alpha/\beta$  pour les CaMKII dans les conditions expérimentales choisies. Il a déjà été montré qu'une imagerie avec deux protéines photoactivables en simultané est possible (Andresen, Stiel et al. 2008; Subach, Patterson et al. 2009). Ces travaux permettront de mesurer directement la stoechiométrie des protéines et de mieux comprendre l'implication des isoformes de la CaMKII impliquées dans l'apprentissage et la mémoire.

Les travaux qui ont porté sur l'exocytose des rAMPA dans les dendrites vont permettre d'évaluer l'implication du rôle de la CaMKII dans ces mécanismes de plasticité. De plus, il serait intéressant d'évaluer les propriétés de diffusion des récepteurs nouvellement apportés à la membrane par la technique de type RICS pour obtenir des cartes de diffusion des récepteurs. Finalement, les mécanismes impliqués dans la LTP peuvent être d'origine présynaptique et/ou postsynaptique (Nicoll and Malenka 1995). Il sera intéressant de combiner les algorithmes de détection de l'exocytose sur des protéines vésiculaires présynaptiques, des marqueurs fluorescents de protéines postsynaptiques et l'imagerie en molécules uniques de récepteurs membranaires pour révéler l'interaction entre les composantes présynaptiques et postsynaptiques. Ce type de travail va permettre de mieux comprendre la synapse dans son ensemble au lieu de la considérer comme deux entités indépendante.

## 7 Conclusion

Le mouvement des récepteurs à la membrane est un mécanisme qui permet de changer rapidement le nombre de récepteurs fonctionnels aux synapses lors de la transmission et de la plasticité synaptique. Cet échange continu des récepteurs aux synapses est une conséquence d'une régulation perpétuelle de l'endocytose/l'exocytose et de la régulation de la diffusion latérale des récepteurs dans la membrane. Tous ces mécanismes sont interdépendants et sont réglementés par l'activité neuronale et par les interactions avec les protéines de la PSD. Dans une synapse, la valeur moyenne du nombre de récepteurs correspond à un équilibre entre les récepteurs entrant ou sortant par la membrane. Alors, la stabilité de la PSD et de ses récepteurs associés doit être considérée dans un contexte d'assemblage moléculaire en équilibre, permettant la permutation de ses éléments, sans en changer la valeur moyenne. Au début de ce projet de doctorat, les mécanismes impliquant la variabilité du nombre de rAMPA aux synapses dans les paradigmes de plasticité synaptique n'étaient pas encore connus. C'est dans cette optique que j'ai développé des paradigmes de plasticité qui induisent la LTP dans les neurones de l'hippocampe en culture. J'ai développé des techniques d'imagerie à haute résolution spatiale et temporelle afin d'évaluer les mécanismes moléculaires qui permettent de mesurer l'augmentation du nombre de récepteurs aux synapses. Les résultats obtenus dans cette thèse nous permettent de conclure que la CaMKII déclenche la LTP en augmentant le nombre de récepteurs à la membrane et en piégeant les rAMPA aux synapses.

Dans le futur, les techniques de molécules uniques permettront d'étudier la dynamique des protéines dans des tissus intacts comme les tranches de cerveaux et in vivo. Il sera intéressant de suivre l'évolution des techniques et leur utilisation dans ces tissus complexes. Il sera alors possible de mesurer l'impact des propriétés de diffusion dans des modèles animaux pour étudier l'apprentissage, la mémoire et éventuellement les maladies neurodégénératives.



## 8 Bibliographie

- Adesnik, H., R. A. Nicoll, et al. (2005). "Photoinactivation of native AMPA receptors reveals their real-time trafficking." Neuron **48**(6): 977-85.
- Ahmad, M., J. S. Polepalli, et al. (2012). "Postsynaptic complexin controls AMPA receptor exocytosis during LTP." Neuron **73**(2): 260-7.
- Andresen, M., A. C. Stiel, et al. (2008). "Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy." Nat Biotechnol **26**(9): 1035-40.
- Ashby, M. C., S. A. De La Rue, et al. (2004). "Removal of AMPA receptors (AMPA receptors) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic AMPARs." J Neurosci **24**(22): 5172-6.
- Ashby, M. C., S. R. Maier, et al. (2006). "Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology." J Neurosci **26**(26): 7046-55.
- Axelrod, D., P. Ravdin, et al. (1976). "Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(12): 4594-8.
- Banke, T. G., D. Bowie, et al. (2000). "Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase." J Neurosci **20**(1): 89-102.
- Barria, A., D. Muller, et al. (1997). "Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation." Science **276**(5321): 2042-5.
- Bats, C., L. Groc, et al. (2007). "The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking." Neuron **53**(5): 719-34.
- Bayer, K. U., P. De Koninck, et al. (2001). "Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation." Nature **411**(6839): 801-5.
- Bekkers, J. M. and C. F. Stevens (1990). "Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus." Nature **346**(6286): 724-9.
- Bennett, M. K., N. E. Erondy, et al. (1983). "Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase that is highly concentrated in brain." J Biol Chem **258**(20): 12735-44.
- Bernard, V., M. Decossas, et al. (2006). "Intraneuronal trafficking of G-protein-coupled receptors in vivo." Trends Neurosci **29**(3): 140-7.
- Betzig, E., G. H. Patterson, et al. (2006). "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution." Science **313**(5793): 1642-5.
- Blanpied, T. A., J. M. Kerr, et al. (2008). "Structural plasticity with preserved topology in the postsynaptic protein network." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(34): 12587-92.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-9.
- Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-56.
- Boehm, J., M. G. Kang, et al. (2006). "Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1." Neuron **51**(2): 213-25.

- Bonneau, S., M. Dahan, et al. (2005). "Single quantum dot tracking based on perceptual grouping using minimal paths in a spatiotemporal volume." IEEE Trans Image Process **14**(9): 1384-95.
- Borgdorff, A. J. and D. Choquet (2002). "Regulation of AMPA receptor lateral movements." Nature **417**(6889): 649-53.
- Borgesius, N. Z., G. M. van Woerden, et al. (2011). "betaCaMKII plays a nonenzymatic role in hippocampal synaptic plasticity and learning by targeting alphaCaMKII to synapses." J Neurosci **31**(28): 10141-8.
- Brocke, L., L. W. Chiang, et al. (1999). "Functional implications of the subunit composition of neuronal CaM kinase II." J Biol Chem **274**(32): 22713-22.
- Buchhave, P. (1991). "Particle Image Velocimetry - Status and Trends." Experimental Heat Transfer, Fluid Mechanics, and Thermodynamics: 35-47.
- Calakos, N. and R. H. Scheller (1996). "Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description." Physiol Rev **76**(1): 1-29.
- Carroll, R. C., E. C. Beattie, et al. (2001). "Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **2**(5): 315-24.
- Carroll, R. C., D. V. Lissin, et al. (1999). "Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures." Nat Neurosci **2**(5): 454-60.
- Carroll, R. C., R. A. Nicoll, et al. (1998). "Effects of PKA and PKC on miniature excitatory postsynaptic currents in CA1 pyramidal cells." J Neurophysiol **80**(5): 2797-800.
- Chandrasekhar, S. (1943). "Stochastic problems in physics and astronomy." Reviews of Modern Physics **15**(1): 0001-0089.
- Cheezum, M. K., W. F. Walker, et al. (2001). "Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles." Biophys J **81**(4): 2378-88.
- Chen, L., D. M. Chetkovich, et al. (2000). "Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms." Nature **408**(6815): 936-43.
- Chen, Y., J. Vela, et al. (2008). "'Giant' multishell CdSe nanocrystal quantum dots with suppressed blinking." J Am Chem Soc **130**(15): 5026-7.
- Cho, M. H., X. Cao, et al. (2007). "Dentate gyrus-specific manipulation of beta-Ca2+/calmodulin-dependent kinase II disrupts memory consolidation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(41): 16317-22.
- Choi, H. S., W. Liu, et al. (2007). "Renal clearance of quantum dots." Nat Biotechnol **25**(10): 1165-70.
- Choi, J., J. Ko, et al. (2002). "Phosphorylation of stargazin by protein kinase A regulates its interaction with PSD-95." J Biol Chem **277**(14): 12359-63.
- Choquet, D. (2010). "Fast AMPAR trafficking for a high-frequency synaptic transmission." Eur J Neurosci **32**(2): 250-60.
- Choquet, D. and A. Triller (2003). "The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane." Nat Rev Neurosci **4**(4): 251-65.
- Cingolani, L. A. and Y. Goda (2008). "Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy." Nat Rev Neurosci **9**(5): 344-56.
- Collingridge, G. L., J. T. Isaac, et al. (2004). "Receptor trafficking and synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **5**(12): 952-62.

- Collingridge, G. L., S. J. Kehl, et al. (1983). "Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus." *J Physiol* **334**: 33-46.
- Correia, S. S., S. Bassani, et al. (2008). "Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation." *Nat Neurosci* **11**(4): 457-66.
- Cox, I. J. (1993). "A Review of Statistical-Data Association Techniques for Motion Correspondence." *International Journal of Computer Vision* **10**(1): 53-66.
- Dahan, M., S. Levi, et al. (2003). "Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking." *Science* **302**(5644): 442-5.
- De Koninck, P. and H. Schulman (1998). "Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations." *Science* **279**(5348): 227-30.
- Derkach, V., A. Barria, et al. (1999). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 3269-74.
- Digman, M. A., C. M. Brown, et al. (2005). "Measuring fast dynamics in solutions and cells with a laser scanning microscope." *Biophys J* **89**(2): 1317-27.
- Dubertret, B., P. Skourides, et al. (2002). "In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles." *Science* **298**(5599): 1759-1762.
- Earnshaw, B. A. and P. C. Bressloff (2008). "Modeling the role of lateral membrane diffusion in AMPA receptor trafficking along a spiny dendrite." *J Comput Neurosci* **25**(2): 366-89.
- Ehlers, M. D. (2000). "Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting." *Neuron* **28**(2): 511-25.
- Ehlers, M. D., M. Heine, et al. (2007). "Diffusional trapping of GluR1 AMPA receptors by input-specific synaptic activity." *Neuron* **54**(3): 447-60.
- English, J. D. and J. D. Sweatt (1996). "Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation." *J Biol Chem* **271**(40): 24329-32.
- Enoki, R., Y. L. Hu, et al. (2009). "Expression of long-term plasticity at individual synapses in hippocampus is graded, bidirectional, and mainly presynaptic: optical quantal analysis." *Neuron* **62**(2): 242-53.
- Esteban, J. A., S. H. Shi, et al. (2003). "PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity." *Nat Neurosci* **6**(2): 136-43.
- Figurov, A., H. Boddeke, et al. (1993). "Enhancement of AMPA-mediated synaptic transmission by the protein phosphatase inhibitor calyculin A in rat hippocampal slices." *Eur J Neurosci* **5**(8): 1035-41.
- Fink, C. C., K. U. Bayer, et al. (2003). "Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII." *Neuron* **39**(2): 283-97.
- Frey, U., Y. Y. Huang, et al. (1993). "Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons." *Science* **260**(5114): 1661-4.
- Frey, U. and R. G. Morris (1998). "Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation." *Trends Neurosci* **21**(5): 181-8.
- Frischknecht, R., M. Heine, et al. (2009). "Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity." *Nat Neurosci* **12**(7): 897-904.

- Frost, N. A., H. Shroff, et al. (2010). "Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines." Neuron **67**(1): 86-99.
- Fujiwara, T., K. Ritchie, et al. (2002). "Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane." J Cell Biol **157**(6): 1071-81.
- Gao, L., L. A. Blair, et al. (2006). "CaMKII-independent effects of KN93 and its inactive analog KN92: reversible inhibition of L-type calcium channels." Biochem Biophys Res Commun **345**(4): 1606-10.
- Giannone, G., E. Hossy, et al. (2010). "Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density." Biophys J **99**(4): 1303-10.
- Groc, L., D. Choquet, et al. (2008). "The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation." Nat Neurosci **11**(8): 868-70.
- Groc, L., B. Gustafsson, et al. (2006). "AMPA signalling in nascent glutamatergic synapses: there and not there!" Trends Neurosci **29**(3): 132-9.
- Groc, L., M. Heine, et al. (2004). "Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors." Nat Neurosci **7**(7): 695-6.
- Groc, L., M. Lafourcade, et al. (2007). "Surface trafficking of neurotransmitter receptor: comparison between single-molecule/quantum dot strategies." J Neurosci **27**(46): 12433-7.
- Groth, R. D., M. Lindskog, et al. (2011). "Beta Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent kinase type II triggers upregulation of GluA1 to coordinate adaptation to synaptic inactivity in hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(2): 828-33.
- Guillaud, L., M. Setou, et al. (2003). "KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons." J Neurosci **23**(1): 131-40.
- Guillaud, L., R. Wong, et al. (2008). "Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: a molecular model of kinesin-cargo release." Nat Cell Biol **10**(1): 19-29.
- Gustafsson, B. and H. Wigstrom (1988). "Physiological mechanisms underlying long-term potentiation." Trends Neurosci **11**(4): 156-62.
- Harris, K. M. and S. B. Kater (1994). "Dendritic Spines - Cellular Specializations Imparting Both Stability and Flexibility to Synaptic Function." Annual Review of Neuroscience **17**: 341-371.
- Hayashi, Y., S. H. Shi, et al. (2000). "Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction." Science **287**(5461): 2262-7.
- Heine, M., L. Groc, et al. (2008). "Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission." Science **320**(5873): 201-5.
- Heine, M., O. Thoumine, et al. (2008). "Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroigin contacts." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20947-52.
- Henriques, R., M. Lelek, et al. (2010). "QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ." Nat Methods **7**(5): 339-40.
- Heynen, A. J., E. M. Quinlan, et al. (2000). "Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo." Neuron **28**(2): 527-36.
- Hodgkin, A. L. and A. F. Huxley (1945). "Resting and action potentials in single nerve fibres." J Physiol **104**(2): 176-95.

- Hohng, S. and T. Ha (2004). "Near-complete suppression of quantum dot blinking in ambient conditions." *J Am Chem Soc* **126**(5): 1324-5.
- Honkura, N., M. Matsuzaki, et al. (2008). "The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines." *Neuron* **57**(5): 719-29.
- Howarth, M., K. Takao, et al. (2005). "Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(21): 7583-8.
- Hudmon, A., E. Lebel, et al. (2005). "A mechanism for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association." *J Neurosci* **25**(30): 6971-83.
- Hudmon, A. and H. Schulman (2002). "Structure-function of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II." *Biochem J* **364**(Pt 3): 593-611.
- Isaac, J. T., R. A. Nicoll, et al. (1995). "Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP." *Neuron* **15**(2): 427-34.
- Ito, I., H. Hidaka, et al. (1991). "Effects of KN-62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, on long-term potentiation in the rat hippocampus." *Neurosci Lett* **121**(1-2): 119-21.
- Izeddin, I., J. Boulanger, et al. (2012). "Wavelet analysis for single molecule localization microscopy." *Opt Express* **20**(3): 2081-95.
- Izeddin, I., C. G. Specht, et al. (2011). "Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe." *PLoS One* **6**(1): e15611.
- Jacobson, K., E. D. Sheets, et al. (1995). "Revisiting the fluid mosaic model of membranes." *Science* **268**(5216): 1441-2.
- Jaskolski, F., B. Mayo-Martin, et al. (2009). "Dynamin-dependent membrane drift recruits AMPA receptors to dendritic spines." *J Biol Chem* **284**(18): 12491-503.
- Kato, A. S., M. B. Gill, et al. (2010). "TARPs differentially decorate AMPA receptors to specify neuropharmacology." *Trends Neurosci* **33**(5): 241-8.
- Kennedy, M. B. (2000). "Signal-processing machines at the postsynaptic density." *Science* **290**(5492): 750-754.
- Kennedy, M. B., H. C. Beale, et al. (2005). "Integration of biochemical signalling in spines." *Nat Rev Neurosci* **6**(6): 423-34.
- Kennedy, M. J., I. G. Davison, et al. (2010). "Syntaxin-4 defines a domain for activity-dependent exocytosis in dendritic spines." *Cell* **141**(3): 524-35.
- Kerr, J. M. and T. A. Blanpied (2012). "Subsynaptic AMPA receptor distribution is acutely regulated by actin-driven reorganization of the postsynaptic density." *J Neurosci* **32**(2): 658-73.
- Kim, S. A., H. Sanabria, et al. (2010). "Quantifying translational mobility in neurons: comparison between current optical techniques." *J Neurosci* **30**(49): 16409-16.
- Kittler, J. T. and S. J. Moss (2003). "Modulation of GABA<sub>A</sub> receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition." *Curr Opin Neurobiol* **13**(3): 341-7.
- Kolodziej, S. J., A. Hudmon, et al. (2000). "Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase II $\alpha$  and truncated CaM kinase II $\alpha$  reveal a unique organization for its structural core and functional domains." *J Biol Chem* **275**(19): 14354-9.
- Kopec, C. D., B. Li, et al. (2006). "Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation." *J Neurosci* **26**(7): 2000-9.

- Kopec, C. D., E. Real, et al. (2007). "GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses." *J Neurosci* **27**(50): 13706-18.
- Korber, C., M. Werner, et al. (2007). "Stargazin interaction with alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) receptors is critically dependent on the amino acid at the narrow constriction of the ion channel." *J Biol Chem* **282**(26): 18758-66.
- Kullmann, D. M. (1999). "Synaptic and extrasynaptic roles of glutamate in the mammalian hippocampus." *Acta Physiol Scand* **166**(2): 79-83.
- Kullmann, D. M. (2001). "Presynaptic kainate receptors in the hippocampus: slowly emerging from obscurity." *Neuron* **32**(4): 561-4.
- Kusumi, A., Y. Sako, et al. (1993). "Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells." *Biophys J* **65**(5): 2021-40.
- Lee, H. K., M. Barbarosie, et al. (2000). "Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity." *Nature* **405**(6789): 955-9.
- Lee, S. J., Y. Escobedo-Lozoya, et al. (2009). "Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation." *Nature* **458**(7236): 299-304.
- Lerma, J. (2003). "Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission." *Nat Rev Neurosci* **4**(6): 481-95.
- Liao, D., N. A. Hessler, et al. (1995). "Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice." *Nature* **375**(6530): 400-4.
- Liao, D., X. Zhang, et al. (1999). "Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons." *Nat Neurosci* **2**(1): 37-43.
- Lin, D. T., Y. Makino, et al. (2009). "Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation." *Nat Neurosci* **12**(7): 879-87.
- Lin, J. W., W. Ju, et al. (2000). "Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization." *Nat Neurosci* **3**(12): 1282-90.
- Lisman, J. and M. Goldring (1988). "Evaluation of a model of long-term memory based on the properties of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase." *J Physiol (Paris)* **83**(3): 187-97.
- Lisman, J. and S. Raghavachari (2006). "A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses." *Sci STKE* **2006**(356): re11.
- Lisman, J., H. Schulman, et al. (2002). "The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory." *Nat Rev Neurosci* **3**(3): 175-90.
- Lisman, J., R. Yasuda, et al. (2012). "Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation." *Nat Rev Neurosci* **13**(3): 169-82.
- Lledo, P. M., G. O. Hjelmstad, et al. (1995). "Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11175-9.
- Lledo, P. M., X. Zhang, et al. (1998). "Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation." *Science* **279**(5349): 399-403.
- Lu, W., K. Isozaki, et al. (2010). "Synaptic targeting of AMPA receptors is regulated by a CaMKII site in the first intracellular loop of GluA1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(51): 22266-71.

- Lu, Y. M., J. C. Roder, et al. (1998). "Src activation in the induction of long-term potentiation in CA1 hippocampal neurons." *Science* **279**(5355): 1363-7.
- Luscher, C., H. Xia, et al. (1999). "Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity." *Neuron* **24**(3): 649-58.
- Luthi, A., R. Chittajallu, et al. (1999). "Hippocampal LTD expression involves a pool of AMPARs regulated by the NSF-GluR2 interaction." *Neuron* **24**(2): 389-99.
- Lynch, G. and M. Baudry (1984). "The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis." *Science* **224**(4653): 1057-63.
- Lynch, G., J. Larson, et al. (1983). "Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation." *Nature* **305**(5936): 719-21.
- MacGillavry, H. D., J. M. Kerr, et al. (2011). "Lateral organization of the postsynaptic density." *Mol Cell Neurosci* **48**(4): 321-31.
- Magde, D., W. W. Webb, et al. (1972). "Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy." *Physical Review Letters* **29**(11): 705-&.
- Mahler, B., P. Spinicelli, et al. (2008). "Towards non-blinking colloidal quantum dots." *Nat Mater* **7**(8): 659-64.
- Majewska, A., A. Tashiro, et al. (2000). "Regulation of spine calcium dynamics by rapid spine motility." *J Neurosci* **20**(22): 8262-8.
- Makino, H. and R. Malinow (2009). "AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis." *Neuron* **64**(3): 381-90.
- Malenka, R. C., J. A. Kauer, et al. (1989). "An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation." *Nature* **340**(6234): 554-7.
- Malenka, R. C., J. A. Kauer, et al. (1988). "Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission." *Science* **242**(4875): 81-4.
- Malenka, R. C. and R. A. Nicoll (1997). "Silent synapses speak up." *Neuron* **19**(3): 473-6.
- Malenka, R. C. and R. A. Nicoll (1999). "Long-term potentiation--a decade of progress?" *Science* **285**(5435): 1870-4.
- Maletic-Savatic, M., T. Koothan, et al. (1998). "Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured hippocampal neurons. Part II: mediation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." *J Neurosci* **18**(17): 6814-21.
- Maletic-Savatic, M. and R. Malinow (1998). "Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured hippocampal neurons. Part I: trans-Golgi network-derived organelles undergo regulated exocytosis." *J Neurosci* **18**(17): 6803-13.
- Malinow, R., D. V. Madison, et al. (1988). "Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation." *Nature* **335**(6193): 820-4.
- Malinow, R., Z. F. Mainen, et al. (2000). "LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic." *Curr Opin Neurobiol* **10**(3): 352-7.
- Malinow, R., H. Schulman, et al. (1989). "Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP." *Science* **245**(4920): 862-6.
- Malinow, R. and R. W. Tsien (1990). "Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices." *Nature* **346**(6280): 177-80.
- Mammen, A. L., K. Kameyama, et al. (1997). "Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II." *J Biol Chem* **272**(51): 32528-33.

- Man, H. Y., J. W. Lin, et al. (2000). "Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization." *Neuron* **25**(3): 649-62.
- Manley, S., J. M. Gillette, et al. (2008). "High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy." *Nat Methods* **5**(2): 155-7.
- Marguet, D., P. F. Lenne, et al. (2006). "Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order." *Embo J* **25**(15): 3446-57.
- Martin, S. J., P. D. Grimwood, et al. (2000). "Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis." *Annu Rev Neurosci* **23**: 649-711.
- Matthies, H. and K. G. Reymann (1993). "Protein kinase A inhibitors prevent the maintenance of hippocampal long-term potentiation." *Neuroreport* **4**(6): 712-4.
- McGlade-McCulloh, E., H. Yamamoto, et al. (1993). "Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." *Nature* **362**(6421): 640-2.
- Meier, J., C. Vannier, et al. (2001). "Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin." *Nat Neurosci* **4**(3): 253-60.
- Miesenbock, G., D. A. De Angelis, et al. (1998). "Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins." *Nature* **394**(6689): 192-5.
- Miller, S., M. Yasuda, et al. (2002). "Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation." *Neuron* **36**(3): 507-19.
- Mulkey, R. M., C. E. Herron, et al. (1993). "An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression." *Science* **261**(5124): 1051-5.
- Nakazawa, K., S. Mikawa, et al. (1995). "Transient and persistent phosphorylation of AMPA-type glutamate receptor subunits in cerebellar Purkinje cells." *Neuron* **15**(3): 697-709.
- Newpher, T. M. and M. D. Ehlers (2008). "Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains." *Neuron* **58**(4): 472-97.
- Newpher, T. M. and M. D. Ehlers (2009). "Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity." *Trends Cell Biol* **19**(5): 218-27.
- Nicoll, R. A., J. A. Kauer, et al. (1988). "The current excitement in long-term potentiation." *Neuron* **1**(2): 97-103.
- Nicoll, R. A. and R. C. Malenka (1995). "Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* **377**(6545): 115-8.
- Nirmal, M., B. O. Dabbousi, et al. (1996). "Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals." *Nature* **383**(6603): 802-804.
- Nomura, T., K. Kumatoriya, et al. (1997). "Overexpression of alpha and beta isoforms of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in neuroblastoma cells -- H-7 promotes neurite outgrowth." *Brain Res* **766**(1-2): 129-41.
- Nowak, L., P. Bregestovski, et al. (1984). "Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones." *Nature* **307**(5950): 462-5.
- Okamoto, K., R. Narayanan, et al. (2007). "The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(15): 6418-23.
- O'Leary, H., E. Lasda, et al. (2006). "CaMKIIbeta association with the actin cytoskeleton is regulated by alternative splicing." *Mol Biol Cell* **17**(11): 4656-65.



- Opazo, P. and D. Choquet (2010). "A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors." *Mol Cell Neurosci* **46**(1): 1-8.
- Opazo, P., S. Labrecque, et al. (2010). "CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin." *Neuron* **67**(2): 239-52.
- Opazo, P., S. Labrecque, et al. (2011). "CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin." *Neuron* **67**(2): 239-52.
- Opazo, P., M. Sainlos, et al. (2011). "Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots." *Curr Opin Neurobiol*.
- Otmakhov, N., J. H. Tao-Cheng, et al. (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* **24**(42): 9324-31.
- Ozawa, S., H. Kamiya, et al. (1998). "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system." *Prog Neurobiol* **54**(5): 581-618.
- Passafaro, M., V. Piech, et al. (2001). "Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons." *Nat Neurosci* **4**(9): 917-26.
- Patterson, M. A., E. M. Szatmari, et al. (2010). "AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(36): 15951-6.
- Peng, J., M. J. Kim, et al. (2004). "Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry." *J Biol Chem* **279**(20): 21003-11.
- Perestenko, P. V. and J. M. Henley (2003). "Characterization of the intracellular transport of GluR1 and GluR2 alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons." *J Biol Chem* **278**(44): 43525-32.
- Petralia, R. S., J. A. Esteban, et al. (1999). "Selective acquisition of AMPA receptors over postnatal development suggests a molecular basis for silent synapses." *Nat Neurosci* **2**(1): 31-6.
- Petrini, E. M., J. Lu, et al. (2009). "Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation." *Neuron* **63**(1): 92-105.
- Pettit, D. L., S. Perlman, et al. (1994). "Potentiated transmission and prevention of further LTP by increased CaMKII activity in postsynaptic hippocampal slice neurons." *Science* **266**(5192): 1881-5.
- Pinaud, F., S. Clarke, et al. "Probing cellular events, one quantum dot at a time." *Nat Methods* **7**(4): 275-85.
- Redondo, R. L., H. Okuno, et al. (2011). "Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium/calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation." *J Neurosci* **30**(14): 4981-9.
- Regehr, W. G. and D. W. Tank (1990). "Postsynaptic NMDA receptor-mediated calcium accumulation in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites." *Nature* **345**(6278): 807-10.
- Roche, K. W., R. J. O'Brien, et al. (1996). "Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit." *Neuron* **16**(6): 1179-88.
- Rosenberg, O. S., S. Deindl, et al. (2005). "Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme." *Cell* **123**(5): 849-60.

- Rust, M. B., C. B. Gurniak, et al. (2010). "Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics." *Embo J* **29**(11): 1889-902.
- Saffman, P. G. and M. Delbruck (1975). "Brownian motion in biological membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(8): 3111-3.
- Sanabria, H., M. T. Swulius, et al. (2009). " $\beta$ CaMKII regulates actin assembly and structure." *J Biol Chem* **284**(15): 9770-80.
- Sanhueza, M., G. Fernandez-Villalobos, et al. (2011). "Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the maintenance of synaptic strength." *J Neurosci* **31**(25): 9170-8.
- Santos, S. D., A. L. Carvalho, et al. (2009). "Regulation of AMPA receptors and synaptic plasticity." *Neuroscience* **158**(1): 105-25.
- Savin, T. and P. S. Doyle (2005). "Static and dynamic errors in particle tracking microrheology." *Biophys J* **88**(1): 623-38.
- Saxton, M. J. (1993). "Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion." *Biophys J* **64**(6): 1766-80.
- Saxton, M. J. and K. Jacobson (1997). "Single-particle tracking: applications to membrane dynamics." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **26**: 373-99.
- Scannevin, R. H. and R. L. Huganir (2000). "Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses." *Nat Rev Neurosci* **1**(2): 133-41.
- Sekine-Aizawa, Y. and R. L. Huganir (2004). "Imaging of receptor trafficking by using alpha-bungarotoxin-binding-site-tagged receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49): 17114-9.
- Serge, A., L. Fourgeaud, et al. (2002). "Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane." *J Neurosci* **22**(10): 3910-20.
- Serge, A., L. Fourgeaud, et al. (2003). "Active surface transport of metabotropic glutamate receptors through binding to microtubules and actin flow." *J Cell Sci* **116**(Pt 24): 5015-22.
- Sharma, K., D. K. Fong, et al. (2006). "Postsynaptic protein mobility in dendritic spines: long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation." *Mol Cell Neurosci* **31**(4): 702-12.
- Shen, K. and T. Meyer (1999). "Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation." *Science* **284**(5411): 162-6.
- Shen, K., M. N. Teruel, et al. (1998). "CaMKII $\beta$  functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKII $\alpha/\beta$  heterooligomers to dendritic spines." *Neuron* **21**(3): 593-606.
- Sheng, M. and S. H. Lee (2001). "AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission." *Cell* **105**(7): 825-8.
- Shi, S. H., Y. Hayashi, et al. (1999). "Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation." *Science* **284**(5421): 1811-6.
- Shirke, A. M. and R. Malinow (1997). "Mechanisms of potentiation by calcium-calmodulin kinase II of postsynaptic sensitivity in rat hippocampal CA1 neurons." *J Neurophysiol* **78**(5): 2682-92.
- Silva, A. J., R. Paylor, et al. (1992). "Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice." *Science* **257**(5067): 206-11.

- Silva, A. J., Y. Wang, et al. (1992). "Alpha calcium/calmodulin kinase II mutant mice: deficient long-term potentiation and impaired spatial learning." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **57**: 527-39.
- Simonson, P. D., E. Rothenberg, et al. (2011). "Single-molecule-based super-resolution images in the presence of multiple fluorophores." Nano Lett **11**(11): 5090-6.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- Smith, C. S., N. Joseph, et al. (2010). "Fast, single-molecule localization that achieves theoretically minimum uncertainty." Nat Methods **7**(5): 373-5.
- Soderling, T. R. (1993). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: role in learning and memory." Mol Cell Biochem **127-128**: 93-101.
- Song, I. and R. L. Huganir (2002). "Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity." Trends Neurosci **25**(11): 578-88.
- Stevens, C. F., S. Tonegawa, et al. (1994). "The role of calcium-calmodulin kinase II in three forms of synaptic plasticity." Curr Biol **4**(8): 687-93.
- Subach, F. V., G. H. Patterson, et al. (2009). "Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy." Nat Methods **6**(2): 153-9.
- Sumioka, A., D. Yan, et al. (2010). "TARP phosphorylation regulates synaptic AMPA receptors through lipid bilayers." Neuron **66**(5): 755-67.
- Svoboda, K., D. W. Tank, et al. (1996). "Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts." Science **272**(5262): 716-9.
- Swope, S. L., S. J. Moss, et al. (1999). "Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation." Adv Second Messenger Phosphoprotein Res **33**: 49-78.
- Tardin, C., L. Cognet, et al. (2003). "Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses." Embo J **22**(18): 4656-65.
- Teyler, T. J., I. Cavus, et al. (1994). "Multideterminant role of calcium in hippocampal synaptic plasticity." Hippocampus **4**(6): 623-34.
- Thiagarajan, T. C., E. S. Piedras-Renteria, et al. (2002). "alpha- and betaCaMKII. Inverse regulation by neuronal activity and opposing effects on synaptic strength." Neuron **36**(6): 1103-14.
- Thompson, R. E., D. R. Larson, et al. (2002). "Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes." Biophys J **82**(5): 2775-83.
- Tomita, S., V. Stein, et al. (2005). "Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs." Neuron **45**(2): 269-77.
- Tovar, K. R. and G. L. Westbrook (2002). "Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses." Neuron **34**(2): 255-64.
- Triller, A. and D. Choquet (2008). "New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging." Neuron **59**(3): 359-74.
- Turrigiano, G. G. (2000). "AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity." Neuron **26**(1): 5-8.
- van Woerden, G. M., F. E. Hoebeek, et al. (2009). "betaCaMKII controls the direction of plasticity at parallel fiber-Purkinje cell synapses." Nat Neurosci **12**(7): 823-5.
- Wang, C., W. A. Wilson, et al. (2001). "Role of NMDA, non-NMDA, and GABA receptors in signal propagation in the amygdala formation." J Neurophysiol **86**(3): 1422-9.
- Wang, X., X. Ren, et al. (2009). "Non-blinking semiconductor nanocrystals." Nature **459**(7247): 686-9.

- Wollmuth, L. P. and A. I. Sobolevsky (2004). "Structure and gating of the glutamate receptor ion channel." Trends Neurosci **27**(6): 321-8.
- Wu, X., H. Liu, et al. (2003). "Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots." Nat Biotechnol **21**(1): 41-6.
- Yildiz, A., J. N. Forkey, et al. (2003). "Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization." Science **300**(5628): 2061-5.
- Yu, B., D. Chen, et al. (2011). "Fast Fourier domain localization algorithm of a single molecule with nanometer precision." Opt Lett **36**(22): 4317-9.
- Yu, L., K. Rostamiani, et al. (2011). "Calpain-mediated regulation of stargazin in adult rat brain." Neuroscience **178**: 13-20.
- Yudowski, G. A., M. A. Puthenveedu, et al. (2007). "Real-time imaging of discrete exocytic events mediating surface delivery of AMPA receptors." J Neurosci **27**(41): 11112-21.
- Ziff, E. B. (1997). "Enlightening the postsynaptic density." Neuron **19**(6): 1163-74.
- Ziff, E. B. (2007). "TARPs and the AMPA receptor trafficking paradox." Neuron **53**(5): 627-33.

Le numero 1 mondial du memoires



[www.rapport-gratuit.com](http://www.rapport-gratuit.com)

[clubmemoire@gmail.com](mailto:clubmemoire@gmail.com)