

# Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Avant-propos.....	5
Table des matières.....	10
Introduction.....	12
Le système nerveux	12
L'hippocampe	13
La mémoire et l'hippocampe	13
Architecture de l'hippocampe	14
Modification synaptique à long terme (LTP/LTD) dans l'hippocampe	14
L'épine dendritique	18
Le calcium	18
La calmoduline (CaM)	19
La kinase calmoduline dépendante II (CaMKII)	19
Autres kinases majeures : PKA et PKC	22
Les récepteurs inotropiques glutamatergiques AMPA et NMDA	22
Récepteurs AMPA	22
Récepteur NMDA	22
Méthode .....	24
Modèle utilisé: cultures dissociées d'hippocampe du rat naissant	24
Protocole de culture	24
La technique du patch-clamp	26
Transport et mise en place de l'échantillon	26
Le choix des cellules	27
La perfusion	29
Obtention d'un « gigaseal »	32
Compensation	33
Le problème du bruit électrique	33
Le problème de la dérive de la pipette	35
Solution extracellulaire	36
Solution intracellulaire	36
Analyse des minis	39
Résultats.....	42
Tentatives de reproduction de protocoles de LTP en culture	42
Lu et al., 2001	42
Oh et al. 2005	45
Impact de la transfection de mutants de la CaMKII sur la force synaptique	48
Possible potentialisation des minis de types glutamatergiques par application prolongée d'une lumière intense	53
Discussion.....	56
Le mot de la fin.....	60
Références.....	61
Annexes.....	68
Le projet Rig	68
Le logiciel libre Rig	70

Le matériel Rig	73
Sites critiques de l'alpha CaMKII	75
Lys42	75
Thr286	75
Thr305 et Thr306	75
Le segment d'autorégulation de l'alpha-CaMKII	76
Quelques mutants intéressants de l'alpha CaMKII	76
1-290	76
1-326 (mCaMKII)	77
T286D	77
T286A	77
T305/306D	77
K42M	77
I205K	77
Méthode de dissociation et culture de neurones de l'hippocampe	78
Préparation des disques d'Aclar pour la culture de neurones	83

## Introduction

La plasticité des courants synaptiques joue un rôle clé dans l'apprentissage et la mémoire. La protéine kinase  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline-dépendante II » ou « CaMKII » est une enzyme importante pour le contrôle des changements de la force des courants synaptiques glutamatergiques (Schulman 2004). L'**objectif** de ce projet était de mieux cerner le mécanisme qui permet à l'enzyme d'amplifier les courants synaptiques glutamatergiques de type AMPA dans le modèle de culture de neurones de l'hippocampe de rat du laboratoire, avec lequel il a été démontré que la CaMKII est recrutée dans la densité postsynaptique (*Post-Synaptic Density PSD*) de façon dynamique lorsque les neurones sont stimulés. *L'hypothèse à tester était que le recrutement de la CaMKII à la PSD est une étape nécessaire à l'augmentation des courants synaptiques.*

Ce texte traitera particulièrement des sujets de la mémoire, de la plasticité synaptique et du rôle joué par la CaMKII. Les concepts de base ne seront pas négligés puisqu'ils aident à structurer la réflexion de l'auteur qui, rappelons-le, n'est pas biologiste. Ce texte consiste en un survol des connaissances acquises et des observations effectuées. Le principe utilisé est d'essayer d'écrire le document résumant toutes les connaissances les plus pertinentes à l'étudiant que j'étais au début de cette maîtrise. Un des buts de ce document est que l'information qui s'y trouve soit utile éventuellement à quelqu'un. Une fois corrigé et débarrassé de toute erreur que j'aurais pu y écrire, son contenu sera rendu disponible en format électronique sur le wiki du laboratoire pour que les étudiants subséquents puissent éventuellement y puiser quelques informations pertinentes au fil de leurs recherches. Comme le reste du contenu du wiki du laboratoire, il sera à la fois indexé pour la recherche par mots clef et utilisera les hyperliens pour la navigation facilitée entre concepts reliés. Les lecteurs de ce texte trouveront ici et là une série de questions ouvertes. Ils sont invités à y répondre s'ils en savent la réponse.

## Le système nerveux

Le système nerveux est composé de deux types cellulaires de base: les neurones et les cellules gliales. Les neurones se démarquent par leur activité bioélectrique, leurs interconnexions et leur différenciation élevée. La glie, plus nombreuse par un facteur 10 (Cherkiak 1990), joue un rôle de soutien pour les neurones mais aussi de régulation de la transmission synaptique. Les neurones possèdent une arborisation dendritique pour recevoir les signaux des autres neurones et en faire une somme pondérée. Ils possèdent également un fin axone pour la transmission de l'intégration des signaux à d'autres neurones en faisant contact avec leurs dendrites. Les connexions dendrodendritiques, somasomatiques et axoaxoniques sont possibles mais plus rares.

L'activité bioélectrique d'un neurone est mesurable sous la forme d'une différence de potentiel électrique entre l'intérieur de la cellule et le liquide extracellulaire. Cette différence de potentiel électrique varie en fonction du temps et de l'emplacement tout au long du neurone. La transmission de la dépolarisation à travers le neurone n'est pas seulement passive. Lorsqu'un seuil critique est atteint, un potentiel d'action est lancé et peut se propager sur de grandes distances. Le potentiel d'action implique en un premier temps l'ouverture de canaux sodiques qui laissent subitement entrer le sodium

extracellulaire. L'entrée de sodium dépolarise la cellule localement et incite les canaux sodiques voisins à s'ouvrir également. La dépolarisation n'est que momentanée puisque les canaux potassiques s'ouvrent en un deuxième temps pour laisser sortir le potassium et rétablir le potentiel normal intracellulaire.

Les neurones communiquent leur activité bioélectrique par l'entremise de la synapse. La communication peut être par conduction électrique à travers des voies appelées connexons ou beaucoup plus fréquemment par l'entremise de la synapse chimique en impliquant les neurotransmetteurs. 99% des synapses seraient chimiques (Greengard 2001).

Dans une synapse chimique, la dépolarisation due à l'arrivée d'un potentiel d'action à l'extrémité de l'axone active les canaux calciques dépendant du voltage. L'élévation subite de calcium intracellulaire dans le bouton axonal pousse des vésicules contenant les neurotransmetteurs à fusionner avec la membrane à la zone active qui déversent ainsi leur contenu dans la fente synaptique. L'élévation temporaire de la concentration du neurotransmetteur dans la fente synaptique amène quant à elle une activation momentanée de récepteurs du côté post-synaptique. L'action du neurotransmetteur peut être excitateur en amenant une dépolarisation du neurone post-synaptique (exemple: glutamate) ou encore inhibiteur en amenant une hyperpolarisation du neurone post-synaptique (exemple: GABA et glycine). Cette action dans l'excitabilité du neurone post-synaptique est dans ce cas très rapide et transitoire (1-3 ms) mais peut aussi être beaucoup plus lente (> 100 ms) et durable dans le cas d'autres neurotransmetteurs peptidiques et amines biogéniques (Greengard 2001). Notons qu'un même neurotransmetteur, comme le glutamate par exemple, peut être impliqué à la fois dans la transmission rapide et lente.

## **L'hippocampe**

L'hippocampe est une structure du système nerveux qui a été particulièrement étudiée. Il se situe à la base du cerveau et fait partie du système limbique.

### **La mémoire et l'hippocampe**

La mémoire est un phénomène complexe qui implique plusieurs systèmes différents dans le système nerveux. Certaines propriétés majeures de la mémoire commencent à être relativement bien cernées. En effet, l'apprentissage explicite, c'est à dire l'apprentissage d'informations qui peuvent être traduites par le langage, implique des régions du lobe temporal incluant l'hippocampe alors que l'apprentissage implicite implique les systèmes sensoriels et moteur impliqués dans la tâche correspondante (Kandel 1997).

Les mémoires autant explicite qu'implicite peuvent être séparées en au moins deux catégories claires: la mémoire à long terme, qui demande une synthèse de protéines pour s'établir puisque l'application d'un inhibiteur de synthèse en agissant sur l'ARN messager la bloque, et la mémoire à court terme, qui est elle insensible à ce genre de traitement. Le siège de ces types de mémoire n'est pas le même comme nous allons le voir plus loin.



L'histoire tragique du patient H.M. a permis de comprendre l'importance et le rôle de l'hippocampe dans le processus complexe de la mémoire car l'ablation bilatérale du lobe temporal médian pour contrer des crises d'épilepsie sévères a amené chez lui une amnésie antérograde sévère : ses souvenirs d'avant l'opération sont intacts mais il est incapable d'acquérir de nouveaux souvenirs à long terme. Il est intéressant de noter que les patients à qui on enlève qu'un côté de l'hippocampe ne sont pas frappés de ce mal. Ceci situerait assez précisément un rôle important de l'hippocampe: un point névralgique de la conversion de la mémoire déclarative à court terme vers le long terme avec, semble-t-il, une redondance qui serait parfaite entre les deux hémisphères.

## **Architecture de l'hippocampe**

L'hippocampe comprend un réseau bien défini:

- Le réseau perforant, provenant du cortex enthorinal, fait synapse dans le gyrus denté sur les cellules granulaires.
- Les axones de la fibre moussue font synapse sur les cellules pyramidales en CA3.
- Les axones de la collatérale de Schaffer en passant à travers CA2 font synapse sur les cellules pyramidales en CA1.

Le cortex enthorinal est la source majeure des afférences de l'hippocampe. Il fait contact avec le gyrus denté mais aussi avec d'autres parties de l'hippocampe dont notamment CA3.

## **Modification synaptique à long terme (LTP/LTD) dans l'hippocampe**

La première observation de potentialisation à long terme (*Long Term Potentiation*, LTP) a été faite sur des tranches de l'hippocampe du lapin (Bliss and Lomo 1973). Une brève stimulation de haute fréquence du réseau perforant provoquait une augmentation durable des potentiels de champ extracellulaire. Le LTP est devenu au cours du temps un outil central dans l'étude du phénomène de la mémoire dans le système nerveux. L'intérêt qu'on porte au phénomène du LTP s'explique par le fait que d'autres structures que l'hippocampe comme le cervelet, l'amygdale et le système nerveux périphérique peuvent démontrer du LTP.

La synapse peut aussi subir une dépression à long terme (*Long Term Depression*, LTD). Il est à souligner que LTP et LTD sont des termes représentant en fait des processus de modification de la force synaptique qui peuvent être complètement différents et même multiples au sein d'une synapse particulière. Les trois contacts synaptiques de l'hippocampe démontrent le phénomène de la potentialisation à long terme lorsque stimulés avec quatre trains de 10 impulsions à 100 Hz séparés par 5 secondes (Bliss and Lomo 1973). Le contact de la fibre moussue se démarque des autres par le fait que la potentialisation est d'origine pré-synaptique plutôt que post-synaptique (Harris and Cotman 1986; Zalutsky and Nicoll 1990).

Il faut noter que des études subséquentes ont nuancé le lien entre LTP et l'apprentissage spatial chez le mammifère. Il a été montré que des souris avec des récepteurs AMPA

dépourvus de la sous-unité GluR1 montraient une capacité normale à acquérir des mémoires de type référence spatiale dans le test du labyrinthe de Morris malgré le fait d'une absence de LTP à la synapse CA3 -> CA1 (Zamanillo, Sprengel et al. 1999). Ceci illustre à quel point le phénomène de la mémoire est complexe et qu'on doit faire attention à ne pas tenter de la réduire à une équation simpliste.

Le LTD est aussi un phénomène observé dans plusieurs parties du système nerveux comme le cervelet (Ito, Sakurai et al. 1982), l'hippocampe et le néocortex (Dodt, Eder et al. 1999). Dans l'hippocampe, un train de stimulation à basse fréquence et de longue durée induit le LTD. C'est l'entrée persistante de calcium qui est à la base de ce LTD. L'implication des récepteurs NMDA n'est pas obligatoire puisque l'activation des récepteurs métabotropiques peut aussi induire le LTD (Bortolotto, Fitzjohn et al. 1999).

### **Rôle du calcium**

L'élévation du calcium intracellulaire joue un rôle primordial dans l'induction du LTP car une chélation du calcium bloque le phénomène (Bliss and Richter-Levin 1993; Nicoll and Malenka 1995). L'amplitude, le patron temporel et la localisation spatiale de cette augmentation de calcium sont tous des facteurs qui décident du type de modification synaptique générée. Suivant les types de LTP, l'élévation nécessaire peut être pré-synaptique et/ou post-synaptique. Cette élévation en calcium peut avoir trois sources différentes: les récepteurs glutamatergiques NMDA, les canaux calciques dépendants du voltage (*Voltage Gated Calcium Channels*, VGCC) et les réserves intracellulaires du réticulum endoplasmique.

La chélation du calcium nuit au LTP sur des tranches d'hippocampe de rat jeune alors qu'elle le favorise sur des tranches de rats âgés (Tonkikh, Janus et al. 2006). La capacité des neurones à réguler de façon optimale le niveau de calcium est critique et cette capacité se dégraderait avec l'âge.

### **Rôle des récepteur NMDA (NMDAR)**

L'entrée de calcium par les récepteurs NMDA est nécessaire pour l'induction de plusieurs formes de LTP. L'utilisation de l'antagoniste des NMDAR AP5 peut bloquer le LTP et nuit de façon sélective à l'apprentissage spatial (Morris, Anderson et al. 1986). Même si le LTP est empêché par le blocage des NMDAR, ceci ne bloque pas entièrement l'apprentissage spatial (Saucier and Cain 1995). Le blocage des NMDAR par l'ion magnésium au potentiel de repos rend caractéristique ce genre de LTP par le fait que seules des stimulations importantes et coordonnées sont capables de faire entrer suffisamment de calcium par les NMDAR et induire ainsi du LTP. Les transitoires de calcium créés par l'ouverture des NMDAR sont très localisés et l'affinité qu'a la CaMKII pour la sous-unité NR2B permet à celle-ci d'y être exposée de façon optimale (Bayer, De Koninck et al. 2001). Il a été démontré que la CaMKII joue un rôle important dans l'induction du LTP (Malinow, Schulman et al. 1989; Hvalby, Hemmings et al. 1994; Otmakhov, Griffith et al. 1997).

## **Autres types de LTP**

Bien qu'important, les NMDAR ne sont pas les seuls impliqués dans l'induction de LTP. Dans la collatéral de Schaffer là même où un LTP dépendant des récepteurs NMDA existe, un second type de LTP beaucoup plus lent s'exprime par l'entremise des canaux calciques dépendants du voltage (VGCC).

Une modification synaptique à long terme dans l'hippocampe peut aussi être induite chimiquement avec le bloqueur de canaux potassiques tetraethylammonium (TEA) (Aniksztejn and Ben-Ari 1991; Huang and Malenka 1993; Hanse and Gustafsson 1994; Song, Xie et al. 2001). En contraste avec la stimulation électrique, le TEA ne produit du LTP qu'en CA1 alors qu'il produit du LTD dans le gyrus denté (Song, Xie et al. 2001). Dans le cas du LTP en CA1 généré par application de TEA, le phénomène dépend d'une entrée de calcium à la fois des canaux VDCC de type T et des canaux NMDA alors que le LTD dans le gyrus denté généré par la même application de TEA sur la même tranche ne dépend que des canaux NMDA (Song, Xie et al. 2001).

L'utilisation de Calyculin A, un inhibiteur de phosphatase, et de Forskolin, un activateur de l'adénylyl cyclase, réussit à créer un autre type de LTP chimique (Makhinson, Chotiner et al. 1999). Comme la voie de l'adénylyl cyclase/protéine kinase A jouerait un rôle dans la suppression de l'activation des phosphatases, le mécanisme en jeu ici serait de contrer doublement l'action des phosphatases pour permettre une activation prolongée de la CaMKII qui est une condition nécessaire à l'établissement du LTP.

Plus récemment, l'utilisation de Rolipram (un inhibiteur de phosphodiesterase) et de Forskolin peut aussi induire chimiquement un autre type de LTP. Ce type de LTP nécessite l'activation des récepteurs NMDA, demande une activité pré-synaptique et est occlus par un protocole de stimulation électrique (Otmakhov, Tao-Cheng et al. 2004).

## **Rôle des récepteurs métabotropiques glutamatergiques (mGluR)**

Les récepteurs métabotropiques glutamatergiques mGluR1 et mGluR5, regroupés sous la classe I, activent la phospholipase C, une enzyme qui transforme les phospholipides de la membrane cellulaire en diacylglycérol (DAG) et inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). L'IP3 est capable de provoquer la libération du calcium des réserves intracellulaires en se liant à son récepteur sur celles-ci. Le DAG quant à lui, couplé à l'action de l'ion calcium et de la phosphatidylsérine, active la protéine kinase C, une kinase centrale. Les récepteurs métabotropiques glutamatergiques mGluR2 et mGluR3 forment la classe II. Leur activation provoque la baisse du second messenger cAMP. Les changements de concentration de cAMP affectent principalement la kinase tétramérique PKA. Chaque site catalytique des deux sous-unités C de PKA est libéré du joug de la séquence auto-inhibitrice du dimère de sous-unités R de PKA par la liaison de deux molécules de cAMP sur la sous-unité R correspondante. PKA est une sérine/thréonine kinase capable de phosphoryler plusieurs dizaines de protéines dont notamment le récepteur AMPA.

L'application de MCPG, un antagoniste des mGluR bloque spécifiquement l'expression initiale du LTP mais pas un renforcement d'un LTP déjà présent (Bashir, Bortolotto et al. 1993).



## **Le cas spécial du LTP en culture**

En comparaison avec le LTP en tranche qui est un phénomène extrêmement bien établi, le LTP en culture n'a été reporté que dans quelques publications (Lu, Man et al. 2001; Oh and Derkach 2005). Ici, la stimulation électrique utilisée en tranche est remplacée par des protocoles de perfusion dont le but est de faire entrer une quantité appropriée de calcium par les canaux NMDA. La potentialisation est déterminée en comparant l'amplitude et la fréquence des minis avant et après le protocole de perfusion. Les cultures dissociées de neurones de l'hippocampe sont à plusieurs niveaux très différentes des neurones en tranche.

1. Le stress mécanique et chimique de la dissociation. On coupe les voies afférentes et efférentes, les axones et les dendrites des neurones. Il ne reste que des cellules sphériques qui doivent reformer entièrement leurs interconnexions.
2. L'environnement de croissance et d'homéostasie des facteurs diffusibles provenant de leurs voisins immédiats mais aussi de l'animal entier et qui sont sous contrôle précis chez l'animal est essentiellement perdu par le fait que les quelques 400,000 neurones d'un puits baignent par eux-mêmes dans 1 ml de liquide, un ratio volume de liquide par neurone tout à fait mirobolant par rapport à la situation physiologique. Le liquide lui-même, bien que suffisant pour maintenir la survie des neurones pendant quelques semaines, a une composition nécessairement différente du liquide cérébrospinal physiologique.
3. Les circuits établis lors de la neurogenèse et le développement intra-utérin sont complètement éliminés par la dissociation.
4. L'activité nerveuse issue des afférences est complètement perdue. Les neurones dissociés ne peuvent compter que sur leur activité spontanée intrinsèque pour rétablir une activité nerveuse. Les stimuli nombreux issus des systèmes sensoriels sont totalement absents en culture.
5. La géométrie de l'espace extracellulaire en particulier autour de la synapse et la composition de la matrice extracellulaire.
6. La portion exacte de l'hippocampe qui est utilisée peut varier de laboratoire en laboratoire.

## **Mécanismes d'expression du LTP**

Les mécanismes d'expression du LTP peuvent être multiples.

Du côté pré-synaptique:

- Augmentation de la probabilité de fusion des vésicules de neurotransmetteurs.
- Augmentation/accroissement des sites de relâchement des vésicules de neurotransmetteurs.
- Augmentation de la concentration de neurotransmetteurs dans les vésicules.
- Augmentation du nombre de vésicules de neurotransmetteurs.

Du côté post-synaptique:

- Augmentation de la perméabilité (Luthi, Wikstrom et al. 2004) et modification de la cinétique des récepteurs AMPA suite à leur phosphorylation.
- Augmentation de la perméabilité des récepteurs par substitution de sous-unité.
- Ajout de récepteurs fonctionnels à la synapse.
- Augmentation de la surface membranaire.
- Changements morphologiques de l'épine dendritique.

Certains de ces mécanismes requièrent une activation enzymatique constante pour leur maintien.

## L'épine dendritique

L'épine dendritique représente un volume confiné de  $0.01\text{--}1\text{ }\mu\text{m}^3$  connecté à la dendrite par un cou d'environ  $0.1\text{ }\mu\text{m}$  de diamètre qui lui confère ainsi des propriétés uniques (Harris and Kater 1994). Avec une capacité relativement faible à tamponner le calcium par rapport à la dendrite et une diffusion lente à travers le cou de l'épine, les transitoires de calcium qui y apparaissent auraient ainsi une capacité accrue à provoquer des changements à long terme (Sabatini, Oertner et al. 2002).

## Le calcium

Le calcium a un rôle majeur dans le fonctionnement des cellules eucaryotes. La concentration de calcium libre extracellulaire est d'environ  $1.5\text{ mM}$  (Jones and Keep 1988) alors qu'elle n'est que  $100\text{ nM}$  à l'intérieur de la cellule, c'est à dire 15000 fois plus faible. Ceci démarque le  $\text{Ca}^{2+}$  de tous les autres ions communs:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ . Pour une épine dendritique de grosseur typique, i.e. de diamètre  $0.5\text{ }\mu\text{m}$  dont on approxime le volume par une sphère où  $V = 4 / 3 * \pi * (d / 2)^3$ , le nombre théorique d'ions calcium libre dans le cytosol est de seulement 4 au repos. Une concentration aussi basse est maintenue par l'action de pompes et la liaison du calcium avec diverses protéines dont notamment la calmoduline. La concentration de calcium est contrôlée de façon serrée par la cellule (Rasmussen, Barrett et al. 1990) car une concentration élevée pendant une période de temps trop longue devient toxique (Lazarewicz and Salinska 1993). L'élévation du calcium intracellulaire peut avoir trois origines distinctes: les canaux calciques dépendants du voltage qui laissent entrer le calcium extracellulaire lorsque l'intérieur de la cellule est dépolarisée, les canaux ioniques activés par les neurotransmetteurs dont notamment le récepteur NMDA, le relâchement de calcium des réserves intracellulaire par l'action de l'inositol triphosphate. Suite à l'entrée de calcium, des pompes calciques activées par l'hydrolyse de l'ATP déplacent le calcium intracellulaire vers les deux principaux réservoirs de calcium: le réticulum endoplasmique et l'espace extra cellulaire en échange de deux ions  $\text{H}^+$ . Un autre type de pompe utilise le gradient de l'ion  $\text{Na}^+$  et qui échange des ions  $\text{Na}^+$  pour des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Rasmussen, Barrett et al. 1990). Dû à la différence importante entre les concentration intra et extra cellulaires et à la concentration élevée de protéines capables de lier le calcium dans la cellule ( $\sim 0.2\text{--}0.3\text{ mM}$ ), les transitoires de calcium sont très localisés dans l'espace ( $\sim 0.1\text{--}0.5\text{ }\mu\text{m}$ ) et dans le temps ( $\sim 30\text{ ms}$ ) (Squire 2003). Étant donné son volume confiné, la synapse représente un endroit privilégié pour décoder les transitoires de calcium.



En plus d'être porteur de charge, le calcium est un messager secondaire important. Une protéine majeure pour le décodage des transitoires de calcium est la calmoduline qui en retour se lie à un nombre important de protéines dont notamment la CaMKII. Le calcium libre dans la cellule se lie aussi directement à des enzymes comme calpain, PKC et des canaux calciques (Horn 1998) et potassiques (Vergara, Latorre et al. 1998).

## **La calmoduline (CaM)**

La calmoduline est une petite protéine avec une séquence de 148 acides aminés (16.7 kDa) qui est très conservée parmi les espèces (la souris, le rat de Norvège et l'humain ont des séquences identiques) et qui peut lier jusqu'à 4 ions calcium lorsque la concentration intracellulaire s'élève aux alentours de 10  $\mu$ M. Elle est exprimée dans plusieurs types cellulaires chez les eucaryotes. Elle est impliquée dans l'inflammation, le métabolisme, la mort cellulaire programmée, la contraction musculaire, le mouvement intracellulaire, la réponse immunitaire et la mémoire à court et long terme. Chaque ion calcium est lié à une main EF, un motif retrouvé dans plusieurs protéines liant le calcium. Ce motif est composé de deux hélices alpha liées par une boucle de 12 résidus. L'ion calcium se lie à la boucle et change ainsi la position relative des deux hélices alpha. Les deux sites de liaison en C-terminale ont une affinité 100 fois plus grande ( $K_d \sim 10E-7$  M) que les sites en N-terminale ( $K_d \sim 10E-5$  M) (Klee 1988). Plus de 20 protéines lient la calmoduline (Nevalainen, Aoyama et al. 1997). Parmi celles-ci, notons la calcineurine, le récepteur NMDA (Ehlers, Zhang et al. 1996) et bien sûr les CaM kinases dont la CaMKII est la mieux connue. La calmoduline lie généralement les protéines par des interactions non polaires grâce à un nombre particulièrement élevé de résidus méthionines qui deviennent exposés lors de la liaison du calcium. La liaison du calcium par la CaM est coopérative (Mamar-Bachi and Cox 1987) et cette coopération s'accroît par la liaison à une protéine cible (Klee 1988). En plus du changement de conformation lors de la liaison du calcium, l'action de la CaM peut être modulée par phosphorylation (Benaïm and Villalobo 2002), acétylation (Jackson, Carraway et al. 1987), méthylation (Sitaramayya, Wright et al. 1980) et la segmentation protéolytique.

La concentration de calmoduline dans le cytosol est estimée entre 10 et 100  $\mu$ M (Kakiuchi, Yasuda et al. 1982; Sharma and Wang 1988) ce qui est de 100 à 1000 fois la concentration de calcium libre et représente donc une éponge considérable pour absorber les élévations transitoires de calcium. À certains endroits restreints, la concentration de calmoduline peut être significativement plus grande. Il est estimé que les canaux calciques dépendants du voltage de type L auraient aux alentours de leur queue cytoplasmique une concentration de calmoduline atteignant 2.5 mM (Mori, Erickson et al. 2004)

## **La kinase calmoduline dépendante II (CaMKII)**

Les kinases, qui modifient leur substrat en leur ajoutant un groupement phosphate, jouent un rôle principal dans une foule de processus cellulaires. Chez les eucaryotes, les kinases sont des protéines homologues qui représentent 1.5 à 2.5 % de tous les gènes. On peut les classer en environ 200 familles à partir des similarités de leur domaine catalytique (Manning, Plowman et al. 2002). À tout moment du développement et suivant les types

cellulaires et les tissus, seulement une fraction de ces kinases est exprimée. Parmi les kinases, la calmoduline dépendante kinase II (CaMKII) est une enzyme centrale du système nerveux et la mieux connue du groupe des CaM kinases. Elle se retrouve dans tous les tissus mais elle est particulièrement présente dans les neurones. Elle représente 1% du cerveau antérieur et 2% des protéines de l'hippocampe (Erondy and Kennedy 1985), un niveau dû à l'expression élevée de l'alpha-CaMKII (Miller and Kennedy 1985). Cette concentration est approximativement 50 fois plus élevée qu'ailleurs dans le corps (Squire 2003). La forte expression de la CaMKII dans l'hippocampe n'est pas égale puisqu'il a été démontré que les inter-neurones de l'hippocampe n'exprime pas l'alpha-CaMKII (Sik, Hajos et al. 1998).

La CaMKII est cytoplasmique mais les variantes AlphaB, GammaA, et DeltaB peuvent être nucléaires (Hook and Means 2001). Les isoformes Alpha et Bêta sont principalement exprimées dans le cerveau alors que les isoformes Gamma et Delta sont exprimées à travers tout le corps (Squire 2003). C'est une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle des substrats nombreux autant du côté pré-synaptique que post-synaptique. Du côté pré-synaptique, citons la synaptotagmine (Popoli 1993), la synaptophysine (Rubenstein, Greengard et al. 1993) et la synapsine I. Du côté post-synaptique, citons les cas particulièrement d'intérêt de la sous-unité GluR1 des récepteur AMPA qui en augmente la conductivité (Barria, Derkach et al. 1997) et de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA. Elle s'associe en un oligomère d'environ 12 sous-unités qui s'attachent par leur extrémité C-terminale en deux cercles superposés de 6 sous-unités (Kolodziej, Hudmon et al. 2000). Comme pour les kinases PKA et PKC, une séquence auto-inhibitrice empêche l'accès du substrat à la zone catalytique. Ses états de phosphorylation et de liaison avec la calmoduline contrôle sa localisation dans des régions précises du neurone et donc son action ciblée (Colbran, Carmody et al. 2003; Tsui, Inagaki et al. 2005). Comme son nom l'indique, elle peut lier la calmoduline lorsque cette dernière est liée à 4 ions  $\text{Ca}^{2++}$ . Ceci dégage le site catalytique et permet ainsi à la kinase de devenir active. De plus, lorsque deux sous-unités adjacentes dans l'oligomère lient la calmoduline en même temps, l'une d'elles devient capable de phosphoryler l'autre sur le site Thr286. La sous-unité ainsi phosphorylée devient indépendante de la calmoduline et peut donc être active au delà du transitoire de  $\text{Ca}^{2++}$  qui a initialement lancé le processus.

L'alpha CaMKII se retrouve seulement dans les neurones (Kolodziej, Hudmon et al. 2000) et est absente des neurones GABAergiques (Sik, Hajos et al. 1998). Dans les neurones de culture de l'hippocampe CA1-CA3, l'expression de l'alpha-CaMKII est réduite lorsque l'activité est diminuée (Thiagarajan, Piedras-Renteria et al. 2002). L'alpha CaMKII serait principalement cytosolique alors que la bêta CaMKII se lierait à la F-actin. Une petite quantité de bêta CaMKII serait suffisante dans un hétéromère pour attirer l'alpha CaMKII à la synapse (Shen, Teruel et al. 1998). Un segment absent de l'isoforme alpha CaMKII confère la bêta une affinité accrue pour la F-actine et du fait même un rôle marqué dans la régulation de l'extension de neurites et de la formation des synapses (Shen and Meyer 1999; Fink, Bayer et al. 2003).

La bêta CaMKII demande une concentration plus petite de calmoduline que l'alpha CaMKII pour son activation. L'autophosphorylation semi-maximale est réalisée à une concentration de calmoduline de 15 nM versus 130 nM pour l'alpha-CaMKII (Brocke, Chiang et al. 1999). Ceci expliquerait pourquoi la bêta CaMKII est plus exprimée lorsque

l'activité neuronale est diminuée par l'ajout de drogues (Thiagarajan, Piedras-Renteria et al. 2002).

## **Autres kinases majeures : PKA et PKC**

La CaMKII partage une similitude dans sa séquence et une importance certaine dans les processus neuronaux avec notamment la protéine kinase A (PKA) ou protéine kinase cAMP-dépendante et la protéine kinase C (PKC). PKA, PKC et la CaMKII font partie du groupe des kinases cognitives. On les nomme ainsi à cause de leur faculté à maintenir leur état activé suite au retour de leur messager secondaire à un niveau basal et aussi parce qu'elles jouent un rôle de premier plan dans la plasticité synaptique en phosphorylant des substrats directement impliqués dans celle-ci. PKA est une sérine/thréonine kinases tétramériques (Tasken and Aandahl 2004). Le LTP induit par plusieurs trains de stimulation à 100 Hertz dans la région CA1 de l'hippocampe dépend de façon critique de PKA (Frey, Huang et al. 1993; Huang and Kandel 1994). PKC est en fait un groupe de plusieurs sérine/thréonine kinases monomériques qui sont activées par deux molécules de diacylglycérol (DAG), par l'ion calcium et finalement le phosphatidylsérine, un phospholipide de la membrane cytoplasmique. PKC est donc activée à la membrane mais une fois activée, elle peut translocaliser dans le cytosol pour phosphoryler une gamme de substrats du cytosquelette et du noyau (Purves 2004).

## **Les récepteurs ionotropiques glutamatergiques AMPA et NMDA**

### **Récepteurs AMPA**

Le récepteur glutamatergique AMPA est le principal responsable de la dépolarisation rapide de la cellule et ce principalement en laissant entrer le sodium extra cellulaire. Il laisse passer aussi le calcium mais sa contribution n'est que de un vingtième de celle du récepteur NMDA (Garaschuk, Schneggenburger et al. 1996). La sous-unité GLUR1 peut être phosphorylée par la CaMKII sur la sérine 831 (Barria, Derkach et al. 1997). Ceci augmente la conductivité du récepteur (Derkach, Barria et al. 1999) et représente une des bases de l'expression du LTP.

### **Récepteur NMDA**

Le récepteur NMDA (NMDAR) se démarque des autres canaux ioniques activés par liaison de ligand par le fait qu'il nécessite la présence de glutamate et de glycine pour être activé (Johnson and Ascher 1987). Étant donné le niveau basal de chacun de ces acides aminés et leur IC50 respectif, i.e. glutamate: niveau basal ~ 0.3  $\mu\text{M}$  (Westergren, Nystrom et al. 1994), IC50 ~ 5  $\mu\text{M}$  (Kew, Koester et al. 2000) et glycine: niveau basal 1.8  $\mu\text{M}$  (Westergren, Nystrom et al. 1994), IC50 ~ 0.08  $\mu\text{M}$  (Kew, Koester et al. 2000), le glutamate joue le rôle de neurotransmetteur alors que la glycine jouerait un rôle de modulateur. Le NMDAR est normalement bloqué par l'ion  $\text{Mg}^{2+}$  du côté extracellulaire (Mayer, Westbrook et al. 1984; Nowak, Bregestovski et al. 1984) mais aussi du côté intracellulaire (Johnson and Ascher 1987). Lorsque la cellule se dépolarise suffisamment, grâce à l'action des récepteurs AMPA, l'ion  $\text{Mg}^{2+}$  dégage le canal pour laisser entrer l'ion



Ca<sup>2+</sup>. Le récepteur NMDA possède plusieurs sites de liaison capables de moduler son action. Le récepteur NMDA laisse passer 20 fois plus de calcium que le récepteur AMPA (Garaschuk, Schneggenburger et al. 1996). En fait, la majorité du calcium dans la synapse passerait par le NMDAR (Kovalchuk, Eilers et al. 2000).

Le récepteur NMDA est composé de deux sous-unités NR1 et deux sous-unités NR2A/NR2B. Dans l'hippocampe du rat, la composition en NR2B prédomine chez le nouveau-né pour devenir minoritaire éventuellement chez l'adulte (Monyer, Burnashev et al. 1994). Une souris qui exprime beaucoup plus de NR2B a vu ses capacités cognitives nettement améliorées (Tang, Shimizu et al. 1999). Les sous-unités NR2A et NR2B ont des queues cytoplasmiques beaucoup plus grandes que la sous-unité NR1 ce qui leur permet des interactions avec diverses protéines dont la CaMKII. La CaMKII autophosphorylée a un site de liaison avec les sous-unités NR2A comme NR2B. Elle peut également phosphoryler le récepteur NR2B. La liaison avec NR2A serait en compétition avec la liaison NR2A-PSD95 (Gardoni, Schrama et al. 2001). L'affinité qu'a la CaMKII pour le récepteur NMDA lui permet d'être positionnée de façon optimale pour "voir" les entrées de calcium synaptique. La CaMKII a une affinité moins grande pour l'extrémité C terminale de la sous-unité NR2A (Leonard, Lim et al. 1999; Strack, Robison et al. 2000; Mayadevi, Praseeda et al. 2002). La liaison de la CaMKII au récepteur NR2B peut aussi verrouiller l'enzyme dans un mode actif indépendamment du Ca<sup>2+</sup> et de son niveau de phosphorylation (Bayer, De Koninck et al. 2001). On rapporte que 65% des NMDARs sont mobiles (Tovar and Westbrook 2002). Cette mobilité amène la possibilité d'une modulation assez rapide de l'entrée de calcium.



## **Méthode**

Rappelons que l'hypothèse est que la translocalisation de la CaMKII à la synapse est nécessaire pour l'expression de la potentialisation. Des études précédentes utilisant des mutants de la CaMKII ont identifié des sites importants sur celle-ci lui permettant d'aller à la synapse. La stratégie pour tester cette hypothèse était de mesurer en électrophysiologie l'évolution des courants synaptiques spontanés dans des neurones transfectés avec les mutants susmentionnés suite à l'application d'un protocole visant à générer une potentialisation.

## **Modèle utilisé: cultures dissociées d'hippocampe du rat naissant**

Un animal est un environnement étroitement contrôlé malgré la variabilité du milieu environnant. En culture, le phénotype des cellules est une fonction directe des conditions de culture: température, compositions chimiques, pH, lumière, patrons des concentrations dans le temps dont notamment les facteurs diffusibles sécrétés dans le milieu extracellulaire, prolifération de la glie, etc. Le modèle utilisé par le laboratoire est la culture des neurones de l'hippocampe de rats de Norvège de souche Sprague-Dawley nouveau-nés (1 à 3 jours) d'une même portée maintenus en culture pendant deux à trois semaines.

### **Protocole de culture**

Les hippocampes de rats sont disséqués chez des rats naissants d'une même portée à un âge de un à trois jours. Il est à noter que la culture résultante est une chimère des rats autant mâles que femelles puisque les neurones sont mélangés. Quel peut être l'impact d'utiliser une chimère? Est-ce que ceci peut contribuer à la variabilité des résultats?

Le protocole complet est donné en annexe mais en voici un résumé simplifié. Les hippocampes sont dissociés de façon mécanique avec une pipette pasteur et de façon enzymatique avec une solution de papaïne et de solution balancée de sels de Hanks. Une certaine partie des neurones survivront à ce traitement sous la forme de sphères qui seront séparées des débris. Ces neurones sphéroïdes sont ensuite déposés par gravité sur les disques d'Aclar ou de verre couvert de polylysine, une substance biocompatible. Les cultures sont ensuite incubées pendant 2 à 3 semaines avant d'être utilisées pour les expériences. Pendant la période d'incubation, les cultures sont nourries deux fois par semaine en remplaçant la moitié du milieu de culture avec du neurobasal frais.

### **Milieu de culture**

Cette section présente le milieu de culture et essaie d'identifier certains points qui peuvent amener une variabilité dans les résultats.

Le milieu de culture utilisé est un milieu purement synthétique, c'est à dire qu'il est

composé d'éléments à la composition précisément connue. L'alternative, qui est d'utiliser un milieu à base de sérum animal, apporte une variabilité importante. Il a été initialement développé et optimisé par Brewer pour avoir une survie maximale des neurones embryonnaires (Brewer, Torricelli et al. 1993). Il baptisa ce milieu le "*neurobasal*". Dans une publication subséquente, il optimisa la composition pour les neurones du rat adulte (Brewer 1997) "*neurobasal A*". Il est à souligner ici que le modèle du laboratoire consiste en des neurones de rats nouveau-nés et se situe donc au milieu des deux situations étudiées par Brewer. Or, le milieu de culture utilisé dans notre cas est le neurobasal. Le milieu optimal pour notre modèle pourrait donc être à mi-chemin entre le neurobasal et le neurobasal A.

Le pH du milieu cérébro-spinal est normalement environ 7.3. Il est contrôlé naturellement par un tampon bicarbonate. Le pH est contrôlé également dans le neurobasal grâce à un tampon bicarbonate mais aussi grâce à une quantité de 10 mM d'HEPES. L'HEPES est une substance très souvent utilisée pour taponner le pH des solutions entrant en contact avec les tissus vivants. Il a l'avantage d'être plus facile d'utilisation que le tampon bicarbonate puisqu'il n'exige pas la présence permanente d'une concentration de 5% de CO<sub>2</sub>. Il est à souligner cependant que l'HEPES est photo-toxique. En effet, il a été découvert que l'exposition pendant quelques minutes de cellules à la lumière ambiante fluorescente provoque une mortalité importante de certains types de cellules (Lepe-Zuniga, Zigler et al. 1987). La photo-toxicité de l'HEPES passerait par la génération de radicaux libres, un phénomène réversible en maintenant le milieu exposé dans la noirceur pendant quelques minutes. Tout au cours de leur croissance, les neurones de cultures sont mis plusieurs fois en contact avec la lumière ambiante lorsqu'ils sont nourris.

Il existe du neurobasal avec et sans phénol rouge. Le neurobasal utilisé dans le laboratoire contient du phénol rouge pour pouvoir juger visuellement du pH d'un puits donné. Le phénol rouge est une substance qui ressemble aux œstrogènes dont l'utilisation a un impact dans les cultures sensibles aux œstrogènes (Berthois, Katzenellenbogen et al. 1986). Les œstrogènes modulent la fonction des récepteurs NMDA dans le système nerveux et contribue à l'accroissement de la densité des épines dendritiques et du nombre de synapses dans l'hippocampe (El-Bakri, Islam et al. 2004). Les œstrogènes influencent la plasticité synaptique, la physiologie de l'hippocampe ainsi que l'apprentissage relié à l'hippocampe (Weiland, Orikasa et al. 1997).

La présence de facteurs diffusibles a un impact fondamental sur les neurones. En fait, toute la structure initiale du système nerveux est construite par une signalisation basée sur les facteurs diffusibles. Ainsi, le neurobasal contient le facteur de croissance FGF2 qui fut identifié comme critique pour la survie des neurones de culture (Brewer 1997).

La quantité de cellules gliales est une variable excessivement importante qui pourra moduler de façon non négligeable la culture pour plusieurs raisons dont notamment le relâchement de facteurs. Pour des densités inférieures à 400 000 cellules par puits, de l'Ara-C est ajouté après le jour 4 pour empêcher une prolifération trop importante des cellules gliales en inhibant simplement la division de celles-ci. Le ratio entre la quantité de neurones et de cellules gliales ainsi que la vitesse à laquelle le neurobasal est remplacé

décideront du sort exact de la culture.

On peut voir que les obstacles à la reproductibilité entre laboratoires travaillant avec les cultures de neurones ne sont pas inexistantes. La section sur le projet Rig présente des améliorations successives aux méthodes de culture en pour but de s'approcher le plus possible de la stabilité du modèle de la tranche.

## La technique du patch-clamp

Cette section documente mon expérience personnelle avec la technique du patch-clamp pour fin de critique. J'ai pu réaliser que l'étendue des connaissances requises pour bien maîtriser la question du patch-clamp est plus importante qu'il n'y paraît et cette section ne fait qu'effleurer le sujet. En fait, il serait tout à fait justifié que le programme de neurobiologie (voire le centre de recherche) offre un cours optionnel d'une durée d'une session couvrant le sujet en profondeur. Ceci aurait un impact positif sur la productivité des étudiants pour qui le patch-clamp représente l'essentiel des manipulations qu'ils auront à accomplir pendant leur maîtrise ou doctorat et qui ignorent tout de cette technique avant de commencer.

La technique du patch-clamp consiste à faire contact avec une cellule à l'aide d'une micropipette montée sur micromanipulateur. La micropipette a une ouverture de l'ordre du micromètre et est remplie d'une solution appropriée suivant l'expérience planifiée. Une fois un bon contact établi, quelques variantes sont possibles pour mesurer les propriétés électriques du neurone et/ou le stimuler. Dans le cadre de cette maîtrise, seule la configuration cellule entière a été utilisée.

## Transport et mise en place de l'échantillon

L'échantillon, un disque d'Aclar ou de verre couvert de cellules qui se sont développées pendant environ deux semaines, est retiré du puits contenant le milieu de culture avec des pincettes en prenant soin de maintenir une goutte de liquide sur le dessus et est transféré dans un pétri contenant la solution extracellulaire de composition différente du contenu du puits, soit le neurobasal, et ce pour différentes raisons dont notamment l'obtention d'un meilleur joint d'étanchéité et la possibilité de varier la concentration de toutes les substances du milieu extracellulaire. Ensuite, le disque est transféré sous le microscope dans le bain de perfusion et est fixé avec un trombone maintenu en place par l'action d'aimants inclus dans le rebord du bain. Le but du trombone est de coller le disque contre le fond du bain et ainsi maintenir un plan focal le plus plat possible. Les disques d'Aclar sont flexibles et sont le plus souvent légèrement courbés. La présence d'un moyen pour les maintenir à plat est donc dans leur cas essentiel. Notons qu'étant donné le contenu élevé en sel de la solution extracellulaire, un trombone corrode rapidement s'il n'est pas enduit d'une couche protectrice comme la colle époxy.

Comme la vaste majorité des expériences en électrophysiologie, toutes les expériences faites dans le cadre de cette maîtrise ont été faites à température ambiante. Quel est l'impact du stress occasionné par le passage du milieu de culture à 37 degrés C vers la



solution extracellulaire du bain à 22 degrés C à la composition différente? Quel est l'impact de la situation d'hypothermie ainsi créée sur le fonctionnement du neurone? On sait qu'une température moindre réduit la vitesse des réactions mais certaines enzymes critiques peuvent cesser purement et simplement d'être opérationnelles sous une certaine température donnée. Simplement à titre d'exemple pour illustrer l'impact de cette différence de température, (Asztely, Erdemli et al. 1997) démontrent une augmentation par un facteur 3 de l'amplitude maximale du courant de la cellule entière suite à l'application par pression d'AMPA ou NMDA. Il est clair que le passage de 37 à 20-22 degrés C amène tout un lot de changements.

Malgré toutes les précautions possibles, une proportion difficile à délimitée des cellules ont subit un stress mécanique important:

- Les cellules ne limitent pas leur croissance au disque mais débordent partiellement dans le fond du puits. Le simple fait de retirer le disque du puits sectionne tous les nerfs qui se sont aventurés en dehors du disque.
- La pincette qui saisie le disque provoque une blessure à l'endroit saisie.
- Le trombone provoque une blessure à l'endroit où son extrémité touche au disque.

Quel est l'impact de ces stress mécaniques sur les neurones? Peux-t-on imaginer que l'impact de ces blessures se fait sentir bien au delà de leur emplacement respectif?

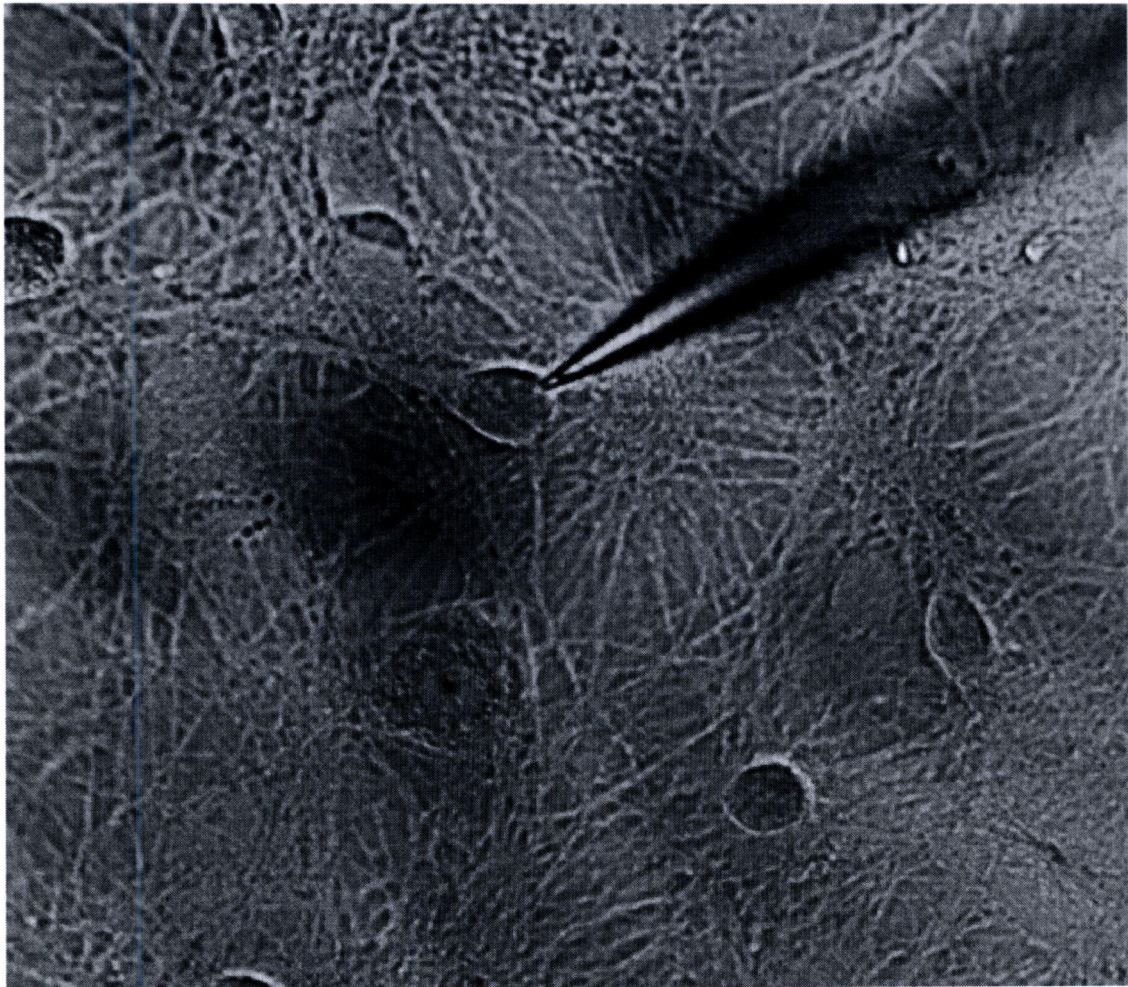
## **Le choix des cellules**

Contrairement à la tranche qui offre une structure définie avec des populations de neurones aux propriétés propres et qui sont fortement corrélées avec leur position dans la tranche, la culture de cellules dissociées n'est essentiellement qu'un amas de cellules diverses disposées de façon aléatoire. La notion de circuit ne s'applique pas dans la culture dissociée. Les caractéristiques de la culture dissociée se résument simplement à un gradient de neurones et cellules gliales vivantes avec une densité maximale au centre. Ainsi, on choisit une cellule pour maximiser les chances de succès de la « patch ». La sélection se fait en lumière transmise pour pouvoir juger de façon optimale de la qualité de la cellule. Voici les caractéristiques recherchées:

- Une cellule avec un soma approximativement triangulaire.
- Un soma avec le plus de relief possible.
- Un soma démontrant une apparence la plus lisse possible. L'apparence lisse de la surface de la cellule est une caractéristique qui devient de plus en plus rare avec l'âge des cultures.
- Un soma relativement isolé de ses congénères. Les quelques cellules transfectées d'un disque sont trop souvent enfouies sous un épais tapis de cellules. Elles sont alors beaucoup plus difficiles à « patcher ».

Une chose qu'il est bon de souligner ici est que le fait de choisir un neurone avec le plus de relief possible pourrait être une erreur selon certaines électrophysiologistes qui m'ont fait la remarque à la toute fin de cette maîtrise. Selon eux, un neurone sphérique serait le

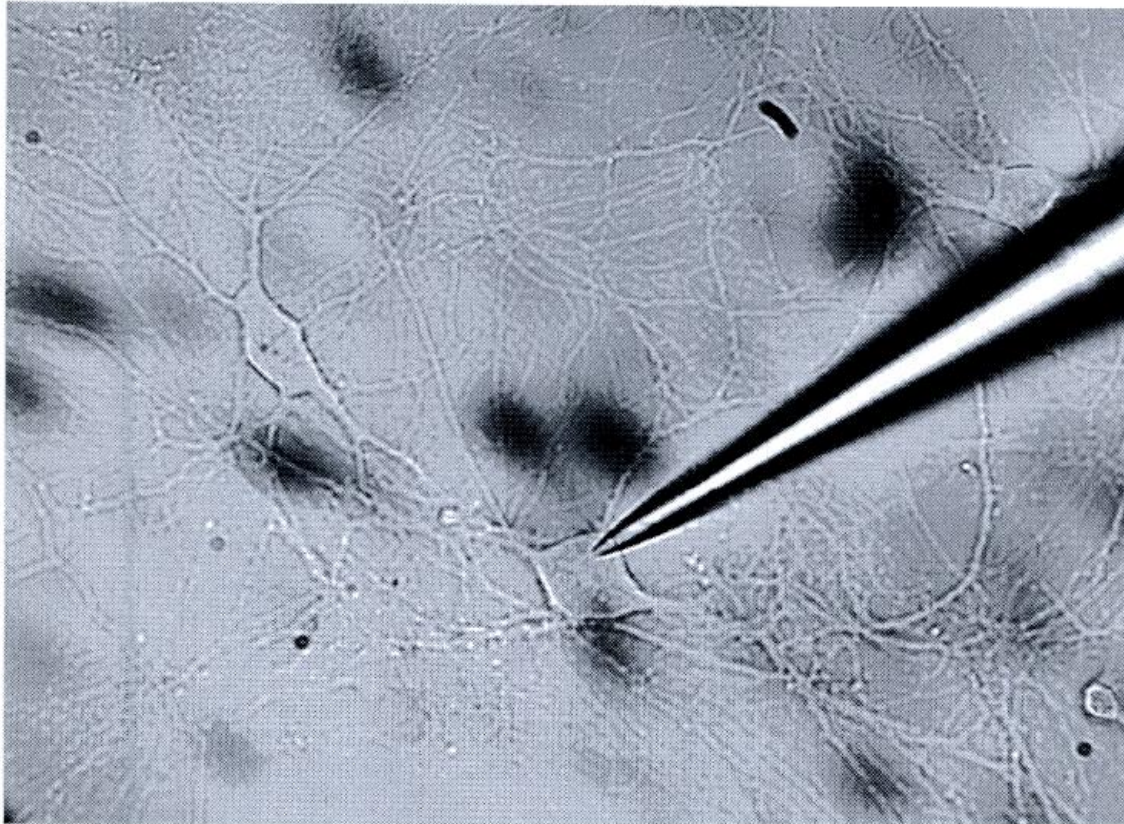
symptôme d'un neurone mal en point. La Figure 1 et la Figure 2 qui suivent présentent des neurones considérés bon à « patcher ». Dans la première figure, la densité des prolongements des neurones est significativement plus élevée que dans la deuxième figure. Une densité plus élevée de prolongements est généralement associée avec une baisse des chances de succès du « gigaseal ».



**Figure 1** Un exemple de neurone considéré bon pour le patch-clamp







**Figure 2** Un autre exemple de neurone considéré bon pour le patch-clamp.

## **La perfusion**

Le but de la perfusion est de pouvoir baigner l'échantillon dans une solution à la composition précise à tout moment au cours d'un protocole de perfusion. Pour pouvoir répéter l'expérience dans les mêmes conditions, le débit de la perfusion et la géométrie de la chambre de perfusion (position de l'arrivée de la perfusion, position du trop-plein de perfusion et volume de la chambre) doivent être très stables. De plus, pour pouvoir exécuter des changements de concentration les plus rapides possibles, l'idéal est d'avoir un débit de perfusion maximal et un volume de chambre minimal.

Le système de perfusion utilisé pendant ce projet de maîtrise est une simple banque de cylindres gradués connectés à des tubes joints par un collecteur juste avant d'entrer dans la chambre de perfusion. Le débit de chaque cylindre est contrôlé de façon tout ou rien par un relais qui pince le tube du cylindre correspondant. L'écoulement est seulement l'œuvre de la gravité. Même dans le cas idéal où le cylindre, le tube et la solution sont d'une propreté absolue, le débit varie entre le cas où le cylindre est plein et celui où il est presque vide car la pression change. De plus, étant donné le faible diamètre des tubes qui lient les cylindres à la chambre de perfusion, tout solide peut affecter de façon non négligeable le débit. Puisque les solutions utilisées contiennent du glucose, un film bactérien se développe graduellement sur les parois des tubes. Le problème de la perfusion mérite une attention toute particulière. Il en va de la fiabilité des expériences

faites dans ce projet de maîtrise.

Ce type de système de perfusion n'est clairement pas optimal. Comme alternative, l'utilisation de pompes péristaltiques qui forcent un débit programmable dans les tubes est fortement recommandée. Cette solution offre aussi l'avantage de contrôler le débit suivant les besoins. Ceci permet entre autres de rincer le système à grande vitesse. Le rinçage à fond du système au débit de 1 ml par minute pour éviter la contamination par l'expérience précédente prend un temps considérable. On peut facilement trouver une pompe péristaltique avec un débit variable de 1 ml à 10 ml.

Le débit de perfusion standard dans les publications est de 1 ml par minute. Or, le volume de la chambre a toute son importance. En première approximation (dont la validité a été vérifiée expérimentalement), la concentration dans le bain peut être modélisée par un système du premier ordre qui répond à un échelon de concentration. En prenant le cas simple où le bain part d'une concentration nulle pour tendre vers la concentration de la solution de perfusion, la concentration dans le bain en fonction du temps sera ainsi exprimée par la formule:

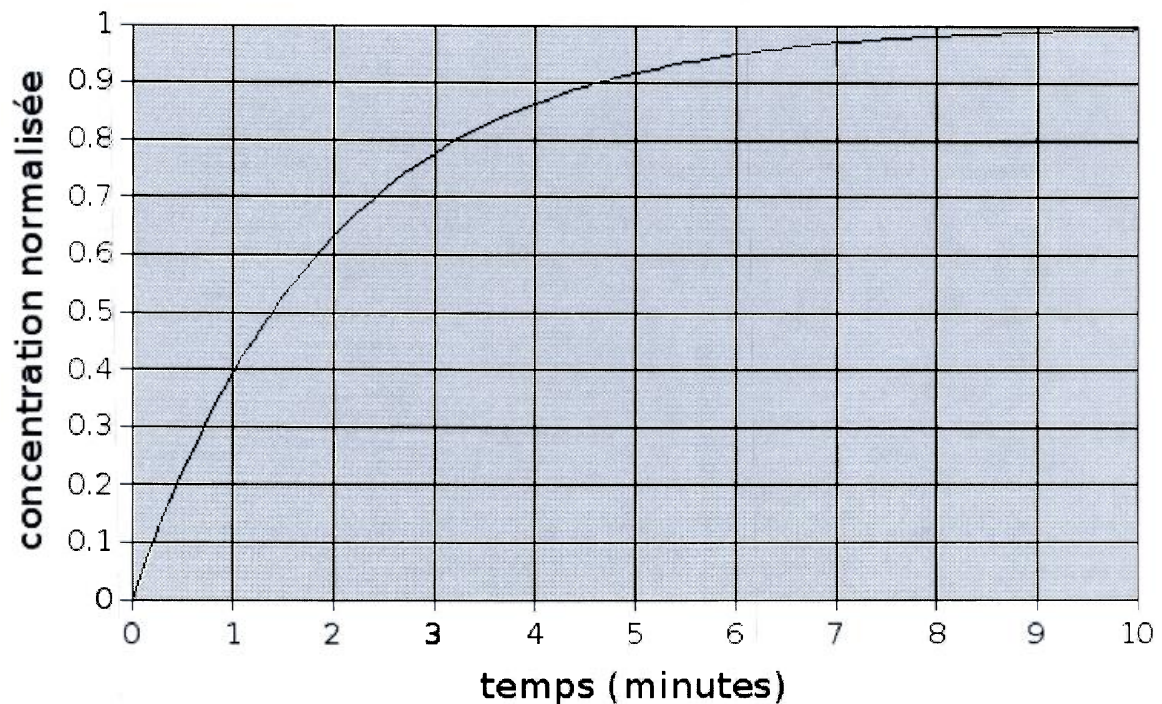
$$[\text{bain}] = [\text{perfusion}] * (1 - \exp(-t/\tau))$$

$$\text{où } \tau = \text{volume du bain} / [\text{perfusion}]$$

Ainsi, dans notre montage expérimental, pour un débit de 1 ml par minute et un volume de bain d'environ 2 ml, la concentration dans le bain en fonction du temps variera ainsi:



Concentration dans le bain en fonction du temps pour un volume de chambre de 2 ml et un débit de 1 ml par minute



**Figure 3** Concentration dans le bain en fonction du temps pour un volume de chambre de 2 ml et un débit de 1 ml par minute

On peut voir que ce montage n'est pas approprié pour les protocoles de perfusion rapide car la concentration dans le bain n'aurait essentiellement pas le temps de changer. Encore plus important, lorsqu'on veut laver le bain d'une certaine substance, étant donné la vitesse lente du changement de concentration, il faut porter une attention toute particulière aux concentrations utilisées. Une condition sursaturante excessive aura l'inconvénient majeur de prendre un temps fou à être lavée du bain.

Le contrôle précis du volume de perfusion qui baigne un nombre assez bien contrôlé de neurones déposés dans le bain est un facteur important mais en plus, le ratio volume de perfusion par neurone a aussi toute son importance. En effet, si les phénomènes étudiés dépendent en tout ou en partie de facteurs diffusibles ou d'une élévation de longue durée de certains neurotransmetteurs, une perfusion trop intense ou même simplement un volume trop important de solution extracellulaire dans le bain peut avoir un impact décisif sur les résultats de l'expérience. En fait, le ratio volume de solution extracellulaire par neurone est tout à fait mirobolant par rapport à la situation physiologique.

Le fait d'approcher l'embouchure de la perfusion du neurone « patché » est une arme à double tranchant : ceci permet de changer le plus rapidement possible le liquide extracellulaire baignant le neurone « patché » et ses voisins mais augmente la probabilité

d'avoir une « patch » instable ou qui ne tient tout simplement pas le coup. De plus, la concentration précise qui atteindra les neurones cible est alors très incertaine.

### **Le problème de la contamination par les expériences précédentes**

Pour un lavage le plus efficace possible des contaminants provenant des expériences précédentes, les principes suivants devraient être suivis avant et après les expériences:

- Rincer les tubes avec 60 ml d'eau distillée au moins deux fois. Il a été estimé expérimentalement en pesant un tube sec et ce même tube vide mais mouillé que chaque cycle de rinçage amène un facteur de dilution approximatif de 1:300.
- Rincer le bain abondamment avec de l'eau distillée.
- Finalement, rincer les tubes en laissant écouler un plein tube de 60 ml d'eau distillée. Étant donné le débit des tubes, cette étape prend environ une heure.

### **Obtention d'un « gigaseal »**

L'obtention du « gigaseal » est une étape cruciale que j'ai personnellement pris beaucoup de temps à maîtriser et même maintenant, je ne suis vraiment pas convaincu que ma technique est la meilleure pour les neurones de culture. En fait, un peu plus loin, la section discutant de l'ATP contient une note importante de dernière minute par rapport à l'obtention d'un « gigaseal » suite aux observations de Stéphane Pagès. Le succès ou l'échec du « gigaseal » est une fonction d'une foule de facteurs: l'âge de la culture, le choix du neurone, la géométrie de la pipette, la composition et "propreté" des solutions extracellulaire et intracellulaire, le profile complet de la pression appliquée, etc.

Premièrement, on peut appliquer une pression positive pour éjecter un flot continu de la solution de la pipette pendant l'approche. Cette technique est utilisée en tranche pour dégager le chemin pendant la descente. Personnellement, j'ai obtenu des résultats de qualité variable avec une pression positive. En autres, la pression positive amène parfois des débris à se coller à l'embouchure de la pipette. Je l'ai progressivement abandonnée. J'ai expérimenté toutes sortes de variantes et ma toute dernière technique se résume aux points suivants:

- Entrer seulement une fois dans le bain.
- Descendre le plus rapidement possible sur la cible.
- Lorsque la résistance augmente d'environ 0.5 à 1 Mohm, appliquer doucement une pression négative à la bouche tout en continuant la descente pendant quelques micromètres.
- Appliquer une tension de -65 mV tout en maintenant une très légère pression négative.

Un « gigaseal » qui s'établit rapidement (en moins d'une minute) augure généralement bien pour le reste de l'expérience alors qu'un « gigaseal » qui nécessite du temps et/ou une pression négative croissante a beaucoup moins de chances de succès.

Étonnamment, dans tous les papiers consultés qui utilisent la culture de neurones dissociés comme modèle (Lu, Man et al. 2001; Thiagarajan, Piedras-Renteria et al. 2002; Oh and Derkach 2005), la solution de perfusion possède des concentrations ioniques et une osmolarité significativement différentes du milieu de culture, i.e. le neurobasal. Un temps fou a été perdu à tenter de reproduire précisément certains de ces protocoles avec des conditions de perfusion qui sont, après analyse, manifestement sous optimales.

L'osmolarité mesurée du neurobasal frais est de 215 mosM. À cause de l'évaporation, cette osmolarité augmente progressivement pour atteindre environ 238 mosM juste avant que la moitié du milieu soit changé, ce qui est fait deux fois par semaine. L'osmolarité faible du neurobasal en comparaison au liquide cérébro-spinal (autour de 320-330 mosM) est un des paramètres que Brewer, le créateur du neurobasal, a optimisé pour une survie optimale des neurones dissociés (Brewer, Torricelli et al. 1993). On peut facilement apprécier un changement non négligeable du volume des somas lorsqu'on fait passer le milieu extracellulaire de 230 mosM vers 320 mosM. Les cellules perdent une partie de leur eau pour établir un équilibre osmotique. En utilisant un milieu extracellulaire à l'osmolarité supérieure à 300 mosM pour « patcher » des neurones qui ont été cultivés dans le neurobasal, on « patche » des neurones à la membrane plissée ce qui nuit à l'obtention d'un « gigaseal ».

## **Compensation**

La compensation permet en théorie un meilleur asservissement de la tension de clamp à l'intérieur de la cellule. Elle consiste en à annuler de façon électronique la résistance d'accès ("R series"). Il est très commun d'avoir une résistance d'accès qui change au cours du temps et la compensation peut être en fait plus nuisible qu'utile dans un cas pareil. Une compensation incorrecte peut provoquer une oscillation du circuit de clamp. Il est donc commun parmi les électrophysiologistes de ne pas compenser du tout. La vaste majorité des enregistrements faits pendant cette maîtrise n'utilisent aucune compensation.

## **Le problème du bruit électrique**

Une condition sine qua non à l'électrophysiologie est d'avoir un montage qui minimise le plus possible les sources de bruit électrique. Et d'autant plus lorsqu'on s'intéresse aux signaux d'amplitudes faibles comme les mEPSC qui n'atteignent typiquement que quelques pA. Les sources de bruits qui peuvent contaminer un montage sont multiples: bruits couplé par induction magnétique, effet d'antenne (ondes électromagnétiques), influences capacitives, boucles de mise à la terre. Au début du projet, le montage utilisé était affreusement bruité au point où la mesure de minis était impossible. Ce montage n'avait pas de cage de Faraday. Aux prix de nombreuses expérimentations, plusieurs améliorations successives ont été apportées pour minimiser le bruit couplé à la pipette. La structure du microscope Zeiss Axioskop 2 FS qui a été utilisé pendant le cours de cette maîtrise est fort étrange. Le microscope est composé d'un nombre important de pièces métalliques qui n'ont pas pour la plupart de contact galvanique les unes avec les autres. Ainsi le fait de relier la base du microscope à la terre ne veut pas dire que le reste du microscope le sera. Chacune de ces parties se comporte comme une antenne qui couple le



bruit capté vers la pipette. À l'aide d'un testeur de conductivité, chacune des parties flottantes au point électrique du microscope furent identifiées et reliées à la terre par des fils.

L'une des améliorations les plus efficaces pour minimiser le bruit couplé à la pipette fut de construire un écran métallique entre le microscope et le bain contenant l'échantillon. Cet écran doit être en contact galvanique avec la partie métallique de l'objectif pour bien fonctionner. Il est particulièrement efficace pour contrer le bruit provenant de la caméra CoolSNAP HQ installé sur le sommet du microscope.

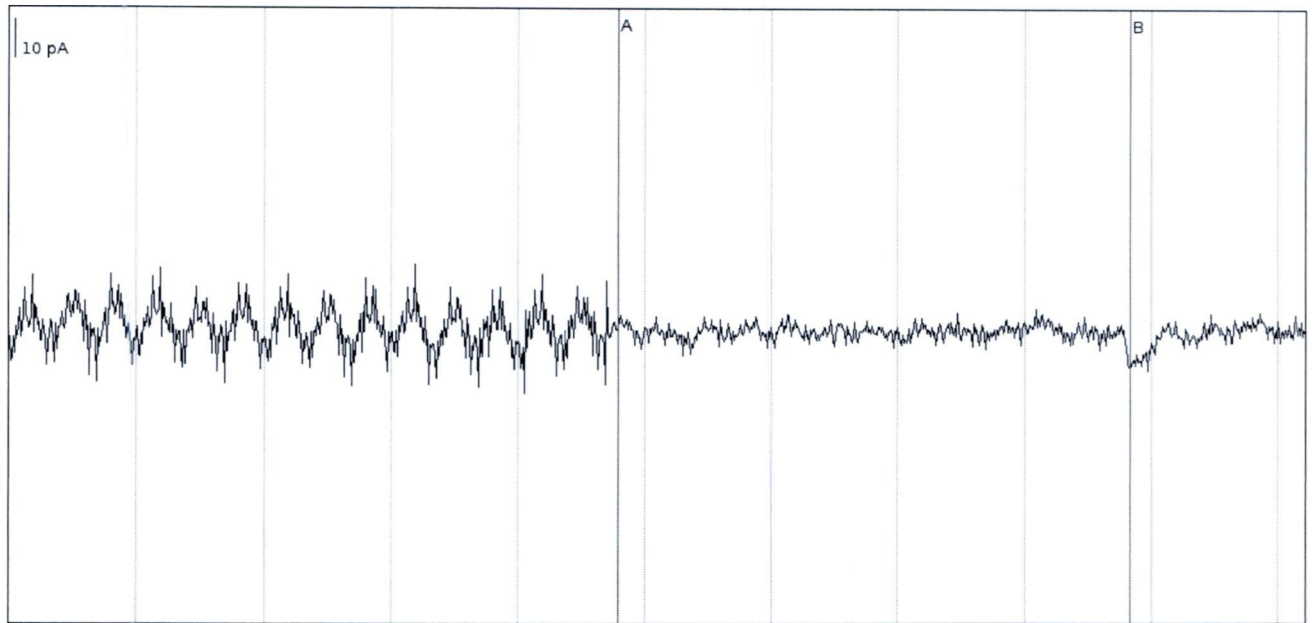
Le problème du bruit de boucle de mise à la terre a été réglé en plaçant l'oscilloscope et le module HEKA sur un transformateur d'isolation commun. L'ensemble est mis à la terre en un point unique.

Suite à l'acquisition d'un nouveau microscope inversé Zeiss Axiovert 200M, un temps non négligeable a été passé à bâtir une cage de Faraday appropriée. Ce microscope se prêtait mieux à l'ajout d'une cage de Faraday étant donné sa structure plus compacte que l'Axioskop 2 FS plus. L'ironie est que ce microscope fut par la suite abandonné pour faire du patch-clamp car malheureusement le taux de succès des « patches » que j'obtenais sur ce microscope, qui était déjà peu reluisant sur l'Axioskop 2 FS plus, tomba à des niveaux inégaux. Ceci s'explique par l'impossibilité de juger de la qualité de la surface des neurones avec un microscope inversé car on l'observe par le dessous alors que la pipette entre en contact avec le neurone par le dessus.

Une autre source de bruit identifiée et réglée est le frigo de la salle de culture qui générait de puissant transitoire à chaque fois que son compresseur démarrait. Le design de ce frigo est étrange car le compresseur est à l'air libre sur le dessus du frigo caché par une paroi purement esthétique. Le fabricant n'a donc fait aucun effort pour minimiser les émissions électromagnétiques. Un grillage métallique fut collé sur le dessus et l'arrière du frigo. Depuis, les transitoires provenant du frigo sont invisibles au système de patch-clamp.

Le frigo de la salle de culture n'était pas le seul appareil problématique. La centrifugeuse Eppendorf 5810 R, qui n'est qu'à quelques mètres du montage de patch-clamp, lorsque connectée à une prise particulière générait un bruit très important dans la pipette. Après avoir identifié la source du bruit, le simple fait de condamner la prise électrique en question régla le problème.

Malgré toutes ces améliorations des bruits d'origine inconnue contaminent encore parfois les mesures électrophysiologiques mais la situation du bruit est rendue acceptable. Certains bruits sont évidents comme par exemple les bruits répétitifs comme les harmoniques du 60 Hz. En plus d'être facilement identifiable, ce type de bruit a l'avantage d'être filtrable dans une certaine mesure après l'acquisition par l'utilisation appropriée d'un "notch filter". Dans la Figure 4 qui suit, un bruit répétitif 60 Hertz apparut spontanément après le début de la « patch » disparaît tout aussi spontanément. Le curseur B est aligné avec le premier mini visible suite à la disparition du bruit.



**Figure 4 Exemple de bruit de type 60 Hertz qui disparaît spontanément**

D'autres bruits sont moins évidents comme par exemple le bruit d'origine électromagnétique. Des non linéarités dans le circuit lors d'une « patch » servent de démodulateur qui ramène en bande de base les fréquences radio. À une certaine époque, avant la mise en place de toutes les mesures précédemment énumérées, on pouvait parfois très bien percevoir à l'écoute des voix provenant d'une émission de télévision dans les enregistrements électrophysiologiques. Ces bruits sont pernicioeux car ils ne sont pas visuellement identifiables comme le 60 Hz et ses harmoniques et son impossible à filtrer lorsqu'il recoupe le spectre du signal. Finalement, on doit se méfier de certaines sources de bruit qui ont été rencontrées au fil du temps comme le fait d'avoir un bain qui déborde un peu sur la platine du microscope, un fil d'argent légèrement dénudé d'AgCl ou une corrosion du contact de l'électrode de la pipette.

### **Le problème de la dérive de la pipette**

Pendant un certain temps, un phénomène pernicioeux a nui au maintien de « patches » de longue durée. La pipette dérivait tranquillement souvent pour éventuellement se détacher du corps cellulaire. Après des tests exhaustifs sur l'origine d'une telle dérive, sa source la plus probable a été identifiée. Le type de support à pipette des appareils HEKA maintient la pipette en place et sa pression interne grâce à deux anneaux de caoutchouc. Suite à son insertion, les anneaux de caoutchouc travaillaient lentement et faisait dériver la pipette. Pour minimiser ce type de problème, une solution consiste à soumettre temporairement la pipette à une pression positive intense. Ceci force la pipette à adopter sa position la plus stable.

## Solution extracellulaire

En plus des solutions telles que définies dans les protocoles publiés qui ont été essayés, i.e. Lu et al., 2001 et Oh et al., 2005, une recette de solution extracellulaire avec une composition ionique et surtout une osmolarité la plus près possible du neurobasal fut élaborée pour éviter le plus possible un choc lors du transfert de l'échantillon de l'incubateur vers le bain sous le microscope. Étonnamment, aucun auteur ne semble se soucier de ce problème pour des conditions de culture similaires. Tous les articles consultés utilisent des compositions ioniques variables qui ne sont jamais ajustées au contenu du neurobasal et plus important, qui ont une osmolarité au moins supérieure à 312 (Lu et al., 2002 : 325 à 335, Oh et al., 2005 : 312 (mesurée), Thiagarajan et al., 2002 : 330 (mesurée)). Ceci se démarque de façon importante de l'osmolarité moyenne du neurobasal mesurée qui est de 235 (le neurobasal frais a une osmolarité mesurée de 215 mais dû à l'évaporation, après deux semaines de remplacement de la moitié du milieu deux fois par semaine, elle atteint environ 235). En fait, une osmolarité aux alentours de 300 aurait un sens lorsqu'on veut s'approcher de celle du liquide cérébro-spinal d'un animal adulte mais le neurobasal a été spécialement élaboré pour les neurones issus d'animaux prénataux ou naissants. Qui plus est, le neurobasalA, qui a été optimisé par Brewer pour les neurones de culture adultes, a une osmolarité de  $260 \pm 10$  (Brewer 1997). Ceci n'est pas encore près des valeurs utilisées par les auteurs cités précédemment. On peut très facilement constater sous le microscope la récupération de volume de cellules cultivées dans du neurobasal plongées dans une solution d'osmolarité 300 qu'on remplace graduellement par une solution à l'osmolarité égale au neurobasal. L'affaissement de la surface des cellules dans le milieu d'osmolarité 300 nuit très certainement notamment dans l'établissement du "gigaseal".

La solution extracellulaire à l'osmolarité égale au neurobasal qui a été élaborée avait la composition suivante:

- NaCl 80 mM (neurobasal + 28.7 mM)
- D-glucose 35 mM (neurobasal + 10 mM)
- HEPES 25 mM (neurobasal + 15 mM)
- KCl 5.2 mM
- CaCl<sub>2</sub> 1.74 mM
- MgCl<sub>2</sub> 0.79 mM
- NaOH 9 mM

Puisque la composition de cette solution extra cellulaire est beaucoup moins complexe que le neurobasal, les quantités de NaCl, D-glucose et d'HEPES ont été augmentées tout en restant à l'intérieur d'une gamme utilisée dans la littérature.

Osmolarité mesurée 230 mOsm et pH mesuré: 7.3.

## Solution intracellulaire

Le fait de passer en cellule entière amène un changement drastique dans le milieu intra

cellulaire. Étant donné, la grosseur du trou appréciable par rapport à la taille du neurone et le ratio gigantesque du volume de la pipette sur le volume cellulaire, la solution intracellulaire prend le contrôle total de l'intérieur de la cellule. Toute substance libre dans la cellule sera éventuellement lessivée. Quelle est la vitesse de ce lessivage? Certaines protéines qui diffusent lentement dû à leur grosseur et/ou qui ont la chance d'avoir des partenaires de liaison ancrés dans la membrane ou le cytosquelette peuvent résister à ce lessivage mais qu'en est-il des petites protéines critiques comme la calmoduline?

## **HEPES**

La cellule asservit le pH de son cytosol principalement grâce au tampon bicarbonate. Le contrôle que prend la solution de la pipette sur le milieu intracellulaire requiert la présence d'un tampon car les mécanismes de la cellule « patchée » sont totalement incapables de maintenir à eux seuls le pH intracellulaire. L'HEPES est le tampon le plus utilisé après le tampon bicarbonate. La concentration utilisée dans la littérature oscille entre 10 et 25 mM. Il est intéressant de souligner que certains auteurs rapportent que l'HEPES est photo-toxique et ce même en condition d'illumination par des fluorescents du plafond (Spierenburg, Oerlemans et al. 1984; Lepe-Zuniga, Zigler et al. 1987). Il faut donc maintenir les solutions dans l'obscurité. Il serait intéressant de pouvoir mesurer à quel point l'utilisation de l'HEPES pour faire de la microscopie par fluorescence est photo-toxique.

## **ATP**

L'ATP est essentielle pour d'innombrables fonctions de la cellule. Dans le contexte de cette maîtrise, notons que l'ATP est directement impliquée dans les deux phénomènes suivant: la phosphorylation par la CaMKII de ses substrats et la phosphorylation des récepteurs AMPA qui est un des phénomènes qui peut être impliqué dans la potentialisation de la synapse glutamatergique.

L'ATP et le GTP sont ajoutés sous la forme de sels. Une note importante ici est que j'ai personnellement utilisé la majorité du temps du di-Tris-ATP. Ceci était cohérent avec l'utilisation d'une solution à base de Cs qui vise à réduire le bruit qui pourrait être causé par l'ion K<sup>+</sup>. À l'heure où j'écris ces lignes, Stéphane Pagès, qui est le deuxième électrophysiologiste du laboratoire après moi, m'a indiqué qu'il obtenait un taux de succès très élevé pour l'obtention de « gigaseal » avec sa solution intracellulaire à base de gluconate de potassium et K2-ATP en comparaison avec la solution que j'utilisais qui contenait du méthanesulfonate de Cs et du di-Tris-ATP.

## **Phosphate de créatine**

Certains auteurs se contentent de mettre un sel d'ATP dans la cellule alors qu'un nombre plus faible met à la fois de l'ATP et du phosphate de créatine. Cette dernière molécule sert de réservoir d'ATP et est convertie par la créatine kinase au fur et à mesure que l'ATP libre est consommée. Un nombre encore plus faible d'auteurs ajoutent de la créatine kinase pour s'assurer qu'il y en ait en quantité suffisante dans la cellule.



## **GTP**

Le guanosine triphosphate (GTP) est essentiel comme source d'énergie mais surtout dans le fonctionnement des protéines-G. Notons que dans l'hippocampe, les récepteurs métabotropiques glutamatergiques sont impliqués dans le LTP (Grover and Yan 1999).

## **EGTA**

À peu près tous les électrophysiologistes mettent une certaine quantité d'EGTA dans la solution intracellulaire. L'EGTA est un chélateur des cations divalents et en particulier du cation  $\text{Ca}^{2+}$ . La présence d'un chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$  permet de minimiser la guérison de la membrane suite au passage en cellule entière. La guérison de la membrane augmente la résistance d'accès à l'intérieur de la cellule. Cette augmentation amène un changement de la tension de clamp et donc de l'amplitude des minis mesurés. La présence d'EGTA n'a pas que des effets bénéfiques, il entre en compétition bien évidemment avec tout phénomène qui dépend du calcium dont le plus important en ce qui nous concerne est l'activation de la CaMKII. Le logiciel MaxChelator a été utilisé pour déterminer la quantité de calcium ajoutée à la pipette étant donné une concentration d'EGTA pour avoir une concentration basale de calcium égale à la valeur théorique de 100 nM.

## **Ions**

Il est courant de substituer les ions normalement trouvés dans le cytoplasme par d'autres pour éliminer certains phénomènes indésirables comme le bruit issu du mouvement de ces ions. Les ions énumérés ici sont ceux utilisés dans un contexte de mesure des minis glutamatergiques.

### **Cs-methanesulfonate**

Le methanesulfonate de césium est utilisé dans la solution intra cellulaire pour substituer les ions  $\text{Cl}^-$  (par  $\text{MS}^-$ ) et  $\text{K}^+$  (par  $\text{Cs}^+$ ) lorsque ceux-ci ne sont pas désirables.

### **CsCl**

Pour assurer le bon fonctionnement de l'électrode AgCl peu importe la polarité appliquée, il est d'usage de maintenir une quantité minimale d'ion  $\text{Cl}^-$  dans la pipette de l'ordre de 25 mM.

### **MgCl<sub>2</sub>**

Comme le magnésium est un cofacteur de plusieurs réactions dans le cytoplasme. Une quantité minime (aux alentours de 2 mM) est ajoutée de façon standard dans la solution intra cellulaire.

### **CaCl<sub>2</sub>**

Étant donné l'ajout standard de EGTA, l'ajout de calcium suivant la recommandation du

logiciel MaxChelator est nécessaire pour maintenir une concentration basale de calcium près de la valeur théorique de 100 nM.

## Analyse des minis

Les mEPSC (*miniature Excitatory Post Synaptic Current*) ou simplement minis sont le résultat de l'ouverture de plusieurs dizaines, voire quelques centaines, de canaux AMPA et NMDA suite au déversement spontané du contenu en glutamate d'une vésicule pré-synaptique dans la fente synaptique. Les canaux AMPA sont responsables d'une entrée de courant à la cinétique plus rapide et d'amplitude plus grande que celle des canaux NMDA. Suivant la pondération relative des canaux AMPA et NMDA, les minis mesurés adoptent une forme correspondante.

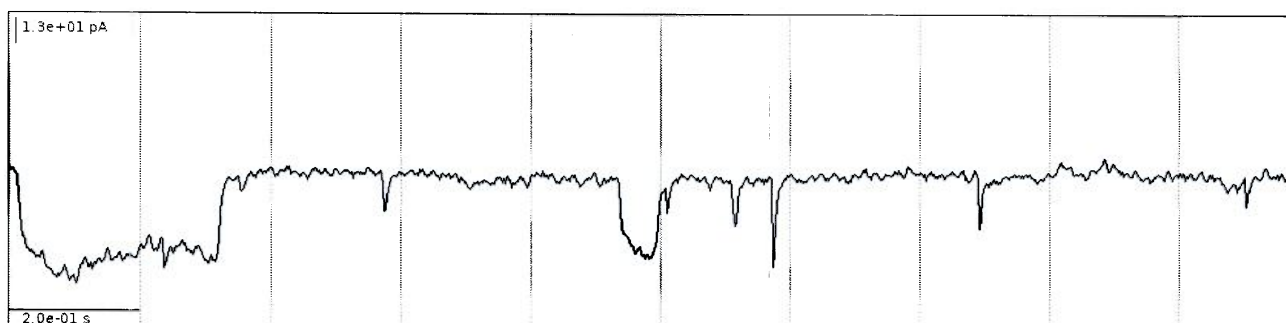
## Critères d'acceptation de l'enregistrement

Les embûches pour arriver en bout de ligne avec un enregistrement valide pour l'analyse sont nombreuses. À chaque enregistrement jugé de qualité suffisante correspond de très nombreux enregistrements rejetés. Même après un "gigaseal" et un passage en cellule entière impeccables, souvent, la « patch » se referme partiellement ou se met à fuir. On détecte ces cas par une variation importante du courant de fuite et de la résistance série et capacité "Cslow" estimées. En fait, si on applique les critères d'acceptation communément utilisés dans certaines publications utilisées comme référence, la presque totalité des enregistrements accumulés pendant cette maîtrise devraient être rejetés.

*"Only cells with series resistance between 10 and 15 M were used in the comparisons of unitary mEPSC properties"* (Thiagarajan, Piedras-Renteria et al. 2002)

*"Input and serial resistances (<10-15 M!, 70-80% compensated) were monitored throughout the experiments, and cells with deviations >15% were discarded."* (Oh and Derkach 2005).

Même avec un enregistrement stable suivant les critères précédents, il arrive relativement souvent d'avoir un bruit de type canal unique mais avec une amplitude comparable aux minis mesurés. Quelle est l'origine de ce bruit? Un bout de membrane obstruant partiellement la pipette avec un canal unique? La Figure 5 en présente un exemple.



**Figure 5** Exemple d'enregistrement avec un bruit fréquent de type canal unique et d'origine encore inconnue

### Détection des minis

La détection des minis est une première étape cruciale. Le logiciel développé permet la détection manuelle ainsi qu'automatique des minis. Pour l'une ou l'autre, on doit premièrement définir la meilleure ligne de base possible pour chaque mini. Cette ligne de base est continuellement en train de changer au cours de l'enregistrement. La ligne de base la plus appropriée pour un mini donné est calculée en moyennant le « silence » le plus récent précédant le mini. Ce silence devrait être d'une durée de l'ordre de celle d'un mini, soit quelques ms.

### Analyse de la plasticité

Comme dans les papiers ayant servi d'inspiration pour les manipulations effectuées (Lu, Man et al. 2001) et (Oh and Derkach 2005), la plasticité synaptique est analysée simplement par le changement en fonction du temps de l'amplitude et de la fréquence moyennes des minis. Une minute de minis est échantillonnée 5 minutes après le passage en cellule entière suivie d'un échantillonnage continue de 15 minutes pendant lequel le protocole de stimulation est appliqué. Finalement, une minute de minis est enregistrée à chaque 5 minutes jusqu'à la fin. En fait, cette méthode avec seulement une minute d'enregistrement pour estimer la fréquence et l'amplitude des minis s'est avérée sensible à un artefact dont il est question un peu plus loin où la fréquence des minis peut parfois doubler et revenir à son niveau de base sur une échelle de temps de l'ordre de la minute. Suite à l'identification de cet artefact, des enregistrements de 5 minutes furent utilisés pour estimer la fréquence et l'amplitude des minis.

Il ne faut pas écarter le cas hypothétique d'une potentialisation où le phénomène dominant consisterait en des synapses silencieuses (sans récepteurs AMPA) gagnant un certain nombre de récepteurs AMPA, on pourrait alors avoir une augmentation de la fréquence moyenne des minis mais associée paradoxalement à une baisse de l'amplitude moyenne. Ainsi, la fréquence moyenne peut être considérée un meilleur indicateur que l'amplitude moyenne pour mesurer une potentialisation.



## **Analyse de la force synaptique**

Une cellule transfectée (fluorescente) est choisie et les minis sont mesurés pendant 5 minutes, 5 minutes après être passé en cellule entière. Pour chaque cellule transfectée, une cellule voisine le plus près possible de cette cellule transfectée est également « patchée » à titre de comparaison.

## Résultats

Cette section présente les quelques résultats obtenus. En fait, je n'y documente essentiellement que mes échecs répétés à reproduire des protocoles publiés et à essayer des variantes. Rappelons que la maîtrise de la potentialisation des neurones de culture représentait une première étape dans le cadre de la maîtrise pour ensuite tester l'influence de la CaMKII sauvage par rapport aux mutants incapables de translocaliser à la synapse sur l'expression du LTP.

## Tentatives de reproduction de protocoles de LTP en culture

Je commencerai cette section par la citation suivante.

*“While slices of tissue provide a more challenging experimental preparation to examine receptor trafficking, this tissue was used, rather than dissociated neurons, since there had been little success in generating LTP using standard electrophysiological protocols in dissociated neurons.”* (Malinow and Malenka 2002)

De plus, au fil des conférences auxquelles j'ai assisté, plusieurs conférenciers ont fait écho à l'opinion exprimée dans cette citation. Je peux maintenant dire, suivant mon expérience personnelle, que le LTP en culture est un projet en soi. La culture de neurones est un modèle jeune encore très mal caractérisé et très certainement beaucoup plus variable de laboratoire en laboratoire que le modèle de la tranche. La qualité de la technique en patch-clamp a aussi tout son rôle à jouer dans l'obtention de résultats. La duplication de résultats obtenus par les autres laboratoires est très difficile et ceci est un euphémisme.

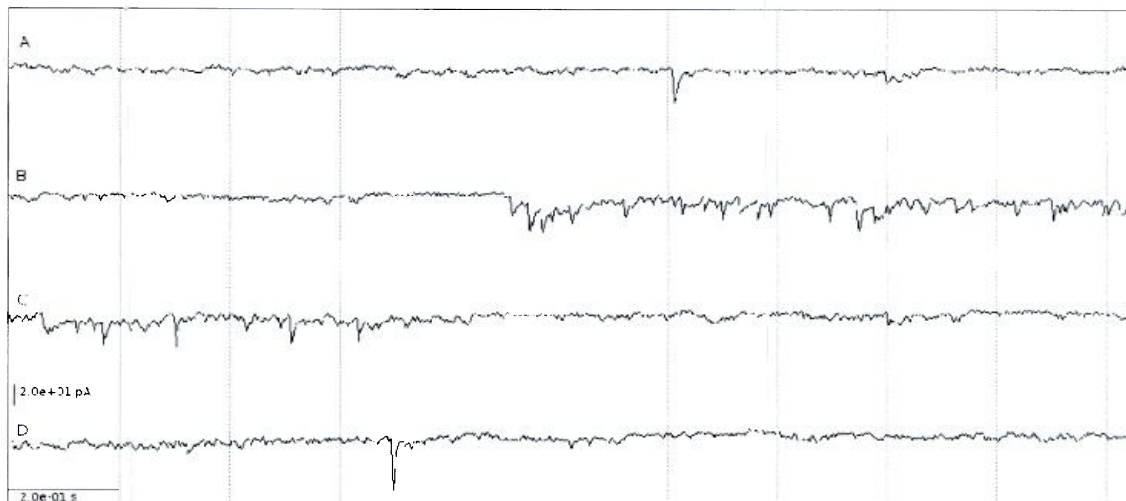
### Lu et al., 2001

Le point de départ pour générer de la potentialisation en culture a été le papier Lu et al., 2001 dans lequel est démontré qu'une simple stimulation de 3 minutes avec une solution sans magnésium et avec une concentration sursaturante de glycine (200  $\mu$ M) dans le but de faire entrer sélectivement du calcium que par les récepteurs NMDA amène une potentialisation rapide par l'insertion de récepteurs AMPA. Cette méthode utilise strictement les minis glutamatergiques pour activer les récepteurs NMDA car la culture est constamment baignée dans 0.5  $\mu$ M de TTX bloquant tout potentiel d'action, 20  $\mu$ M de bicuculline pour bloquer les minis inhibiteurs GABAergiques et finalement 1  $\mu$ M de strychnine pour s'assurer que la concentration sursaturante de glycine n'active pas les récepteurs glycinergiques.

Cette méthode n'a pas fonctionné. La fréquence et l'amplitude des minis mesurés suite à la stimulation de 3 minutes n'ont pas augmenté mais ont plutôt décru lentement mais sûrement. Au mieux, certaines cellules démontraient une amplitude et une fréquence

identique avant et après la stimulation pour éventuellement décroître graduellement aussi longtemps que la « patch » tenait bon.

Dans la Figure 6, une cellule de 11 jours est stimulée suivant ce protocole. Cet exemple sert aussi à illustrer un artefact encore inexpliqué qui fut identifié dans quelques enregistrements : la fréquence des minis augmente de façon très visible pendant une durée de l'ordre de la minute et revient au niveau précédant. On peut voir ici en fait l'exemple le plus drastique de cet artefact puisque la fréquence des minis augmente puis revient à son niveau précédent de façon extrêmement subite. La durée du phénomène est d'environ une minute.



**Figure 6** Une cellule stimulée avec un pulse de glycine et sans magnésium environ 10 minutes après la stimulation et à quelques secondes avant l'augmentation subite de la fréquence des minis (A), au moment où la fréquence des minis augmente subitement (B), au moment où la fréquence des minis revient à son niveau précédent (C) et quelques secondes après la fin subite de l'augmentation de la fréquence des minis (D).

J'ai alors essayé d'identifier une quelconque erreur expérimentale dans ma technique en doutant systématiquement de tout dont notamment toutes les solutions « stock » utilisées et en refaisant progressivement chacune d'elles avec du matériel entièrement neuf sans plus de succès. En essayant de comprendre le pourquoi de chaque substance et leur concentration respective dans le protocole Lu et al., 2001; j'ai cru un moment avoir trouvé une piste: le papier donnait une concentration en EGTA de 2.5 mM dans la solution intracellulaire sans même ajouter la moindre quantité de calcium. L'EGTA est un chélateur de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Il est utilisé par (Lynch, Larson et al. 1983) pour bloquer le LTP. En fait, le laboratoire d'origine du papier Lu et al., 2001 a par la suite confirmé qu'il utilisait en fait 0.5 mM d'EGTA. Cette piste prometteuse n'a cependant pas porté fruit, la potentialisation des minis n'était toujours pas au rendez-vous après avoir réduit la concentration d'EGTA à 0.5 mM et avoir ajouté suffisamment de calcium selon le logiciel MaxChelator pour avoir une concentration basale de calcium égale à la valeur théorique de 0.1  $\mu\text{M}$ .

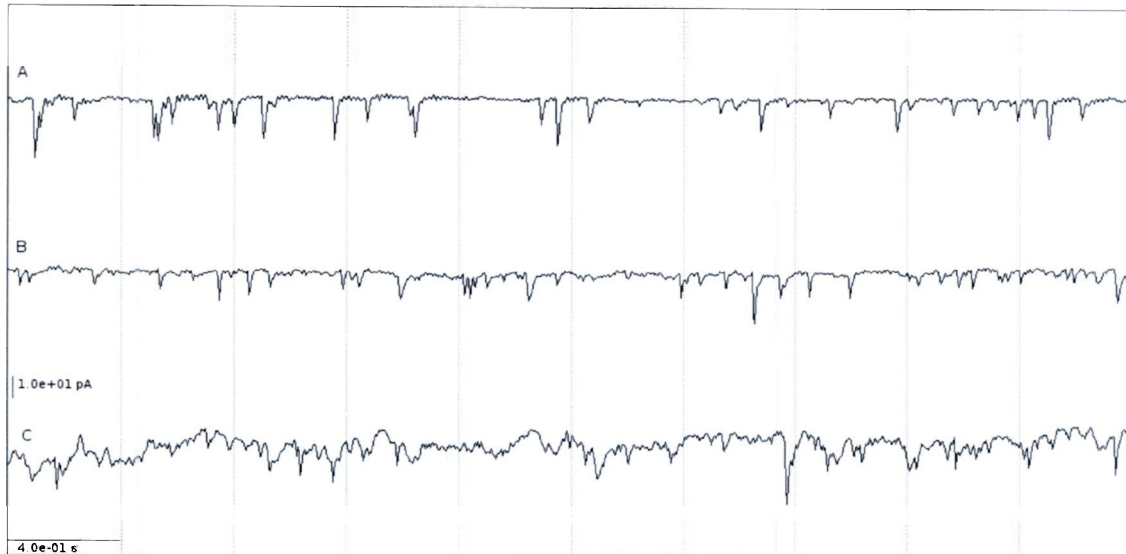


Au fil du temps, en désespoir de cause, un mélange des variations suivantes furent essayées sans succès.

- allonger le temps de stimulation
- augmenter la concentration en glycine
- doubler le calcium extracellulaire
- neurones plus jeunes / plus vieux
- prétraitement à l'AP5
- prétraitement au TTX

À un certain moment donné, le laboratoire d'origine du papier Lu et al., 2001 nous a fait part qu'ils n'utilisaient plus le protocole de stimulation qu'ils avaient publié mais utilisaient maintenant une nouvelle technique: seulement 20 secondes de stimulation avec une solution sans magnésium, avec glycine en concentration sursaturante et contenant 100 mM de sucrose pour favoriser la fusion subite des vésicules de neurotransmetteur. Cette technique n'a pas donné de résultats positifs et même après l'allongement progressif de la stimulation qui est très courte dans ce nouveau protocole. Notons ici que plus une stimulation est courte plus la variabilité augmente. Pour contrer la variabilité, l'idéal est de dépasser plusieurs fois la constante de temps du système de perfusion tel que discutée dans la section méthode.

Dans la Figure 7, une cellule est stimulée pendant 10 minutes plutôt que 3 minutes. La potentialisation présentée dans le papier Lu et al., 2001 est un phénomène rapide avec une constante de temps de moins de 5 minutes où l'amplitude moyenne devrait augmenter d'environ 30% et la fréquence moyenne d'environ 40%. Ici, 10 minutes après la stimulation, la fréquence et l'amplitude estimées sur une durée d'une minute ne montrent pas ce genre d'augmentation : la fréquence reste essentiellement identique alors que l'amplitude moyenne décroît de 11%. En fait, cet exemple sert aussi à illustrer un phénomène très fréquent suite à une stimulation : on peut très bien voir comment la ligne de base est dégradée 15 minutes après la stimulation à tel point que l'estimation de la fréquence et de l'amplitude moyenne des minis n'a plus aucun sens. La raison la plus probable pour expliquer que la ligne de base devient à ce point bruitée est une dégradation du joint d'étanchéité (le « gigaseal »).



**Figure 7** Exemple d'une cellule stimulée pendant 10 minutes plutôt que 3 minutes: avant la stimulation (A), 10 minutes après la stimulation (B), 15 minutes après la stimulation la ligne de base est sérieusement dégradée au point où la mesure des minis devient impossible (C)

## Oh et al. 2005

La publication du papier Oh et al., 2005 représenta un nouvel espoir d'obtenir de la potentialisation en culture. Dans ce papier, ils ont utilisé un protocole où les neurones sont stimulés beaucoup plus agressivement en retirant le TTX pendant 10 minutes de stimulation avec 100-200  $\mu$ M de glycine, sans magnésium et avec bicuculline (ce qui veut dire qu'il n'y a pas d'inhibition et que la fréquence de potentiels d'action devient beaucoup plus grande que dans une solution extracellulaire standard). Le phénomène de potentialisation de Oh et al., 2005 se distingue par une constante de temps d'environ 30 minutes ce qui est beaucoup plus grand que la constante de temps de Lu et al., 2001 qui rappelons-le n'était que de 5 minutes ou moins. Ce protocole et variantes essayées ont échoué. Pour fin d'illustration, je présente ici les deux seules cellules de tous les enregistrements faits qui semblent présenter une potentialisation.

La Figure 8 montre l'amplitude et la fréquence des minis d'une première cellule qui présente non seulement une certaine tendance vers un état potentialisé mais de façon plus intéressante, elle permet d'illustrer un phénomène que j'ai pu constater dans plusieurs cellules: un accroissement notable de la fréquence des minis qui vient et qui repart aussitôt sur une durée dans l'ordre de la minute. Cet accroissement est un phénomène qui mérite d'être éventuellement investigué pour en trouver la cause. Étant donné l'absence totale de potentiel d'action dans les neurones, une explication possible est que les astrocytes en seraient l'origine en ayant temporairement une action concertée comme par exemple une vague de calcium. La méthode utilisée pour estimer la fréquence des minis dans ce graphique vient directement du papier (Oh and Derkach 2005) : compter le nombre de minis pendant une minute à chaque 5 minutes. Le phénomène représente une

source d'artefact dont il faut se méfier avant de conclure trop rapidement à la potentialisation. Puisque la durée du phénomène semble de l'ordre de la minute, une estimation de la fréquence des minis sur une période de 5 minutes est à conseiller pour contrer cet artefact.

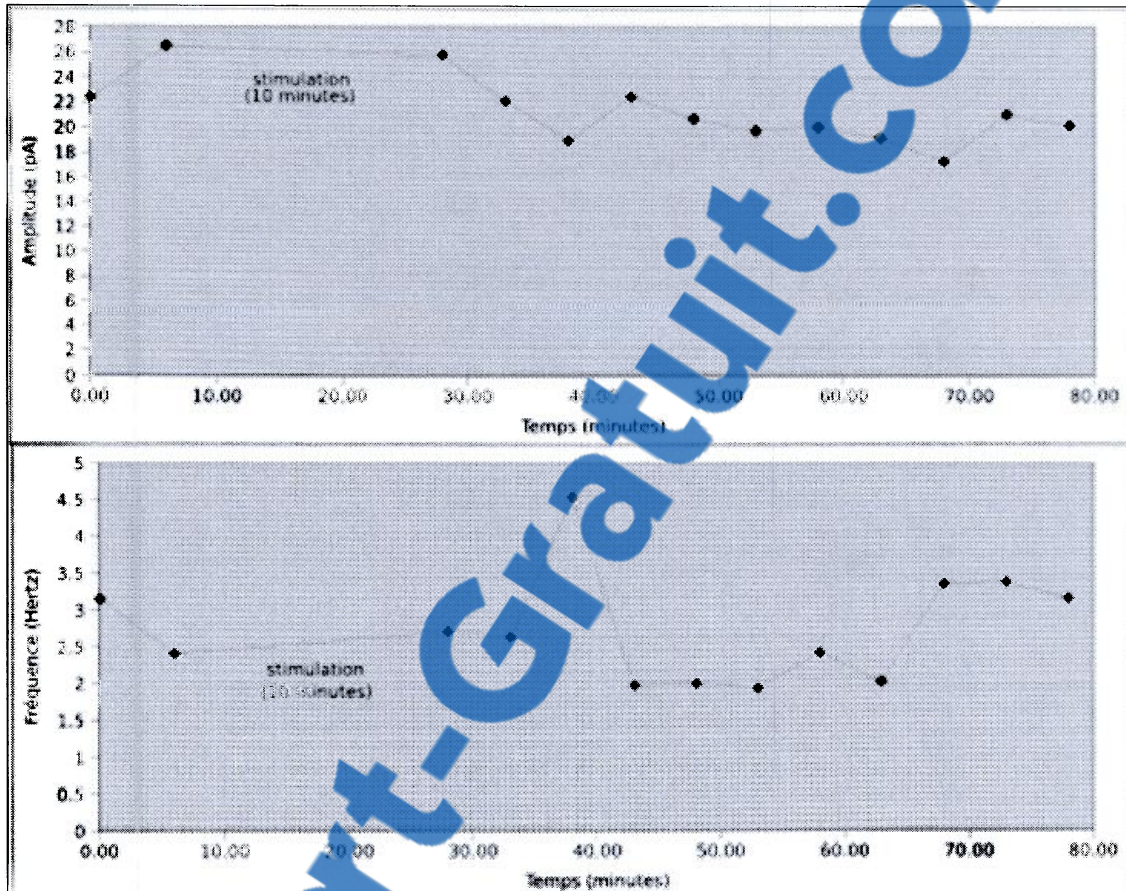
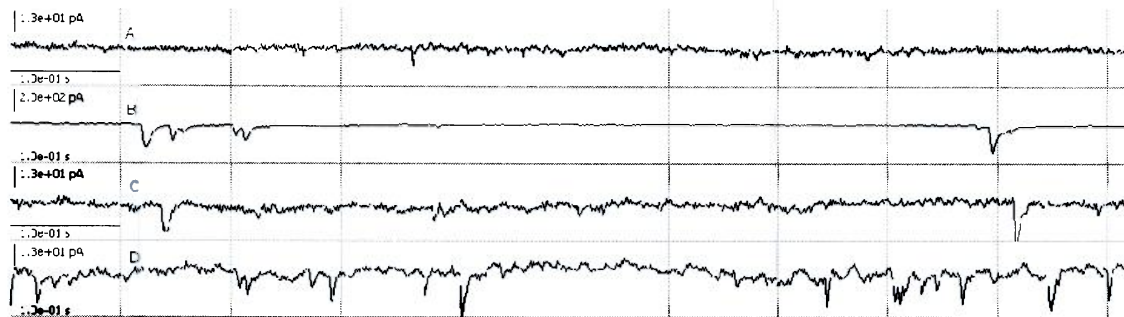


Figure 8 Amplitude et fréquence en fonction du temps d'une cellule ayant subi le protocole Oh et al., 2005

La Figure 9 présente une deuxième cellule où, suivant les conseils de Jenny Tsui du laboratoire Malenka (Stanford), un protocole de culture en deux temps fut essayé: premièrement du neurobasal/B27 et passage vers le MEM/N2. On peut voir dans cette saisie d'écran du logiciel Rig des enregistrements avant la stimulation, pendant la stimulation (premier potentiel d'action, notez l'échelle différente), 45 minutes, 60 minutes, 1h15 et 1h30 après la stimulation. Cette cellule a tenu le coup pendant un temps anormalement long. Bien que l'enregistrement devienne de plus en plus bruyant, on peut voir que les minis sont de plus en plus fréquents.





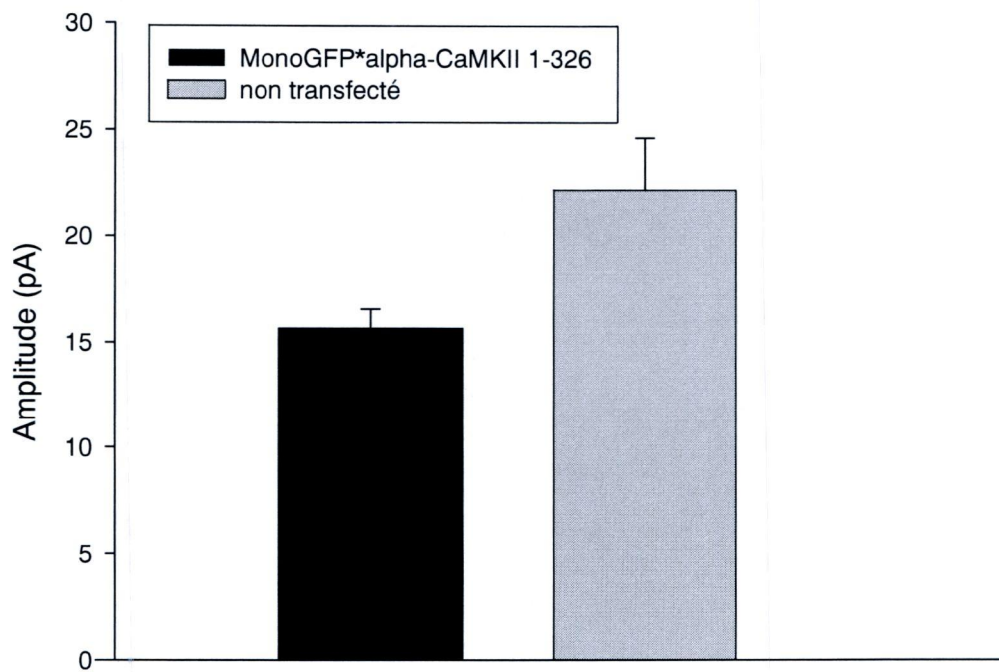
**Figure 9** Une cellule stimulée suivant le protocole Oh et al., 2005 : avant la stimulation (A), pendant la stimulation utilisant les potentiels d'actions, notez l'échelle différente (B), 45 minutes après la fin de la stimulation (C) et finalement 1h30 après (D).

## Impact de la transfection de mutants de la CaMKII sur la force synaptique

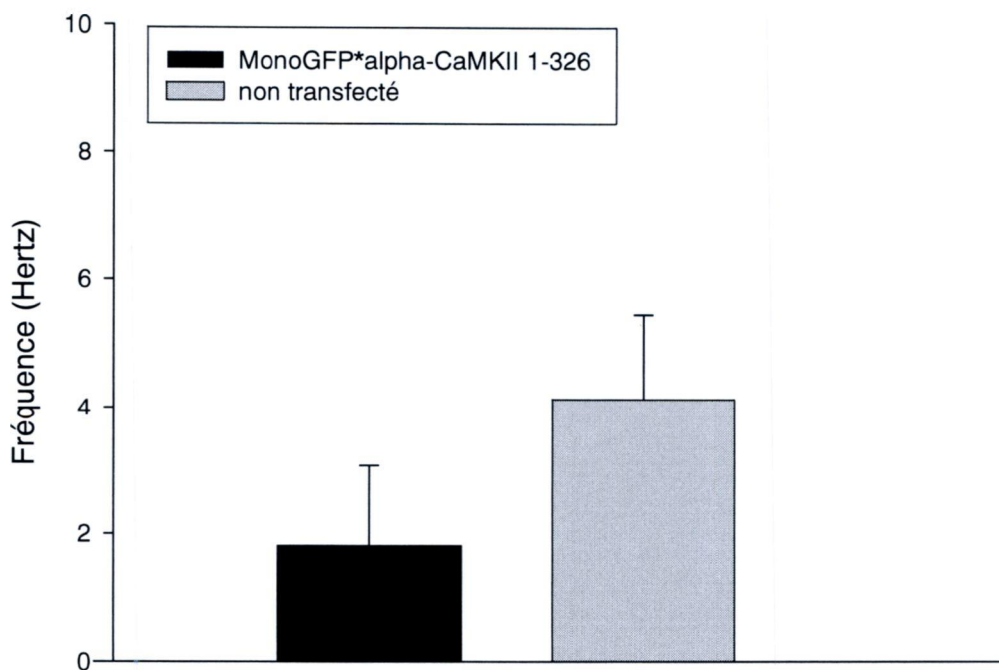
Une méthode pour évaluer par quel mécanisme la CaMKII affecte la force synaptique est de transfecter des neurones en culture avec des mutants dont l'adressage est affecté (Hudmon, Lebel et al. 2005; Bayer, LeBel et al. 2006). En attachant une GFP (*Green Fluorescent Protein*) à la CaMKII transfectée on peut identifier les neurones transfectés et mesurer la fréquence et l'amplitude des minis. Cette méthode est utilisée par Thiagarajan pour comparer l'impact de la CaMKII alpha et la CaMKII bêta sur les minis (Thiagarajan, Piedras-Renteria et al. 2002). La GFP utilisée dans le laboratoire est en fait un mutant de la GFP originale qui a été optimisée pour une fluorescence accrue, une sensibilité réduite au pH et un comportement monomérique. En plus de la séquence de la CaMKII et la GFP, le plasmide comprend un promoteur qui permet un certain contrôle sur la quantité de protéine exprimée.

Plusieurs techniques existent pour introduire un plasmide dans les cellules cibles: l'exposition transitoire à une forte concentration de phosphate de calcium, l'électroporation, le "gene gun" et la lipofection. C'est cette dernière technique qui est utilisée dans le laboratoire. Avec la lipofection, le taux de cellules transfectées est très bas. On peut trouver que quelques dizaines ou centaines de cellules transfectées par pétri qui en contient plusieurs centaines de millier. Le fait que le taux de transfection est bas est parfois considéré comme un avantage mais ici, c'est un inconvénient car « patcher » des neurones transfectés représente malheureusement une difficulté supplémentaire : on ne peut plus choisir les neurones en fonction de leur accessibilité et de la qualité de leur surface en lumière transmise. En effet, le peu de neurones transfectés dans les cultures sont pour la plupart enfouis sous des congénères.

Le mutant MonoGFP\*alpha-CaMKII 1-326 est monomérique car il ne possède pas le domaine d'association nécessaire pour former l'holoenzyme. Il est activée par la calmoduline et a une activité pour phosphoryler des peptides de façon presque identique au type sauvage (Hanson, Meyer et al. 1994). Il fait partie des mutants qui ne translocalisent pas à la synapse suite à une stimulation au glutamate et glycine (Bayer, LeBel et al. 2006). De plus, ce mutant ne s'auto-associe pas (Hudmon, Lebel et al. 2005). Le mutant MonoGFP\*alpha-CaMKII 1-326 fut transfecté dans des cellules au onzième jour après le début des cultures. La force synaptique de cellules transfectées et non-transfectées fut testée en mesurant les minis glutamatergiques en présence de TTX à 0.5 uM pour bloquer les potentiels d'action et de bicuculline à 20 uM pour bloquer les minis de type inhibiteurs GABAergiques et de strychnine à 1 uM pour bloquer les minis de types inhibiteurs glycinergiques.



**Figure 10** Comparaison de l'amplitude des minis de cellules transfectées et non transfectées



**Figure 11** Comparaison de la fréquence des minis de cellules transfectées et non transfectées

L'échantillon pour le mutant MonoGFP\*alpha-CaMKII 1-326 contient une fréquence qui est la seule valeur aberrante extrême selon la convention où une valeur est déclarée aberrante extrême si elle est supérieure à quartile Q3 + 3 \* écart interquartiles. Le rejet de cette valeur permet d'accepter l'hypothèse de normalité suivant le test de Shapiro-Wilk ce qui en retour permet l'analyse statistique suivante. L'explication probable pour cette valeur aberrante extrême serait d'avoir « patché » une cellule non transfectée faisant écran par-dessus la cellule transfectée sans m'en apercevoir.

- Fréquence des minis avant de retirer la valeur aberrante extrême: 1.83594 Hertz
- Fréquence des minis après avoir retiré la valeur aberrante extrême: 0.6182173 Hertz
- Amplitude moyenne des minis avant de retirer la valeur aberrante extrême: 15.74113 pA
- Amplitude moyenne des minis après avoir retiré la valeur aberrante extrême: 15.58414 pA

	MonoGFP*alpha-CaMKII 1-326	non transfecté
<b>Fréquence</b> moyenne	0.6182173 Hertz	4.134818 Hertz
<b>Fréquence</b> erreur standard	0.2380079 Hertz	1.316971 Hertz
<b>Amplitude</b> moyenne	15.58414 pA	22.17906 pA
<b>Amplitude</b> erreur standard	0.9462437 pA	2.441416 pA

**Table 1** Comparaison des fréquences et amplitudes du mutant MonoGFP\*alpha-CaMKII 1-326 aux cellules non transfectées (valeur aberrante extrême retirée)



Donc, une fois la seule valeur aberrante extrême retirée, les fréquences et amplitudes peuvent toutes être considérées comme suivant une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk:

- Amplitude MonoGFP\*alpha-CaMKII 1-326 :  $W = 0.9675$ ,  $\alpha^* = 0.8802$  ( $> 0.05$ )
- Amplitude non transfecté :  $W = 0.9579$ ,  $\alpha^* = 0.7903$  ( $> 0.05$ )
- Fréquence MonoGFP\*alpha-CaMKII 1-326 :  $W = 0.8374$ ,  $\alpha^* = 0.09395$  ( $> 0.05$ )
- Fréquence non transfecté :  $W = 0.8782$ ,  $\alpha^* = 0.1811$  ( $> 0.05$ )

Ensuite, le test de Fmax de Hartley (avec  $\alpha = 0.05$ ) amène à considérer les variances inhomogènes pour l'amplitude comme pour la fréquence :

- Amplitude :  $F_{obs} = 0.1314$ ,  $\alpha^* = 0.02463$  ( $< 0.05$ )
- Fréquence :  $F_{obs} = 0.0286$ ,  $\alpha^* = 0.0003773$  ( $< 0.05$ )

Finalement, le test de Student ( $\alpha = 0.10$ ) avec les hypothèses suivantes peut être appliqué:

- $H_0 : \mu_{\text{non-transfecté}} - \mu_{\text{MonoGFP*alpha-CaMKII 1-326}} = 0$
- $H_1 : \mu_{\text{non-transfecté}} > \mu_{\text{MonoGFP*alpha-CaMKII 1-326}}$
- Pour l'amplitude :  $\alpha^* = 0.01639$  ( $< 0.10$  donc rejet de  $H_0$ )
- Pour la fréquence :  $\alpha^* = 0.01609$  ( $< 0.10$  donc rejet de  $H_0$ )

On peut ainsi affirmer ici que l'amplitude et la fréquence des minis du mutant MonoGFP\*alpha-CaMKII 1-326 sont plus petites que celles des neurones non transfectés. Donc, la transfection du mutant MonoGFP\*alpha-CaMKII 1-326 pendant environ 24 heures déprime la force synaptique.

Dans ces conditions expérimentales précises, nous avons une CaMKII endogène qui cohabite avec le mutant. Le ratio de concentration du mutant en comparaison à la CaMKII endogène est indéterminé. Le fait d'avoir un mutant monomérique nous assure à tout le moins que ce dernier ne se substituera pas dans l'holoenzyme de la CaMKII. Le fait qu'il ne translocalise pas à la synapse contrairement au type sauvage nous permet de croire que peu de MonoGFP\*alpha-CaMKII 1-326 s'attarde à la synapse comparativement au type sauvage et pourtant, ce mutant déprime la force synaptique. Il n'est pas impossible qu'une quantité importante de ce mutant réussisse à entrer en compétition pour la liaison avec des partenaires critiques comme la sous-unité NR2B du récepteur NMDA. Le mutant monomérique n'ayant pas la faculté de l'holoenzyme pour maintenir son état activé après un transitoire de calcium, la synapse perdrait ainsi une partie de sa capacité à maintenir sa force synaptique. Cette interprétation demeure spéculative, une autre possibilité qu'on ne peut écarter pour le moment est que toute transfection avec le promoteur utilisé déprime systématiquement la force synaptique. Malheureusement, la taille de l'échantillon avec le contrôle GFP seul est trop faible pour

tirer une quelconque conclusion par rapport à cette hypothèse pour l'instant.

## **Possible potentialisation des minis de types glutamatergiques par application prolongée d'une lumière intense**

Vers la fin de cette maîtrise, j'explorais les sources potentielles d'artefacts qui auraient pu me faire croire qu'il y avait eu potentialisation alors qu'il n'y en avait pas dans un enregistrement suspect où la perfusion s'était bouchée alors que j'avais laissé la lumière du microscope allumée. J'ai donc essayé d'exposer des neurones de cultures dissociées à une lumière intense en ayant stoppé la perfusion. Ce stimulus représente en fait l'intensité maximale offerte par la lumière halogène connectée sur le microscope Axioskop 2 FS plus. L'intensité de la lumière en position maximale est ridiculement élevée par rapport à ce qui est nécessaire pour bien voir les neurones et représente donc des conditions tout à fait extrêmes qui ne sont jamais approchées dans le cours normal des expériences d'électrophysiologie. L'idée était d'identifier un changement clair en conditions extrêmes pour revenir graduellement vers des conditions plus normales et voir où se situait le seuil de l'artefact. Je prévoyais un échauffement du bain qui allait en retour provoquer une certaine augmentation de la fréquence des minis.

La fréquence et l'amplitude moyenne des minis ont démontré une augmentation sans précédent sur 3 des 7 premiers neurones testés. Un taux de succès inférieur à 100% représentait un premier indice qu'une simple élévation de température du bain n'était peut-être pas la source du changement. En fait, un test subséquent suggère que le phénomène se produit et qu'une potentialisation évidente persiste même si la perfusion est constamment active pendant et après le stimulus lumineux et que la température du bain mesurée avec une sonde reste égale à la température ambiante pendant le stimulus lumineux de 5 minutes. Il est à noter que si ceci était une forme de potentialisation, cela représenterait un taux de succès phénoménal par rapport à tous les protocoles essayés au cours de cette maîtrise.

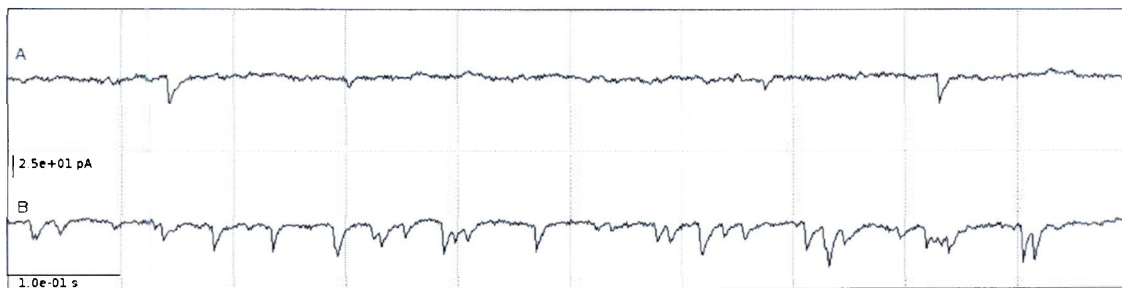
Ceci étant dit, l'existence du phénomène de potentialisation par la lumière n'est vraiment pas encore confirmée hors de tout doute. Le phénomène pourrait être entièrement le fruit d'un échauffement local dans la couche de cellules augmentant la probabilité de fusion des vésicules de neurotransmetteur et qui prendrait du temps à se dissiper. Une possibilité cependant est qu'il y a plusieurs phénomènes superposés incluant un échauffement local. L'existence de ce dernier n'invalide pas automatiquement la méthode si ces autres phénomènes éventuels de potentialisation sont suffisamment importants et identifiables hors de tout doute.

Une recherche de la littérature n'a pas permis d'identifier de papiers faisant mention de cette méthode pour obtenir une potentialisation par l'entremise des récepteurs AMPA. Les seuls articles trouvés jusqu'à maintenant concerne une modification modeste de la perméabilité au calcium des récepteurs NMDA suite à une exposition à la lumière (Leszkiewicz, Kandler et al. 2000). En fait, l'effet identifié par Leszkiewicz et al. contribue certainement à la potentialisation potentielle identifiée ici mais il est encore trop tôt pour dire si c'est là le seul mécanisme impliqué. On peut facilement imaginer

d'autres contributions comme par exemple l'accélération des réactions par la chaleur, la migration accélérée des récepteurs AMPA mobiles vers la synapse, etc.

Je me suis arrêté après une taille d'échantillon très faible mais le taux de succès à augmenter de façon très claire la fréquence des minis (environ 50%) est sans commune mesure avec toutes les manipulations effectuées pendant cette maîtrise. Je ne présenterai donc ici que des enregistrements bruts.

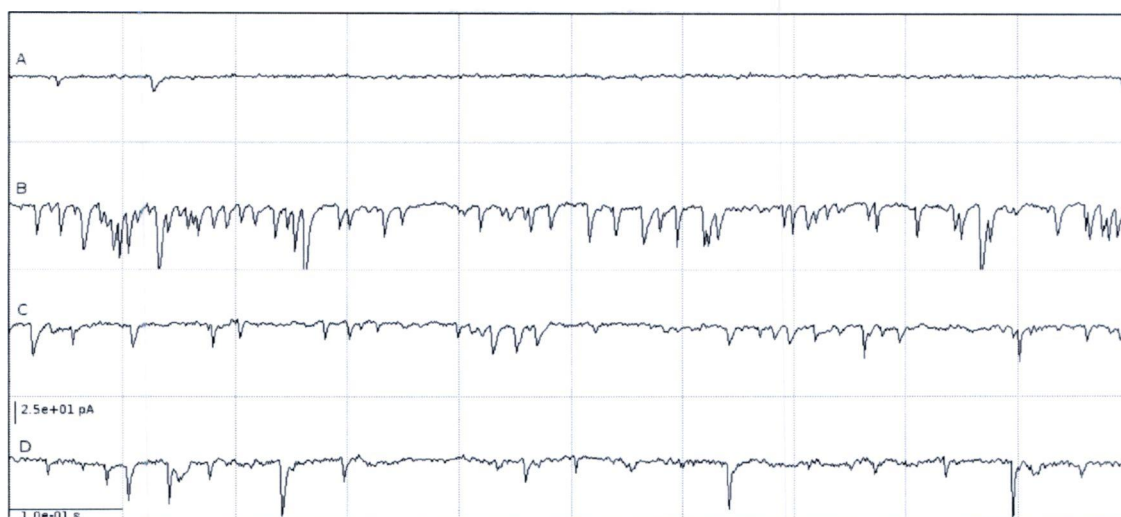
La Figure 12 qui suit illustre le changement très évident (approximativement un facteur 10) de la fréquence des minis au cours du temps pendant toute la durée d'une stimulation lumineuse sur une cellule issue d'une culture de 11 jours. Étant donné le nombre important de minis superposés les uns aux autres à la fin de la stimulation, une mesure fiable de l'amplitude moyenne n'est pas possible. La cellule est constamment perfusée d'une solution extracellulaire contenant les éléments critiques suivants: 1 mM de  $Mg^{2+}$ , 0.5  $\mu M$  de TTX, 20  $\mu M$  de bicuculline et 1  $\mu M$  de strychnine.



**Figure 12** Une cellule au tout début d'une stimulation lumineuse de 5 minutes (A) et à la fin (B).

La Figure 13 et la Table 2 qui suit présente un autre exemple de changement bien visible de la fréquence des minis au cours du temps suite à une stimulation lumineuse sur une cellule issue d'une culture de 10 jours. La cellule est constamment perfusée d'une solution extracellulaire contenant les éléments critiques suivants: 1 mM de  $Mg^{2+}$ , 0.5  $\mu M$  de TTX, 20  $\mu M$  de bicuculline et 1  $\mu M$  de strychnine. Ainsi, il est important de noter que rien n'a été fait dans ce test pour favoriser l'entrée de calcium par les récepteurs NMDA. Un protocole sans magnésium et avec glycine en concentration sursaturante comme utilisé par (Lu, Man et al. 2001; Oh and Derkach 2005) pourrait être avantageux. Notons que la baisse de l'amplitude moyenne en comparant avant et après la stimulation est minime et peut être le résultat d'une augmentation plus importante des minis à faible amplitude par rapport aux minis à forte amplitude.





**Figure 13** Exemple d'une cellule subissant une stimulation par une lumière intense : avant la stimulation lumineuse de 5 minutes (A), à la toute fin de la stimulation lumineuse de 5 minutes (B), 10 minutes après la fin de la stimulation lumineuse (C) et 20 minutes après la fin de la stimulation lumineuse (D).

	Fréquence (Hertz)	Amplitude (pA)
avant la stimulation (A)	1.37	-26.3
pendant la stimulation (B)	> 60	NA
10 minutes après la stimulation (C)	16.67	-23.1
20 minutes après la stimulation (D)	14.49	-22.8

**Table 2** Fréquences et amplitudes en fonction du temps d'une cellule subissant une stimulation par une lumière intense

## Discussion

Selon mon expérience personnelle dans les conditions précises qui ont prévalu pendant cette maîtrise, le nombre d'essais pour pouvoir générer un enregistrement de qualité suffisante pour pouvoir conclure à la réalité du phénomène de potentialisation par l'analyse de l'amplitude et la fréquence des minis est très important. La vaste majorité des enregistrements générés pendant le cours de cette maîtrise sont à rejeter pour une raison ou pour une autre. Rappelons ici les difficultés principales rencontrées qui ont nui à la production de résultats :

1. Faible taux de succès à générer un « gigaseal », une condition nécessaire à produire un enregistrement de qualité.
2. Passage en cellule entière raté: échec à rompre la membrane (pipette bouchée), membrane qui se referme presque immédiatement, succion trop intense pour la cellule ruinant le joint d'étanchéité.
3. Forte valeur de résistance d'accès ( $> 20 \text{ Mohm}$ ) soit dès le début ou très souvent, après un temps variable pendant l'enregistrement.
4. Courant DC variant de façon importante pendant l'enregistrement. Le plus souvent ceci est corrélé avec un changement de la résistance d'accès.
5. Ligne de base bruitée avec une amplitude comparable aux minis soit immédiatement ou très souvent, après un temps variable pendant l'enregistrement. Ici, on peut identifier trois types de bruits : le bruit intrinsèque à la cellule de type canal unique ou encore celui à la distribution approximativement gaussienne et le bruit capté. Ce dernier type a progressivement été diminué au fil du temps en améliorant le montage mais sans jamais être éliminé complètement.
6. Joint d'étanchéité qui rompt subitement pendant l'enregistrement.

Évidemment, plus la longueur d'observation nécessaire s'allonge, plus il est difficile de générer un nombre suffisant d'enregistrements de qualité. Un fait digne de mention est qu'il y a une différence importante dans la constante de temps de la potentialisation rapportée par Lu et al., 2001 (approximativement 5 minutes) et celle par Oh et al., 2005 (approximativement 30 minutes). Rappelons que Lu et al., 2001 utilisent comme stimulation une solution extracellulaire sans magnésium et avec glycine en concentration sursaturante pendant 3 minutes alors que Oh et al., 2005 retirent en plus le TTX pendant la stimulation qu'ils allongent à 10 minutes. Cette différence non négligeable dans la vitesse d'expression de la potentialisation dans les deux seuls cas rapportés de LTP en culture ouvre la porte à toutes les possibilités quant à cette vitesse d'expression dans des conditions différentes de façon délibérées ou à l'insu de l'expérimentateur. Le patch-clamp en cellule entière est en soi nécessairement un traumatisme pour une cellule. Lorsqu'on veut observer des phénomènes avec une échelle de temps de l'ordre d'une heure, en plus des difficultés énumérées plus haut, il faut faire face au fait que les cellules

subissent des changements importants dont notamment la perte importante des petites molécules comme la calmoduline et un changement de volume des segments du neurone par l'affaissement du cytosquelette qui amène en retour une modification de la transmission des minis vers l'électrode. En regard de ceci et suite à mon expérience personnelle avec la technique du patch-clamp en cellule entière, je déconseille son usage pour l'observation de phénomènes qui ne peuvent pas être constatés rapidement dans les quelques minutes suivant le passage en cellule entière. Ceci étant dit, avec une observation de relativement courte durée, on doit se méfier de l'artéfact identifié quelques fois dans les enregistrements où la fréquence des minis augmente de façon notable mais temporaire pendant une durée de l'ordre de la minute. Soulignons ici qu'en contraste avec la méthode très invasive du patch-clamp en cellule entière, une méthode alternative pour évaluer la plasticité synaptique en culture consiste à faire cette culture sur une grille d'électrodes. Avec cette grille, on peut établir une carte de corrélation dans l'activité mesurée par les électrodes. Un changement dans la force synaptique amènera obligatoirement un changement dans cette carte.

Si on exclut la technique de l'expérimentateur, on peut spéculer sur le pourquoi de n'avoir pu reproduire le type de LTP en culture dans les papiers publiés. Pendant les deux premières semaines, la culture subit des changements importants. De simples cellules dissociées à l'aspect sphérique, les neurones développent un vaste réseau dendritique. De plus la glie se multiplie. En parallèle à ce développement, l'activité initialement complètement absente devient de plus en plus importante. La synaptogenèse initiale est un phénomène indépendant de l'activité. Par la suite, l'activité est un mécanisme relativement subtil modulant la synaptogenèse en favorisant ou en défavorisant certaines connexions. La culture n'ayant pas la capacité du milieu physiologique pour fournir des conditions optimales de développement, on peut spéculer qu'une culture n'arrivera pas à se placer dans la zone de plasticité optimale mais pourrait plutôt entrer rapidement en un mode de saturation synaptique où une potentialisation est très difficile alors qu'une dépression est facile à obtenir. Si telle était la réalité pour les cultures utilisées pendant cette maîtrise, il ne serait pas étonnant de voir que seul un protocole passablement agressif comme la stimulation par la lumière intense arrive à provoquer une potentialisation. Face à une plasticité déficiente des neurones dans les conditions de culture actuelles, on pourrait envisager de faire un balayage de conditions de culture alternatives mais avec une méthode plus efficace que le patch-clamp comme l'immunocytochimie des récepteurs glutamatergiques. Finalement, mentionnons qu'on pourrait bien sûr aller jusqu'à envisager comme solution d'utiliser des cultures organotypiques ou encore des tranches aiguës pour se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques.

Les quelques résultats préliminaires mais prometteurs utilisant la potentialisation par la lumière intense m'a fait réaliser de façon tardive l'importance sûrement cruciale de la température dans l'amplification de l'expression du phénomène de la potentialisation. Utiliser une température plus élevée que la température de la pièce amène notamment une plus grande vitesse des réactions et une plus grande mobilité des protéines impliquées dont les incontournables récepteurs AMPA. Donc, face aux diverses embûches à générer de la potentialisation en culture, le simple fait d'augmenter la température est un atout

dont on ne devrait pas se priver.

Dans l'hypothèse que le phénomène de la potentialisation par stimulation avec une lumière intense est réel, en éclairant l'échantillon avec un masque programmable, ce type de potentialisation présenterait l'avantage d'offrir une résolution spatiale du stimulus au micromètre près. On pourrait aussi envisager des stimulations avec un très grand nombre de zones distinctes, ce qui est inconcevable avec des électrodes de stimulation. Aussi, on peut imaginer stimuler des neurones de cultures périodiquement sur plusieurs semaines et ainsi moduler de façon intéressante leur développement.

En somme, le phénomène est intéressant mais demande une caractérisation supplémentaire non triviale pour bien faire le tour de la question. Lorsque le projet Rig sera suffisamment avancé et à travers le cadre expérimental qu'il offrira, j'entends revenir sur la question avec en autres les expériences suivantes:

- Éclairer avec une densité de puissance lumineuse mesurée et égale sur toute la surface de la culture. L'illumination pour les expériences réalisées jusqu'à maintenant avait un profil décidé par l'ajustement du collimateur de lumière sous le microscope, la densité de puissance obtenue ainsi est une gaussien avec une largeur visiblement beaucoup plus étroite que la surface couverte par la culture. De plus, dans le montage utilisé, la zone d'intensité maximale est systématiquement le centre de la culture alors qu'on voudrait que celle-ci soit centrée sur le neurone « patché ».
- Comparer le changement de concentration de récepteurs AMPA aux synapses par immuno pour deux régions d'une même culture avec seulement l'une d'elle exposée au stimulus lumineux.
- Mesurer la température au niveau du neurone « patché » pour voir à quel point le phénomène implique un échauffement local.
- Comparaison du changement de fréquence des minis si:
  - on élimine le magnésium pendant la stimulation
  - on élimine le magnésium pendant la stimulation et on ajoute de la glycine
  - on bloque les canaux NMDA avec le bloqueur réversible AP5
  - on bloque tout effet du côté post synaptique en bloquant les récepteur NMDA avec de l'AP5 et AMPA avec du CNQX
  - on inhibe de façon réversible le côté pré synaptique pendant le stimulus lumineux (si cet inhibiteur existe ou peut-être simplement retirer temporairement tout le calcium de la solution extracellulaire)
- En fonction de la durée et de l'intensité du stimulus, déterminer précisément la durée de la potentialisation.
- Déterminer si la stimulation est toxique pour les cellules en observant leur viabilité sur plusieurs jours.
- Forte concentration de glutathion dans la pipette pour maintenir les protéines avec ponts cystines dans leur état réduit (la potentialisation des récepteurs NMDA identifiée par (Leszkiewicz, McLaughlin et al. 2002) consiste en un changement durable de l'état du pont cystine présent dans le récepteur NMDA).
- Déterminer si la CaMKII translocalise suite au stimulus



- Inhibition des kinases clef CaMKII, PKA et PKC dans la pipette
- Évaluer la potentialisation en fonction de l'intensité et la durée de la stimulation lumineuse pour trouver les valeurs optimales. La valeur atteinte par la concentration de calcium dans les synapses est critique pour déterminer de ce qui advient de la force synaptique.
- Stimulation lumineuse avec un spectre étroit et balayage progressif du spectre lumineux.
- Stimulation lumineuse par zones.
- Ajouter une boucle de rétroaction permettant d'ajuster la fréquence maximale des minis au plus fort de la stimulation.
- Stimulation lumineuse sur des neurones de différents âges.

Contrairement à la détection de la potentialisation, la méthode consistant à mesurer la force synaptique de neurones transfectés a l'avantage de nécessiter qu'un enregistrement de courte durée. Cependant, rappelons que le nombre très faible de neurones transfectés dans une culture amène une baisse importante dans la probabilité de succès du « gigaseal » car on est plus souvent qu'autrement contraint de « patcher » des neurones enfouis sous des congénères. La position relative d'un neurone sur le disque de culture a certainement une influence sur la fréquence des minis. On peut raisonnablement imaginer que le nombre de synapses par neurone est corrélé avec la densité locale de neurones. Il serait éventuellement intéressant de pouvoir diminuer la variabilité des résultats en intégrant l'information de la position et de la densité locale de cellules. Ce genre d'information sera facilement intégrable dans le cadre expérimental Rig.

Le seul mutant pour lequel j'ai réussi à bâtir un échantillon suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif est le mutant MonoGFP\*alpha-CaMKII 1-326 et je vous avouerai que ceci a planté le dernier clou dans le cercueil des manipulations de cette maîtrise. J'ai dès lors consacré tous mes efforts à faire avancer le plus possible le logiciel Rig pour améliorer le bilan de mon passage par cette maîtrise. D'autant plus que je considère le projet Rig comme l'investissement optimal de mes efforts étant donné mes compétences pour avoir à moyen terme un maximum de retombées positives. Le travail qu'il reste à faire pour pouvoir prouver l'hypothèse que la CaMKII doit pouvoir s'accumuler à la synapse pour l'expression du LTP est premièrement d'avoir une méthode robuste, rapide et validée pour générer ce LTP. Le meilleur candidat est définitivement la potentialisation par un stimulus de lumière intense mais il reste à en faire une validation exhaustive. Finalement, une fois cet outil validé, il restera à tester comment l'expression d'un plasmide de CaMKII sauvage se distingue par rapport aux plasmides ne pouvant pas translocaliser à la synapse. En fait, le plasmide idéal serait celui qui n'aurait aucune autre action que de déloger la CaMKII endogène de la PSD en entrant en compétition avec celle-ci pour des sites de liaisons cruciaux dont notamment le site de la sous-unité NR2B du récepteur NMDA.

## Le mot de la fin

En résumé, voici quelques points saillants de ce mémoire:

- J'ai réalisé après m'être engagé dans le projet de maîtrise qu'il était incompatible avec mon profil.
- Ceci étant dit, il a été riche en apprentissages et en leçons. Je peux garantir que mon passage par cette maîtrise aura des retombées positives pour le domaine des neurosciences mais pas celles initialement prévues.
- Essentiellement, il n'a pas été possible de reproduire les protocoles publiés pour produire de la potentialisation sur les neurones de culture du laboratoire. En fait, ces protocoles appliqués sur les cultures du laboratoire et combinés avec la technique de l'auteur de ce mémoire ne fournissaient pas du tout une méthode robuste, évidente et rapide pour générer du LTP. Ces tentatives ont monopolisé une partie importante de la maîtrise. Il était impossible de pourvoir générer des résultats fiables et significatifs avec ces protocoles et variantes. Le travail pour tester l'hypothèse centrale du mémoire et énoncée dans l'introduction est clairement inachevé. Entre produire des résultats scientifiques invalides et un échec pour cette maîtrise, je choisis l'échec.
- Une fois confirmée hors de tout doute et mieux caractérisée, la potentialisation par un stimulus de lumière intense pourrait représenter une nouvelle méthode compatible avec les cultures du laboratoire. Une méthode qui promet d'être robuste, évidente et à expression rapide pour être en mesure de générer des résultats fiables.
- Il est clair à mon point de vue que le cadre expérimental avec lequel j'ai été mis en contact pendant cette maîtrise peut être amélioré de façon importante en investissant les efforts nécessaires.
- Désormais, ma contribution se fera strictement par le biais de mes compétences d'ingénieur. J'ai la ferme intention de régler tous les problèmes grands et petits auxquels j'ai été confronté par l'entremise du projet Rig: un cadre expérimental hautement automatisé permettant la répétition immédiate et à volonté d'une certaine classe de résultats, à savoir les expériences de patch-clamp et microscopie par fluorescence sur cultures cellulaires. Les retombées positives mentionnées plus haut seront ainsi sous la forme d'outils logiciel (libre) et matériel. Tous les efforts nécessaires seront investis pour que ce système soit le plus accessible à toute personne qui voudra l'utiliser.
- L'état actuel du logiciel Rig est une version alpha. Rig offre pour le moment quelques fonctionnalités intéressantes pour certains membres du laboratoire mais le meilleur est à venir dans les prochains mois lorsque l'essentiel de ce qui a été envisagé sera en place et complètement testé.
- Bien que je n'ai pas produit de résultat statistiquement significatif pour corroborer l'hypothèse centrale à cette maîtrise, la partie n'est que remise car j'y reviendrai mais cette fois armé de l'outil Rig qui permettra de faire des balayages exhaustifs de conditions carrément hors d'atteinte par la technique manuelle.

## Références

- Aniksztejn, L. and Y. Ben-Ari (1991). "Novel form of long-term potentiation produced by a K<sup>+</sup> channel blocker in the hippocampus." *Nature* **349**(6304): 67-9.
- Asztely, F., G. Erdemli, et al. (1997). "Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: dependence on temperature and the role of active glutamate uptake." *Neuron* **18**(2): 281-93.
- 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.
- Bashir, Z. I., Z. A. Bortolotto, et al. (1993). "Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors." *Nature* **363**(6427): 347-50.
- 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.
- Benaim, G. and A. Villalobo (2002). "Phosphorylation of calmodulin. Functional implications." *Eur J Biochem* **269**(15): 3619-31.
- Berthois, Y., J. A. Katzenellenbogen, et al. (1986). "Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(8): 2496-500.
- 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.
- Bliss, T. V. and G. Richter-Levin (1993). "Spatial learning and the saturation of long-term potentiation." *Hippocampus* **3**(2): 123-5.
- Bortolotto, Z. A., S. M. Fitzjohn, et al. (1999). "Roles of metabotropic glutamate receptors in LTP and LTD in the hippocampus." *Curr Opin Neurobiol* **9**(3): 299-304.
- Brewer, G. J. (1997). "Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons." *J Neurosci Methods* **71**(2): 143-55.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, et al. (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." *J Neurosci Res* **35**(5): 567-76.
- 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.
- Cherkniak, C. (1990). "The bounded brain: Toward quantitative neuroanatomy." *J Cog. Neurosci.* **2**: 58-68.
- Colbran, R. J., L. C. Carmody, et al. (2003). "Analysis of specific interactions of native protein phosphatase 1 isoforms with targeting subunits." *Methods Enzymol* **366**: 156-75.

- 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.
- Dodt, H., M. Eder, et al. (1999). "Precisely localized LTD in the neocortex revealed by infrared-guided laser stimulation." *Science* **286**(5437): 110-3.
- Ehlers, M. D., S. Zhang, et al. (1996). "Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit." *Cell* **84**(5): 745-55.
- El-Bakri, N. K., A. Islam, et al. (2004). "Effects of estrogen and progesterone treatment on rat hippocampal NMDA receptors: relationship to Morris water maze performance." *J Cell Mol Med* **8**(4): 537-44.
- Erondu, N. E. and M. B. Kennedy (1985). "Regional distribution of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain." *J Neurosci* **5**(12): 3270-7.
- 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.
- Fong, Y. L., W. L. Taylor, et al. (1989). "Studies of the regulatory mechanism of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. Mutation of threonine 286 to alanine and aspartate." *J Biol Chem* **264**(28): 16759-63.
- 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.
- Garaschuk, O., R. Schneggenburger, et al. (1996). "Fractional Ca<sup>2+</sup> currents through somatic and dendritic glutamate receptor channels of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones." *J Physiol* **491** ( Pt 3): 757-72.
- Gardoni, F., L. H. Schrama, et al. (2001). "Hippocampal synaptic plasticity involves competition between Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and postsynaptic density 95 for binding to the NR2A subunit of the NMDA receptor." *J Neurosci* **21**(5): 1501-9.
- Giese, K. P., N. B. Fedorov, et al. (1998). "Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning." *Science* **279**(5352): 870-3.
- Greengard, P. (2001). "The neurobiology of slow synaptic transmission." *Science* **294**(5544): 1024-30.
- Grover, L. M. and C. Yan (1999). "Evidence for involvement of group II/III metabotropic glutamate receptors in NMDA receptor-independent long-term potentiation in area CA1 of rat hippocampus." *J Neurophysiol* **82**(6): 2956-69.
- Hanse, E. and B. Gustafsson (1994). "TEA elicits two distinct potentiations of synaptic transmission in the CA1 region of the hippocampal slice." *J Neurosci* **14**(8): 5028-34.
- Hanson, P. I., T. Meyer, et al. (1994). "Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals." *Neuron* **12**(5): 943-56.
- Harris, E. W. and C. W. Cotman (1986). "Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists." *Neurosci Lett* **70**(1): 132-7.
- Harris, K. M. and S. B. Kater (1994). "Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function." *Annu Rev Neurosci* **17**: 341-



- Hook, S. S. and A. R. Means (2001). "Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 471-505.
- Horn, R. (1998). "Run, don't hop, through the nearest calcium channel." Biophys J **75**(3): 1142-3.
- Huang, Y. Y. and E. R. Kandel (1994). "Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization." Learn Mem **1**(1): 74-82.
- Huang, Y. Y. and R. C. Malenka (1993). "Examination of TEA-induced synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus: the role of voltage-dependent Ca2+ channels in the induction of LTP." J Neurosci **13**(2): 568-76.
- Hudmon, A., E. Lebel, et al. (2005). "A mechanism for Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association." J Neurosci **25**(30): 6971-83.
- Hvalby, O., H. C. Hemmings, Jr., et al. (1994). "Specificity of protein kinase inhibitor peptides and induction of long-term potentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4761-5.
- Ito, M., M. Sakurai, et al. (1982). "Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells." J Physiol **324**: 113-34.
- Jackson, A. E., K. L. Carraway, 3rd, et al. (1987). "Association of calmodulin and smooth muscle myosin light chain kinase: application of a label selection technique with trace acetylated calmodulin." Proteins **2**(3): 202-9.
- Johnson, J. W. and P. Ascher (1987). "Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons." Nature **325**(6104): 529-31.
- Jones, H. C. and R. F. Keep (1988). "Brain fluid calcium concentration and response to acute hypercalcaemia during development in the rat." J Physiol **402**: 579-93.
- Kakiuchi, S., S. Yasuda, et al. (1982). "Quantitative determinations of calmodulin in the supernatant and particulate fractions of mammalian tissues." J Biochem (Tokyo) **92**(4): 1041-8.
- Kandel, E. R. (1997). "Genes, synapses, and long-term memory." J Cell Physiol **173**(2): 124-5.
- Kew, J. N., A. Koester, et al. (2000). "Functional consequences of reduction in NMDA receptor glycine affinity in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site." J Neurosci **20**(11): 4037-49.
- Klee, C. B. (1988). Molecular Aspects of Cellular Regulation. Elsevier, Elsevier, Amsterdam. **5**: 35-56.
- Kolodziej, S. J., A. Hudmon, et al. (2000). "Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase IIalpha and truncated CaM kinase IIalpha reveal a unique organization for its structural core and functional domains." J Biol Chem **275**(19): 14354-9.
- Kovalchuk, Y., J. Eilers, et al. (2000). "NMDA receptor-mediated subthreshold Ca(2+) signals in spines of hippocampal neurons." J Neurosci **20**(5): 1791-9.
- Lai, Y., A. C. Nairn, et al. (1986). "Autophosphorylation reversibly regulates the Ca2+/calmodulin-dependence of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(12): 4253-7.

- Lazarewicz, J. W. and E. Salinska (1993). "Role of calcium in glutamate-mediated toxicity: mechanisms of calcium fluxes in rabbit hippocampus in vivo investigated with microdialysis." Acta Neurobiol Exp (Wars) **53**(1): 3-13.
- Leonard, A. S., I. A. Lim, et al. (1999). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3239-44.
- Lepe-Zuniga, J. L., J. S. Zigler, Jr., et al. (1987). "Toxicity of light-exposed Hepes media." J Immunol Methods **103**(1): 145.
- Leszkiewicz, D. N., K. Kandler, et al. (2000). "Enhancement of NMDA receptor-mediated currents by light in rat neurones in vitro." J Physiol **524 Pt 2**: 365-74.
- Leszkiewicz, D. N., B. A. McLaughlin, et al. (2002). "Protein kinases and light: unlikely partners in a receptor localization puzzle." Physiol Behav **77**(4-5): 533-6.
- Lu, W., H. Man, et al. (2001). "Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons." Neuron **29**(1): 243-54.
- Luthi, A., M. A. Wikstrom, et al. (2004). "Bi-directional modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity." BMC Neurosci **5**(1): 44.
- Lynch, G., J. Larson, et al. (1983). "Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation." Nature **305**(5936): 719-21.
- Makhinson, M., J. K. Chotiner, et al. (1999). "Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation." J Neurosci **19**(7): 2500-10.
- Malinow, R. and R. C. Malenka (2002). "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." Annu Rev Neurosci **25**: 103-26.
- 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.
- Mamar-Bachi, A. and J. A. Cox (1987). "Quantitative analysis of the free energy coupling in the system calmodulin, calcium, smooth muscle myosin light chain kinase." Cell Calcium **8**(6): 473-82.
- Manning, G., G. D. Plowman, et al. (2002). "Evolution of protein kinase signaling from yeast to man." Trends Biochem Sci **27**(10): 514-20.
- Mayadevi, M., M. Praseeda, et al. (2002). "Sequence determinants on the NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor responsible for specificity of phosphorylation by CaMKII." Biochim Biophys Acta **1598**(1-2): 40-5.
- Mayer, M. L., G. L. Westbrook, et al. (1984). "Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones." Nature **309**(5965): 261-3.
- Merrill, M. A., Y. Chen, et al. (2005). "Activity-driven postsynaptic translocation of CaMKII." Trends Pharmacol Sci **26**(12): 645-53.
- Meyer, T., P. I. Hanson, et al. (1992). "Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase." Science **256**(5060): 1199-202.
- Miller, S. G. and M. B. Kennedy (1985). "Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction." J Biol Chem **260**(15): 9039-46.
- Monyer, H., N. Burnashev, et al. (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." Neuron **12**(3): 529-40.

- Mori, M. X., M. G. Erickson, et al. (2004). "Functional stoichiometry and local enrichment of calmodulin interacting with Ca<sup>2+</sup> channels." *Science* **304**(5669): 432-5.
- Morris, R. G., E. Anderson, et al. (1986). "Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5." *Nature* **319**(6056): 774-6.
- Nevalainen, L. T., T. Aoyama, et al. (1997). "Characterization of novel calmodulin-binding peptides with distinct inhibitory effects on calmodulin-dependent enzymes." *Biochem J* **321** ( Pt 1): 107-15.
- 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.
- Nowak, L., P. Bregestovski, et al. (1984). "Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones." *Nature* **307**(5950): 462-5.
- Oh, M. C. and V. A. Derkach (2005). "Dominant role of the GluR2 subunit in regulation of AMPA receptors by CaMKII." *Nat Neurosci* **8**(7): 853-4.
- Otmakhov, N., L. C. Griffith, et al. (1997). "Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing-induced long-term potentiation." *J Neurosci* **17**(14): 5357-65.
- 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.
- 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.
- Popoli, M. (1993). "Synaptotagmin is endogenously phosphorylated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin protein kinase II in synaptic vesicles." *FEBS Lett* **317**(1-2): 85-8.
- Purves (2004). *Neuroscience*.
- Rasmussen, H., P. Barrett, et al. (1990). "Calcium ion as intracellular messenger and cellular toxin." *Environ Health Perspect* **84**: 17-25.
- Rich, R. C. and H. Schulman (1998). "Substrate-directed function of calmodulin in autophosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II." *J Biol Chem* **273**(43): 28424-9.
- 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.
- Rubenstein, J. L., P. Greengard, et al. (1993). "Calcium-dependent serine phosphorylation of synaptophysin." *Synapse* **13**(2): 161-72.
- Sabatini, B. L., T. G. Oertner, et al. (2002). "The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines." *Neuron* **33**(3): 439-52.
- Saucier, D. and D. P. Cain (1995). "Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation." *Nature* **378**(6553): 186-9.
- Schulman, H. (2004). "Activity-dependent regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II localization." *J Neurosci* **24**(39): 8399-403.
- Sharma, R. K. and J. H. Wang (1988). "Isolation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes." *Methods Enzymol* **159**: 582-94.



- 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). "CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines." Neuron **21**(3): 593-606.
- Shields, S. M., T. S. Ingebritsen, et al. (1985). "Identification of protein phosphatase 1 in synaptic junctions: dephosphorylation of endogenous calmodulin-dependent kinase II and synapse-enriched phosphoproteins." J Neurosci **5**(12): 3414-22.
- Sik, A., N. Hajos, et al. (1998). "The absence of a major Ca<sup>2+</sup> signaling pathway in GABAergic neurons of the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3245-50.
- Sitaramayya, A., L. S. Wright, et al. (1980). "Enzymatic methylation of calmodulin in rat brain cytosol." J Biol Chem **255**(18): 8894-900.
- Song, D., X. Xie, et al. (2001). "Differential effect of TEA on long-term synaptic modification in hippocampal CA1 and dentate gyrus in vitro." Neurobiol Learn Mem **76**(3): 375-87.
- Spierenburg, G. T., F. T. Oerlemans, et al. (1984). "Phototoxicity of N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid-buffered culture media for human leukemic cell lines." Cancer Res **44**(5): 2253-4.
- Squire (2003). Fundamental Neuroscience.
- 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.
- Strack, S., A. J. Robison, et al. (2000). "Association of calcium/calmodulin-dependent kinase II with developmentally regulated splice variants of the postsynaptic density protein densin-180." J Biol Chem **275**(33): 25061-4.
- Tang, Y. P., E. Shimizu, et al. (1999). "Genetic enhancement of learning and memory in mice." Nature **401**(6748): 63-9.
- Tasken, K. and E. M. Aandahl (2004). "Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A." Physiol Rev **84**(1): 137-67.
- 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.
- Tonkikh, A., C. Janus, et al. (2006). "Calcium chelation improves spatial learning and synaptic plasticity in aged rats." Exp Neurol **197**(2): 291-300.
- Tovar, K. R. and G. L. Westbrook (2002). "Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses." Neuron **34**(2): 255-64.
- Tsui, J., M. Inagaki, et al. (2005). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) localization acts in concert with substrate targeting to create spatial restriction for phosphorylation." J Biol Chem **280**(10): 9210-6.
- Vergara, C., R. Latorre, et al. (1998). "Calcium-activated potassium channels." Curr Opin Neurobiol **8**(3): 321-9.
- Weeber, E. J., Y. H. Jiang, et al. (2003). "Derangements of hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a mouse model for Angelman mental retardation syndrome." J Neurosci **23**(7): 2634-44.



- Weiland, N. G., C. Orikasa, et al. (1997). "Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats." J Comp Neurol **388**(4): 603-12.
- Westergren, I., B. Nystrom, et al. (1994). "Concentrations of amino acids in extracellular fluid after opening of the blood-brain barrier by intracarotid infusion of protamine sulfate." J Neurochem **62**(1): 159-65.
- Yang, E. and H. Schulman (1999). "Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." J Biol Chem **274**(37): 26199-208.
- Zalutsky, R. A. and R. A. Nicoll (1990). "Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons." Science **248**(4963): 1619-24.
- Zamanillo, D., R. Sprengel, et al. (1999). "Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning." Science **284**(5421): 1805-11.

## Annexes

### Le projet Rig

L'élaboration du projet Rig est un produit direct de mon passage par cette maîtrise.

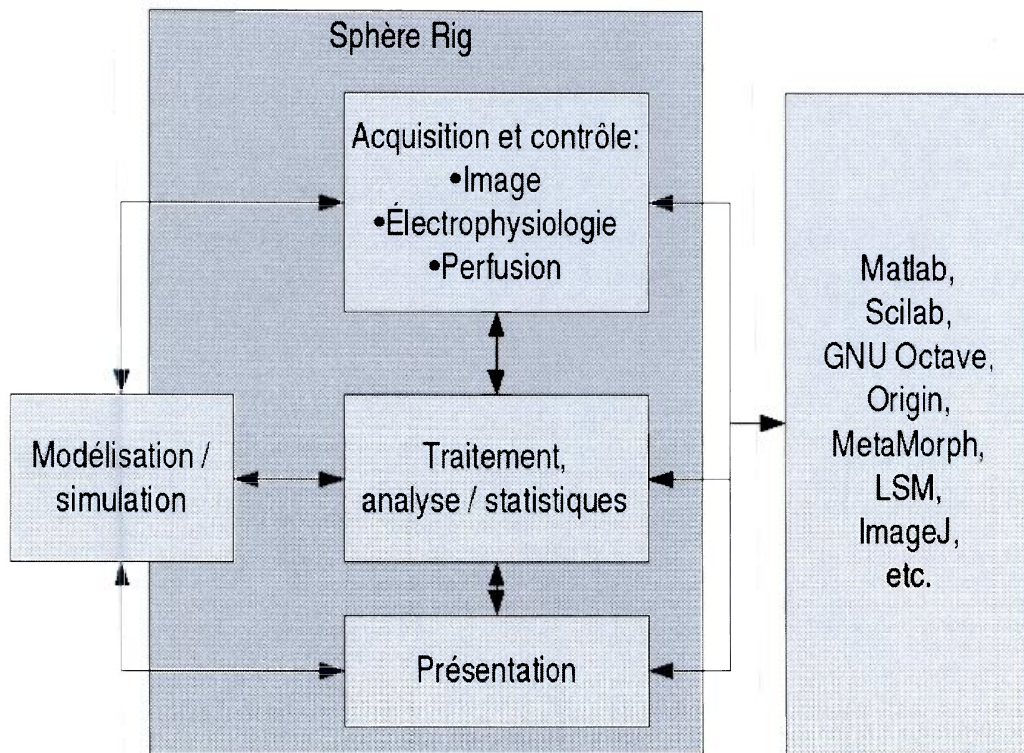
Le projet Rig consiste à l'automatisation à l'extrême limite du possible des manipulations effectuées pendant cette maîtrise pour pouvoir répéter autant de fois que désiré les résultats qui pourront être obtenus dans le cadre offert. Il consiste en premier en une partie logiciel libre générique offrant la capacité d'exécuter des expériences en électrophysiologie et en microscopie dans un système intégré. Étant donné son support pour un nombre grandissant d'appareils utilisés en électrophysiologie et en microscopie, l'utilisation seule du logiciel Rig sera indépendante de son utilisation dans le cadre intégré du projet Rig.

Environ une année sera requise après la fin de cette maîtrise pour avoir un premier prototype fonctionnel de base impliquant autant le logiciel que le matériel envisagé pour fin de démonstration claire et nette de la validité du concept. Les années subséquentes seront consacrées à raffiner sans cesse le système. Les capacités avancées suivantes seront progressivement ajoutées.

- production automatisée de circuits neuronaux planaires de culture à la structure complexe mais contrôlée grâce à:
  - sélection de type cellulaire par cytométrie de flux lors du plaquage
  - guidage physique par le substrat de culture
  - gradient de concentration de substances
  - stimulation électrique avec un "Multi-Electrode Array" (MEA)
  - stimulation lumineuse avec patron spatial programmable
  - mort cellulaire sélective induite (par laser deux-photons par exemple)
  - transfection sélective par injection de plasmide cellule par cellule
- production automatisée de circuits neuronaux 3D de culture se rapprochant graduellement du modèle de la tranche:
  - par dépôt successif des circuits planaires précédents
  - et/ou migration et développement guidés dans une matrice 3D

En fait, une fois les fonctions de base du système bien en place, des appareils ont fonctionnalités complémentaires seront progressivement intégrés au fil du temps.

En une page, ce vers quoi tend Rig ultimement



Caractéristiques principales:

- Système intégré
  - toutes les opérations enregistrées et automatisables à tous les niveaux
  - toute information à tout niveau aura sa généalogie permettant de revenir en arrière
- Logiciel libre (GPL)
- Multiplateformes: Windows, Mac, Linux
- Parallélisme:
  - accélération du traitement en combinant toutes les ressources disponibles
  - acquisitions et contrôle synchronisés d'autant des ressources matérielles que nécessaire
- Le plus ouvert et interoperable possible:
  - on y prend ce qui est utile, point de contraintes à tout faire dans Rig
  - support le plus poussé possible pour les formats de fichier
    - toute information contenue est accessible et exportable vers les autres logiciels
    - ce champ de vision maximal de Rig permet le "data mining"

Figure 14 Diagramme simplifié illustrant Rig

Tous mes efforts dans l'élaboration du système seront guidés par les principes généraux suivants:

- matériel nécessaire le moins cher possible et tout le logiciel sera libre pour faire baisser au minimum la barrière de la reproductibilité des résultats scientifiques.
- support poussé à l'extrême des formats de fichier en électrophysiologie et image et outil de recherche sans pareil pour faire du "data mining" de toute information contenue dans ces fichiers.
- coordination dans un flot intégré d'un nombre virtuellement illimité de processus logiciels et matériels
- en parallèle à la définition d'un cœur logiciel/matériel le moins cher possible et le plus intégré possible, support pour une gamme grandissante de matériel déjà existant. Ceci a plusieurs objectifs:
  - chaque matériel ajouté fait progresser la qualité du système: l'architecture devient de plus en plus générique et universelle
  - les utilisateurs prennent ce qu'ils ont besoin dans le système et ne sont pas obligés de le prendre comme un tout (mais le tout a ses avantages)
- éliminer les tâches abrutissantes et répétitives. Les tâches abrutissantes et répétitives sont démotivantes et sont en soit une barrière à la reproductibilité.
- fournir un cadre qui élimine la subjectivité humaine dans le tri des résultats
- faire en sorte qu'on puisse créer facilement autant de copies du système que nécessaire pour accommoder une croissance de la demande. Ceci implique un coût le plus faible possible par unité.
- l'opérateur et le système n'auront pas besoin d'être physiquement au même endroit. Une connexion internet supérieure à 1Mbits/seconde reliant l'opérateur et le système sera la seule exigence pour pouvoir opérer le système à distance.

## **Le logiciel libre Rig**

Cette section fait état des capacités actuelles et développements futurs du logiciel libre Rig. Il faut savoir que le logiciel est encore présentement en version alpha. Ceci veut dire que l'interface usager n'est pas encore stabilisée, que certains aspects énumérés ne sont encore que partiellement fonctionnels et que certaines parties du logiciel n'ont pas encore été suffisamment testées.

### **Capacités actuelles et activement développées du logiciel libre Rig**

- Fonctionne sous Windows 95, 98, NT, 2000, XP et Linux (fonctionnera aussi sous Macintosh mais pas encore testé)
- Toutes les fonctionnalités offertes par le logiciel sont automatisables dans le langage interprété Python
- Support en lecture pour les formats de fichier suivants avec possibilité d'exporter toute information qui y est contenue:
  - Électrophysiologie:
    - Heka Pulse (.dat, .pul et .pgf)
    - Heka Patchmaster (.dat)
    - Axon Text File (.atf)
    - Axon Binary File (.abf et .dat) (support en écriture également)
    - Binaire



- Image:
  - Tagged Image File Format (.tif) (support en écriture également)
  - MetaMorph stack (.stk)
  - Zeiss LSM (.lsm)
- Support pour les appareils suivants:
  - Caméras Photometrics (CoolSNAP HQ, Cascade 512B, ...) (support partiel dans la version alpha)
  - Source au xénon Sutter Instruments Lambda DG-4
  - Microscopes Zeiss Axioskop 2 FS plus et Axiovert 200M (support partiel dans la version alpha)
  - Amplificateur de patch Heka EPC-9 et EPC-10 (support partiel dans la version alpha)
- Support et conversion entre les formats d'images multi-canaux 8, 16 et 32 bits.
- Duplication, combinaison et élimination d'images
- Support pour les types suivants de régions d'intérêt pour le traitement et l'analyse d'image:
  - Point
  - Ligne
  - Courbe arbitraire
  - Rectangle
  - Ellipse
  - Forme fermée arbitraire
- Support pour les types de traitements suivants sur les images:
  - Alignement automatique d'images
  - Translation arbitraire ("sub-pixel")
  - Détection de transition:
    - Laplace
    - Verticale
    - Horizontale
    - Sobel
    - Prewitt
    - Kirsch
  - Filtres passe-bas/passe-haut et passe-bande
  - Ajout/soustraction d'une constante à une image
  - Multiplication d'une image par une constante
  - Et, ou, ou exclusif bit à bit d'une constante à une image/région
  - Combinaison arithmétique de deux images/régions
  - Dilatation
  - Érosion
  - Correction gamma
  - Ratio de deux images
  - Fixer la valeur maximale ou minimale d'une image/région
  - Fixer la valeur d'une image/région
  - Effet miroir d'une image/région
  - Adoucissement d'une image/région
  - Éclaircissement ("sharpen") d'une image/région

- Seuil ("thresholding")
  - Détection d'objets dans une image
  - Convolution avec une fonction définie par l'utilisateur
- Surimpression non destructive du temps d'acquisition et de l'échelle d'une image
- Table de substitution de couleurs ("look-up tables"): rouge, vert, bleu, cyan, magenta, jaune, rouge-vert, gris, "fire", "ice", "spectrum"
- Mise au point automatique d'une image/région
- Enregistrement/stimulation électrophysiologique des types suivants:
  - Stimulation épisodique incluant:
    - échelon
    - onde triangulaire
    - train biphasique
    - train triangulaire
    - train cosinus
  - Enregistrement d'événements de durée fixe
  - Enregistrement d'événements à durée variable
  - Enregistrement continu
- Filtre passe-bas, passe-haut, passe-bande et "notch" sur les enregistrements électrophysiologiques
- Estimation de la densité spectrale de puissance (FFT) sur les enregistrements électrophysiologiques
- Détection automatique d'événements dans les acquisitions électrophysiologiques
- Régression double exponentielle automatique des événements détectés
- Mesures des types suivants dans une région d'intérêt d'un enregistrement électrophysiologique:
  - Valeurs crête et anti-crête
  - Valeurs maximale et minimale
  - Valeur moyenne
  - Écart type
  - Pente maximale et minimale
  - Temps et pentes de montée et de descente
  - Aire sous la courbe
  - Largeur à 50%
  - Régression linéaire
  - Régression double exponentielle
- Contrôle de perfusion:
  - contrôle jusqu'à 8 lignes de perfusion par le port parallèle
  - Éditeur de solutions intracellulaire et extracellulaires avec l'estimation automatique des valeurs suivantes: osmolarité, force ionique, potentiel d'inversion, concentration des espèces chimiques dissociées, coût approximatif des solutions
  - Éditeur de protocoles de perfusion
- Peut estimer la réponse spectrale du chemin optique complet en tenant compte des éléments suivants:
  - Sources lumineuses:
    - Xénon

- Halogène
- Mercure
- Laser
- Filtres d'excitation et dichroïques Chroma (plusieurs)
- Objectifs Zeiss (plusieurs)
- Filtres d'émission Chroma (plusieurs)
- Molécules fluorescentes (plusieurs)
- Détecteurs:
  - Caméras CCD: CoolSNAP HQ, Cascade 512B
  - "Photo Multiplier Tube" (PMT) du LSM Meta

### **Développements futures**

- Intégration totale avec le chiffrier Gnumeric et tendre progressivement vers un cadre totalement intégré permettant d'avoir la généalogie de toute information. Ultimement, ce cadre inclura donc: manipulation et collecte des données, traitement et analyse des données, publication des résultats
- Intégration avec les logiciels Matlab, Scilab et GNU Octave. Rig pourra appeler des programmes exécutés par ces environnements mais fournira également une interface de programmation complémentaire à ceux-ci.
- Compression non destructive des images et enregistrement électrophysiologiques dans le format logiciel libre FLAC
- Effort d'intégration avec les environnements de simulation Neuron et Genesis
- Support pour les appareils suivants:
  - Axon Digidata
  - Microscopes confocaux Zeiss
  - Caméra CCD Hamamatsu
- Distribution automatique de tâches intensives de traitement sur un parc d'ordinateurs roulant Rig
- Autres formats de fichier comme WinWCP, CED, Biorad, etc.

### **Le matériel Rig**

Le projet Rig prend toute sa valeur dans la combinaison du logiciel et du matériel envisagés.

Premièrement, l'objectif ultime est que tout le système soit en milieu stérile sous atmosphère contrôlée pour pouvoir effectuer des manipulations et observations pendant tout le développement des colonies cellulaires. Le premier prototype n'a cependant pas besoin d'offrir un cadre stérile pour toutes les étapes pour être utile.

En unifiant incubateur et instruments de mesures, les conditions de cultures seront contrôlées avec une précision imbattable.

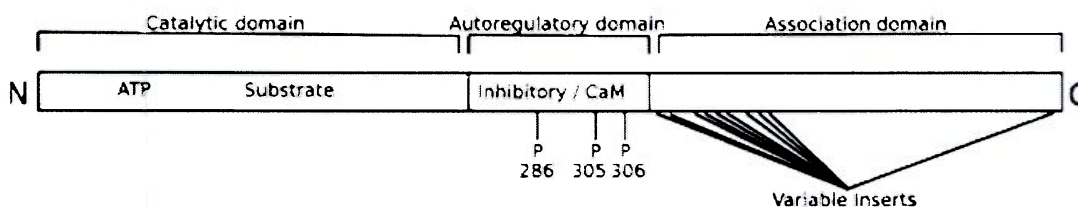
Les capacités matérielles suivantes seront développées progressivement:

- observation en microscopie et manipulation non destructives automatisées de multiples colonies cellulaires en milieu stérile sur une durée aussi longue que nécessaire (semaines ou même mois).
- application/extraction automatique de liquides en fonction du temps
- tireuse de pipette automatique et chargement sur micromanipulateur en milieu stérile
- remplissage automatique des pipettes
- élaboration automatique de solutions complexes à partir de solutions "stock" en milieu stérile



## Sites critiques de l'alpha CaMKII

L'alpha CaMKII présente des sites critiques qui ont une importance capitale dans le fonctionnement et la modulation de l'activité de l'enzyme.



(dérivé de (Hudmon, Lebel et al. 2005))

### Lys42

Lorsque ce site est muté pour une méthionine, la kinase est incapable de phosphoryler quoi que ce soit. C'est le site de liaison de la molécule d'ATP qui donnera le groupement phosphate qui sera ajoutée au substrat à phosphoryler (Rich and Schulman 1998).

### Thr286

La phosphorylation de la thréonine 286 maintient la CaMKII dans un état actif indépendant de la calmoduline (Miller and Kennedy 1985; Lai, Nairn et al. 1986; Yang and Schulman 1999) et augmente l'affinité de la sous-unité par un facteur 13000 (Meyer, Hanson et al. 1992).

La déphosphorylation de ce site est principalement l'œuvre des protéines phosphatases 1 et 2A (Shields, Ingebritsen et al. 1985; Strack, Choi et al. 1997; Weeber, Jiang et al. 2003).

Il a été démontré que les sites de phosphorylation Thr286 et Thr305 sont la cible d'une phosphorylation excessive dans le modèle du syndrome d'Angelman chez la souris, une maladie qui touche une naissance sur 15000 à 20000 et qui est associée avec de l'épilepsie et des retards mentaux sévères (Weeber, Jiang et al. 2003).

### Thr305 et Thr306

La phosphorylation in vitro de ces thréonines réduit la capacité de la CaMKII à se lier à la densité post-synaptique (Strack, Choi et al. 1997).

## Le segment d'autorégulation de l'alpha-CaMKII

(Rosenberg, Deindl et al. 2005)

- H282
  - important pour l'auto-inhibition
  - Senseur de pH acide
- R
  - important pour l'auto-inhibition
- QE
- T286
  - important pour l'auto-inhibition
  - site de phosphorylation: rend l'enzyme autonome
- VDCL
- K
  - important pour l'auto-inhibition
- K
- F293
  - important pour l'auto-inhibition
- N
  - important pour l'auto-inhibition
- A
- R296
- R
  - important pour l'auto-inhibition
- K300
  - important pour l'auto-inhibition
- L
- K
- GAIL
- T305
  - site de phosphorylation: amène une perte d'affinité pour la calmoduline
- T306
  - site de phosphorylation: amène une perte d'affinité pour la calmoduline
- MLA
- T310

## Quelques mutants intéressants de l'alpha CaMKII

### 1-290

Ce mutant est actif de façon constitutive (Pettit, Perlman et al. 1994).

## **1-326 (mCaMKII)**

Ce mutant est aussi appelé la CaMKII monomérique (mCaMKII).

## **T286D**

Le site de mutation du mutant T286D est dans le domaine autorégulateur. La thréonine 286 est normalement le site d'autophosphorylation qui rend la sous-unité active et indépendante de la calmoduline. Le remplacement par un acide aspartique simule une phosphorylation permanente.

## **T286A**

Le site de mutation du mutant T286A est dans le domaine autorégulateur. La thréonine 286 est normalement le site d'autophosphorylation qui rend la sous-unité active et indépendante de la calmoduline. Le remplacement par une alanine empêche la phosphorylation de la sous-unité (Fong, Taylor et al. 1989).

Cette mutation chez la souris supprime le LTP dépendant des canaux NMDA dans la région CA1 de l'hippocampe et l'apprentissage spatial tel que testé par le labyrinthe de Morris (Giese, Fedorov et al. 1998).

## **T305/306D**

Ce mutant concerne les sites de phosphorylation qui inhibent la liaison de la calmoduline après la phosphorylation de l'un ou l'autre. Ce mutant simule une phosphorylation permanente de ces sites par le remplacement des thréonines par des acides aspartiques.

## **K42M**

Le site de mutation du mutant K42M est dans le domaine catalytique. Le mutant K42M est incapable de phosphoryler les substrats puisque que son site liant l'ATP est désactivé (Rich and Schulman 1998). Ce mutant démontre une affinité pour la sous-unité NR2B du récepteur NMDA similaire au type sauvage (Bayer, LeBel et al. 2006).

## **I205K**

Ce mutant ne se lie pas à la sous-unité NR2B du récepteur NMDA et ne translocalise pas aux synapses (Bayer, De Koninck et al. 2001). Cette mutation amène une augmentation significative de l'affinité pour la calmoduline (Yang and Schulman 1999). Il a moins tendance à s'auto-associer (Hudmon, Lebel et al. 2005; Merrill, Chen et al. 2005).

# Méthode de dissociation et culture de neurones de l'hippocampe

(traduit de l'anglais par l'auteur de ce mémoire)

Ce protocole est basé sur plusieurs techniques de culture. Les neurones néonataux de l'hippocampe sont cultivés normalement à une densité dite élevée (2000 cellules/mm<sup>2</sup>) dans un medium exempt de sérum ou 2% FBS (Gibco) qui est basé sur Brewer *et al* (J. Neurosci. Res. 35:567-576, 1993).

Couvrir les disques de culture (voir protocole complet plus loin) : (verre ou Aclar #22C, 5 mil) avec de la poly-D-lysine en les trempant dans 50-250 ug/ml de poly-D-lysine dans 100 mM de tampon borate à pH 8.5 soit pendant toute la nuit à 4°C ou 2-3 heures avant l'ajout des cellules à la température de la pièce. Rincer les disques abondamment avec de l'eau distillée. Les disques peuvent être séchés et gardés plusieurs jours/semaines avant leur utilisation.

Insérer les disques dans une plaque de 24 puits.

Préparer une solution fraîche de papaïne :

<u>Solution de papaïne</u>	<u>30 ml</u>
ddH <sub>2</sub> O	24 ml
6.67 X HBSS sol.	4.5 ml
DNAse I ( 20 K unités/ml)	0.4 ml
40X solution	0.750 ml
Cystéine	0.3 ml

Garder sur la glace

Ajouter (juste avant la dissection) : Papaïne 360 unités (12 unités/ml final).

Réchauffer la solution de papaïne pendant 10 minutes pour permettre à la papaïne de se dissoudre. Puisque la papaïne d'origine n'est pas stérile, filtrer la solution à travers un filtre de 0.22 µm avec une seringue de 10 ml. Il est bon de rincer le filtre en premier avec 10 ml d'eau distillée stérile.

<u>Solution à dissection (à utiliser)</u>	<u>40 ml</u>
Solution à dissection	40 ml
40X solution	1 ml

## Solution à dissection sans 40X solution:

20 ml HBSS (10X sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>/NaHCO<sub>3</sub>)  
2 ml HEPES (10 mM final; stock = 1M at pH 7.6)  
173 ml H<sub>2</sub>O distillée  
La solution finale donnera un pH de 7.4.

-Couvrir les rats (P1-3) avec de la glace pendant environ 5 minutes.



-Enlever le cerveau et transférer dans un pétri de 35 mm contenant la solution de dissection. Coupez-le en deux avec un scalpel sur la fissure délimitant les deux hémisphères, laisser une moitié dans le plat de pétri (sur la glace) pendant que vous disséquez l'autre moitié.

-Disséquer les hippocampes des rats (ce qui est beaucoup plus facile à faire sous un microscope) dans un plat de pétri de 150 mm contenant du Sylgard polymérisé couvert avec un papier Whatmann #1 (100 mm) sur lequel il y a suffisamment de solution de dissection pour tout couvrir.

-Couper chaque hippocampe en des petites pièces sur un plat de pétri de 35 mm contenant du Sylgard polymérisé avec un scalpel et transférer vers un plat de pétri de 100 mm contenant la solution de papaine maintenue à une température tiède (30-37 °C sur une source de chaleur).

-Pendant toute la dissection, maintenir les morceaux d'hippocampes sous 95% d'oxygène et 5% de CO<sub>2</sub> en plaçant un tube connecté à une bombonne de gaz dans le plat de pétri (faites un trou dans le couvercle, connectez un petit filtre sur le tube et insérer-le dans le trou). Le phénol rouge dans la solution permet de visualiser son pH, la solution est initialement rose mais devrait être orange/rouge une fois qu'elle est saturée avec le mélange de gaz. Faites circuler le gaz avant de débiter la dissection.

*Chaque hippocampe devrait donner 5-10 disques (12-13 mm de diamètre), avec des neurones se développant dans le centre. La suspension de neurones est déposée comme une gouttelette dans le centre occupant approximativement 60 mm<sup>2</sup> (voir plus bas pour les détails).*

#### Préparer:

<b><u>Solution de trituration</u></b>	<b><u>50 ml</u></b>
Solution de Neurobasal	47.5 ml
BSA (300 mg/ml)	332.5 ul
40X solution	1.25 ml
DNAse I ( 20 K unités/ml)	0.66 ml

<b><u>Colonne BSA</u></b>	<b><u>3 x 5 ml</u></b>
Solution de trituration	5 ml
BSA (300 mg/ml)	0.3 ml
NaOH (0.1 N)	0.15 ml

<b><u>Solution de culture</u></b>	<b><u>500 ml</u></b>
Solution de Neurobasal	500 ml
Supplément B-27	1 vial (~11 ml)
Pen/Strep (stock)	2.5 ml
Glutamax (200 mM)	1.25 ml

À un jour de la préparation et le jour suivant si vous ajoutez de l'Ara-C au jour 2, ajoutez:

**“Fetal bovine serum”** **final = 2%**

\*Le jours 5, ajouter µM Ara-C (stock = 200 X, 1mM) dans la même solution (voir plus bas).

-Après la dissection, permettre aux hippocampes d'incuber sur une source de chaleur pour 30 minutes

additionnelles, arrêter la dissociation en transférant les morceaux d'hippocampes dans un tube stérile de 50 ml (contenant déjà 15 ml de solution de trituration) en utilisant une pipette de 5 ml (pipeter pas plus de 0.5 ml à la fois). Laisser les pièces se déposer pendant environ une minute. Aspirer le surnageant et transférer les cellules vers un tube frais de 15 ml avec de la solution fraîche de trituration pour aider le transfert, remplir le tube jusqu'à 12 ml avec la solution de trituration, inverser et laisser les cellules se déposer encore.

-Passer à la flamme la pointe d'une longue pipette Pasteur (9 pouces avec coton), couvrir la pipette avec la solution de trituration (garder la pipette dans un tube vide).

-Enlever le plus de solution possible (faire attention pendant l'aspiration de la solution, l'ADN des cellules mortes peut causer les morceaux à monter dans la pipette), ajouter environ 2 à 3 ml de solution de trituration.

-Triturer les cellules avec une pipette Pasteur (environ 40 à 100 fois), laisser les morceaux visibles se déposer au fond pendant environ une minute et transférer la moitié supérieure des cellules dissociées dans un tube de centrifugation de 15 ml (en déposant la solution doucement sur le dessus de la solution de centrifugation qui a une densité plus grande, i.e. les cellules vont flotter).

-Passer à la flamme la pipette Pasteur un peu plus pour réduire la pointe un peu, ajouter environ 1 à 2 ml de solution de trituration au tube contenant les morceaux d'hippocampes (utilisant une pipette Pasteur ainsi la refroidissant), triturer à nouveau.

-Répéter les deux étapes précédentes jusqu'à ce que le tube de centrifugation soit plein (normalement, des petits morceaux restent dans le tube de trituration et ils peuvent être abandonnés; si ils sont encore gros, ceci veut dire que la digestion n'a pas bien fonctionné ou que la trituration n'a pas été suffisante ou que la papaine n'a pas fonctionné de façon optimale). Abandonner les cellules non dissociées.

-Centrifuger avec une centrifugeuse clinique à la vitesse #4 pendant environ 7 minutes. Ne centrifuger pas plus longtemps car tous les débris vont aussi se déposer; la solution dense de BSA ralentit la déposition des débris (le temps et la vitesse peut varier suivant la centrifugeuse).

#### **Densité des cellules pour la déposition:**

*Les cellules sont déposées directement sur un disque sec. L'ajout de gouttes de cellules dans des puits remplis ne mènera pas à un nombre aussi élevé de neurones sains.*

-Enlever le surnageant, suspendre à nouveau les cellules dans environ 200 µl de solution de croissance (**sans FBS**) par animal. Compter les cellules et ajuster le volume de la suspension de cellules pour obtenir  $2 \times 10^6$  cellules / ml dans le tube #1

-Ajouter une première goutte de suspension de cellules à partir du tube #1 à tous les disques directement dans le centre et remettre dans l'incubateur pour 10-15 minutes, ajouter une goutte de suspension de cellules provenant du tube #2 à  $2 \times 10^5$  sur le dessus de la première goutte et finalement ajouter une goutte de la suspension de cellules provenant du tube #3  $2 \times 10^4$  sur le dessus des gouttes précédentes. (L'objectif est de déposer les cellules à une densité élevée dans le centre et de baisser progressivement la densité sur le bord, i.e. on veut une densité de type gaussienne.

-Mettre la plaque de 24 puits dans l'incubateur pendant au moins 45 minutes pour permettre aux cellules de s'attacher au fond. Si il reste de cellules d'un des tubes, garder-les jusqu'à la prochaine étape.

-Rincer les cellules pour enlever les débris avec 0.5 ml de solution de Neurobasal sans les additifs **directement sur les cellules** et remplacer séquentiellement aussitôt avec 1 ml de solution de croissance fraîche contenant du FBS (si des cellules en extra furent gardées des étapes précédentes, ajouter les à la

solution de croissance). Ne jamais laisser les puits vides pendant plus d'une seconde.

-Nourrir les cellules le jour 5 ou le jour suivant l'ajout de 5  $\mu\text{M}$  d'Ara-C dans la solution de culture (sans FBS) pour empêcher la division cellulaire, en ajouter un autre 0.5 ml de solution de croissance contenant 10  $\mu\text{M}$  d'Ara-C. Ne pas laisser l'Ara-C pendant plus d'une semaine (réduire l'Ara-C à 2.5  $\mu\text{M}$  ou moins le jour 5 ou le jour 9 en remplaçant 50% de la solution de croissance. À partir de ce moment, nourrir les cellules deux fois par semaines en remplaçant la moitié de la solution de croissance. Essayer de préparer de la solution de croissance fraîche à chaque fois que vous nourrissez les cellules.

#### **Aliquotes de solution stock:**

-Ara-C (1 mM)	VWR cat # 80056.258 (1g)  or (Sigma # C-1768); 4.8 mg/20 ml H <sub>2</sub> O distillée, filtrée à 0.22 $\mu\text{m}$ ; <i>Aliquotes 1 ml eppendorf</i>
-Supplément B-27 (50X)	(Gibco #17504-044); <i>Aliquotes 2 ml</i>
-BSA (300 mg/ml)	(Sigma # A-9576); BSA fraction V (solution 30%); <i>Aliquotes 1 ml eppendorf</i>
-L-Cystéine (100 x)	(Sigma # C-2529 remplacé par C7477) Hydrochloride anhydre; stable sous forme de poudre pendant 24 mois 42 mg/ml eau distillée, filtrée à 0.22 $\mu\text{m}$ ; <i>~200 <math>\mu\text{l}</math> eppendorf aliquotes</i>
-DNase 1 (20K unités/ml)	(Sigma # D-5025), type IV, à partir de pancréas de bovins; 150 000 unités dissoutes dans 7.5 ml d'eau distillée, filtrée à 0.22 $\mu\text{m}$ ; <i>Il se peut que la dissolution ne soit pas parfaite (cela dépend du lot) mais l'enzyme ne sera pas affectée, centrifuger le matériel non dissout</i> <i>Aliquotes 1 ml eppendorf</i>
-Glucose (200mg/ml)	(Gibco # 15023-021); 40 g/200 ml eau distillée, filtrée à 0.22 $\mu\text{m}$ ; <i>Bouteille de 200 ml</i>
-HBSS (10 x) (sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> /NaHCO <sub>3</sub> /Phénol rouge)	(Gibco # 14185-052); 10 ml de phénol rouge ajouté par bouteille de 500 ml
-HBSS (10X) (avec Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> sans NaHCO <sub>3</sub> / Phénol rouge)	(Gibco # 14065-056); 10 ml de phénol rouge ajouté par bouteille de 500 ml

-HBSS/NaHCO <sub>3</sub> /EDTA (6.67 x)	80 ml HBSS 10X (sans Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> /NaHCO <sub>3</sub> ) 23.5 ml NaHCO <sub>3</sub> (stock 7.5%) 0.8 ml EDTA (100 x stock=0.5 M) 16.5 ml eau distillée
-HEPES (1 M)	(Gibco # 15630-080 pKa @ 7.6); <i>La solution de 10-20 mM Hepes sera à pH 7.4</i>
-Papaine	(Worthington # LS003126); Note : la concentration peut varier selon les lots.
-Pen/Strep/Pyruvate/Glucose: (40 x)	10 ml pen/strep (see plus bas) 10 ml glucose (200mg/ml stock) 20 ml pyruvate de sodium (100 mM) 10 ml eau distillée <i>Aliquotes 1 ml eppendorf</i>
-Pen/Strep	(Gibco # 15140-031); Pénicilline (10000 units/ml) / Streptomycine (10000 µg/ml) <i>Aliquotes 1 ml eppendorf</i>
-L-Glutamine (200 mM)	(Gibco # 25030-032 n'est plus utilisé, remplacé par le glutamax) <i>Aliquotes 1 ml eppendorf</i>
-Glutamax-1 (200 mM)	(Gibco # 35050-061)
-Phénol rouge (0.5%)	(Gibco # 15100-43); <i>Bouteille de 100 ml</i>
-NaHCO <sub>3</sub> (7.5% w/v)	(Gibco # 25080-094); <i>Bouteille de 100 ml</i>
-Neurobasal	(Gibco # 21103-049); <i>Bouteille de 500 ml</i>
-Sodium Pyruvate (100 mM)	(Gibco # 11360-070); <i>Aliquotes de 2.5 ml</i>
-EDTA (0.5 M)	(Gibco # 15575-038); <i>Bouteille de 100 ml</i>
-Eau distillée	(Gibco # 15230-162); <i>Bouteille de 500 ml</i>



## **Préparation des disques d'Aclar pour la culture de neurones**

Utiliser des gants et de la verrerie réservés exclusivement pour cet usage et qui ne seront jamais lavés avec du détergent. Utiliser de l'eau doublement distillée de qualité pour la culture pour laver et préparer les solutions. Manipuler les disques avec des pinces et non pas avec les mains ou même des gants.

-Couper les disques en taillant des trous à travers une feuille d'Aclar (5 mil d'épaisseur). Utiliser un poinçon de 13 mm de diamètre, un marteau et une planche à tailler en Teflon. Mettre environ 100 disques dans un Erlenmeyer de 250 ou 500 ml.

-Optionnel: si il y beaucoup de débris de métal provenant du poinçon, ajouter un aimant avec les disques dans l'Erlenmeyer.

-Laver les disques avec environ 100 ml d'eau doublement distillée 3 ou 4 fois en brassant vigoureusement sur un mélangeur orbital et retirer soigneusement la solution dans un entonnoir de verre au cas où des disques tomberaient.

-Enlever l'aimant le cas échéant.

-Laver les disques avec de l'éthanol à 70% 3 ou 4 fois (environ 100 ml), pas plus de 5 minutes chaque fois.

-Laver les disques 3 ou 4 fois avec de l'eau doublement distillée pour enlever l'éthanol.

-Ajouter 100 à 200 ml d'acide nitrique (dissout dans de l'eau doublement distillée); remuer doucement mais de longuement sur un mélangeur orbital; faire caler les disques qui flottent avec une pipette Pasteur ; couvrir le récipient avec du papier d'aluminium et laisser pendant la nuit dans la hotte chimique (ou mieux, au moins 3 ou 4 heures).

-Verser l'acide dans un contenant approprié pour sa disposition. Laver 4 ou 5 fois avec

environ 100 ml d'eau doublement distillée.

-Drainer l'eau le plus possible; ajouter environ 20 à 40 ml de solution de Poly-D-lysine pour couvrir tous les disques provenant d'une feuille d'Aclar. Incuber sur un mélangeur orbital pendant 2 à 3 heures à la température ambiante ou mieux pendant la nuit à 4°C mais ajouter une heure à la température ambiante avant la nuit.

-Laver avec de l'eau doublement distillée, 3 ou 4 fois (brasser vigoureusement).

-Ne pas porter de gants pour cette dernière étape (pour éviter que de la poudre ne colle sur les disques) ; mettre de l'éthanol sur vos mains à la place. Séparer les disques avec des pincettes dans la hotte biologique et les étendre sur un grand « Kimwipe » pour qu'ils sèchent. Allumer la lumière ultraviolette pendant environ 30 minutes, transférer dans un plat de pétri stérile (60 ou 100 mm) ou des plaques à plusieurs puits en mettant la face stérilisée à la lumière ultraviolette à l'envers pour une autre période de 30 minutes. Ensuite, mettre le couvercle sur les puits et ranger les à 4 °C. Ne jamais toucher les disques avec les doigts. Faites attention pour ne pas égratigner les disques avec les pincettes ; manipuler-les par le rebords.

#### Tampon borate à pH 8.5:

Préparer une solution d'acide borique à 100 mM et une solution de borate de sodium à 100 mM.

Mélanger environ une part de borate de sodium avec environ 3 part d'acide borique jusqu'à ce que vous obtenir un pH de 8.5, filtrer pour stériliser.

#### Poly-D-Lysine :

Nous utilisons présentement:

BD # 354210 (20 mg) de VWR ~\$115.00

Suspendre à nouveau (très bien) une fiole de 10 ml d'eau doublement distillée et compléter le volume pour obtenir 50 ug/ml (50 to 250 ug/ml est correct) en utilisant le tampon borate à pH 8.5. Il est préférable de l'utiliser frais.

Note: (La poly-D-lysine peut précipiter si elle n'est pas suspendue à nouveau dans de l'eau). Lorsque la poly-D-lysine ne se suspend pas bien dans l'eau ou si elle précipite lorsque vous ajoutez le tampon borate, ceci veut dire qu'il y a quelque chose d'anormal à propos de la poly-D-lysine, utiliser une autre lot.