

# TABLE DES MATIERES

<i>LA BIOLUMINESCENCE DE L'AEQUORINE</i> .....	2
1 INTRODUCTION .....	2
1.1 <i>La biologie de la bioluminescence</i> .....	2
1.1.1 Généralités sur la bioluminescence .....	2
1.1.2 Diversité des systèmes bioluminescents .....	6
1.1.3 Origine de la coelentérazine .....	13
1.2 <i>La photoprotéine aequorine</i> .....	15
1.2.1 Préparation de l'aequorine.....	15
1.2.2 Bioluminescence de l'aequorine indépendante du calcium .....	15
1.2.3 Activité luciférase de l'aequorine .....	16
1.2.4 Structure de l'aequorine.....	18
1.3 <i>Le domaine de liaison du calcium Dans l'aequorine : l'EF-hand</i> .....	23
1.3.1 Structure d'un domaine EF-hand .....	23
1.3.2 Affinité pour le calcium.....	26
1.3.3 Bioluminescence de l'aequorine dépendante du calcium .....	26
1.4 <i>Mécanisme de la bioluminescence</i> .....	28
1.4.1 De la liaison du calcium à l'émission de lumière.....	28
1.4.2 La chimie de la bioluminescence. Les espèces émettrices .....	30
1.4.3 L'émission de lumière par le coelentéramide.....	32
1.4.4 Transfert d'énergie de bioluminescence par résonance (BRET) .....	34
2. RESULTATS : ETUDE DE L'AEQUORINE PAR MUTAGENESE ALEATOIRE ET CRIBLAGE FONCTIONNEL .....	36
2.1 <i>Présentation de l'article 1 : "Thermostable mutants of the photoprotéin aequorin obtained by in vitro evolution"</i> .....	37
2.1.1 Sélection des mutants Bright et SloDK .....	37
2.1.2 Thermostabilité .....	37
2.1.3 Déclenchement de la bioluminescence par liaison du $Ca^{2+}$ à l'EF3.....	38
Article 1 : Thermostable mutants of the photoprotéine aequorin obtained by <i>in vitro</i> evolution ..	39
2.2 <i>Présentation de l'article 2 : "Calcium dépendence of aequorine bioluminescence dissected by random mutagenesis"</i> .....	40
2.2.1 Sensibilité calcique .....	40
2.2.2 Cinétique de la luminescence et quantité totale de photon.....	41
2.2.3 Rôle des résidus Gln168 et Leu170 dans la cinétique de bioluminescence .....	42
2.2.4 Dépendance au calcium de la bioluminescence de l'aequorine : un modèle .....	42
Article 2 : « Calcium dépendence of aequorine bioluminescence dissected by random mutagenesis » et informations supplémentaires.....	44
2.3 <i>Remarques générales</i> .....	45
<i>IMAGERIE DES ACTIVITES NEURONALES PAR BIOLUMINESCENCE AEQUORINE</i> .....	47
1. INTRODUCTION .....	47
1.1 <i>Utilisation de l'aequorine comme senseur calcique</i> .....	47
1.1.1 Historique .....	47
1.1.2 La protéine de fusion GFP-aequorine.....	50

1.1.3 Avantages et inconvénients .....	50
1.2 <i>Modulation cholinergique dans le néocortex</i> .....	51
1.2.1 Architecture du réseau néocortical .....	51
1.2.2 Les connexions intracorticales et entrées-sorties .....	63
1.2.3. acétylcholine dans le réseau néocortical. ....	71
2. MATERIELS ET METHODES .....	82
<i>Préparation de pseudovirion sindbis recombinant</i> .....	82
<i>Préparation des tranches néocorticales</i> .....	84
<i>Enregistrement de la bioluminescence</i> .....	84
<i>Enregistrements électrophysiologiques</i> .....	85
<i>Analyse des données de bioluminescence</i> .....	86
<i>Histochimie</i> .....	87
3. RESULTATS : ÉTUDE DE LA MODULATION CHOLINERGIQUE DANS LE NEOCORTEX PAR IMAGERIE DE BIOLUMINESCENCE AEQUORINE .....	89
<i>Caractérisation des réponses bioluminescentes en tranches de néocortex</i> .....	89
Expression de GA .....	89
Réponses à la stimulation d'un seul neurone .....	93
Réponses à l'application de glutamate .....	95
Intégrité du réseau excitateur .....	95
Intégrité du réseau inhibiteur .....	98
Réponses du réseau aux stimulations électriques .....	100
<i>Modulation cholinergique du réseau néocortical</i> .....	104
Les agonistes muscariniques augmentent l'amplitude et la durée des réponses évoquées .....	104
Augmentation d'amplitude des réponses évoquées .....	108
Activités persistantes en couche V .....	111
Correspondance avec l'activité électrophysiologique .....	114
4. DISCUSSION .....	119
<i>Imagerie de bioluminescence aequorine</i> .....	119
<i>Les effets muscariniques sur l'extension spatiale</i> .....	120
<i>Les effets muscariniques sur la durée</i> .....	121
<i>L'acétylcholine a-t-elle un effet biphasique inhibiteur/excitateur sur réseau cortical ?</i> ...	123
ANNEXE .....	124
REFERENCES .....	129

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Introduction à la bioluminescence de l'aequorine

Figure 1.1 : Réaction de bioluminescence .....	3
Figure 1.2 : Structure des luciférines.....	4
Figure 1.3 : Bioluminescence chez les bactéries .....	7
Figure 1.4 : Exemple de bioluminescence chez les insectes .....	9
Figure 1.5 : Exemple de bioluminescence chez les dinoflagellés .....	10
Figure 1.6 : La bioluminescence chez les cnidaires.....	12
Figure 1.7 : Activité luciférase de l'aequorine.....	17
Figure 1.8 : Alignement des photoprotéines.....	20
Figure 1.9 : Structure de l'aequorine .....	22
Figure 1.10 : Structure d'un domaine EF-hand .....	25
Figure 1.11 : Comparaison obéline native vs obéline déchargée.....	29
Figure 1.12 : Espèces émettrices .....	31
Figure 1.13 : Mécanisme de bioluminescence de l'obéline .....	33

### Introduction à l'imagerie neuronale dans le néocortex

Figure 2.1 : Adressage de la GFP-aequorine.....	49
Figure 2.2 : Propriétés des cellules pyramidales de la couche V .....	55
Figure 2.3 : Propriétés morphologiques des cellules étoilées de la couche IV .....	56
Figure 2.4 : Classification neurochimique des interneurons GABAergiques .....	59
Figure 2.5 : Morphologie des interneurons GABAergiques .....	60
Figure 2.6 : Profil de décharge des interneurons GABAergiques.....	61
Figure 2.7 : Connexions entre les éléments neuronaux du réseau néocortical.....	65
Figure 2.8 : Projections des neurones cholinergiques télencéphaliques.....	69
Figure 2.9 : Innervation cholinergique du cortex cérébral .....	70
Figure 2.10 : Effets cholinergiques sur les cellules pyramidales du cortex .....	76
Figure 2.11 : Activité persistante en présence d'agonistes cholinergiques .....	78
Figure 2.12 : Effet de l'acétylcholine sur les neurones du cortex cérébral .....	81

### Résultats

Figure 1 : Expression de la GA dans des tranches aiguës de néocortex.....	90
Figure 2 : Expression préférentielle de GA dans les cellules pyramidales.....	91
Figure 3 : Relation entre l'activité électrique des neurones et la bioluminescence aequorine .....	94
Figure 4 : Réponse à l'application de glutamate .....	96

Figure 5 : Effet de l'absence de magnésium extracellulaire .....	97
Figure 6 : Effet du blocage de l'inhibition par la bicuculline.....	99
Figure 7 : Réponses à des stimulations électriques .....	101
Figure 8 : Contribution des transmissions synaptiques rapides glutamatergiques et GABAergiques.....	103
Figure 9 : Modulation cholinergique de la réponse aux stimulations électriques .....	105
Figure 10 : Amplitude et cinétique des réponses évoquées par stimulation électrique en présence d'agonistes cholinergiques .....	107
Figure 11 : Effet du carbachol sur le profil temporel de la réponse à une stimulation électrique.....	109
Figure 12 : Extension spatiale des réponses immédiatement après la stimulation ..	110
Figure 13 : Répartition spatiotemporelle des réponses aux stimulations électriques dans la substance blanche .....	112
Figure 14 : Répartition spatiotemporelle des réponses aux stimulations électriques dans la couche I .....	113
Figure 15 : Activités persistantes dans les RAs individuelles.....	115
Figure 16 : Effet des agonistes cholinergiques sur les réponses électrophysiologiques .....	117

## **LA BIOLUMINESCENCE DE L'AEQUORINE**

# LA BIOLUMINESCENCE DE L'AEQUORINE

---

## 1 INTRODUCTION

---

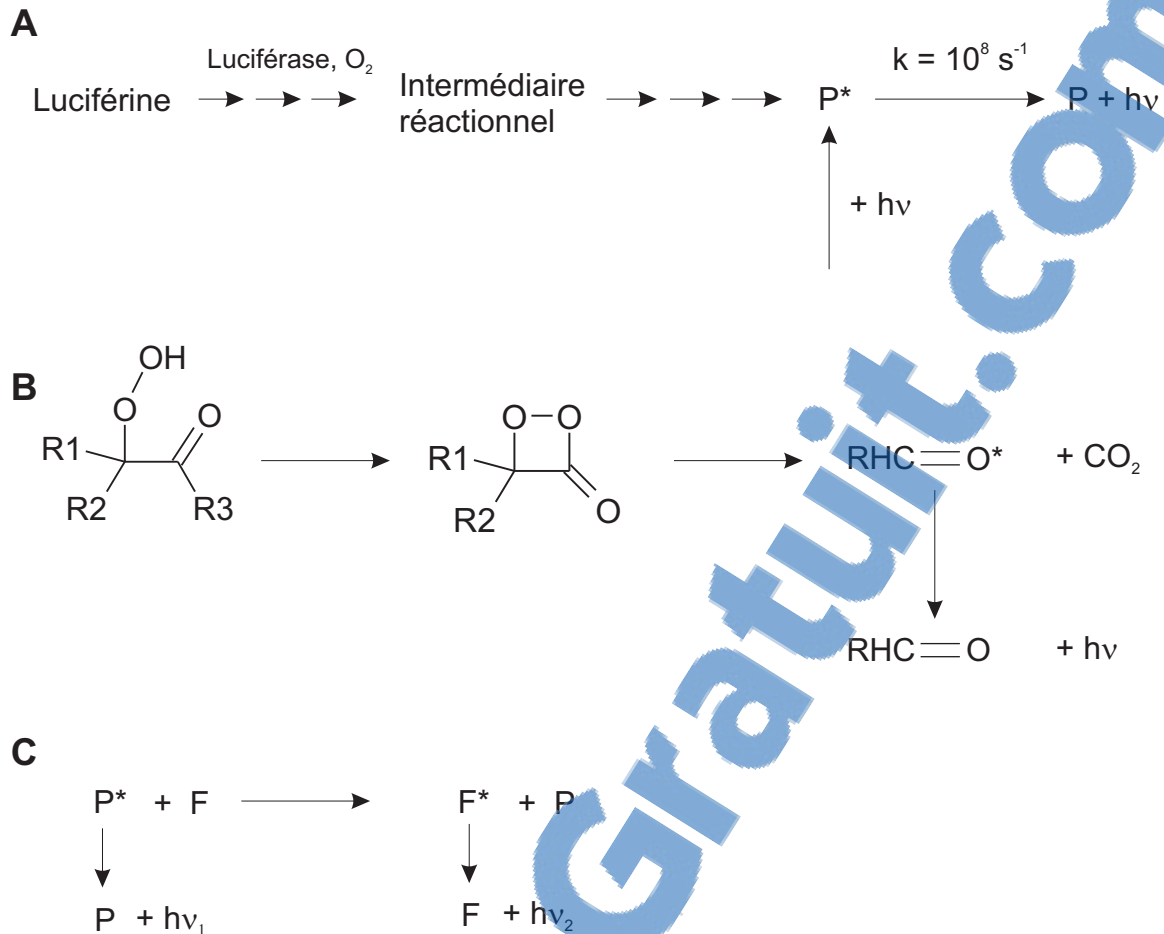
L'aequorine a été découverte en 1962 par Shimomura et collaborateurs chez la méduse *Aequorea victoria*. Celle-ci vit sur les rivages de la côte ouest des Etats-Unis près de l'état de Washington (Friday harbor). Elle mesure environ 5 à 10 cm de diamètre (pour information, <http://faculty.washington.edu/cemills/Aequorea.html>). On retrouve l'aequorine dans d'autres espèces de la famille *Aequorea* comme la méduse *Aequorea forskalea* et *Aequorea macrodactyla* (Xia et coll., 2002).

L'aequorine est bioluminescente. Elle fait partie de la famille des luciférase, c'est-à-dire qu'elle est capable d'émettre de la lumière suite à une réaction chimique sans excitation lumineuse. C'est la bioluminescence. A la différence de la Green Fluorescent Protein (GFP), aussi isolée de la méduse *Aequorea victoria*, les luciférase ne sont pas fluorescentes. Au cours de l'évolution, la bioluminescence a été réinventée plusieurs fois. Il existe quelque 30 systèmes différents indépendants encore existants.

### 1.1 LA BIOLOGIE DE LA BIOLUMINESCENCE

#### 1.1.1 GENERALITES SUR LA BIOLUMINESCENCE

La recherche fondamentale sur la bioluminescence a porté sur la manière dont certains organismes vivants parviennent à convertir de l'énergie chimique en lumière visible. De manière générale, le terme de luciférase est donné aux enzymes responsables de la réaction d'émission de lumière chez les bactéries, les coléoptères, les dinoflagellés et les cnidaires bien que les enzymes de ces différents systèmes ne présentent pas d'homologie entre elles. Le substrat de la réaction, un groupement prosthétique appelé luciférine, ne présente pas non plus d'analogie entre les différents systèmes bioluminescents sur le plan de la structure chimique (Figure 1.1). Cependant, il y a un aspect qui relie tous ces différents systèmes au niveau moléculaire : Toutes ces formes de bioluminescence impliquent une réaction d'oxydation catalysée par les luciférase entre l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) et les luciférines pour donner une molécule appelée oxyluciférine (Figure 1.2).

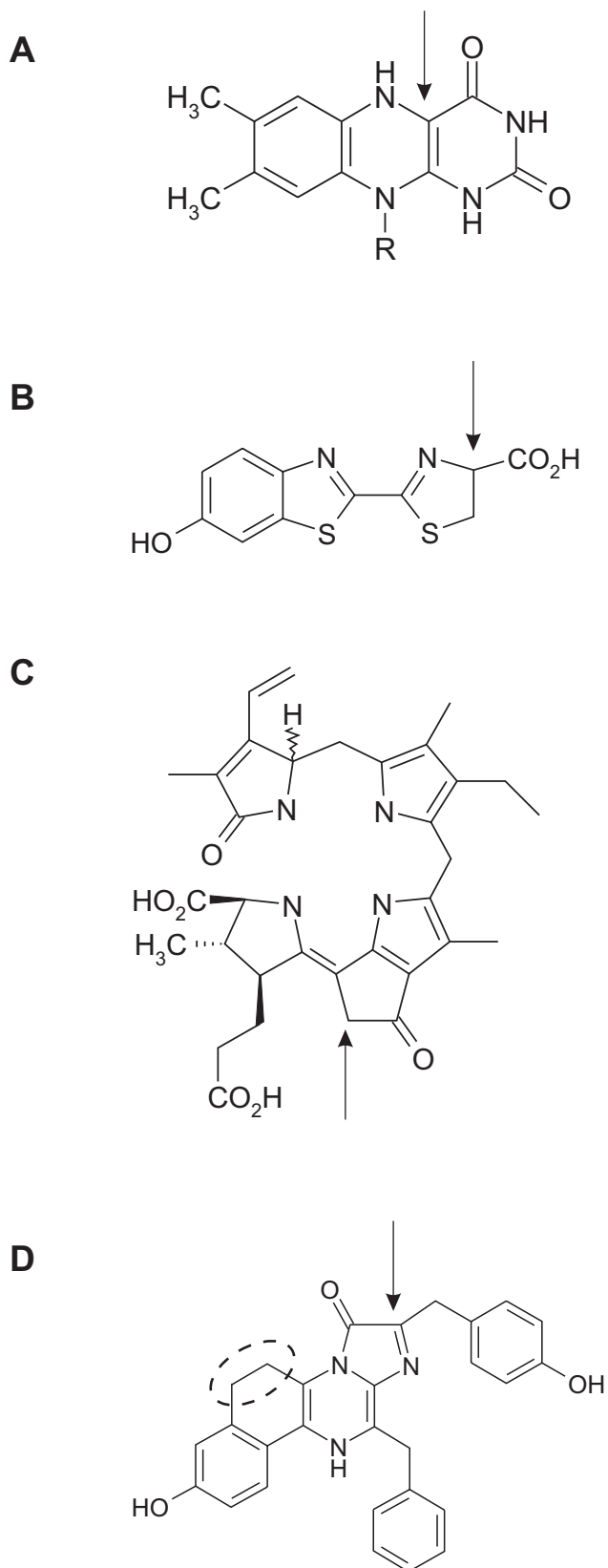


### Figure 1.1. Réaction de bioluminescence

A. Schémas réactionnel de l'oxydation de la luciférine par la luciférase et de l'émission de lumière ( $h\nu$ ).  $P^*$  représente l'état excité du produit  $P$  de la réaction d'oxydation.  $k$  est la constante de vitesse de la réaction de désexcitation de  $P^*$  en  $P$ .

B. Structure de l'hydropéroxyde de luciférine, de l'intermédiaire dioxétanone à 4 atomes et dégradation en composé carbonyle.  $R1$ ,  $R2$  et  $R3$  représente le reste de la molécule de luciférine

C. Transfert non radiatif d'énergie entre l'état excité de  $P$  et le chromophore de la GFP. ce dernier se désexcite ensuite en émettant un lumière de plus grande longueur d'onde. (D'après Wilson et Hastings, 1998)



### Figure 1.2. Structure des luciférines

A. Flavine mononucléotide réduite (bactérie)

B. "Firefly luciferin" (luciole)

C. Luciférine de dinoflagellés

D. Coelentérazine (cnidaires dont Aequorea). Les tirets indiquent le groupement supplémentaire présent dans la (e)-coelentérazine

La flèche désigne le carbone où se produit la réaction d'oxydation



A chaque fois qu'un photon visible est émis à température ambiante par un organisme vivant ou par une réaction chimique dans un tube à essai, la réaction conduisant à la formation de l'état excité, puis par la suite à l'émission, doit être très exergonique. En effet, un photon à 500 nm (vert) correspond à une énergie de 60kcal par mol, c'est-à-dire environ 8 fois l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP en ADP. L'émission réelle de lumière par chimioluminescence ou bioluminescence est une étape finale extrêmement rapide constituée habituellement d'une réaction en plusieurs étapes dont l'avant-dernière produit l'oxyluciférine dans un état excité. Toutes les réactions mettent en jeu un intermédiaire réactionnel composé d'un peroxyde de luciférine lié à la luciférase (Figure 1.2). La rupture de cette liaison fournit l'énergie nécessaire à l'émission de lumière (pour revue, Wilson et Hastings, 1998). Dans certains systèmes modèles (coléoptère et cnidaires, dont l'aequorine), l'hydropéroxyde donne un nouvel intermédiaire possédant un cycle dioxétanone (Figure 1.2). Ces intermédiaires (cycle à 4 atomes) sont riches en énergie et se dégradent en CO<sub>2</sub> et un composé carbonylé, la plupart du temps excité, libérant ainsi une grande quantité d'énergie pour un coût initial faible (la rupture de la liaison O-O).

L'état excité de cet émetteur possède une très brève durée de vie. Il retient l'énergie de la réaction pendant quelques nanosecondes avant de la libérer sous la forme d'un photon. Cet état excité ne peut pas être distingué de l'état excité singulet (1<sup>er</sup> état excité) qu'on trouve en fluorescence qui résulte de l'absorption d'un photon par le chromophore dans l'état fondamental. C'est pour cette raison qu'en principe, le spectre d'émission par chimioluminescence correspond au spectre de fluorescence du produit de la réaction de la luciférine (oxyluciférine). Comme corollaire à cela, la réaction de bioluminescence ne peut pas être efficace si l'émetteur présente une faible efficacité de fluorescence. Dans une réaction luciférase/luciférine, les événements cinétiques se déroulant à une échelle supérieure à la nanoseconde reflètent les processus précédant la formation de l'émetteur excité et non sa rapide désactivation radiative.

La luciférase peut elle-même influencer sur le spectre d'émission en modifiant l'environnement du chromophore et donc ses états d'excitation. Chez la luciole, la substitution de certains acides aminés de la luciférase conduit à un décalage important du spectre d'émission. Dans les bactéries et les cnidaires, les chromophores de protéines accessoires associées aux luciférases peuvent servir d'émetteurs alternatifs comme c'est le cas de la GFP chez les cnidaires (Figure 1.2).

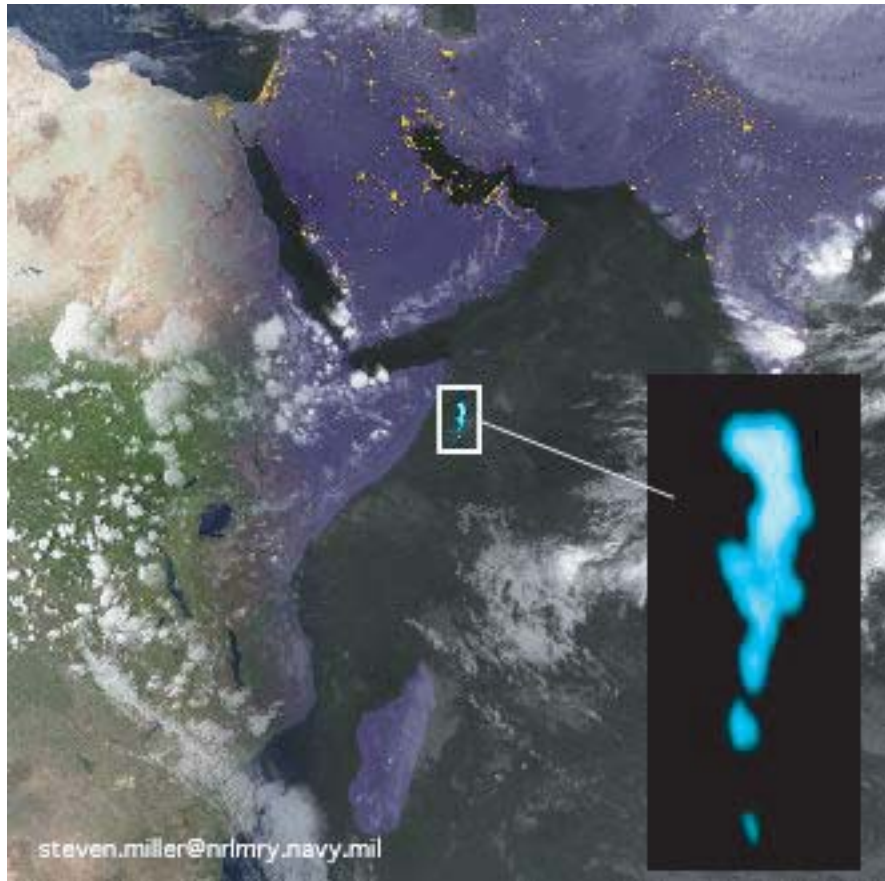
La biologie cellulaire et la régulation de la bioluminescence diffèrent selon les systèmes bioluminescents (Morin et Hastings, 1971). Dans certains cas comme les bactéries, le système luciférase est distribué dans tout le cytoplasme, tandis que chez d'autres, des cellules spécialisées, appelées photocytes, possèdent des organelles responsables de l'émission de lumière. Tandis que les bactéries émettent de la lumière en continu, dans beaucoup de systèmes, la luminescence se présente sous la forme de flash d'une durée typique de 0,1-1s. Cela nécessite une régulation rapide de la réaction dans laquelle les réactifs sont séquestrés de manière appropriée et mobilisés très rapidement.

## 1.1.2 DIVERSITE DES SYSTEMES BIOLUMINESCENTS

### 1.1.1.1 Chez les bactéries

La bioluminescence bactérienne est un exemple d'une bioluminescence qui n'implique pas un intermédiaire dioxétanone. La luciférase catalyse l'oxydation d'un aldéhyde à longue chaîne carbonée et d'une flavine mononucléotide réduite, FMNH<sub>2</sub> (Figure 1.1 A). La première étape de la réaction catalytique est la formation d'un complexe hydropéroxyde de flavine–luciférase. Lors d'une seconde étape, l'aldéhyde réagit avec ce complexe pour former un intermédiaire dont la durée de vie détermine la cinétique de la réaction. L'émetteur identifié grâce à son spectre d'émission est le complexe enzyme-(4a-hydroxyflavine).

Les luciférases de toutes les bactériennes bioluminescentes étudiées sont des hétérodimères. Elles sont codées respectivement par les gènes luxA et luxB, adjacents, dans l'opéron lux. Cet opéron contient entre autres également les gènes luxC, D et E qui codent pour des protéines qui interviennent dans la synthèse de l'aldéhyde. LuxA et luxB ont été clonés et exprimés en système hétérologue et utilisés comme gène rapporteur. La caractérisation de ce système a permis de mettre en évidence un mode de communication intercellulaire à la base de la détection du quorum. Les bactéries sécrètent une molécule diffusible, aussi appelé autoinducteur, qui agit comme une phéromone. Lorsque la concentration de bactérie en solution est suffisamment élevée, la concentration en autoinducteur est telle qu'elle induit l'expression des gènes de l'opéron lux et les bactéries deviennent alors luminescentes (pour revue Wilson et Hastings, 1998). Ainsi en détectant le niveau d'autoinducteur, les cellules sont capables d'estimer leur densité et d'initier des processus coûteux en énergie comme l'expression de la luciférase et de ses partenaires, seulement lorsqu'elles sont suffisamment nombreuses pour être vues (Figure 1.3). C'est le cas des colonies hébergées par l'organe lumineux d'un hôte comme un poisson ou un calmar.



**Figure 1.3: Bioluminescence chez les bactéries**

Image satellite en lumière visible d'une colonie de bactérie bioluminescence (D'après Miller et Haddock, 2005)

### 1.1.1.2 Chez les insectes

La plupart des insectes bioluminescents sont des scarabées (coleoptera) appartenant aux familles des *Elateridae* (tel que le taupin-click beetle en anglais), *Phengodidae* (le ver-chemin-de-fer, railroad worm en anglais) avec ses lanternes rouges et vertes est un exemple spectaculaire) et les *Lampyridae*, les lucioles (figure 1.4). La chimie de la réaction est probablement la même ou très similaire chez tous les coléoptères car leurs luciférase réagissent toutes pour donner de la lumière avec la luciférine de luciole (firefly luciferin).

La luciférine de luciole est un benzothiazoyl-thiazole (figure 1.1) qui est une molécule complètement différente de la luciférine des cnidaires. Cependant, une dioxétanone est l'intermédiaire crucial riche en énergie de la réaction. Tout d'abord, la luciférase catalyse la condensation de la luciférine avec de l'ATP en présence de  $Mg^{2+}$ , puis la réaction de l'adenylate avec l'oxygène et la cyclisation du peroxyde. L'ATP fournit un bon groupe partant, l'AMP. La rupture de la dioxétanone (et non pas l'hydrolyse de l'adenylate) fournit l'énergie ( $\approx 50 \text{ kcal/mol}$ ) nécessaire pour générer l'état excité de l'oxyluciférine. Bien que la luciférine soit la même chez tous les scarabées, leur émission s'étend sur une large gamme de longueur d'onde, du vert à l'orange (voir au rouge dans le cas du ver-chemin-de-fer). Il faut noter que la différence d'énergie entre des photons de 560 et 630 nm est de  $\approx 6 \text{ kcal/mol}$  seulement. L'émission dépend probablement de l'énergie de l'état excité de l'oxyluciférine qui est lui-même influencé par la structure tertiaire du site catalytique.

La luciférase de luciole est une protéine monomérique de 62kDA ne possédant pas de groupe prosthétique. Son ADNc et celui de plusieurs autres luciférase de scarabées ont été clonés et exprimés dans *E. coli* ainsi que dans des cellules eucaryotes.

### 1.1.1.3 Chez les dinoflagellés

Les dinoflagellés sont des organismes unicellulaires du plancton pouvant libérer des toxines très puissantes (Figure 1.5). Parmi les nombreux organismes bioluminescents de cette famille, c'est *Gonyaulax polyedra* qui a été le plus étudié. Étant donné que sa luciférine (Figure 1.1) réagit avec toutes les luciférase de dinoflagellés testés jusqu'à présent, il constitue très probablement un exemple représentatif de ce groupe. La structure de la luciférine de dinoflagellé, élucidée chez *Pyrocystis lunula*, ne présente aucune homologie avec les autres luciférines. C'est un tétrapyrrole linéaire qui dérive probablement de la chlorophylle et qui est très sensible à l'autooxydation. L'émission de lumière a seulement lieu dans le cas de la réaction enzymatique.

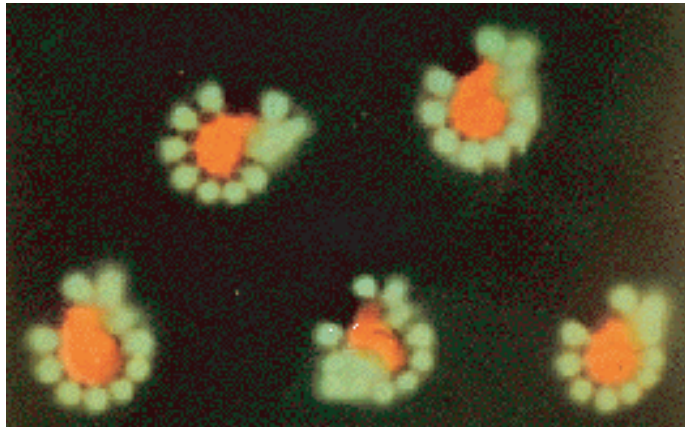
**A**



**B**

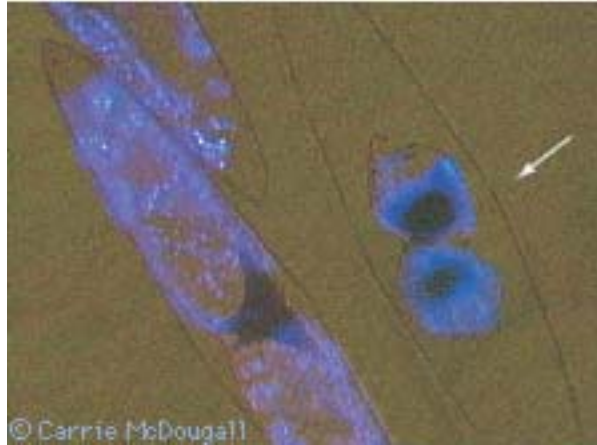


**C**



**Figure 1.4: Exemple de bioluminescence chez les insectes**

A. Luciole *Lampyris* B. Scarabée *Pyrophorus* C. Ver chemin-de-fer *Phrixothrix*, sur la photo, les vers sont enroulés sur eux-mêmes, la tête brille en rouge et la luminescence verte est au niveau des pattes.



**Figure 1.5: Exemple de bioluminescence chez les dinoflagellés**

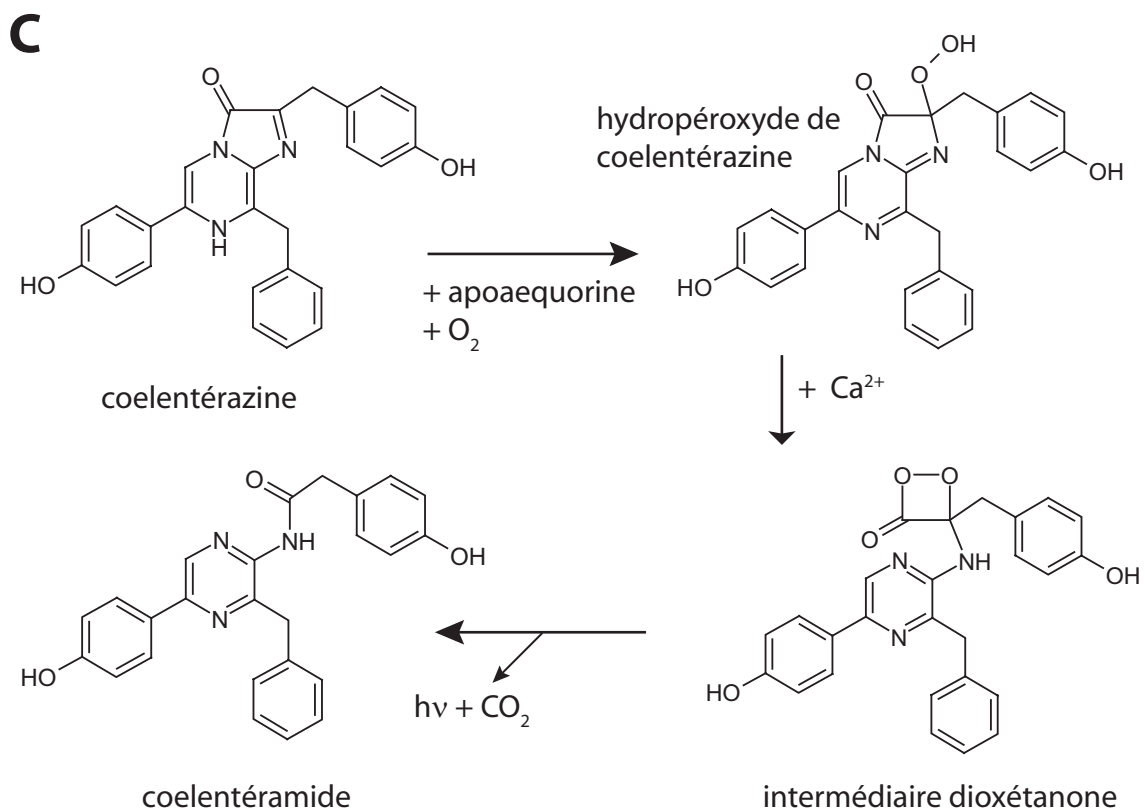
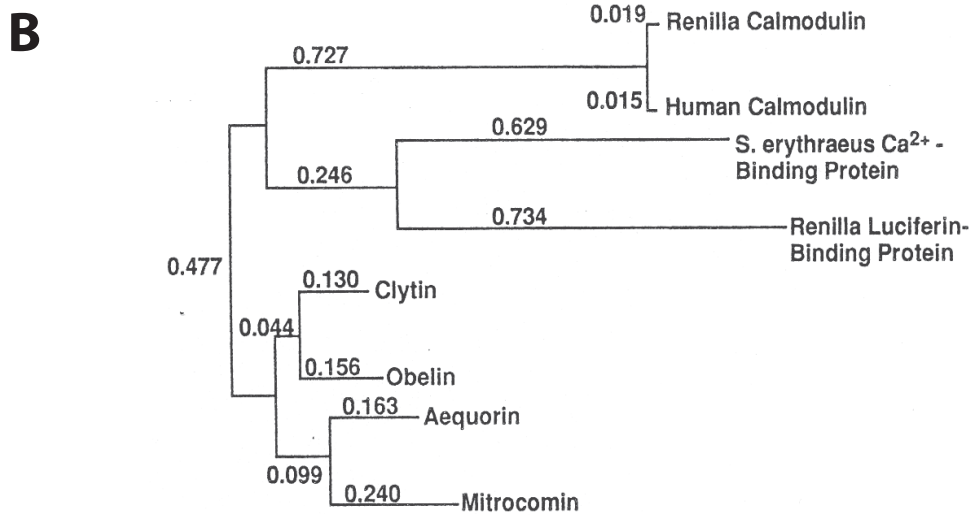
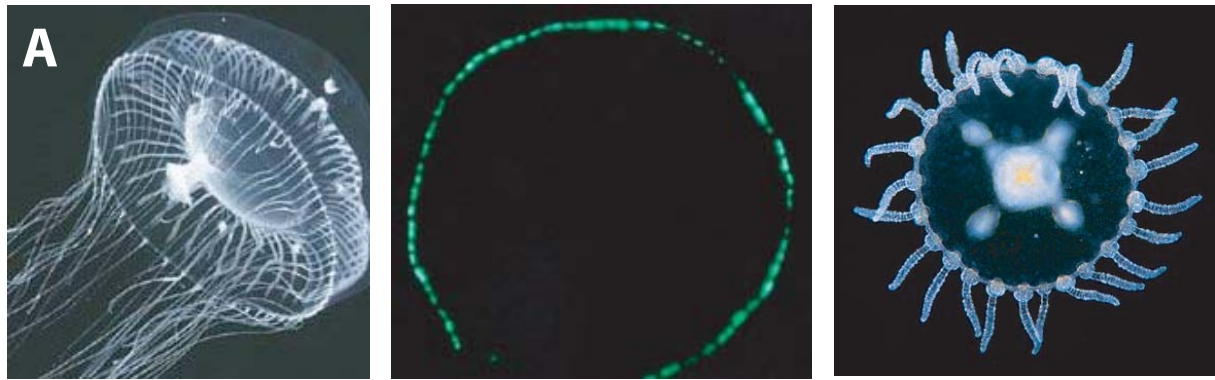
Image en vraie couleur de trois cellules *Pyrocystis fusiformis*. Une d'elle (flèche) vient d'achever sa division et les deux cellules filles occupent la même enveloppe cellulaire

Le produit de la réaction n'est pas fluorescent à la différence de la luciférine non oxydée. Cette dernière est très fluorescente avec un spectre qui correspond au spectre de la bioluminescence ( $\lambda_{\text{max}} \approx 470 \text{ nm}$ ). Chez *Gonyaulax polyedra* deux protéines sont impliquées. La première est une luciferin binding protein constituée d'un dimère de deux sous-unités identiques de 75,5kDa. Elle séquestre la luciférine à pH physiologique, la protège de l'autooxydation, et la libère lorsque le pH tombe à 6. L'autre protéine, une luciférase (137kDa), est inactive à pH 8 et devient active exactement dans la gamme de pH où la luciferin binding protein rend la luciférine disponible pour la réaction. Les deux protéines sont concentrées dans des organelles cytoplasmiques particulières appelées scintillons. La luciférase présente trois séquences répétées et homologues successives de 377 acides aminés. Chacune de ces séquences code pour un peptide ayant une activité catalytique. In vivo, la bioluminescence est émise sous forme de flashes brefs ( $\approx 100 \text{ ms}$ ). Il a été proposé que le mécanisme implique un potentiel d'action provoquant l'ouverture de canaux perméables aux protons et conduisant à l'acidification des scintillons et donc à l'émission de lumière (Eckert et Reynolds, 1967 ; Hastings et Dunlap, 1986).

#### 1.1.1.4 Chez les cnidaires

Beaucoup de cnidaires tels que les méduses *Renilla reniformis* et *Aequorea victoria* sont bioluminescents (Figure 1.6). Dans ces systèmes, l'émission de lumière est déclenchée par le calcium via des mécanismes cellulaires et moléculaires différents selon les espèces. Bien que les systèmes bioluminescents des hydrozoaires (ex : *Aequorea*) et des anthozoaires (ex : *Renilla*) soient assez différents, ils utilisent la même luciférine, la coelentérazine (7H-imidazo[1,2- $\alpha$ ]pyrazin-3-one, M=423 ; Figure 1.6).

Chez *Renilla*, une sulfokinase retire un groupement sulfate du précurseur (forme de stockage ?) de la coelentérazine. La coelentérazine se fixe ensuite à une protéine (luciferin-binding protein, 18,5kDa, possédant trois sites de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$ ) et est libérée en présence de calcium. Son oxydation est catalysée par la *Renilla* luciférase (35kDa) ; la réaction implique un intermédiaire dioxétanone qui se décompose en  $\text{CO}_2$  et en luciférine oxydée (coelentéramide) dans un état excité (Hart, 1978). La lumière est émise avec un pic à 480 nm.



**Figure 1.6: La bioluminescence chez les cnidaires**

A. Photographie de la méduse *Aequorea victoria* (gauche) , de sa couronne lumineuse (milieu) et de la méduse *Obelia geniculata* (droite)

B. Arbre phylogénétique de quelques protéines liant le calcium dont les photoprotéines (D'après Tsuji et coll, 1995)

C. Schéma de la réaction d'oxydation de la coelentérazine par l'aequorine conduisant à l'émission de lumière et du coelentéramide



Chez *Aequorea*, la protéine qui émet la lumière, l'aequorine, est en fait un intermédiaire réactionnel stable de luciférase. Une forme oxygénée (hydropéroxyde) de la coelentérazine est déjà liée à la protéine, appelée apoequorine. Le calcium, pour lequel la protéine possède trois sites de liaison, déclenche un flash de lumière ( $\lambda_{\text{max}} = 469 \text{ nm}$ , bleu) résultant de l'oxydation complète de la coelentérazine via un intermédiaire dioxétanone (Figure 1.6). Ainsi, au lieu de déclencher la biodisponibilité de la luciférine, le calcium agit ici sur un intermédiaire réactionnel. D'autres protéines fonctionnant comme l'aequorine ont été découvertes et étudiées, c'est le cas de l'obéline (*Obelia longissima* et *Obelia geniculata*), la mitrocomine (*Mitrocoma cellularia*) et de la clytine (*Clytia gregaria*). Ces protéines constituent la famille des photoprotéines.

Chez *Obelia*, des potentiels d'action dans l'épithélium conducteur déclenchent des courants calciques entrants dans des cellules support et non dans les photocytes. Des jonctions gap entre les deux types cellulaires fournissent un canal pour l'entrée de calcium dans les photocytes (Dunlap et coll., 1987).

Les trois domaines de liaison du calcium de l'aequorine, des photoprotéines en général, et de la luciferin-binding protein de *Renilla* présentent de fortes homologues avec les domaines à EF-hand (cf. 1.4) présents dans d'autres protéines de liaison du calcium comme la calmoduline. Initialement, 4 EF-hands avaient été décrites par homologie mais seulement trois (La première et les deux dernières) sont capables de lier un ion  $\text{Ca}^{2+}$  (Deng et coll., 2005). Lors de cet exposé, les différents motifs EF-hand des photoprotéines qui lient effectivement le calcium seront numérotés de 1 à 3. L'EF-hand restante sera désignée par le terme de pseudo-EF-hand.

### 1.1.3 ORIGINE DE LA COELENTERAZINE

#### 1.1.3.1 Sources biologiques

Lorsque le gène de l'apoequorine est introduit dans un organisme, aucune lumière n'est émise suite à l'augmentation du calcium intracellulaire à moins que la coelentérazine ne soit fournie de manière exogène. Malgré le fait que la coelentérazine soit présente dans une variété de phylla lumineux ou pas (Campbell et coll., 1990; Shimomura et coll., 1980; Haddock et Case, 1994; Shimomura, 1987; Thomson, et coll., 1997), peu d'éléments existant à ce jour permettent de déterminer comment la coelentérazine est synthétisée par ces organismes. Elle y intervient comme substrat de luciférase. Ces protéines sont capables d'émettre de la lumière comme l'aequorine mais indépendamment de la

concentration en calcium (Pour revue, Wilson et Hasting, 1998). Dans le cas de la méduse *Aequorea victoria*, il a été montré que sa bioluminescence était dépendante de la composition du milieu nutritif dans lequel elle se trouve. Lorsqu'une méduse qui est privée source de coelentérazine reçoit des proies non lumineuses comme *Hormiphora californensis*, elle reste non bioluminescente. Par contre, si elle est nourrie avec des ctenophores bioluminescents comme *Bathocyroe fosteri* ou des fragments de méduses bioluminescentes comme *Mitrocoma cellularia*, elle présente une bioluminescence qui apparaît 8h après ingestion et qui peut durer plus de deux semaines avec une seule dose (Haddock et coll., 2001). La source de coelentérazine pourrait ainsi provenir du plancton ou des crustacés dont se nourrissent les espèces bioluminescentes. Il est à noter également que la méduse est incapable de recycler le coelentéramide produit lors de la génération du signal lumineux.

#### 1.1.3.2 Analogues de coelenterazine et aequorine semi synthétique

La coelentérazine peut être synthétisée également par voie chimique. Dans un effort d'améliorer les propriétés d'émission de lumière de l'aequorine, des aequorines semi-synthétiques ont été produites en remplaçant la partie coelentérazine de l'aequorine avec différents analogues de la coelentérazine (Shimomura et coll., 1988,1989, 1990, 1993a,b). Les aequorines semi-synthétiques ayant une coelentérazine substituée en 2 ou en 8 (voir figure) présentent des décalages dans le spectre de bioluminescence et des modifications de sensibilité vis-à-vis du calcium (Shimomura et coll., 1989). Par contre, le groupement p-hydroxyphenyle en position 6 de la coelentérazine apparaît nécessaire sous sa forme intacte pour obtenir la formation d'aequorine active.

Une aequorine semi synthétique préparée avec la (e)-coelentérazine (Figure 1.2) présente un spectre bimodal ( $\lambda_{\text{max}}$ =405 et 465 nm) ainsi qu'une cinétique d'émission de lumière 4 fois plus rapide que la forme native. De manière intéressante, il a été montré chez l'une des isoformes de l'aequorine (l'isoforme C) que l'amplitude relative des pics à 405 et 465 nm évolue avec la concentration en calcium (Shimomura et coll., 1988). Cela suggère que les formes émettrices à 405 et 465 nm évoluent en fonction de la concentration en calcium. En ce qui concerne la reconstitution d'aequorine active, les analogues de coelenterazine testés ont une vitesse de reconstitution plus faible que pour la coelenterazine native à l'exception de la (e)-coelenterazine qui est trois fois plus rapide (Shimomura et coll., 1993).

En conclusion, les systèmes bioluminescents sont très divers et ont développé différentes stratégies pour émettre de la lumière en réponse à un signal biologique. Les

bactéries émettent de la lumière quand elles sont suffisamment denses. Les dinoflagellés et les cnidaires émettent un signal lumineux en réponse à un potentiel d'action. Parmi les cnidaires, les photoprotéines comme l'aequorine ont peut-être évolué à partir d'un ancêtre commun avec la calmoduline et les protéines de liaison du calcium. Et les trois domaines EF-hand de l'aequorine jouent un rôle majeur dans la régulation de l'émission de lumière par l'aequorine.

## **1.2 LA PHOTOPROTEINE AEQUORINE**

### **1.2.1 PREPARATION DE L'AEQUORINE**

L'aequorine est un complexe non covalent entre une partie protéique, appelée apoaequorine, et une forme oxygénée (hydropéroxyde) de la coelentérazine. Par la suite, le terme de coelentérazine remplacera le terme hydropéroxyde de coelentérazine quand il s'agira de parler du groupement prosthétique de l'aequorine.

De sa découverte en 1962 jusqu'à son clonage en 1985 (voir plus loin), l'aequorine était préparée et purifiée à partir d'extract de méduse en présence de chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$  (EDTA ou EGTA) et dans l'obscurité (Shimomura et Johnson, 1970). Bien que la bioluminescence de l'aequorine mette en jeu une réaction d'oxydation irréversible de la coelentérazine en coelentéramide, l'aequorine peut être régénérée, soit à partir de l'apoprotéine soit à partir d'aequorine qui a déjà été activée par du calcium, en présence de coelentérazine, d'EDTA ou d'EGTA, d'un réducteur doux (le mercaptoéthanol ou le dithiotreitol) et d'oxygène moléculaire (l'oxygène dissout dans l'eau suffit ; Shimomura et Johnson, 1975). Cette réaction de reconstitution est relative lente, de l'ordre d'une heure à 4°C, en comparaison avec la cinétique rapide d'émission de lumière. Suite à l'addition de calcium, l'aequorine émet un flash de lumière qui dure environ une seconde durant lequel tout le stock d'aequorine activable est consommé.

### **1.2.2 BIOLUMINESCENCE DE L'AEQUORINE INDEPENDANTE DU CALCIUM**

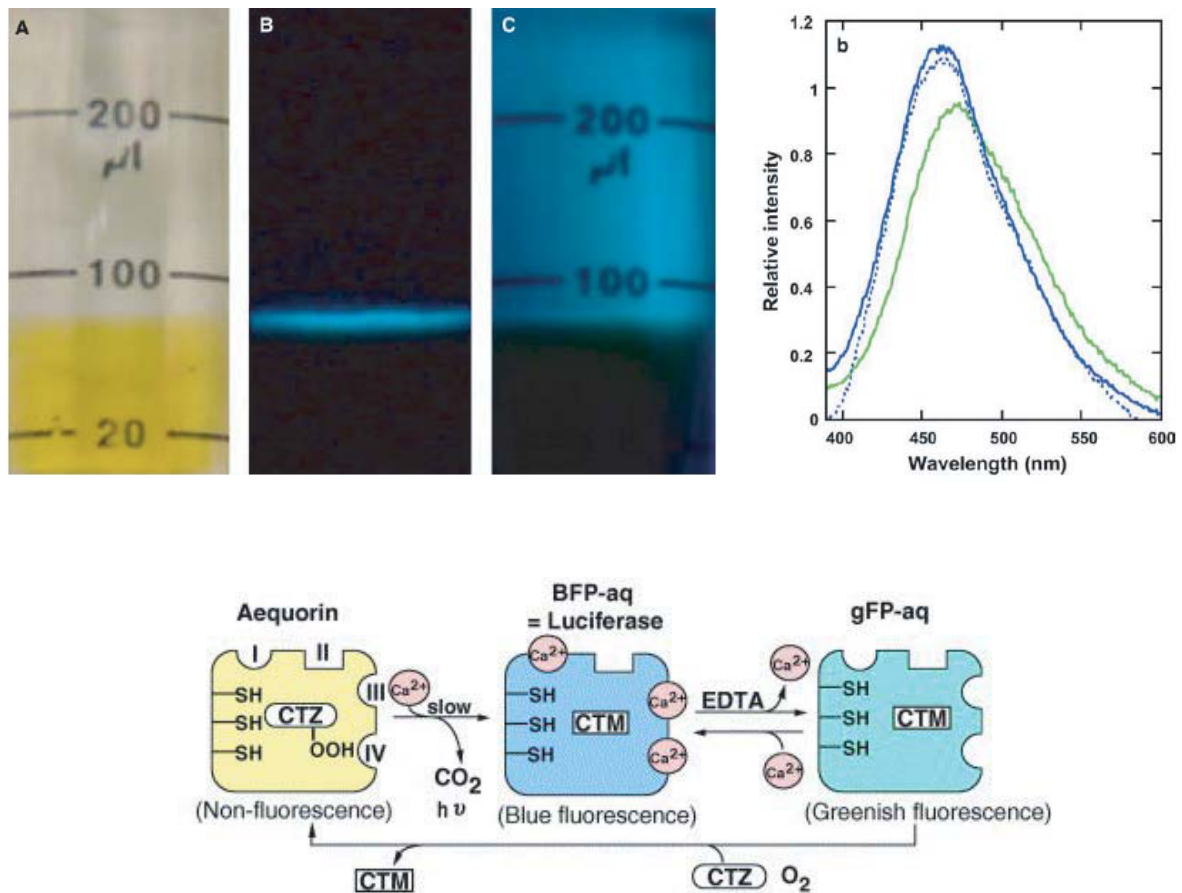
Même en absence de calcium, l'aequorine, comme l'obéline, présente une activité de bioluminescence très faible, environ  $10^6$  fois plus faible que celle induit par une concentration saturante de calcium (Allen et coll., 1977 ; Illarionov et coll., 2000). Bien que l'origine de cette bioluminescence reste encore non élucidée, il a été montré que l'aequorine, suite à cette réaction, passe d'une forme complètement active, avec une conformation rigide, à une forme déchargée, complètement dépliée avec plusieurs acides aminés ayant acquis une plus de mobilité (Ray et coll., 1985). La protéine une fois

déchargée présente une conformation différente de celle de l'aequorine déchargée par addition de calcium. Sa structure est plus désordonnée (pourcentage d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  inférieure). La constante de temps de décharge de l'aequorine en l'absence de calcium est de 30 jours à 5°C. Elle est augmentée à 70 jours en présence de magnésium (Ray et coll., 1985). Dans les deux cas, le coelentéramide reste lié à la protéine.

### 1.2.3 ACTIVITE LUCIFERASE DE L'AEQUORINE

Bien que l'aequorine ne soit pas une enzyme au sens strict du terme, le processus de régénération associant l'apoequorine, la coelentérazine et l'oxygène moléculaire pour donner de l'aequorine, est similaire à la formation d'un complexe enzyme-substrat. Ainsi, l'aequorine (le complexe non covalent de l'apoequorine et de l'hydroperoxyde de coelentérazine) peut être considérée comme un complexe luciférase-luciférine stabilisé comme le proposait déjà Hastings et Gibson (Hastings et Gibson, 1963). Le produit de la réaction déclenchée par le calcium fut appelée "blue fluorescent protein" (BFP-aq, Shimomura et Johnson, 1969) en raison de la fluorescence de cette molécule (Figure 1.7). La BFP-aq, en tant que complexe entre l'apoequorine avec le calcium et la coelentéramide correspond au complexe enzyme produit.

En 1921, Harvey rapporta que des extraits dissociés de la bordure de l'ombrelle d'*Aequorea* émettait une lumière bleue pendant plusieurs heures (Harvey, 1921). Shimomura et Johnson ont indiqué que suite à l'activation de la réaction de bioluminescence par le calcium, le mélange réactionnel était capable de produire une luminescence continue par incubation en présence de coelentérazine (Shimomura et Johnson, 1975). Shimomura proposa alors que le complexe apoequorine- $\text{Ca}^{2+}$ -coelentéramide était en mesure d'agir comme une enzyme en catalysant l'oxydation de la coelentérazine (Shimomura, 1995). Par traitement avec de l'EDTA pour retirer le  $\text{Ca}^{2+}$ , la fluorescence bleue (émission  $\lambda_{\text{max}}=459$  nm) est décalée vers le vert (émission  $\lambda_{\text{max}}=467$  nm). La protéine résultante appelée GFP-aq, est un complexe entre l'apoequorine sans  $\text{Ca}^{2+}$  et une molécule de coelentéramide. Le chromophore de la BFP-aq et de la GFP-aq est le coelenteramide. Le spectre de fluorescence de la BFP-aq est similaire à celui du spectre d'émission de l'aequorine activée par le calcium (Inouye, 2004 ; Figure 1.7). Cela indique que l'état excité responsable de la fluorescence de la BFP-aq est le même que celui dû à l'émission de lumière par l'aequorine. Le décalage de fluorescence observé pour la GFP-aq est probablement dû à une modification de l'environnement du coelentéramide lors du retrait du  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figure 1.7 : Activité luciférase de l'aequorine BFP-aq et gFP-aq à partir d'aequorine**

A. Aequorine recombinante (couleur jaune) en solution dans un tube . B. Bioluminescence bleue de l'aequorine en contact avec 5mM  $\text{Ca}^{2+}$ . C. Fluorescence bleue de la BFP-aq sous illumination UV (366nm). D. Spectre de fluorescence de la BFP-aq (trait bleu) et gFP-aq (trait vert), et spectre de bioluminescence de l'aequorine en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (pointillé bleu). (D'après Inouye, 2004 & 2006)

**Mécanisme proposé par Inouye pour la formation de la BFP-aq et de la gFP-aq à partir d'aequorine et pour la régénération en aequorine**

CTZ, coelentérazine; CTZ-OOH, hydroperoxyde de coelenterazine; CTM, coelentéramide; SH, résidu thiol d'une cystéine.

(D'après Inouye, 2004)

La GFP-aq peut être convertie en aequorine active avec un rendement de 90% et en absence de réducteur. Une fois convertie en aequorine, la fluorescence verte a disparu indiquant que le coelentéramide a été remplacé par l'hydroperoxyde de coelentérazine.

En présence de coelentérazine et de DTT, la BFP-aq produit de la lumière pendant plus d'une heure. Par contre en l'absence de DTT, la luminescence décroît très vite ( $t_{1/2}=8,3\text{min}$ ) probablement en raison de la formation de ponts disulfure durant l'oxydation de la coelentérazine (Inouye, 2004). L'apoequorine- $\text{Ca}^{2+}$  est également capable de produire de la lumière en présence de coelentérazine mais avec une efficacité moindre (12% de la BFP-aq). La BFP-aq et l'apoequorine- $\text{Ca}^{2+}$  se comportent donc comme des luciférases. Bien que le coelentéramide n'intervienne pas dans la réaction d'oxydation de la coelentérazine, son rôle serait de maintenir une conformation efficace pour la catalyse.

#### 1.2.4 STRUCTURE DE L'AEQUORINE

##### 1.2.4.1 Structure primaire

La partie protéique de l'aequorine, l'apoequorine (Figure 1.8), a été clonée en 1985 par criblage d'une banque d'ADNc (Inouye et coll., 1985) et par séquençage de fragment peptidique (Charbonneau et coll., 1985 ; Prasher et coll., 1985). Quatre autres photoprotéines homologues à l'aequorine ont été isolées et clonées. Il s'agit de l'obéline d'*Obelia geniculata* (Markova et coll., 2002) et d'*Obelia longissima* (Illarionov et coll., 1995), la clytine de *Clytia gregaria* (Inouye et Tsuji, 1993) et la mytrocomine de *Mitrocoma cellularia* (Fagan et coll., 1993). Ces protéines présentent entre 61,9% et 68,8% d'homologie avec l'aequorine (Figure 1.8 ; Tsuji et coll., 1995).

L'apoequorine est codée par une séquence de 591 bases sous la forme d'un polypeptide précurseur. La protéine mature (189 acides aminés ;  $M=21\text{kDa}$ ) ne présente pas les 7 premiers acides aminés N terminaux, indiquant que ces résidus sont probablement clivés durant la maturation de la protéine. Le rôle de ces acides aminés en tant que peptide signal reste encore non élucidé (Inouye et coll., 1985). La numérotation des acides aminés utilisée ici sera identique à celle publiée dans Inouye et collaborateurs (1985). L'acide aminé n°1 est le premier de la protéine native (sans peptide signal), ici, une valine. A partir d'extrait de méduse, au total 8 isoformes (aequorines A-H) ont pu être isolées par séparation chromatographique. Ces isoformes présentent des propriétés de bioluminescence proches (Shimomura, 1986). Ces variations résultent probablement d'un polymorphisme dans la séquence de l'apoequorine. En effet, le séquençage de fragments

peptidiques a montré une hétérogénéité dans la séquence de la protéine (Charbonneau et coll, 1985). Aucune autre modification posttraductionnelle n'a été décrite chez l'aequorine ou chez les autres photoprotéines.

Parmi les protéines liant le calcium telles que la calmoduline, très peu possèdent des cystéines. Cependant, la séquence de l'apoequorine en présente trois qui sont conservées chez les autres photoprotéines. Sachant que du mercaptoéthanol est nécessaire pour reconstituer entièrement l'aequorine à partir d'apoequorine et de coelentérazine (Shimomura et Johnson, 1975), cela suggère que ces cystéines sont impliquées dans la formation du complexe apoequorine-coelentérazine. En effet, ces trois cystéines semblent impliquées dans la liaison de la coelentérazine mais pas dans la réaction de bioluminescence. La modification chimique des groupements thiols par un radical maléimide provoque la libération de coelentérazine par la molécule et la perte complète d'activité de bioluminescence (Kemple et coll., 1984). D'autre part, une étude en spectroscopie de masse a montré la présence d'un pont disulfure entre les Cys145 et Cys152 dans l'apoequorine (Ohmiya et coll., 1993). Ce pont est rompu après incubation avec du DTT. Il est probable que la présence de ce pont disulfure empêche la liaison de la coelentérazine avec l'apoprotéine.



**Figure 1.8: Alignement multiple des séquences protéiques de l'aequorine, de l'obéline, de la clytine et de la mitrocomine**

Les hélices  $\alpha$  et les feuillets  $\beta$  sont représentés respectivement par des barres noires et blanches. Les sites de liaison du calcium sont indiqués en gris.



#### 1.2.4.2 Structure secondaire et tertiaire

L'aequorine (Head et coll., 2000) comme l'obéline (Liu et coll., 2000) possède une structure globulaire contenant une cavité centrale hydrophobe hébergeant l'hydropéroxyde de coelentérazine (Figure 1.9). Le squelette protéique possède quatre motifs hélice boucle hélice, caractéristique des domaines à EF-hand, organisés en deux paires (cf. 1.3). Chacune des paires est organisée dos à dos et forme deux bandes courtes de feuillet  $\beta$  comme chez les autres protéines de liaison du calcium. En absence de calcium, la molécule d'aequorine montre des analogies conformationnelles avec la calmoduline quand elle lie sa cible en présence de calcium. Une surface hydrophobe est présente sur chaque moitié de la molécule dans le creux formé par chaque paire d'EF-hands. Comme dans la calmoduline, les deux creux sont rassemblés par une boucle se trouvant entre la seconde hélice de la pseudo EF et la première hélice de l'EF1. Cependant, à la différence de la calmoduline, les deux moitiés de la protéine se font face et forment la cavité qui abrite l'hydropéroxyde de coelentérazine. Cet arrangement avec une cavité hydrophobe présente des analogies avec celui de la recoverine qui abrite une queue myristoylée. La conformation globale de l'aequorine cristallisée est similaire aux protéines de liaison du calcium sarcoplasmiques qui présentent une telle structure globulaire avec quatre EF-hands.

#### 1.2.4.3 Liaison de la coelentérazine

La cavité où se trouve la coelentérazine, sous sa forme hydropéroxyde, est située au centre de la protéine et n'offre aucune possibilité d'accès au solvant. La paroi de cette cavité est constituée des chaînes latérales de résidus hydrophobes ou aromatiques. Les histidines et les tyrosines sont organisés en trois paires associées chacune avec un tryptophane. Le rôle de ces triades n'est pas élucidé. Le groupement hydropéroxyde semble être stabilisé par une liaison hydrogène avec l'oxygène phénolique de Tyr184 qui est lui-même en interaction avec His169 (Figure 1.9). De la même manière, le groupement hydroxyl du phénol en C6 de la coelentérazine se trouve au centre d'un triangle constitué de Tyr82, His16 et Trp86. Tous ces résidus jouent un rôle important dans la bioluminescence de l'aequorine et en particulier dans le mécanisme conduisant à l'émission de lumière.

A 3D ribbon diagram of a protein structure. The protein is shown in blue and yellow. The C terminus is labeled. The Y184 residue is highlighted in yellow.

A. Structure tridimensionnelle. Les hélices  $\alpha$  sont représentés en cyan, les feuillets  $\beta$  en jaune et les boucles en magenta. La coelentérazine (au centre) et la chaîne latérale de Y184 sont représentés en mode bâtons.

22

Le résidu Pro189 semble également essentiel pour l'intégrité de la cavité abritant la coelentérazine. Ce résidu est conservé chez toutes les photoprotéines dont il constitue le dernier acide aminé, sauf dans la mitrocomine qui se termine par une tyrosine après la Pro189 (Fagan et coll., 1993). Toute mutation de ce résidu (délétion, remplacement addition d'un peptide) dans l'aequorine provoque une forte réduction de l'intensité de la bioluminescence de même que la délétion du résidu le précédant (Nomura et coll., 1991). Il a été montré *in vitro* que le remplacement de ce résidu conduisait à une protéine assez instable qui perdait très rapidement en absence de calcium sa capacité à émettre de la lumière (Watkins et Campbell, 1993). Ceci suggère que l'extrémité C-terminal est très importante dans la stabilité du complexe apoaquorine-coelentérazine. En effet, le résidu Tyr184, qui interagit avec l'hydroperoxyde, se trouve dans ce domaine de la photoprotéine. Le segment peptidique 177-189 adopte une structure en boucle et se place dans l'espace situé entre la 1<sup>ère</sup> hélice de l'EF 1 et la 1<sup>ère</sup> hélice de l'EF 3 (Figure 1.9). De nombreuses liaisons hydrogène dans cette région ancrent la chaîne C-terminale, la maintiennent dans cette conformation et permettent le positionnement de la chaîne latérale du résidu Tyr184 par rapport à His169 et à la coelentérazine. Ces interactions maintiennent ensemble les deux moitiés de la protéine et referment la cavité hydrophobe hébergeant la coelentérazine (Head et coll., 2000).

### **1.3 LE DOMAINE DE LIAISON DU CALCIUM DANS L'AEQUORINE : L'EF-HAND**

Le calcium est capable d'interagir avec un très grand nombre de protéines mais le nombre de configurations différentes pour le site de liaison est assez restreint. Il existe plusieurs types de domaines de liaison du calcium. L'un d'eux est le domaine C2, constitué essentiellement de feuillet  $\beta$ , qu'on trouve dans des protéines comme la synaptophysine ou la synaptotagmine. Un autre domaine de liaison du calcium est le domaine EF-hand. Ce motif est très répandu chez les protéines liant le calcium comme la calmoduline, la parvalbulmine, la calbindine ou la troponin C.

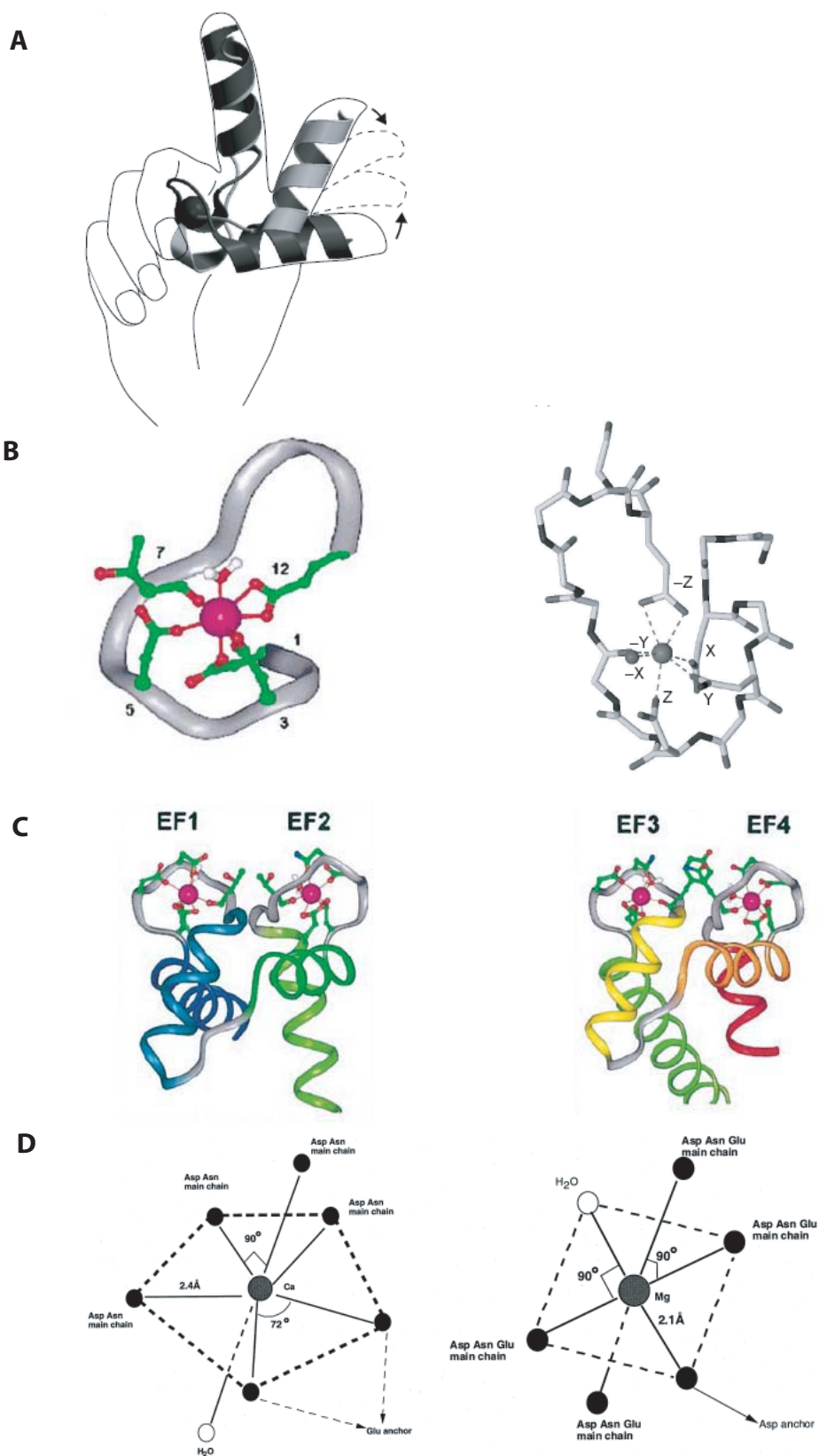
#### **1.3.1 STRUCTURE D'UN DOMAINE EF-HAND**

Le terme d'EF-hand a été utilisé pour la première fois par Kretsinger et Nockolds, il y a plus de 25 ans, pour représenter graphiquement le site de liaison du calcium dans la parvalbumine (Figure 1.10). Chaque EF-hand ne peut lier qu'un seul ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans sa forme classique ou canonique, c'est un motif hélice-boucle-hélice caractérisé par une séquence de 29 acides aminés. Les neuf premiers forment une hélice  $\alpha$  suivie d'une boucle de 12 acides aminés dont les trois derniers constituent l'amorce d'une hélice  $\alpha$  de 11 résidus. La boucle du domaine EF-hand contient 6 résidus complexant le  $\text{Ca}^{2+}$  via 7 atomes

d'oxygène. La distance moyenne entre les atomes d'oxygène et le calcium est de 2,4Å (Strynadka et James, 1989) Ces résidus sont désignés par leur position dans la séquence linéaire de la boucle de 12 acides aminés et par la géométrie tertiaire imposée aux résidus. Ils se trouvent sur les axes d'une bipyramide à base pentagonale comme suit : positions 1 (+X), 3 (+Y), 5 (+Z), 7 (-Y), 9 (-X), and 12 (-Z) (Figure 1.10). Les paires de résidus des axes Y et Z se trouvent sur les sommets d'un pentagone presque plat tandis que la paire de l'axe X présente une orientation perpendiculaire aux axes Y et Z (pour revue, Strynadka et James, 1989).

Seuls les résidus 1, 3, 5, 9 et 12 sont susceptibles d'interagir avec le calcium par l'intermédiaire de leur chaîne latérale. Le résidu en position 1 (+X) est toujours un aspartate. Le résidu en position 3 (+Y) est le plus fréquemment un aspartate ou une asparagine. En position 5 (+Z), on trouve le plus souvent un aspartate, une sérine ou une asparagine. Plusieurs acides aminés ont été trouvés en position 9 (-X). Cependant, ce n'est que lorsque ce résidu est un glutamate que ce dernier interagit directement avec le calcium. Quand cette position est occupée par un résidu autre qu'un glutamate, la chaîne latérale n'interagit pas avec le calcium directement. A la place, une molécule d'eau fait la liaison entre le résidu et l'ion calcium. Le résidu en position 12 (-Z) est invariablement un glutamate dans lequel les deux atomes d'oxygène de sa chaîne latérale carboxylate interagissent avec le calcium. De plus, le résidu en position 7 (-Y) lie le calcium via l'oxygène du groupement carbonyle de la liaison peptidique. En position 6, on rencontre toujours une glycine. Bien que cette position n'intervienne pas directement dans la liaison avec le calcium, il a été proposé qu'elle permette à la chaîne latérale du résidu 5 et à la chaîne principale du résidu 7 de lier le calcium (Herzberg et James, 1985).

Dans la plupart des cas connus, les motifs à EF-hand se retrouvent sous la forme de paire de motifs adjacents : la parvalbumine et les protéines S100 présentent ce motif minimal (Figure 1.10). Les protéines contenant 4 EF-hands ont habituellement deux domaines, chacun formé d'une paire d'EF-hand, séparés par une chaîne flexible. Les EF-hands d'une même protéine peuvent avoir des affinités différentes pour les ions métalliques et leur appariement conduit à une coopérativité comme conséquence fonctionnelle de la liaison du calcium.



**Figure 1.10: Structure d'un domaine EF-hand**

A. Représentation symbolique d'un motif EF-hand. L'hélice s'enroule autour de l'index tandis que l'hélice F s'enroule autour du pouce de la main droite. Lorsque le calcium se fixe, l'hélice F bouge de la conformation fermé (gris clair) à la conformation ouverte (gris foncé).

B. *A gauche*. Représentation en ruban d'un motif EF-hand classique avec un calcium lié (rose). Les atomes d'oxygène (rouge) impliqués dans la complexation du calcium sont numérotés suivant leur position dans la boucle. *A droite*. La géométrie des ligands du calcium.

C. Motif EF-hand de la calmoduline (coordonnées à partir de 1CLL.pdb).

D. Site de liaison du calcium avec sa géométrie pentagonale bipyramidale (*gauche*) et le site de liaison du magnésium. L'atome d'oxygène de la molécule d'eau qui coordonne le cation est représenté par un cercle blanc.

Chez certaines protéines de liaison du calcium, bien que la structure de la protéine présente un motif hélice boucle hélice caractéristique d'une EF-hand, ce domaine n'est pas fonctionnel et ne lie pas le calcium en raison de l'absence des résidus nécessaires à la complexation du calcium. Même si ce domaine est incapable de lier le calcium, il interagit avec l'autre EF-hand de la paire (celle là est fonctionnelle) via des liaisons hydrogènes au niveau de la boucle entre les hélices. C'est le cas de l'aequorine et des autres photoprotéines.

### 1.3.2 AFFINITE POUR LE CALCIUM

Plusieurs facteurs structuraux influencent l'affinité calcique des protéines à domaine EF-hand. Cela comprend l'hydrophobicité des hélices bordant la boucle, de la boucle elle-même, des résidus de la boucle qui ne complexent pas le  $\text{Ca}^{2+}$  et également du nombre et de la position des résidus chargés aux positions complexantes. Reid et Hodges ont proposé l'hypothèse de la paire d'acides (« acid pair hypothesis ») qui relie les positions des résidus complexant chargés négativement à l'affinité pour le calcium (Reid et Hodges, 1980). Cette hypothèse prédit que l'affinité calcique la plus élevée se rencontre lorsqu'il y a au maximum 4 résidus acides aux positions 1, 5, 9 et 11. Cela provoque l'appariement des oxygènes des groupes carboxylates des axes X et Z. Cette hypothèse prédit également que l'introduction d'un 5<sup>ème</sup> résidu carboxylate complexant devrait diminuer l'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  à cause de l'augmentation de la répulsion électrostatique. La validité de l'hypothèse de la paire d'acide a été vérifiée sur des fragments synthétiques basés sur le 3<sup>ème</sup> site de liaison du calcium du la troponine C (Marsden et coll., 1988; Reid, 1990; Procyshyn et Reid, 1994) mais aussi sur le 3<sup>ème</sup> site de la calmoduline dans laquelle le 4<sup>ème</sup> avait été inactivé par mutation (Wu et Reid, 1997). Cette hypothèse a enfin été vérifiée sur le domaine N terminal de la calmoduline. Il a ainsi été montré que l'augmentation d'affinité était due à une augmentation de la constante d'association pour les paires d'acides situées sur les axes Y et Z tandis qu'une paire d'acides sur l'axe X provoquait une diminution de la constante de dissociation. (Black et coll. 2000).

### 1.3.3 BIOLUMINESCENCE DE L'AEQUORINE DEPENDANTE DU CALCIUM

Il a été montré que la liaison du calcium provoquait une cascade de réactions irréversibles conduisant à la formation de l'état excité du coelentéramide et à l'émission rapide de lumière (Hastings et coll., 1969). Suite à l'addition de  $\text{Ca}^{2+}$ , l'émission de lumière

par l'aequorine se produit sous la forme d'un flash lumineux dont la phase de montée ( $\tau \approx 10$  ms) est indépendante de la concentration en calcium. En revanche la rapidité de la phase de décroissance, due à la consommation progressive d'aequorine, augmente avec  $[Ca^{2+}]$  ( $\tau \approx 833$  ms à 20°C, d'après Hastings et coll., 1969). De plus, le rendement quantique (nombre de photons émis par molécule d'aequorine active) semble rester constant lorsque la concentration en calcium augmente (Hastings et coll., 1969). Cela suggère donc que la bioluminescence de l'aequorine déclenchée par le calcium est aussi régulée par la concentration en ions  $Ca^{2+}$ .

Plusieurs études ont tenté de déterminer la dépendance calcique de la bioluminescence de l'aequorine. Allen et coll. (1977) ont établi expérimentalement et modélisé la relation entre l'intensité du flash de bioluminescence et  $[Ca^{2+}]$  et ont proposé que la liaison de trois calcium sous tendait la pente élevée de la courbe dose-réponse. D'un autre côté, Shimomura a proposé que seulement deux calciums fussent nécessaires pour déclencher la réaction de bioluminescence sur la base du nombre de photon émis lorsque la concentration en calcium est augmentée de manière graduelle et continue dans le mélange réactionnel (Shimomura, 1995). De plus, bien que trois calciums se lient effectivement à la photoprotéine, la liaison des deux premiers présente une affinité 20 fois plus grande que celle du troisième (Shimomura et Inouye, 1996).

L'ion  $Mg^{2+}$  est, avec le calcium, le cation divalent le plus rencontré dans les organismes vivants. Paradoxalement, l'ion magnésium qui est proche chimiquement des ions calcium ne déclenche pas la luminescence de l'aequorine. Au contraire, il aurait un effet d'inhibiteur compétitif (Illarionov et coll., 2000 ; Ohashi et coll., 2005). Dans un grand nombre de protéine de liaison du calcium, les domaines EF-hand sont capables de lier également le calcium avec une géométrie octaédrique avec six ligands (Figure 1.10 ; bipyramide pentagonale avec sept ligands pour le  $Ca^{2+}$ ). L'aequorine est capable de lier deux ions magnésium sur les EF1 et EF2 avec une plus grande affinité pour l'EF1. En condition physiologique, c'est-à-dire lorsque la concentration en magnésium dans la cellule avoisine 1mM, seule l'EF2 serait occupée par un ion  $Mg^{2+}$  (Ohashi et coll., 2005).

La liaison du magnésium induit une diminution de la sensibilité pour le calcium (un ordre de grandeur en  $[Ca^{2+}]$  entre 0 et 10mM  $Mg^{2+}$ ) et un ralentissement de la cinétique et en particulier celle de la phase de montée de la bioluminescence ( $\tau = 8$  ms sans  $Mg^{2+}$  versus 77 ms avec 10mM  $Mg^{2+}$  à 20°C ; d'après Illarionov et coll., 2000). Comme le magnésium ne modifie pas la quantité totale de lumière émise, le ralentissement de la cinétique se traduit pas une diminution de l'intensité du flash lumineux.

L'effet du magnésium a également été étudié chez l'obéline d'*Obelia longissima* (Illarionov et coll., 2000) et d'*Obelia geniculata* (Markova et coll., 2002). Ces protéines présentent une sensibilité au  $Mg^{2+}$  plus faible que l'aequorine (facteur 3 entre 0 et 10mM  $Mg^{2+}$ ). L'effet sur la cinétique de décroissance de la bioluminescence est lui également moins fort dans l'obéline ( $\tau = 0,25$  ms sans  $Mg^{2+}$  versus 0,3 ms avec 10mM  $Mg^{2+}$  à 20°C ; d'après Illarionov et coll., 2000).

## 1.4 MECANISME DE LA BIOLUMINESCENCE

### 1.4.1 DE LA LIAISON DU CALCIUM A L'EMISSION DE LUMIERE

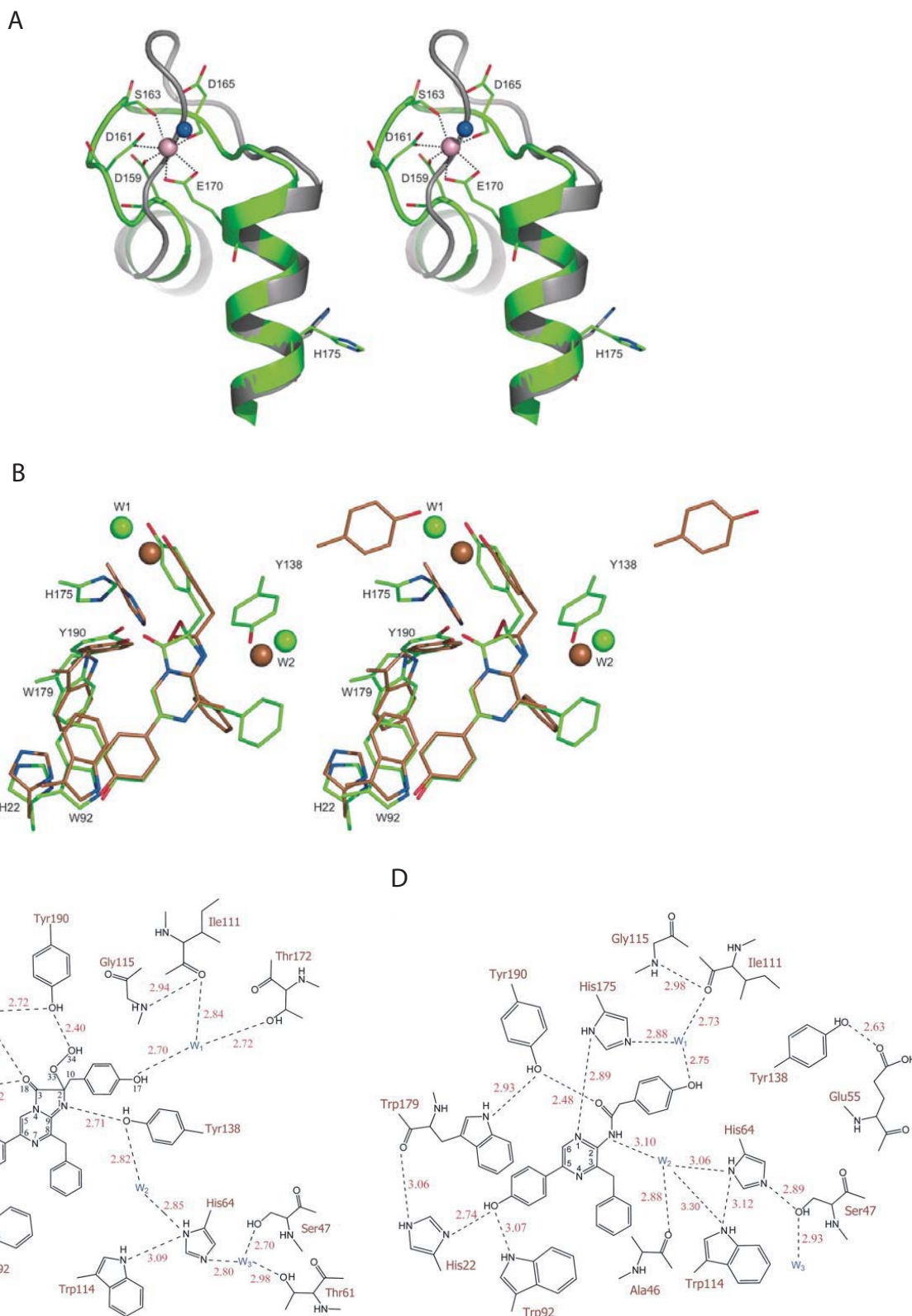
Seule la structure de l'obéline a été élucidée sous sa forme active (sans  $Ca^{2+}$  et avec coelentérazine) et sous sa formée « oxydée » (avec  $Ca^{2+}$  et coelentéramide ; Liu et coll., 2000 ; Liu et coll., 2006). La comparaison de ces deux structures et en particulier les résidus qui se sont déplacés permet de formuler une hypothèse concernant le déclenchement de la réaction de bioluminescence par liaison du calcium. Sous les deux états, la protéine conserve une structure globale globulaire avec ses deux paires de domaines hélice-boucle-hélice. Parmi les trois motifs EF-hand, c'est l'EF3 qui présente le plus d'écart entre les deux structures (rms[chaine principale]=1.839 Å / rms[chaine latérale]=3.350 Å). L'EF2, présente un écart similaire à l'EF3 mais inférieur (rms=1.818 Å / 3.094 Å). L'écart de l'EF1 est le plus faible des trois (rms=1.685 Å / 1.283 Å). En ce qui concerne la pseudo EF-hand, l'écart entre les deux structures est assez faible (rms= 0.463 Å / 1.536 Å) en accord avec son incapacité à lier le calcium. Ceci indique que les réarrangements conformationnels les plus importants ont lieu dans la partie C terminale de la protéine.

Malgré cela, la queue C-terminale de la protéine contenant le résidu Tyr190<sup>Obl</sup><sup>1</sup> et la proline terminale reste bien ancrée au reste de la protéine via un réseau de liaisons hydrogène permettant de maintenir fermée (inaccessible au solvant) la cavité abritant le coelentéramide. Cela est cohérent avec la fluorescence observée après activation par le calcium car le coelentéramide n'est pas fluorescent en solution. D'autre part ce sont les résidus de l'EF3 qui présentent, parmi les trois EF-hands, le plus grand réarrangement pour coordonner l'ion  $Ca^{2+}$ . Ce réarrangement se propage jusqu'à l'His175<sup>Obl</sup>. Avec le résidu Tyr138<sup>Obl</sup>, le résidu His175<sup>Obl</sup> présente le réarrangement le plus remarquable au sein de la cavité hydrophobe. Le cycle imidazole est quasi perpendiculaire à sa position avant

---

<sup>1</sup> Par soucis de clarté, les acides aminés de l'obéline seront notés avec *Obl* en exposant.





### Figure 1.11: Comparaison obéline native vs obéline déchargée

A. Vues stéréo de la superposition du domaine EFIII de l'obéline dans l'état déchargé(vert) et dans l'état natif (bleu). Les ions calcium et le molécules d'eau sont représentées respectivement sous forme de boule rose et bleu.

B. vue stéréo de la superposition de la 2-hydroxyperoxycoelenterazine dans la protéine native (vert) et le coelentéramide dans la protéine activée (brun) avec les principaux résidus faisant face à la cavité hydrophobe. Les molécule d'eau sont représentées sous forme de sphère.

C et D.représentation bidimensionnel du réseau de liaisons hydrogène (ligne en tiret) dans cavité hydrophobe de l'obéline native (C) et de l'obéline déchargée (D). A noter que la décomposition de la coelentérazine s'accompagne du déplacement du Tyr138 interagissant avec le N1 et son remplacement par une molécule d'eau W2.

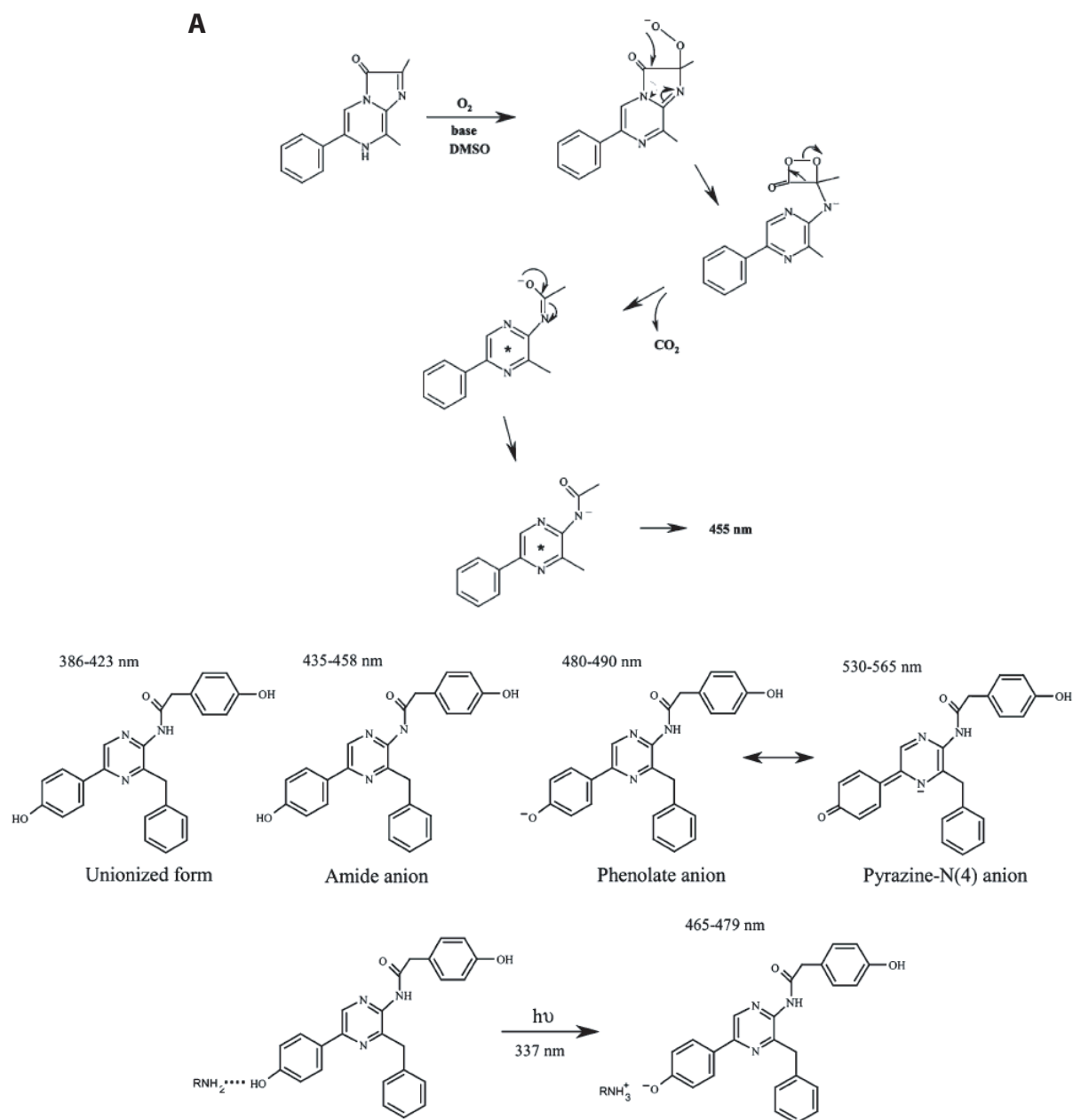
activation par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 1.11). Ce résidu est postulé être le déclencheur de la réaction chimique de bioluminescence (Vysotski et Lee, 2004). En effet, son remplacement dans l'aequorine (His169) conduit à une perte totale de bioluminescence (Ohmiya et Tsuji, 1993).

Entre Tyr190<sup>Obl</sup>, le résidu interagissant directement avec le groupement hydroperoxyde, et His175<sup>Obl</sup>, la distance est de 1.72 Å (Figure 1.11) ce qui suggère une liaison hydrogène avec un caractère électrostatique. Un mécanisme hypothétique est que la liaison du calcium renforce l'interaction entre Tyr190<sup>Obl</sup> et His175<sup>Obl</sup> et donc la contribution électrostatique. Cela revient à dire que His175<sup>Obl</sup> devient partiellement protonée. Etant donné que la tyrosine et l'hydroperoxyde ont des pKs voisins (environ 10), il y a une probabilité que l'hydroperoxyde donne son proton au phénolate de Tyr190<sup>Obl</sup>. L'anion peroxyde a lui une probabilité élevée d'effectuer une addition nucléophile sur le carbone C3 de la coelentérazine pour former l'intermédiaire anion dioxétanone. L'exergonicité de cette dernière étape fournit la faisabilité thermodynamique du processus complet. La réaction de décomposition de cette intermédiaire va donner le coelentéramide sous une forme excitée et ensuite l'émission de lumière.

#### 1.4.2 LA CHIMIE DE LA BIOLUMINESCENCE. LES ESPECES EMETTRICES

A l'instar des luciférase de coléoptères, une même luciférine associée avec différentes luciférase peut conduire à des émissions de lumière de spectre différent. C'est également le cas chez les photoprotéines avec la coelentérazine. Les pics d'émission de sont à 469 nm et 485 nm respectivement pour l'aequorine (Shimomura, 1995) et l'obéline (Markova et coll., 2002). Ainsi le mécanisme conduisant à l'état excité du coelentéramide est important dans la détermination du spectre de bioluminescence (pour revue, Vysotski et Lee, 2004).

McCapra et Chang (1967) ont proposé un mécanisme pour la réaction chimique de bioluminescence (Figure 1.12) à partir d'une étude modèle de la luminescence d'analogue de la coelentérazine en solvant aprotique (sans eau). La réaction de la coelentérazine avec l'oxygène moléculaire donne un produit primaire, le C2-hydroperoxyde. Il est ensuite déprotoné et se referme pour donner une dioxétanone (un cycle  $\alpha$  peroxy lactone à 4 membres). L'intermédiaire hydroperoxyde dans les réactions de chimioluminescence et de bioluminescence a été confirmé par plusieurs études (Musicki et coll., 1986 ; Teranishi et coll., 1994 ; Teranishi et coll., 1995 ; Head et coll., 2000 ; Liu et coll., 2003). Par contre la vérification expérimentale de la dioxétanone est plus difficile. Cependant, des expériences



**Figure 1.12: Espèces émettrices**

A. Mécanisme proposé par McCapra/Chang pour la chimioluminescence d'un analogue de la coelentérazine

B. Formes fluorescentes du coelentéramide. La gamme du pic d'émission est indiquée pour chaque espèce.

(D'après Vysotski et Lee, 2004)

de marquages isotopiques montrent qu'un des oxygènes du CO<sub>2</sub> produit provient de l'oxygène moléculaire (Shimomura et coll., 1977).

Suite à la décarboxylation de la dioxétanone et suivant l'état de charge du coelentéramide excité, la désexcitation ne produit pas le même spectre de luminescence. Shimomura et Teranishi (2000) ont effectué des études de fluorescence du coelentéramide et de 5 analogues dans des solvants de polarités différentes et ont également déterminé l'effet de l'inclusion de bases fortes et faibles. Ils ont proposé que le coelentéramide puisse donner 5 sortes d'états excités illustrés dans la figure 1.12B avec des maxima de fluorescence qui dépendent de la polarité et de la basicité du solvant.

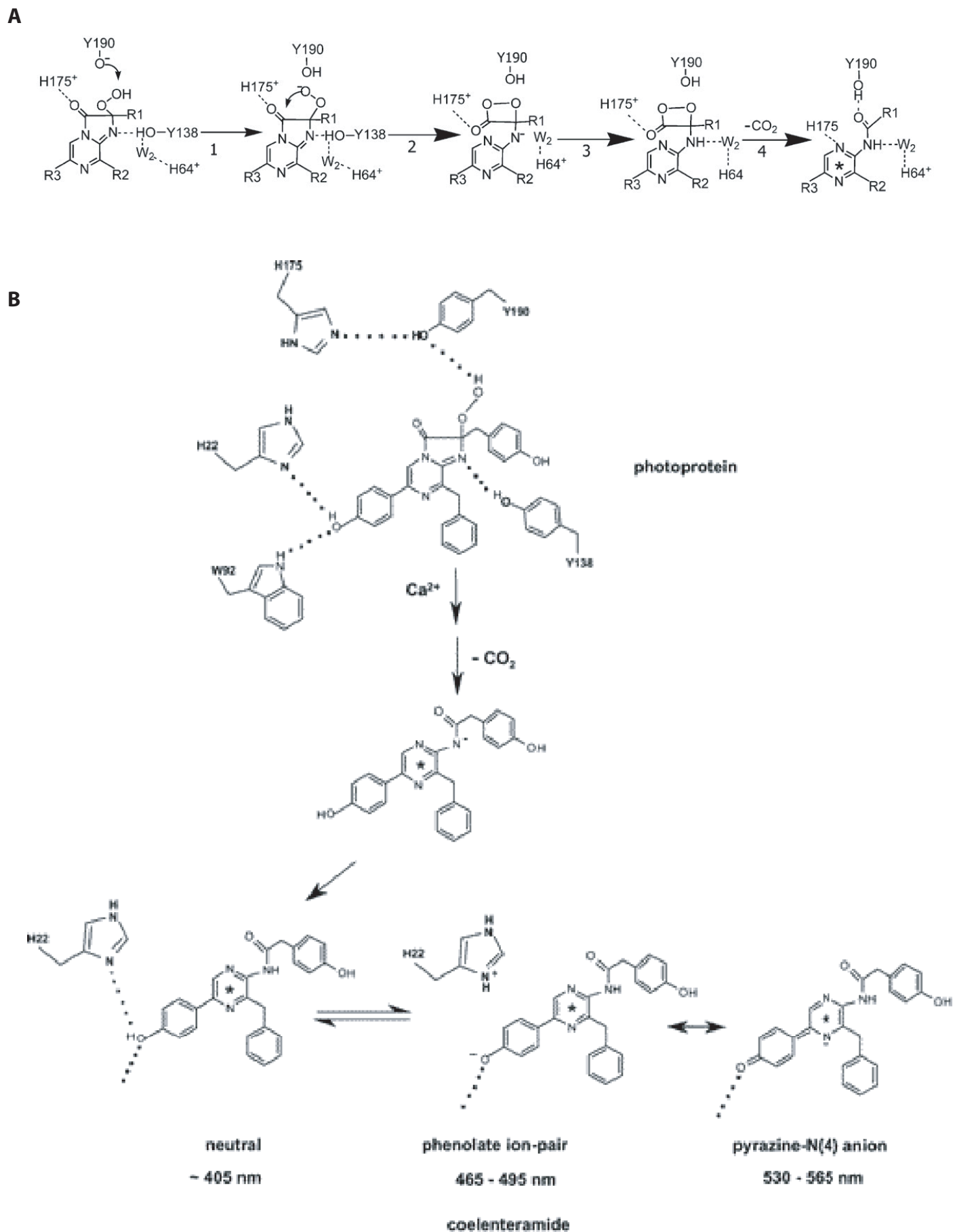
#### 1.4.3 L'EMISSION DE LUMIERE PAR LE COELENTERAMIDE

L'émission de lumière par la photoprotéine dépend fortement de l'environnement du coelentéramide excité. La plupart des études réalisées sur le mécanisme conduisant à l'émission de lumière ont été faites sur l'obéline. L'hydroxyperoxyde de coelentérazine dont il résulte se trouve au sein d'une cavité hydrophobe constituée des résidus appartenant aux hélices de la protéine. On y trouve également plusieurs résidus hydrophiles comme His22<sup>Obl</sup>, Tyr138<sup>Obl</sup>, His175<sup>Obl</sup> et Tyr190<sup>Obl</sup>. La plupart des contacts entre la protéine et l'hydroxyperoxyde de coelentérazine impliquent des résidus au voisinage de l'EF1.

Des expériences de mutagenèse dirigée avaient montré l'importance de certains résidus histidine et tryptophane dans la bioluminescence des photoprotéines. Le remplacement du Trp86 de l'aequorine en phénylalanine conduit à un spectre de bioluminescence bimodal (max : 400 et 455 nm). La mutation équivalente chez l'obéline (Trp92Phe) conduit à une modification similaire du spectre de bioluminescence.

L'élucidation de la structure de l'obéline déchargée (avec Ca<sup>2+</sup> et coelentéramide ; Liu et coll., 2006) a révélé le déplacement du résidu Tyr138<sup>Obl</sup> et d'une molécule d'eau qui se trouve dans la cavité hydrophobe. Le résidu Tyr138<sup>Obl</sup>, dans la structure de l'obéline (et de l'aequorine) sans calcium, interagit avec l'azote N1 qui devient l'azote amide du coelentéramide dans la protéine déchargée. Par contre ce résidu dans la structure de la protéine déchargée se retrouve en dehors de la cavité de la coelentérazine et exposé au solvant. A la place on trouve la molécule d'eau qui auparavant faisait un pont entre Tyr138<sup>Obl</sup> et His64<sup>Obl</sup>.

Le groupe de Vysotski a proposé un mécanisme prenant en compte ces remaniements de la cavité de la coelentérazine pour rationaliser certains des propriétés de bioluminescence de l'obéline (Figure 1.13).



**Figure 1.13: Mécanisme de la bioluminescence de l'obéline**

A. Schéma proposé par Liu et coll pour la genèse de l'état excité du coelentéramide et des réarrangements dans la cavité de la coelentérazine.

B. Mécanisme conduisant à la formation des différents états de protonation de l'état excité du coelentéramide et gamme d'émission de bioluminescence

L'étape déclenchant la bioluminescence implique le transfert d'un proton de la Tyr190<sup>Obl</sup> à la His175<sup>Obl</sup> suivi par l'étape 1 (Figure 1.13), la déprotonation de l'hydroperoxyde et de la formation de l'anion dioxétanone (étape 2). On suppose que la molécule d'eau s'est déplacée jusque là. L'anion est alors protoné par réaction avec la molécule d'eau se trouvant à proximité conduirait à la dioxétanone neutre (étape 3). La présence de l'His64<sup>Obl</sup> dans son état protoné facilite cet échange de proton. L'étape 4 fournit ensuite le coelentéramide neutre comme produit excité primaire dans la bioluminescence.

Suite à la protonation de l'anion amide, plusieurs transferts de proton sont encore faisables. C'est le cas entre le groupement 6-(p-hydroxy) phényl et le résidu His22<sup>Obl</sup> qui donne l'état excité phénolate (Figure 1.13B). Il est ainsi proposé que dans l'obéline, la liaison hydrogène avec Trp92<sup>Obl</sup> stabilise l'état phénolate. Cela expliquerait pourquoi l'obéline et l'aequorine ne présentent pas de bioluminescence aux faibles longueurs d'onde (400 nm, correspondant à la forme neutre du coelentéramide). Ainsi, la substitution du Trp92<sup>Obl</sup> par une phénylalanine ne faisant pas de liaison hydrogène, retarde le transfert de proton si bien que les espèces neutres ont une plus grande probabilité d'émettre avant le transfert de proton. Cela se traduit ainsi par un spectre bimodal.

#### 1.4.4 TRANSFERT D'ENERGIE DE BIOLUMINESCENCE PAR RESONANCE (BRET)

Il a été proposé qu'*in vivo* chez *Aequorea victoria*, la GFP est au voisinage de l'aequorine et l'énergie d'excitation du coelentéramide est transférée de manière non radiative vers le chromophore de la GFP. Cela expliquerait pourquoi la méduse émet une bioluminescence verte plutôt que bleue spécifique de l'aequorine seule (Ward, 1979 ; Morise et coll., 1974). Ce phénomène a été décrit chez d'autres espèces marines chez lesquelles le pic d'émission de bioluminescence est décalé vers le rouge *in vivo* par rapport au spectre de la luciférase obtenu *in vitro* (Morin et Hastings, 1971). Il a ainsi été proposé que la luciférase de *Renilla reniformis* et l'obéline d'*Obelia longissima* participent en tant que donneur à un transfert d'énergie vers leur partenaire fluorescent (Cormier, 1978; Illarionov et coll., 2000). Ce phénomène appelé BRET pour Bioluminescence resonance energy transfer, par analogie avec le FRET, nécessite que le donneur bioluminescent soit très proche de l'accepteur fluorescent. De plus, pour que le transfert soit efficace sur un plan quantique, il faut que le spectre de luminescence recouvre le spectre d'absorption du partenaire fluorescent.

Cependant le BRET a été observé uniquement avec les protéines de *Renilla*. Aucun transfert n'a été observé en mélangeant l'aequorine et la GFP (Morise et coll., 1974). En revanche, le BRET a été observé avec une aequorine fusionnée à la GFP (Baubet et coll.,

2000 ; Waud et coll., 2001) mais aussi avec une fusion GFP-obéline (Gorokhovatsky et coll., 2004). Dans ces protéines de fusion, le spectre d'émission présente un pic à 510 nm ce qui correspond au pic d'émission de fluorescence de la GFP.

## 2. RESULTATS : ETUDE DE L'AEQUORINE PAR MUTAGENÈSE ALEATOIRE ET CRIBLAGE FONCTIONNEL

---

La bioluminescence est bien adaptée aux approches de mutagenèse aléatoire et criblage en raison de sa rapidité de mesure et de la facilité à détecter la lumière émise avec des instruments conventionnels.

La mutagenèse aléatoire par « DNA shuffling » (pour revue, Minshull et Stemmer, 1999) consiste en la recombinaison homologue *in vitro* d'un ensemble de gènes mutants par fragmentation aléatoire et réassemblage par PCR. Cette étape est suivie d'un criblage permettant d'isoler des mutants. Plusieurs itérations de ce processus (alors appelé évolution *in vitro*) permettent une évolution de la séquence et une meilleure exploration de l'espace des séquences que d'autres techniques de mutagenèse comme l'« error-prone » PCR.

Nous avons utilisé cette approche pour générer des banques de mutants d'aequorine, à l'exemple du travail réalisé pour « l'amélioration » de la GFP (Crameri et coll., 1996). Notre espoir était d'obtenir des mutants présentant une bioluminescence plus élevée en système hétérologue. Cette approche étant assez lourde, nous avons également isolé des mutants de la cinétique de bioluminescence afin d'étudier cette propriété qui semblait déterminer la sensibilité calcique de la photoprotéine (Hastings et coll., 1969). Après expression dans *E. coli*, les mutants ont été criblés sur la base du signal de bioluminescence mesuré sur les fenêtres de temps 0-4s ( $L_{0-4}$ ) et 4-8s ( $L_{4-8}$ ) après l'injection d'une solution  $Ca^{2+}$ -triton. Le signal de bioluminescence évoqué par le calcium se présente sous la forme d'un flash lumineux dont la cinétique de décroissance traduit la vitesse de consommation de l'aequorine. Ainsi,  $L_{0-4}$  est un indicateur de l'amplitude du signal mesuré et le rapport  $L_{4-8}/L_{0-4}$  de la cinétique de décroissance du signal. Plus  $L_{4-8}/L_{0-4}$  est proche de 0, plus le signal lumineux décroît rapidement. Plus  $L_{4-8}/L_{0-4}$  est proche de 1 plus la cinétique de décroissance est lente voire quasi stationnaire. Sur la base de ces deux indicateurs, les mutants présentant une valeur de  $L_{0-4}$  plus grande que la forme sauvage (WT) ont été sélectionnés et désignés par le terme Bright. Les mutants avec un rapport  $L_{4-8}/L_{0-4}$  plus élevé que celui du WT, ce qui équivaut à une cinétique de bioluminescence plus lente, ont été nommés SloDK.

Le résultat de l'évolution *in vitro* et de l'exploration des phénotypes des mutants Bright sont présentés dans l'article 1 (« Thermostable mutants of the photoprotein aequorin obtained by *in vitro* evolution »). L'étude des relations entre la sensibilité calcique de l'aequorine et la cinétique de bioluminescence chez le WT et les mutants est décrite dans



l'article 2 (« Calcium dependence of aequorine bioluminescence dissected by random mutagenesis »).

## **2.1 PRESENTATION DE L'ARTICLE 1 : "THERMOSTABLE MUTANTS OF THE PHOTOPROTEIN AEQUORIN OBTAINED BY *IN VITRO* EVOLUTION"**

### **2.1.1 SELECTION DES MUTANTS BRIGHT ET SLODK**

Une seule étape de mutagenèse-sélection a été suffisante pour isoler les mutants SloDK (entre 20 et 57 fois plus lent que le WT). Les 20 clones sélectionnés possèdent tous une mutation parmi les suivantes : E35G, V44A, D117G, E128G, F149S et D153G. Ces mutations sont situées soit au voisinage des EF-hands soit sur des résidus liant le calcium. Quatre des six mutations résultent dans la suppression d'une chaîne latérale liant le calcium. L'étude de la cinétique de ces mutants ainsi que de leur sensibilité calcique est donnée dans l'article 2.

Au fil de trois cycles de mutagenèse-sélection, deux mutations K17R et Q168R sont devenues prédominantes dans la population de mutants Bright. Les autres mutations Bright isolées étaient V25I, V25A, N26D, H27N et L170I. Tous ces mutants présentaient une bioluminescence en bactérie supérieure à celle du WT. De toutes les combinaisons obtenues et testées, c'est le double mutant K17R&Q168R qui présentait l'intensité de bioluminescence la plus élevée. Les mutations Bright étaient localisées dans l'EF1 ou aux voisinages des résidus His16 et His169 qui interviennent dans la liaison de la coelentérazine. Elles impliquent des résidus conservés chez les photoprotéines.

Afin de caractériser les mutations Bright (K17R, N26D, Q168R et L170I) et SloDK (E35G, V44A, D117G, E128G, F149S et D153G), les protéines comportant une seule mutation ont été produites en système acellulaire pour être étudiées *in vitro*. Aucun des mutants Bright n'a montré ainsi une bioluminescence plus élevée que le WT. Cela a été confirmé par des mesures faites sur protéines purifiées et en expression eucaryote (HEK293, non décrit dans l'article). Aucun phénotype n'a pu être trouvé chez le mutant K17R pouvant expliquer sa prédominance parmi les mutants Bright. Le mutant N26D présente une sensibilité calcique plus grande que le WT (cf. article 2). Ceci peut conduire à une réponse plus grande lorsque le calcium est ajouté aux bactéries, ce qui expliquerait sa sélection lors du criblage.

### **2.1.2 THERMOSTABILITE**

Lors de la recherche des phénotypes ayant pu mener à la sélection des mutants Bright, la stabilité des photoprotéines mutantes a été examinée. Les photoprotéines

mutantes Q168R et L170I présentait une stabilité thermique à 37°C plus grande que le WT avec un effet additif chez la protéine double mutant Q168R&L170I. Cette dernière conserve 50% de son activité totale de bioluminescence après 72h à 37°C (4h pour le WT). De manière cohérente, les mutants Q168R, L170I et Q168R&L170I possèdent une température de demi-inactivation plus élevée que celle du WT (respectivement 53°C, 48°C et 57°C versus 44°C). Les mutations SloDK ont peu d'effet sur la thermostabilité de la protéine à l'exception de la mutation F149S qui diminue la thermostabilité par rapport au WT.

Une banque de mutants des résidus Gln168 et Leu170 a été réalisée avec des oligonucléotides dégénérés sur les codons correspondants. Cette banque de mutants a été exprimée dans *E. coli* et criblée pour la résistance à un choc thermique à 55°C pendant 30 minutes. Le criblage de cette banque a confirmé le rôle des résidus Gln168 et Leu170 dans la thermostabilité de l'aequorine. De plus, elle a également révélé que la thermostabilité la plus grande était obtenue avec les mutations Q168R et L170I qui avaient été précédemment sélectionnées par évolution *in vitro*.

### 2.1.3 DECLenchement DE LA BIOLUMINESCENCE PAR LIAISON DU $Ca^{2+}$ A L'EF3

Les résultats précédents montrent que l'EF3 joue un rôle important dans thermostabilité et dans la cinétique de la bioluminescence (cf. article 2). En effet, les positions Gln168 et Leu170 encadrent l'His169, qui lie la coelentérazine, et se situent donc à l'interface entre la liaison du calcium et l'émission de lumière. Le remplacement du résidu polaire Gln168 par un résidu arginine chargé positivement permettrait de former de nouvelles interactions attractives avec le reste du squelette protéique en plus des liaisons hydrogène. Cela permettrait d'augmenter la thermostabilité en limitant les mouvements de la partie C terminale de la protéine. D'autre part, le résidu Phe149 qui se trouve en amont de l'EF3, interagit avec des résidus des EF2 et 3 ainsi qu'avec le Trp129 qui lie la coelentérazine. Ainsi la mutation F149S pourrait provoquer une rupture de la liaison entre les EF2, EF3 et le Trp129 conduisant à la déstabilisation locale de l'aequorine et réduire les l'effet des changements conformationnels induits par la liaison du  $Ca^{2+}$ . Cela pourrait rendre compte du phénotype SloDK et de la thermolabilité du mutant F149S.

Ceci nous a conduits à proposer que la liaison du calcium à l'EF3 provoque la rupture des liens EF3-Gln168 et Phe149-Trp129. Ces changements pourraient déstabiliser les interactions de la Tyr184 (qui forme une liaison hydrogène avec His169) et Trp129 avec l'hydroperoxyde de coelentérazine. Les effets coordonnés de l'EF3 sur ces résidus déclencherait efficacement l'émission de lumière. Cependant, la coelentérazine interagit

avec d'autres résidus situés au voisinage des autres EF-hands. La position des mutations SloDK suggère que chacune des trois EF-hands lie effectivement le calcium et déclenche la bioluminescence.

ARTICLE 1 : THERMOSTABLE MUTANTS OF THE PHOTOPROTEINE AEQUORIN OBTAINED BY *IN VITRO* EVOLUTION

# Thermostable Mutants of the Photoprotein Aequorin Obtained by *in Vitro* Evolution\*

Received for publication, May 16, 2005, and in revised form, June 21, 2005 Published, JBC Papers in Press, June 22, 2005, DOI 10.1074/jbc.M505303200

Keisuke Tsuzuki, Ludovic Tricoire, Olivier Courjean, Nathalie Gibelin, Jean Rossier, and Bertrand Lambolez<sup>1</sup>

From the Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire, CNRS UMR 7637, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, 75005 Paris, France

Aequorin is a photoprotein that emits light upon binding calcium. Aequorin mutants showing increased intensity or slow decay of bioluminescence were isolated by *in vitro* evolution combining DNA shuffling and functional screening in bacteria. Luminescence decay mutants were isolated at the first round of screening and carried mutations located in EF-hand calcium binding sites or their vicinity. During *in vitro* evolution, the luminescence intensity of the population of mutants increased with the frequency of effective mutations whereas the frequency of other amino acid substitutions remained roughly stable. Luminescence intensity mutations neighbored the His-16 or His-169 coelenterazine binding residues or were located in the first EF-hand. None of the selected mutants exhibited an increase in photon yield when examined in a cell-free assay. However, we observed that two mutants, Q168R and L170I, exhibited an increase of the photoprotein lifetime at 37 °C that may underlie their high luminescence intensity in bacteria. Further analysis of Q168R and L170I mutations showed that they increased aequorin thermostability. Conversely, examination of luminescence decay mutants revealed that the F149S substitution decreased aequorin thermostability. Finally, screening of a library of random Gln-168 and Leu-170 mutants confirmed the involvement of both positions in thermostability and indicated that optimal thermostability was conferred by Q168R and L170I mutations selected through *in vitro* evolution. Our results suggest that Phe-149 and Gln-168 residues participate in stabilization of the coelenterazine peroxide and the triggering of photon emission by linking the third EF-hand to Trp-129 and His-169 coelenterazine binding residues.

The photoprotein aequorin, isolated from the jellyfish *Aequorea victoria*, is a bioluminescent complex formed with the protein apoaquorin and the prosthetic factor coelenterazine that emits light upon calcium binding (1, 2). Aequorin belongs to the family of calcium-dependent luciferase/luciferin systems (3) and has been extensively used as a Ca<sup>2+</sup> reporter in living cells (4) or as a luminescent label in binding assays (5). The 189-amino acid polypeptide apoaquorin contains three EF-hand Ca<sup>2+</sup> binding sites located close to the N terminus (EF1) and the C terminus (EF2, -3 pair) of the protein (6, 7). As in other luciferase/luciferin systems (3, 8) aequorin bioluminescence involves the formation of an oxygenated reaction intermediate. In the case of aequorin, this is a slow process (9) resulting in the formation of a coelenterazine per-

oxide (10) that is stabilized in the hydrophobic core of the protein through interactions with several amino acid residues (11). The binding of Ca<sup>2+</sup> leads to the fast release of a photon with a quantum yield of 0.23 at 25 °C because of the final oxidization of coelenterazine (1). Aequorin bioluminescence thus occurs as a flash in which intensity and exponential decay kinetics depend on calcium concentration (12, 13). Site-directed mutagenesis (14–19) and crystal structure (11, 20) have suggested differential roles of the three EFs and identified key residues involved in aequorin bioluminescence.

Bioluminescence provides a simple readout for mutant selection, and early studies have demonstrated the usefulness of random mutagenesis to investigate specific luciferase properties (21, 22). Nonetheless, relatively few reports have used this approach, and none of them deals with calcium-dependent photoproteins (21–27). Here, we used a random mutagenesis and *in vitro* evolution approach based on DNA shuffling (28) to isolate functional aequorin mutants with a simple bacterial screening system. This resulted in the selection of aequorin mutants characterized by an increased luminescence in bacterial screening (Bright mutants) or by slow decay kinetics of bioluminescence (SloDK mutants). Most of the Bright and SloDK mutants selected exhibited modifications of Ca<sup>2+</sup> sensitivity and/or decay kinetics that will be described elsewhere. In the present study we investigated the stability of the coelenterazine-apoaquorin complex formed by Bright and SloDK mutants. Our results provide insights into mechanisms that stabilize the apoaquorin-coelenterazine complex and enable calcium-dependent photon emission.

## MATERIALS AND METHODS

**Random Mutagenesis and *in Vitro* Evolution of Aequorin**—Random mutagenesis by DNA shuffling was performed essentially as described previously (28). Our WT<sup>2</sup> apoaquorin (GenBank<sup>TM</sup> accession number AY601106, kind gift from Dr. T. Pozzan) differs from the natural gene product by 10 additional amino acids at the N terminus. However, we retained the sequence numbering of the natural gene product (6). Three  $\mu$ g of the WT apoaquorin cDNA (coding sequence, 600 bp) was digested with DNase I (1 ng/ $\mu$ l) at 25 °C for 7 min. DNA fragments between 50 and 300 bp were purified from a 2% agarose gel using the Qiaquick gel extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), and 1  $\mu$ g was used in a primerless PCR (35 cycles: 94 °C, 30 s; 45 °C, 30 s; 72 °C, 30 s) for DNA shuffling. A 2.5- $\mu$ l aliquot of the shuffling reaction was used in a new PCR (20 cycles: 94 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 40 s) with sense primer UpAeq 5'-CGGGTACCGATGCTTTATGATGTTCTT-GAT-3' and antisense primer LoAeq 5'-TGGAATTCCTTAGGGGACAGCTCCAC-3' to obtain a pool of mutant full-length cDNA (start and stop codons underlined). After digestion by KpnI and EcoRI, mutant apoaquorin cDNAs were inserted into the bacterial expression

\* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank<sup>TM</sup>/EBI Data Bank with accession number(s) AY601106.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Neurobiologie des Processus Adaptatifs, CNRS UMR 7102, Université Pierre et Marie Curie, 9 quai St Bernard, 75005 Paris, France. Tel.: 33-1-44-27-25-09; Fax: 33-1-44-27-25-84; E-mail: bertrand.lambolez@snv.jussieu.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: WT, wild type; RTS, rapid translation system; RLU, relative luminescence units.

TABLE ONE

## Random mutagenesis and in vitro evolution of Bright aequorin mutants

	Selected Bright clones			Random, 1st round
	1st round	2nd round	3rd round	
Sequenced clones	14	34	34	16
Total mutations	19	72	105	16
Mean of total per clone	1.36	2.12	3.09	1.00
Bright mutations	12	50	77	0
Silent mutations	4	11	19	5
Amino acid substitutions other than Bright	3	11	9	11
Mean of other substitutions per clone	0.21	0.32	0.26	0.69
Nucleotide substitution				
A→G or T→C	15	52	81	9
A→T or T→A	0	4	7	1
A→C or T→G	0	2	1	2
C→G or G→C	0	0	0	0
C→A or G→T	1	1	7	1
C→T or G→A	3	13	9	3

plasmid pPD16 (29) under control of the Plac promoter and used to transform the XL1 *Escherichia coli* strain (Stratagene, La Jolla, CA). Bacteria were grown overnight at 37 °C on an LB agar plate containing ampicillin, 100 µg/ml. Next, single colonies were transferred to 96-well plates either manually or using a QBot automated colony picker (Genetix, New Milton, UK). Every second plate contained only 95 mutant colonies plus 1 colony of WT aequorin as a control. Colonies were grown overnight at 37 °C in 200 µl of a medium supplemented with ampicillin containing (in g/liter): bacto-tryptone, 26; bacto yeast extract, 10; NaCl, 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.27; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.16; sodium citrate, 2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.9; glycerol, 50. Finally, 96-well plate replicas were grown for 4–6 h at 37 °C in 50 µl of LB ampicillin medium. Aequorin was then reconstituted by adding 50 µl of a solution containing 100 mM Tris (pH 8), 90 mM NaCl, 5 µM coelenterazine (Prolume, Pinetop, AZ) and incubating overnight at 4 °C in the dark. After equilibration at room temperature for 15 min, screening was performed in a PhL microplate luminometer (Mediator, Vienna, Austria) upon addition of 100 µl of a solution containing Triton X-100, 0.75% and CaCl<sub>2</sub>, 15 mM. Luminescence amplitudes are given in relative luminescence units (RLU), with 1 RLU corresponding to 1000 photomultiplier counts/s. Results are expressed as mean ± S.E. After screening, selected clones were plated, and single colonies were grown in 96-well plates as duplicate or triplicate in parallel with WT aequorin. Their bioluminescence was then compared again with that of WT aequorin using the above protocol.

For *in vitro* evolution of Bright mutants, the apoaquorin cDNAs of the 40 mutants showing the highest light intensity were mixed in equal proportions and co-amplified using the UpAeq and LoAeq primers. 3 µg of the amplification product was used for the next round of shuffling-screening as described above.

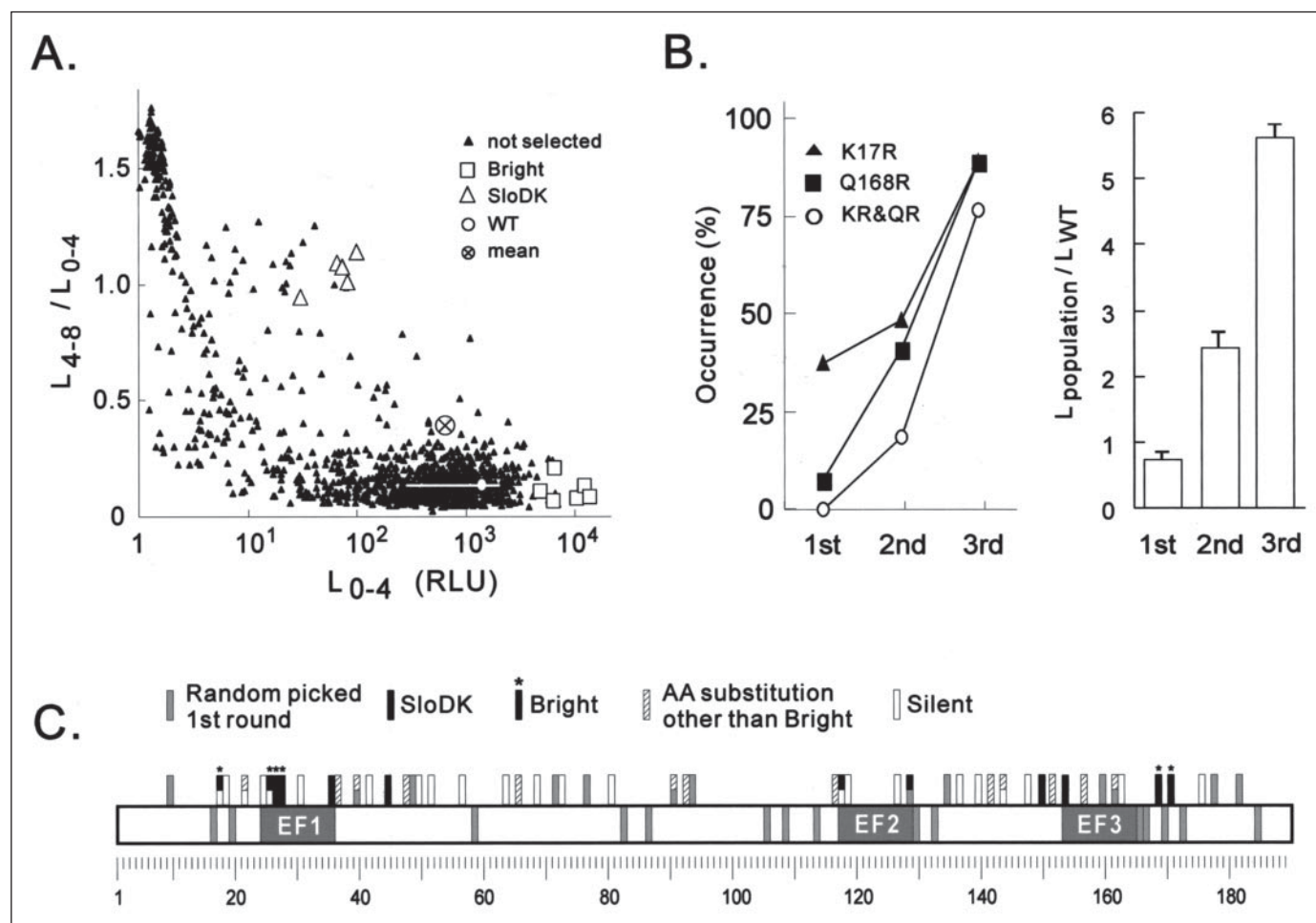
**Library of Gln-168 and Leu-170 Mutants**—First, a unique MluI site (bold in following primers) was created upstream of the Gln-168 codon by introducing silent mutations in the WT apoaquorin cDNA carried by the plasmid pPD16. Then, mutagenesis of the Gln-168 and Leu-170 positions (underlined) was performed by a PCR step with sense primer, 5'-GAGATG**ACGCGT**NN(C/G)CATNN(C/G)GGATTTTGGT-3', and the LoAeq antisense primer (20 cycles: 94 °C, 30s, 50 °C, 30s, 72 °C, 30s). The PCR product was used for a further PCR with sense primer, 5'-ATGTTGATGAGATG**ACGCGT**-3' and LoAeq (5 cycles: 94 °C, 30 s, 50 °C, 30 s, 72 °C, 30 s) to avoid mismatches at the Gln-168 and Leu-170 codons. Finally, mutated fragments were inserted between

MluI and EcoRI sites of the pPD16-apoaquorin plasmid. The resulting library was processed and screened as described above for shuffled aequorin mutants, except aequorin was reconstituted by adding 50 µl of a solution containing 100 mM Tris (pH 8), 90 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 µM coelenterazine. A heat shock (55 °C, 30 min) was applied to aequorin-containing bacteria before light intensity was measured.

**Functional Analysis of Apoaquorin Mutants**—The KpnI-EcoRI full-length coding sequences of WT and mutant apoaquorins were sub-cloned into the pRSETc expression vector (Invitrogen). This resulted in the addition of 40 amino acids at the N terminus, including a His<sub>6</sub> tag for purification. Cell-free expression of apoprotein was performed using the Rapid Translation System (RTS, Roche Diagnostics). The reaction proceeded for 24 h at 30 °C, with stirring at 135 rpm, using 10 µg of recombinant pRSETc plasmid. The product of the reaction was then diluted 1:1 in glycerol, and this working stock was stored at -20 °C. Relative amounts of WT and mutant apoaquorins in RTS reaction products were determined by immuno-Western blot analysis using an anti-His<sub>6</sub> peroxidase antibody (Roche Diagnostics) revealed with the ECL Western blotting analysis system (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Relative maximum photon yield of WT and mutant aequorins was determined by normalizing the integral of the light emitted at saturating Ca<sup>2+</sup> concentration to relative amounts of the corresponding apoproteins.

Aequorin was reconstituted for 1 h at 4 °C in the presence of 10 mM 1,4-dithiothreitol, 50 mM Tris (pH 8), 5 mM EDTA, and 5 µM coelenterazine and then diluted 20 times into Tris (pH 8, 50 mM) and EDTA (5 mM) to minimize luminescence background because of unincorporated coelenterazine. Fifty µl of this solution (corresponding to 0.2 µl of apoaquorin working stock) was used per well for functional analysis performed in 96-well plates with a PhL microplate luminometer.

For investigation of aequorin lifetime at 37 °C, all aliquots were initially stored at 4 °C and sequentially transferred at 37 °C so as to stop all incubations simultaneously. For thermostability at different temperatures, aliquots were incubated at 25, 37, 42, 48, 54, or 60 °C for 30 min. For recovery from thermal inactivation, undiluted aequorin aliquots were incubated at 60 °C for 30 min. Then, aequorin was reconstituted for 1 h at 4 °C by adding 10 mM 1,4-dithiothreitol and 5 µM coelenterazine. These aliquots were then diluted as described above, and their activity was compared with that of control aliquots kept at 4 °C during the heat shock and reconstitution process.



**FIGURE 1. Isolation of Bright and SloDK aequorin mutants.** A, distribution of 1146 bacterial clones expressing shuffled aequorin mutants corresponding to twelve 96-well plates screened for initial light intensity ( $L_{0-4}$ ) and decay kinetics ( $L_{4-8}/L_{0-4}$ ) during the first round. White circle and bars indicate the mean and standard deviation for six measurements of WT aequorin activity. Circle enclosing a cross indicates the mean of shuffled clones. Note that Bright mutants selected exhibited a high  $L_{0-4}$  value with fast decay kinetics, whereas SloDK mutants showed slow decay kinetics. B, left, spread of K17R and Q168R mutations during *in vitro* evolution as judged from their occurrence in clones sequenced in first ( $n = 14$ ), second ( $n = 34$ ), and third ( $n = 34$ ) rounds. KR&QR denotes the double K17R and Q168R mutant. Right, mean activity of the mutant population relative to WT. Each value derives from a sample of 9550 screened clones and has been normalized against the mean of 50 WT aequorin measurements (error bars represent S.E.). C, positions on the aequorin sequence of mutations found in the present study. Gray boxes and gray bars inside the aequorin sequence box denote EF-hand calcium binding sites and coelenterazine binding residues, respectively. Note that Bright mutations distributed in the N- and C-terminal peptides and flanked the His-16 and His-169 coelenterazine binding residues or affected EF1. In contrast, SloDK mutations of apoaequorin were located in the sequence between EF1 and EF3, at the borders of EF-hands or in their vicinity.

Following equilibration at room temperature for 15 min, aequorin activity was measured at 22 °C by injecting 100  $\mu$ l of a solution containing 50 mM Tris (pH 8), 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 5 mM EDTA. Luminescence data were collected with 0.1 s integration time. In our PhL luminometer, injection of 100  $\mu$ l of solution required 280 ms, and recording started 365 ms after the beginning of injection during the decay phase after luminescence onset ( $\sim 10$  ms, see Ref. 12). Hence, bioluminescence intensities were measured at the start of the recording unless otherwise stated. Each value represents the mean of at least two experiments performed in triplicate. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.

Some of the lifetime and thermostability experiments presented in this study for RTS-expressed apoaequorins were confirmed with purified proteins that yielded the same results (WT, K17R, and Q168R). Purified apoaequorins were obtained from recombinant pRSETc plasmids expressed in the BL21DE3(pLys) strain of *E. coli*, using the Xpress purification kit (Invitrogen) with a His<sub>6</sub> affinity Probond column (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Purified proteins were used as described above for RTS-expressed apoaequorin.

**Local Environments of Residues at Amino Acid Positions 149 and 168—**Distances between atoms were obtained from the crystal structure of WT

aequorin (Protein Data Bank code 1EJ3, see Ref. 11) or from the predicted three-dimensional structures of the Q168R and F149S aequorin mutants. Predictions were performed by homology modeling through the Geno3D server (see Ref. 30) based on spatial restraints in the crystal structure of WT aequorin.

## RESULTS

**Isolation of Bright and SloDK Aequorin Mutants—**A library of aequorin mutants was generated by DNA shuffling and expressed in *E. coli* (see "Materials and Methods"). The mean number of nucleotide mutations was 1 per molecule, as determined by sequencing 16 randomly picked clones (TABLE ONE). In this sample, the occurrence of A $\rightarrow$ G or T $\rightarrow$ C substitutions was highest, whereas C $\rightarrow$ G or G $\rightarrow$ C substitutions were not found. The absence of these latter substitutions in apoaequorin mutants selected through functional screening confirmed their low occurrence in the library. The distribution of these nucleotide substitutions spanned most of the aequorin sequence (Fig. 1C). No nucleotide deletion or addition was observed in any clone sequenced in this study.



TABLE TWO

**Relative bioluminescence in bacteria of Bright mutants compared with that of WT aequorin**

Luminescence was measured during the first 4 s after injection of  $\text{Ca}^{2+}$ . Numbers of measurements are indicated. For some mutants, values derive from several independently selected clones (e.g. 10 clones for K17R value). For each clone, measurement of WT aequorin ( $n = 6$ ) was performed in parallel.

Bright mutation	$I_{0-4}$ activity/WT
K17R	$13 \pm 2$ ( $n = 21$ )
V25A	$10 \pm 2$ ( $n = 3$ )
N26D	$13 \pm 2$ ( $n = 16$ )
H27N	$18 \pm 3$ ( $n = 5$ )
Q168R	$11 \pm 3$ ( $n = 6$ )
L170I	$16 \pm 4$ ( $n = 4$ )
K17R + N26D	$14 \pm 2$ ( $n = 8$ )
K17R + Q168R	$25 \pm 9$ ( $n = 22$ )
K17R + L170I	$8 \pm 2$ ( $n = 8$ )
V25I + Q168R	$20 \pm 8$ ( $n = 3$ )
V25I + L170I	$24 \pm 3$ ( $n = 4$ )
N26D + Q168R	$8 \pm 1$ ( $n = 16$ )
H27N + Q168R	$13 \pm 5$ ( $n = 4$ )
K17R + N26D + Q168R	$14 \pm 3$ ( $n = 8$ )
K17R + H27N + Q168R	$11 \pm 2$ ( $n = 12$ )
KR + HN + QR + LI	$14 \pm 3$ ( $n = 4$ )

After reconstitution with coelenterazine, 15,853 clones were screened in a luminometer by applying a  $\text{Ca}^{2+}$ -Triton solution onto intact bacteria (see "Materials and Methods"). The light emitted during the first 4 s after injection ( $L_{0-4}$ ) and during the 4 following s ( $L_{4-8}$ ) was measured. As aequorin flash bioluminescence follows an exponential decay, the  $L_{4-8}/L_{0-4}$  ratio is an index of decay kinetics. Screening is illustrated in Fig. 1A for a sample of 1146 clones. This sample population exhibited lower activity ( $640 \pm 30$  RLU) and slower kinetics ( $L_{4-8}/L_{0-4} = 0.39 \pm 0.01$ ) than WT ( $1433 \pm 417$  RLU and  $0.10 \pm 0.01$ , respectively,  $n = 6$ ). Given a mean number of one mutation per molecule, this indicates that a large proportion of amino acid substitutions affects aequorin bioluminescence and its kinetics. Mutants showing a high  $L_{0-4}$  activity as compared with WT aequorin were selected and termed Bright. Mutants with a high  $L_{4-8}/L_{0-4}$  value as compared with WT, i.e. with slow decay kinetics, were termed SloDK.

Selected SloDK mutants showed strikingly slower decay kinetics than WT (not shown). The 20 SloDK mutants showing the highest  $L_{4-8}/L_{0-4}$  and  $L_{0-4}$  values were sequenced. Clones contained a single substitution that consisted of the E35G, V44A, D117G, E128G, F149S, or D153G mutation, located in EFs or their vicinity (Fig. 1C). Four of six types of SloDK mutations consisted of an Asp or Glu to Gly substitution at the end of EF1–3. These mutations presumably affect EF  $\text{Ca}^{2+}$  affinity, but they also increase the flexibility of the EF peptide bond to its neighboring  $\alpha$ -helix. Detailed characterization of the decay kinetics and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of SloDK mutants will be reported elsewhere.

The large standard deviation of luminescence amplitudes obtained for WT aequorin (Fig. 1A) suggested that screening stringency was too low to accurately select Bright mutants. This was confirmed by the occurrence of WT aequorin among selected Bright clones ( $n = 2$  of 14 clones sequenced). This prompted us to perform two additional rounds of DNA shuffling and screening aimed at segregating Bright mutants by *in vitro* evolution.

The 40 Bright mutants showing the highest  $L_{0-4}$  activity were used for the next round of shuffling-screening (see "Materials and Methods"). Two additional rounds were performed, with 19,100 and 17,859 clones screened in the second and third rounds, respectively. Fig. 1B shows that two mutations, K17R and Q168R, selected during the *in vitro* evolution

process, eventually combined and spread to be present in 33 of 34 Bright clones selected at the third round. The mean activity of the population increased concomitantly with the relative occurrence of the K17R and Q168R mutations. Consistently, the highest activity was found in the double K17R/Q168R Bright mutant that showed a  $25 \pm 9$ -fold higher activity than WT in our bacterial system (TABLE TWO), indicating that successful adaptation of aequorin to bacterial expression occurred during *in vitro* evolution. Other Bright mutations obtained were V25A, V25I, N26D, H27N, and L170I. TABLE TWO describes their relative activities versus WT aequorin, either as single mutants or in combinations found in selected mutants. All Bright mutations were observed in at least two independently selected clones, with V25A showing the lowest occurrence ( $n = 2$ ). The mean number of Bright mutations per molecule increased during *in vitro* evolution to reach 2.26 at the third round (TABLE ONE), with K17R and N26D remaining as the only single Bright mutations in third round mutants selected. In contrast with N26D and H27N that persisted throughout the *in vitro* evolution process, the V25A and V25I mutations disappeared at the third round suggesting a lower efficiency, at least in combination with other mutations. The increasing number of silent mutations found in selected clones suggests that further mutations were introduced at each round of shuffling (TABLE ONE). Nonetheless, the frequency of other-than-Bright amino acid substitutions remained roughly stable (TABLE ONE), showing that the mutational load was eliminated during *in vitro* evolution, presumably because of deleterious effects on bioluminescence.

Bright mutations of aequorin were all found in EF1 or close to coelenterazine binding residues (Fig. 1C). Indeed, the K17R mutation was flanked by His-16 and Met-19, which are coelenterazine binding residues. Similarly, the Q168R and L170I mutations were located within an  $\alpha$ -helix containing a cluster of residues (Met-165, Thr-166, His-169, and Trp-173) that bind coelenterazine (11). The K17R, N26D, Q168R, and L170I substitutions affected residues conserved among members of the calcium-activated photoprotein family (31–33). In contrast with SloDK mutants, no amino acid substitution expected to decrease EF affinity was observed in the Bright mutants. The distribution of other-than-Bright amino acid substitutions found in selected Bright mutants delineated mutation-free regions of apoaequorin (Fig. 1C) in which modification may be deleterious to bioluminescence. In particular, none of the coelenterazine binding residues (11) or the essential Cys-145, Cys-152, or Cys-180 residues (18) were affected. Indeed, only 13 positions were affected by other-than-Bright substitutions, much less than the 23 silent mutations that distributed more evenly across the sequence. However, the absence of mutation in some parts of the sequence (e.g. between amino acid positions 95 and 115) suggests that amino acid substitution at all possible aequorin positions have not been explored in this study.

**Thermostable Shuffled Mutants**—The functional properties of Bright mutants were next examined with the aim of identifying changes that may explain their increased luminescence in bacteria. Detailed characterizations of K17R, N26D, Q168R, and L170I were carried out in cell-free assays on RTS-expressed proteins (see "Materials and Methods"). None of these mutants showed a higher maximum photon yield than WT (not shown). Given large number of clones ( $n = 52,992$ ) screened during *in vitro* evolution, this suggests that the quantum yield of WT aequorin cannot be increased by single amino acid substitutions.

We first noticed that, in bacteria, the Bright mutants Q168R and L170I showed an extended lifetime at 37 °C as compared with WT (not shown), which could explain their selection by *in vitro* evolution. This property was confirmed in the cell-free assay (Fig. 2A). This was more prominent for the Q168R mutation, and the effects of each mutation were additive in the double Q168R/L170I mutant that retained ~50% of its activity after 72 h at

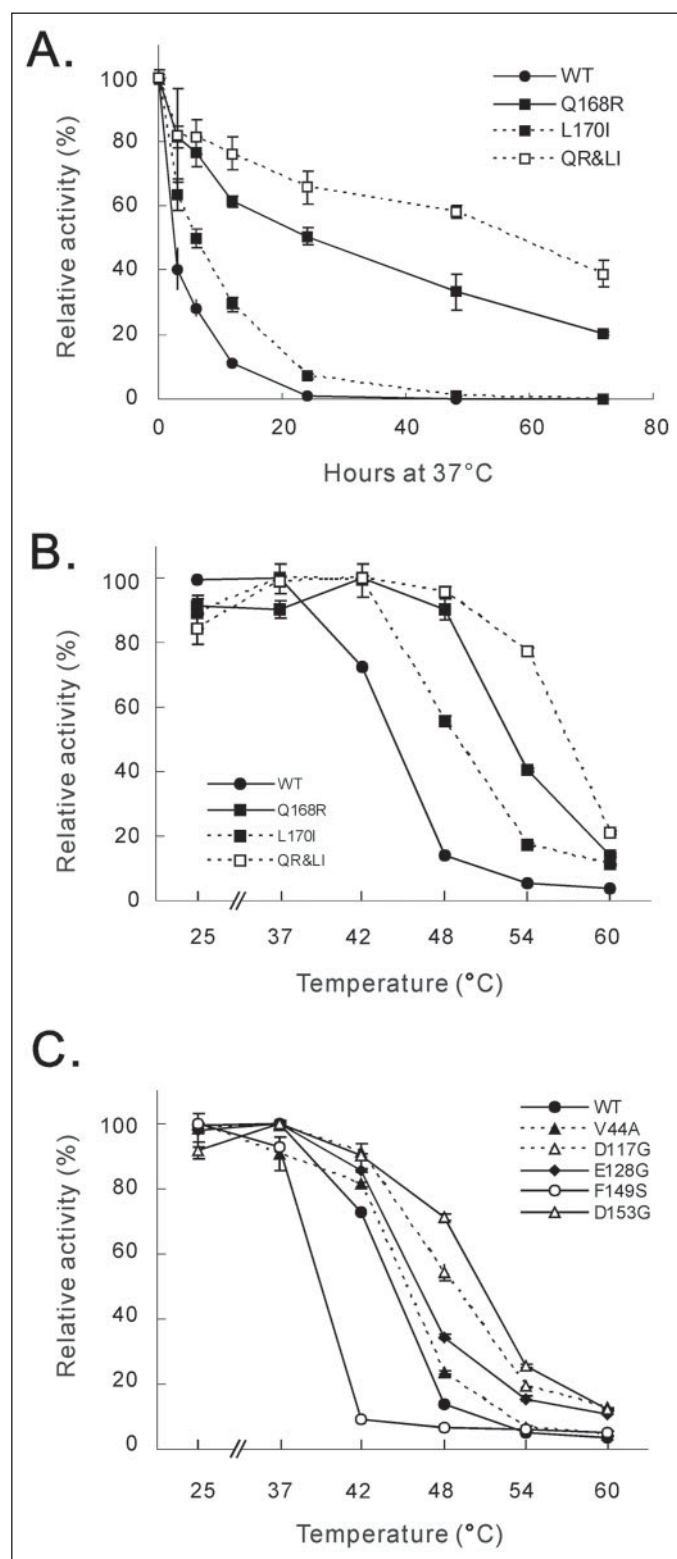


FIGURE 2. **Stability of aequorin mutants.** *In vitro* translated proteins were used in cell-free assays. **A**, lifetime of WT aequorin and Bright mutants. **B**, thermostability of Bright mutants was investigated by applying a 30-min heat shock at indicated temperatures. Note the additive effects of Q168R and L170I mutations in **A** and **B**. **C**, thermostability of SloDK mutants. Note that mutations located in or just upstream of EF3 showed decreased (F149S) or increased (D153G) thermostability. The curve of E35G was almost identical to that of WT and was therefore not plotted. Light intensity was normalized to that of aliquots kept at 4°C (**A**) or to maximal values (**B** and **C**).

TABLE THREE

**Temperature for 50% inactivation of aequorin bioluminescence by a 30-min heat shock**

Experiments were performed on RTS-expressed WT and mutant aequorins. Aequorin activity was measured at 22°C.

Aequorins	$T_{50\%}$ °C
WT	44
E35G	44
V44A	45
D117G	49
E128G	46
F149S	39
D153G	51
Q168R (RHL)	53
L170I	48
Q168R + L170I (RHI)	57
Q168R + L170V (RHV)	57
Q168R + L170M (RHM)	51.5
Q168A + L170V (AHV)	51.5
Q168K + L170V (KHV)	51.5

37°C (4 h for WT). Free energies deduced from inactivation curves of photoproteins at 37°C were  $98.7 \pm 0.2$ ,  $99.9 \pm 0.1$ ,  $103.6 \pm 0.2$ , and  $105.2 \pm 0.3$  kJ/mol for WT, L170I, Q168R, and Q168R/L170I aequorins, respectively. The K17R mutant showed a lifetime at 37°C identical to that of WT aequorin. Thermostability was next investigated by applying a 30-min heat shock at different temperatures. Consistent with their extended lifetime, the Q168R and L170I mutants were resistant to higher temperatures than WT (Fig. 2B). This effect was more pronounced for Q168R, and the effects of each mutation were additive in the double Q168R/L170I mutant, which retained  $77 \pm 1\%$  of its activity after a 54°C heat shock (Fig. 2B). Temperatures for 50% inactivation ( $T_{50\%}$ ) interpolated from thermostability curves of WT and mutant aequorins are given in TABLE THREE. The thermostabilities of the K17R and N26D mutants were identical to that of WT aequorin. The same lifetime and thermostability experiments performed on purified WT, K17R, and Q168R aequorins (see "Materials and Methods") yielded similar results (not shown).

The increased stability conferred by the Q168R and L170I mutations presumably resulted from stabilization of the local aequorin structure surrounding His-169 and other C-terminal coelenterazine binding residues. We thus anticipated that some SloDK mutations, which may affect the rigidity of the protein scaffold (e.g. Asp/Glu to Gly mutations in EF1–3), may alter aequorin thermostability. Strikingly, the largest effects on thermostability were observed for SloDK mutations of the EF3 domain (Fig. 2C). Indeed, the F149S mutant showed decreased thermostability, whereas D153G substantially increased aequorin thermostability. In contrast, EF1 mutations had little or no effect (V44A and E35G, respectively), and both EF2 mutations (D117G and E128G) moderately increased aequorin thermostability (Fig. 2C).  $T_{50\%}$  values obtained for all SloDK mutants are summarized in TABLE THREE.

Following thermal inactivation of photoproteins for 30 min at 60°C, the bioluminescence of WT aequorin and of the F149S, Q168R, and L170I mutants could be restored to almost control levels by reconstitution with coelenterazine (see "Materials and Methods"). Indeed, heat-inactivated WT, F149S, Q168R, L170I, and Q168R/L170I aequorins recovered  $91 \pm 4$ ,  $104 \pm 2$ ,  $93 \pm 4$ ,  $89 \pm 4$ , and  $100 \pm 8\%$  of their activity after reconstitution, respectively. This observation, together with the smooth temperature dependence of the heat inactivation curve (Fig. 2, B and C), suggests that bioluminescence inactivation did not result from apoprotein denaturation.



The characterization of the sensitivity of bioluminescent responses of the mutants to  $\text{Ca}^{2+}$  concentration will be reported elsewhere. This revealed that N26D exhibited a higher sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  than WT aequorin, which could explain its Bright phenotype in bacterial cells. In contrast, no change was observed for K17R, whereas Q168R and L170I showed a lower  $\text{Ca}^{2+}$  affinity than WT aequorin.

**Random Substitutions of Gln-168 and Leu-170 Residues**—The above results suggest that the EF3 domain is critically involved in both bioluminescence thermostability and decay kinetics. Structural correlates of these properties were further investigated at the key  $^{168}\text{QHL}^{170}$  spot. Indeed, these amino acids are at the interface between EF3 calcium binding residues and coelenterazine and may thus constitute an essential trigger of photon emission. This spot was explored using a library of random Gln-168 and Leu-170 mutants expressed in *E. coli* (see “Materials and Methods”). Analysis of 500 clones showed that the mean  $L_{0-4}$  activity was reduced to 5% of WT, indicating that most Gln-168 or Leu-170 substitutions disrupt aequorin function, consistent with a direct role of  $^{168}\text{QHL}^{170}$  in bioluminescence. Subsequently, 3840 clones were screened for resistance to a 30-min heat shock at 55 °C (see “Materials and Methods”) and for decay kinetics of light emission as described for shuffled mutants. Among 191 heat-resistant clones, 29 were selected that showed a range of decay kinetics similar to that of the population of 191 clones. Results pertaining to calcium sensitivity and decay kinetics of selected clones will be reported elsewhere. Amino acids found at position 168 were Arg, Ser, Lys, or Ala and were Ile, Val, Phe, Met, or Leu at position 170. Both Bright mutations Q168R and L170I were isolated using this procedure, and the WT Gln-168 residue was never found in thermostable mutants, confirming this position as critical for thermostability. Only hydrophobic residues were observed at position 170. Mutants at the  $^{168}\text{QHL}^{170}$  triplet are designated by their amino acid sequence (e.g. RHI is the double Q168R/L170I mutant).

Thermostability was characterized in the cell-free assay on RTS-expressed proteins as described above.  $T_{50\%}$  values, investigated for four mutants, were 57 °C for RHV and 51.5 °C for AHV, RHM, and KHV (TABLE THREE). Comparison between AHV, KHV, and RHV indicates that at position 168, the highest thermostability was conferred by the Gln→Arg substitution. The increased thermostability observed following the order RHM < RHL < RHV = RHI indicates that at position 170, Ile or Val conferred optimal thermostability. These results confirm the importance of both amino acid positions 168 and 170 in aequorin stability. They further indicate that maximal stability was reached with the RHI mutant that combines the Q168R and L170I mutations selected through *in vitro* evolution.

## DISCUSSION

Screening a library of random mutants is a means to explore an entire protein sequence to identify amino acids involved in specific functional properties without *a priori* knowledge of its structure-activity relationships (34, 35). In the present study, this allowed identification of key residues throughout the apoaquorin sequence and assessment of the functional relevance of conservative substitutions (e.g. V44A and L170I). The subsequent use of site-directed random mutagenesis proved useful in exploring amino acid diversity at the Gln-168 and Leu-170 spots. Mutations selected appeared to preserve the overall aequorin structure and function. Importantly, none of the residues reportedly involved in the coelenterazine binding and oxidization process (11, 18) were affected in selected mutants, confirming their absolute requirement for aequorin bioluminescence.

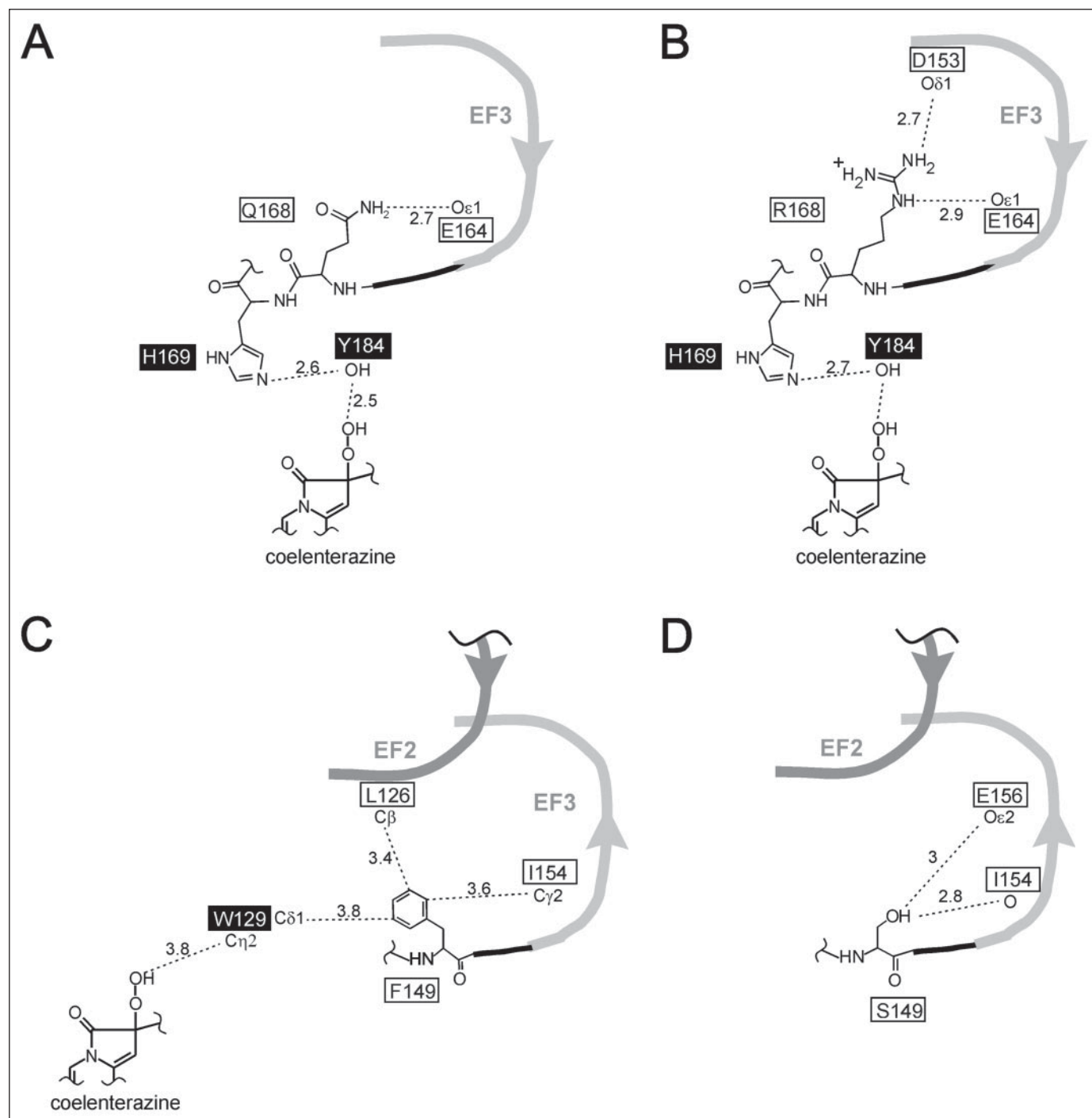
**Random Mutagenesis of Aequorin**—As reported for other proteins (28, 36–41), DNA shuffling efficiently introduced mutations that spanned the entire apoaquorin sequence and recombined these muta-

tions during the *in vitro* evolution process. Several observations indicate that a relatively limited proportion of all functional apoaquorin amino acid substitutions has been explored in this study, despite the large number of mutants screened and the small size of apoaquorin. Indeed, the high occurrence of A→G or T→C and the absence of C→G or G→C substitutions in shuffled mutants indicate a bias in the mutation rate affecting both the type of amino acid substitution and its distribution along the sequence. This bias presumably resulted from *Taq* polymerase and DNase I base preference (42–44). Additionally, no mutation was found in the region between amino acid positions 95 and 115. This may result from the relatively large fragments selected after DNase I treatment (300 bp, see “Materials and Methods”). Indeed, the complete cDNA sequences that are subsequently screened are expected to originate preferentially from the largest fragments during primerless PCR. This is also a likely explanation for the low mean number of mutations in the first round library (one per molecule). Although this low mutation rate favored the isolation of key amino acid substitutions, it did not allow exploration of the combinatorial effect of multiple mutations. Despite these limitations, the present study identifies many amino acids throughout the aequorin sequence that are involved in various functional aspects of bioluminescence, thereby confirming the robustness of DNA shuffling and its usefulness in the study of structure-activity relationships. It is noteworthy that, although generated by different random mutagenesis techniques, most mutations of other luciferases affecting stability, decay kinetics, and/or binding affinity result from single amino acid changes (23–27).

**In Vitro Evolution of Bright Mutants**—The presence of WT aequorin in clones selected in the first round revealed that screening for Bright mutants was performed at low stringency. This presumably resulted from variability in bacterial growth and from the use of the Plac promoter, in which induction starts after exponential growth. The selection pressure was nonetheless sufficient to induce evolution of the mutant population as evidenced by the spread and recombination of Bright mutations, the increase of population activity, and the low level of other-than-Bright mutations.

Strikingly, Bright mutations were distributed exclusively in the N-terminal and C-terminal peptides that are in closest proximity to coelenterazine, in particular for K17R, Q168R, and L170I, which flank the coelenterazine binding residues His-16 and His-169 (11). In contrast, SloDK mutations were all found in the sequence located between EF1 and EF3. Bright mutations maintained throughout the third round affected residues conserved in other photoproteins (31–33), except for H27N. Although no distinctive functional property could be subsequently identified for K17R, its dominance throughout *in vitro* evolution and its position close to His-16 point toward an important role for Lys-17 in aequorin bioluminescence. Two types of functional adaptation to selection in bacteria could be identified in Bright mutants. One is an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  affinity (N26D, not shown) that likely favors maximal luminescence discharge in intact bacterial cells, where  $\text{Ca}^{2+}$  influx upon activation is presumably limited. On the other hand, the selection of the Q168R and L170I mutants probably relates to their increased stability resulting in an extended lifetime in bacteria. Indeed, WT aequorin appears sensitive to the intracellular environment, as its lifetime in eukaryotic cells greatly depends on the subcellular compartment (45). Because none of the Bright mutants were screened for their specific adaptive property, higher calcium sensitivity or thermostability of aequorin may be achieved through other mutations.

Interestingly, in the photoproteins obelin, clytin, and mitrocomin, Val-25 is replaced by Ile (as in our V25I Bright mutant), and His-27 is replaced by Gly or Ser (31–33). The observation that obelin shows lower



**FIGURE 3. Predicted local environment of thermostable Q168R and thermolabile F149S mutations.** Amino acids interacting with coelenterazine are denoted by white letters in filled rectangles. Distances are given in angstroms. *A*, local environment of Gln-168 (Q168) and Phe-149 (F149) in the WT aequorin crystal (11). Note that Gln-168 interacts with EF3 residue Glu-164 (E164), which binds  $\text{Ca}^{2+}$  (48) and that Phe-149 coordinates EF2, EF3, and the Trp-129 (W129) coelenterazine binding residue via hydrophobic interactions. The bond formed by the O $\epsilon$ 1 of Gln-168 with the thiol group of Cys-180 (diameter, 3.5 Å) has been omitted for clarity. *B*, the Q168R substitution may result in the formation of an additional hydrogen bond with the Asp-153 (D153) residue involved in  $\text{Ca}^{2+}$  binding (48), thus explaining its lower affinity and its higher thermostability. Additional bonds of Arg-168 (R168) with the carboxyl groups of Val-151 (distance, 2.7 Å), Cys-152 (distance, 2.9 Å), and Ala-179 (distance, 2.8 Å) have been omitted. *C* and *D*, interactions of Phe-149 with EF2, EF3, and Trp-129 may be replaced in the F149S mutant by hydrogen bonds with the EF3 backbone and the Glu-156 (E156) side chain that do not interact with  $\text{Ca}^{2+}$  (48). This loss of interaction with EF2 and Trp-129 may account for the slow decay kinetics and the thermolability of F149S.

sensitivity to inhibition by  $\text{Mg}^{2+}$  and faster decay kinetics than WT aequorin (46) suggests that similar properties of the V25A, V25I, and H27N Bright mutants may be responsible for their increased  $L_{0-4}$  activity in bacteria. Indeed, a lower sensitivity to  $\text{Mg}^{2+}$  is expected to enhance the aequorin peak response to  $\text{Ca}^{2+}$  (46). Similarly, faster decay kinetics result in an increased luminescence peak amplitude provided

that the maximum photon yield does not change (12), as has indeed been demonstrated for obelin (46).

Aequorin is a small photoprotein specialized in the calcium-dependent emission of light. For all mutants of the present study, identified gain of function was associated with loss of function that consisted in modification of stability, apparent  $\text{Ca}^{2+}$  affinity, or decay kinetics. This indicates that the

flexibility of the aequorin protein space allows gain of function through the interplay between these three functional properties. In contrast, no mutant presenting an increased maximum photon yield was isolated. This suggests that WT apoaquorin is optimized for maximal bioluminescence quantum yield, which would thus be essentially limited by the fluorescence quantum yield of the prosthetic light-emitter coelenterazine (3). This may relate to the energetic cost of coelenterazine and its dietary requirement for *Aequorea* bioluminescence (47).

**Thermostability**—Among residues that interact with coelenterazine (11), a large number are present in the C-terminal peptide. These residues are under the direct influence of EF3 conformational changes and surround Gln-168 and Leu-170, the mutations of which influence thermostability. In particular, His-169 and Tyr-184 are essential to bioluminescence (11, 17) and interact with each other (11). In addition, both Tyr-184 and the Trp-129 that is immediately downstream of EF2 directly interact with the coelenterazine peroxide (11).

In the WT aequorin crystal (11), Gln-168 interacts with the EF3 residue Glu-164 that binds  $\text{Ca}^{2+}$  in WT apoaquorin (48), whereas Phe-149 links EF3 with EF2 and the coelenterazine binding residue Trp-129 (Fig. 3). The opposite effects of Q168R and F149S on thermostability can be tentatively interpreted in this structural context using predictions of their local environments (see “Materials and Methods” and Fig. 3). Indeed, the Q168R substitution may result in the formation of an additional hydrogen bond with the EF3 residue Asp-153 that binds  $\text{Ca}^{2+}$  in WT apoaquorin (48). This may increase thermostability by restricting movements of the C-terminal peptide and provides an explanation for the reduced  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of the Q168R mutant. In the F149S mutant, disruption of the link between EF2, EF3, and Trp-129 may destabilize this aequorin subdomain and reduce the effect of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced EF conformational changes. This may account for the slow decay kinetics and the thermolability of the F149S mutant.

**Triggering of Photon Emission by  $\text{Ca}^{2+}$  Binding to EF3**—The present study describes multiple mutations of EF3 and surrounding residues that induce modifications in  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, thermostability, and decay kinetics. These findings challenge previous reports suggesting that this EF may not trigger bioluminescence (18, 20). However, crystal structures of  $\text{Ca}^{2+}$ -bound apoaquorin and apo-obelin show that EF3 indeed binds  $\text{Ca}^{2+}$  (48). In addition, all of our data strongly indicate that EF3 plays a key role in the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent bioluminescence of aequorin. Based on these results, we propose that  $\text{Ca}^{2+}$ -induced conformational changes of EF3 disrupt the Glu-164–Gln-168 and Phe-149–Trp-129 bonds. Indeed, these bonds are not present in the  $\text{Ca}^{2+}$ -bound apoaquorin and apo-obelin crystals (48). These changes may then destabilize Tyr-184 (which forms a hydrogen bond with His-169) and Trp-129 interactions with the coelenterazine peroxide. The coordinated effects of EF3 on these coelenterazine binding residues may be an efficient trigger of aequorin bioluminescence. Nonetheless, structural interactions within the photoprotein scaffold and coordination of coelenterazine binding by multiple EF-neighboring residues (11, 20, 48, 49) indicate that EFs are interdependent for  $\text{Ca}^{2+}$  affinity and triggering efficiency. Indeed, the positions of SloDK mutations in apoaquorin suggest that each of the three EF domains of photoproteins may efficiently bind  $\text{Ca}^{2+}$  and trigger bioluminescence.

**Acknowledgments**—We thank Tullio Pozzan, Andrea Grant, Stephen Harris, Stephen Rees, Philippe Glaser, and Daniel Bruscianno for their valuable help.

## REFERENCES

- Shimomura, O., and Johnson, F. H. (1970) *Nature* **227**, 1356–1357
- Shimomura, O., Johnson, F. H., and Morise, H. (1974) *Biochemistry* **13**, 3278–3286

- Wilson, T., and Hastings, J. W. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 197–230
- Brini, M., Pinton, P., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1999) *Microsc. Res. Tech.* **46**, 380–389
- Lewis, J. C., and Daunert, S. (2000) *Fresenius' J. Anal. Chem.* **366**, 760–768
- Inouye, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., Takagi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S., Miyata, T., and Tsuji, F. I. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 3154–3158
- Prasher, D., McCann, R. O., and Cormier, M. J. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 1259–1268
- Hastings, J. W., and Gibson, Q. H. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 2537–2554
- Shimomura, O., and Johnson, F. H. (1975) *Nature* **256**, 236–238
- Shimomura, O., and Johnson, F. H. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2611–2615
- Head, J. F., Inouye, S., Teranishi, K., and Shimomura, O. (2000) *Nature* **405**, 372–376
- Hastings, J. W., Mitchell, G., Mattingly, P. H., Blinks, J. R., and Van Leeuwen, M. (1969) *Nature* **222**, 1047–1050
- Moisesescu, D. G., and Ashley, C. C. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **460**, 189–205
- Kendall, J. M., Sala-Newby, G., Ghalaut, V., Dormer, R. L., and Campbell, A. K. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1091–1097
- Nomura, M., Inouye, S., Ohmiya, Y., and Tsuji, F. I. (1991) *FEBS Lett.* **295**, 63–66
- Ohmiya, Y., Ohashi, M., and Tsuji, F. I. (1992) *FEBS Lett.* **301**, 197–201
- Ohmiya, Y., and Tsuji, F. I. (1993) *FEBS Lett.* **320**, 267–270
- Tsuji, F. I., Inouye, S., Goto, T., and Sakaki, Y. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 8107–8111
- Watkins, N. J., and Campbell, A. K. (1993) *Biochem. J.* **293**, 181–185
- Toma, S., Chong, K. T., Nakagawa, A., Teranishi, K., Inouye, S., and Shimomura, O. (2005) *Protein Sci.* **14**, 409–416
- Cline, T., and Hastings, J. W. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 500–504
- Cline, T. W., and Hastings, J. W. (1972) *Biochemistry* **11**, 3359–3370
- Kajiyama, N., and Nakano, E. (1991) *Protein Eng.* **4**, 691–693
- Kajiyama, N., and Nakano, E. (1993) *Biochemistry* **32**, 13795–13799
- White, P. J., Squirrel, D. J., Arnaud, P., Lowe, C. R., and Murray, J. A. (1996) *Biochem. J.* **319**, 343–350
- Hirokawa, K., Kajiyama, N., and Murakami, S. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1597**, 271–279
- Hosseinkhani, S., Szittner, R., and Meighen, E. A. (2005) *Biochem. J.* **385**, 575–580
- Stemmer, W. P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10747–10751
- Fire, A., Harrison, S. W., and Dixon, D. (1990) *Gene (Amst.)* **93**, 189–198
- Combet, C., Jambon, M., Deleage, G., and Geourjon, C. (2002) *Bioinformatics* **18**, 213–214
- Fagan, T. F., Ohmiya, Y., Blinks, J. R., Inouye, S., and Tsuji, F. I. (1993) *FEBS Lett.* **333**, 301–305
- Illarionov, B. A., Bondar, V. S., Illarionova, V. A., and Vysotski, E. S. (1995) *Gene (Amst.)* **153**, 273–274
- Inouye, S., and Tsuji, F. I. (1993) *FEBS Lett.* **315**, 343–346
- Kolkman, J. A., and Stemmer, W. P. (2001) *Nat. Biotechnol.* **19**, 423–428
- Kurtzman, A. L., Govindarajan, S., Vahle, K., Jones, J. T., Heinrichs, V., and Patten, P. A. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 361–370
- Christians, F. C., Scapozza, L., Crameri, A., Folkers, G., and Stemmer, W. P. (1999) *Nat. Biotechnol.* **17**, 259–264
- Crameri, A., Whitehorn, E. A., Tate, E., and Stemmer, W. P. (1996) *Nat. Biotechnol.* **14**, 315–319
- Iffland, A., Tafelmeyer, P., Saudan, C., and Johnsson, K. (2000) *Biochemistry* **39**, 10790–10798
- Leong, S. R., Chang, J. C., Ong, R., Dawes, G., Stemmer, W. P., and Punnonen, J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1163–1168
- Moore, J. C., and Arnold, F. H. (1996) *Nat. Biotechnol.* **14**, 458–467
- Yano, T., Oue, S., and Kagamiyama, H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5511–5515
- Herrera, J. E., and Chaires, J. B. (1994) *J. Mol. Biol.* **236**, 405–411
- Keohavong, P., and Thilly, W. G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 9253–9257
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) *Science* **239**, 487–491
- Badminton, M. N., Sala-Newby, G. B., Kendall, J. M., and Campbell, A. K. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 950–957
- Markova, S. V., Vysotski, E. S., Blinks, J. R., Burakova, L. P., Wang, B. C., and Lee, J. (2002) *Biochemistry* **41**, 2227–2236
- Haddock, S. H., Rivers, T. J., and Robison, B. H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11148–11151
- Deng, L., Vysotski, E. S., Markova, S. V., Liu, Z. J., Lee, J., Rose, J., and Wang, B. C. (2005) *Protein Sci.* **14**, 663–675
- Liu, Z. J., Vysotski, E. S., Chen, C. J., Rose, J. P., Lee, J., and Wang, B. C. (2000) *Protein Sci.* **9**, 2085–2093

## 2.2 PRESENTATION DE L'ARTICLE 2 : "CALCIUM DEPENDENCE OF AEQUORINE BIOLUMINESCENCE DISSECTED BY RANDOM MUTAGENESIS"

Comme décrit dans l'introduction générale, la reconstitution de l'aequorine est un processus lent tandis que la réaction de luminescence est rapide et va jusqu'à son terme en présence de calcium. La bioluminescence apparaît donc comme un pic dont la décroissance est exponentielle. L'amplitude de ce pic augmente avec la  $[Ca^{2+}]$ . La cinétique de la phase de montée est indépendante de la  $[Ca^{2+}]$ . En revanche, la cinétique de la phase de décroissance du signal bioluminescent est dépendante de la  $[Ca^{2+}]$ . Il a été montré précédemment que cette vitesse augmente avec la  $[Ca^{2+}]$  tandis que la quantité totale de photons semble relativement indépendante de la  $[Ca^{2+}]$  (Hastings et coll., 1969). Ceci suggère que l'augmentation du pic de bioluminescence avec la  $[Ca^{2+}]$  résulte de l'accélération de la cinétique de bioluminescence à quantité totale de photons constante.

Dans cette étude, j'ai utilisé les mutants SloDK et Bright qui présentent des modifications de cinétique et/ou de sensibilité calcique afin d'étudier les relations entre la liaison du calcium aux différentes EF-hands et le rôle de la cinétique dans la dépendance au calcium de la bioluminescence.

### 2.2.1 SENSIBILITE CALCIQUE

Les trois mutations au voisinage de l'EF1 (N26D, E35G et V44A) induisent une augmentation de la sensibilité calcique en comparaison avec le WT tandis que les autres mutations situées au voisinage des EF2 et EF3 (D117G, E128G, F149S, D153G, Q168R et L170I) induisent au contraire une diminution de sensibilité calcique. Le résultat paradoxal chez le mutant E35G peut s'interpréter en attribuant une faible affinité à l'EF1 et une haute affinité aux EF2 et 3.

En effet, la mutation N26D augmente l'affinité de l'EF1 par remplacement d'un résidu neutre liant le calcium par un résidu acide chargé négativement. Il est probable que les mutations E35G et V44A suppriment la contribution de l'EF1 au déclenchement de la bioluminescence. En effet, la mutation E35G qui supprime une des chaînes latérales liant le calcium, rend plus flexible le squelette peptidique au point d'ancrage de l'EF1 avec le reste de la protéine. La mutation V44A affecte un des points d'interactions de l'EF1 avec la cavité abritant la coelentérazine.

Les mutations D117G, E128G et D153G, qui affectent des résidus liant le calcium, suppriment la contribution de l'EF2 ou 3 en rendant plus flexible le point d'ancrage de l'EF-hand avec le reste de la protéine. La mutation F149S supprime un lien entre l'EF3 et le

résidu Trp129 et donc affecte la contribution de l'EF3 à la bioluminescence. L'effet de la mutation Q168R résulte probablement de l'interaction entre l'arginine avec plusieurs résidus de l'EF3 liant le calcium (cf. article 1).

L'étude des doubles mutants SloDK, dans lesquels une seule EF-hand reste intacte, confirme la faible affinité calcique de l'EF1 par rapport aux EF2 et 3. Ces doubles mutants émettent de la lumière bien qu'avec une cinétique plus lente que les mutants SloDK. Ceci suggère donc que la luminescence de l'aequorine peut être déclenchée par la liaison d'une seule EF-hand.

A la différence des mutations Bright, toutes les mutations SloDK semblent provoquer la rupture d'un point d'ancrage d'une EF-hand avec le reste de la protéine. Ceci affecterait le déclenchement de la bioluminescence par cette EF-hand et serait responsable de la cinétique observée chez les mutants SloDK.

#### 2.2.2 CINETIQUE DE LA LUMINESCENCE ET QUANTITE TOTALE DE PHOTON

La décroissance de l'intensité de bioluminescence est décrite par la somme de deux exponentielles décroissantes. Une courbe exponentielle peut être définie par sa constante de temps  $\tau$  et par son intégrale ( $\Sigma$  aire sous la courbe, ici, la quantité totale de photon). Ainsi le décours temporel de l'intensité de bioluminescence a été décrit comme la combinaison d'une composante lente ( $\tau_S$ ,  $\Sigma_S$ ) et d'une composante rapide ( $\tau_F$ ,  $\Sigma_F$ ). La quantité totale de photon émis a été calculée comme la somme des intégrales des deux composantes ( $\Sigma_T = \Sigma_S + \Sigma_F$ ).

Pour le WT, la vitesse de décroissance augmente avec la  $[Ca^{2+}]$  tandis que  $\Sigma_T$  reste quasi constant. Il apparaît que cette accélération résulte principalement d'une augmentation du rapport  $\Sigma_F / \Sigma_T$  (contribution de la composante rapide à la bioluminescence). Les évolutions de l'amplitude du pic et de  $\Sigma_F$  avec la  $[Ca^{2+}]$  sont très voisines. Cela indique que l'augmentation de l'amplitude du pic est sous tendue par l'augmentation du rapport  $\Sigma_F / \Sigma_T$ .

L'analyse des mutants SloDK indique que les trois EF-hands participent à l'évolution de ces paramètres. Chez ces mutants, la contribution de la composante rapide à la bioluminescence est négligeable et la vitesse de décroissance n'augmente pas avec la  $[Ca^{2+}]$ . L'augmentation du pic de bioluminescence résulte de l'augmentation de  $\Sigma_T$ .

Chez toutes les formes d'aequorine, même chez les doubles mutants SloDK, on note la présence de deux exponentielles. Ceci semble donc refléter l'existence intrinsèque de deux formes émettrices de l'aequorine.

La constante  $\tau_F$  est comparable entre le WT et les mutants et ne varie pas en fonction de la  $[Ca^{2+}]$ . Chez le WT, la constante  $\tau_S$  varie en fonction de la  $[Ca^{2+}]$ . Cependant ces variations contribuent peu à l'accélération de la cinétique de décroissance.

### 2.2.3 RÔLE DES RÉSIDUS GLN168 ET LEU170 DANS LA CINÉTIQUE DE BIOLUMINESCENCE

Dans l'article 1, nous avons vu que les résidus du site QHL[168-170], qui interagissent à la fois avec l'EF3 et la coelentérazine, participeraient au déclenchement de la bioluminescence par l'EF3. Ils interviendraient donc dans les variations de cinétique avec la  $[Ca^{2+}]$ . En effet, le criblage de la banque de mutants aléatoires aux positions 168 et 170 (cf. article 1) a permis d'isoler des mutants présentant une large gamme de cinétiques. Deux de ces mutants ont été caractérisés : les doubles mutants Q168R&L170I (RHI) et Q168A&L170V (AHV).

Le mutant RHI présente les mêmes propriétés cinétiques que le WT avec un décalage vers les  $[Ca^{2+}]$  plus élevées. Dans ce mutant, les liens entre l'EF3 et les résidus interagissant avec la coelentérazine persistent. En revanche le mutant AHV présente des caractéristiques cinétiques proches de celles des mutants SloDK. Chez ce mutant, l'interaction entre les résidus Gln168 et Glu164 liant le calcium dans l'EF3 est rompue. Ces résultats confirment le rôle de ces résidus dans le déclenchement de la bioluminescence par liaison du calcium sur l'EF3 et que le ralentissement de la cinétique de bioluminescence provient de la rupture d'un lien entre une EF-hand et un résidu interagissant avec la coelentérazine.

### 2.2.4 DÉPENDANCE AU CALCIUM DE LA BIOLUMINESCENCE DE L'AEQUORINE : UN MODÈLE

Les résultats de cette étude suggèrent que l'aequorine se présente sous deux formes émettant de la lumière avec des vitesses différentes et que les variations de la proportion entre ces deux formes est responsable de l'augmentation du pic de bioluminescence avec la  $[Ca^{2+}]$ . Un modèle a été proposé avec les postulats suivants :

- Les deux formes émettrices sont en équilibre. La constante d'interconversion de cet équilibre, et donc leurs proportions, dépend du nombre de calcium lié à la photoprotéine.
- La quantité totale de photons émis  $\Sigma_T$  est la même quelle que soit la concentration en calcium et le nombre de calcium lié.



- La valeur de  $\tau_F$  est constante. Les variations de  $\tau_S$  dépendent du nombre de calcium lié.

L'ajustement de ce modèle avec les valeurs expérimentales montre que l'augmentation de la proportion de la forme « rapide » se fait avec la liaison de plus d'un  $\text{Ca}^{2+}$ . Les résultats suggèrent qu'au moins une des EF-hands est impliquée à la fois dans les variations de  $\tau_S$  et de  $\Sigma_F / \Sigma_T$ . Ce modèle permet également de rendre compte des cinétiques de mutants SloDK pour lesquels les équilibres d'interconversion entre les deux formes émettrices seraient affectés au détriment de la forme « rapide ».

Enfin, l'évolution de l'amplitude du pic avec la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , calculée à partir des résultats de l'ajustement, se superpose avec les données expérimentales. Ceci montre que ce modèle de dépendance au calcium décrit convenablement les relations entre l'amplitude du pic, la cinétique et la quantité totale de photons émis qui déterminent la sensibilité calcique de l'aequorine.

ARTICLE 2 : « CALCIUM DEPENDANCE OF AEQUORINE BIOLUMINESCENCE DISSECTED BY RANDOM  
MUTAGENESIS » ET INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES



# Calcium dependence of aequorin bioluminescence dissected by random mutagenesis

Ludovic Tricoire\*, Keisuke Tsuzuki\*, Olivier Courjean, Nathalie Gibelin, Gaëlle Bourout, Jean Rossier, and Bertrand Lambolez†

Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7637, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, 10 Rue Vauquelin, 75005 Paris, France

Communicated by J. Woodland Hastings, Harvard University, Cambridge, MA, April 20, 2006 (received for review October 12, 2005)

**Aequorin bioluminescence is emitted as a rapidly decaying flash upon calcium binding. Random mutagenesis and functional screening were used to isolate aequorin mutants showing slow decay rate of luminescence. Calcium sensitivity curves were shifted in all mutants, and an intrinsic link between calcium sensitivity and decay rate was suggested by the position of all mutations in or near EF-hand calcium-binding sites. From these results, a low calcium affinity was assigned to the N-terminal EF hand and a high affinity to the C-terminal EF-hand pair. In WT aequorin, the increase of the decay rate with calcium occurred at constant total photon yield and thus determined a corresponding increase of light intensity. Increase of the decay rate was underlain by variations of a fast and a slow component and required the contribution of all three EF hands. Conversely, analyses of double EF-hand mutants suggested that single EF hands are sufficient to trigger luminescence at a slow rate. Finally, a model postulating that proportions of a fast and a slow light-emitting state depend on calcium concentration adequately described the calcium dependence of aequorin bioluminescence. Our results suggest that variations of luminescence kinetics, which depend on three EF hands endowed with different calcium affinities, critically determine the amplitude of aequorin responses to biological calcium signals.**

EF hand | kinetics | luminescence | photoprotein | transduction

The photoprotein aequorin is a stable luciferase intermediate formed from the reaction of the protein apoaequorin (luciferase) and the substrate coelenterazine (luciferin), which emits light upon  $\text{Ca}^{2+}$  binding (1–5). Aequorin contains three EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites (6–8) located close to its N (EF1) or C terminus (EF2,3 pair). Aequorin mutagenesis and crystal structure suggest that these three EF hands indeed bind  $\text{Ca}^{2+}$ , but their individual contribution to luminescence is still a matter of debate (9–13).

The steep increase of luminescence intensity with  $[\text{Ca}^{2+}]$  makes aequorin a useful reporter of intracellular calcium signals (14). The formation of aequorin is a slow process (2), whereas the luminescence reaction is very fast and proceeds to completion in the continuous presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . The aequorin response thus occurs as a flash that decays exponentially and whose onset rate does not depend on  $[\text{Ca}^{2+}]$  (15). It has been observed early that the decay rate of this response increases with  $[\text{Ca}^{2+}]$ , whereas the total light emitted (light integral) remains relatively constant (15). This suggests that the increase of luminescence intensity with  $[\text{Ca}^{2+}]$  is determined by variations of the decay rate but not of the light integral. In other words, the shorter the duration of the flash (i.e., the faster the decay), the larger the amplitude of the response (i.e., light intensity). However, the relationships among the intensity, the decay rate, and the integral of bioluminescence and their links to EF-hand occupancy have not been clearly established.

To analyze the contribution of decay kinetics to aequorin responses, we recently isolated aequorin mutants exhibiting slow decay rates (SloDK mutants) through random mutagenesis and functional screening (16). This procedure allows the selection of mutants that most efficiently affect a specific subfunction of a

protein with minimal alteration of its overall structure–function relationships. A different screening process yielded other mutants (Bright) exhibiting high luminescence in bacteria because of increased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity or photoprotein stability (16). In contrast to SloDK mutants in which both  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity and decay rate are modified, Bright mutants show modifications of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity with little change of decay rate. Both SloDK and Bright mutants carried single amino acid substitutions located in EF hands or their adjacent  $\alpha$ -helices. Here, the dependence of mutant and WT aequorin luminescence on  $[\text{Ca}^{2+}]$  was analyzed and combined with modeling to examine the contribution of the three EF hands and the role of decay kinetics in aequorin responses. We found that EF hands have different  $\text{Ca}^{2+}$  affinities, and all contribute to the variations of decay rate that determine the increase of luminescence intensity with  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

## Results

Bright and SloDK mutations (16) affect residues conserved in other photoproteins (see the supporting information, which is published on the PNAS web site), located either in EF hands at canonical  $\text{Ca}^{2+}$ -binding positions (8) or in their adjacent  $\alpha$ -helices (Fig. 1A). Each SloDK mutation was selected several times independently during the screening of random mutants (16), and four of them similarly consisted in a D/E to G substitution at an EF-hand border. This observation suggests that SloDK mutations efficiently affect the decay rate, whereas other aequorin properties remain relatively unaffected. Indeed, the luminescence decay rates of SloDK mutants were strikingly slow, with half-decay times ranging from 20- (F<sup>149</sup>S) to 57-fold (E<sup>35</sup>G) greater than that of WT aequorin (Fig. 1B). In contrast, luminescence half-decay times of Bright mutants were similar to or only slightly slower than WT.

**Luminescence Intensity.** The  $[\text{Ca}^{2+}]$  dependence of luminescence intensity was examined first. Because in our experimental setup, recording started after the peak of bioluminescence (see *Materials and Methods*), curves were plotted from initial maximum intensity measured upon  $\text{Ca}^{2+}$  addition (Fig. 2A). The plot of the L<sup>170</sup>I mutant, very close to that of Q<sup>168</sup>R, was omitted for clarity. EC<sub>50</sub>s for  $\text{Ca}^{2+}$  interpolated from these curves (Fig. 1B) are used as an index of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity.

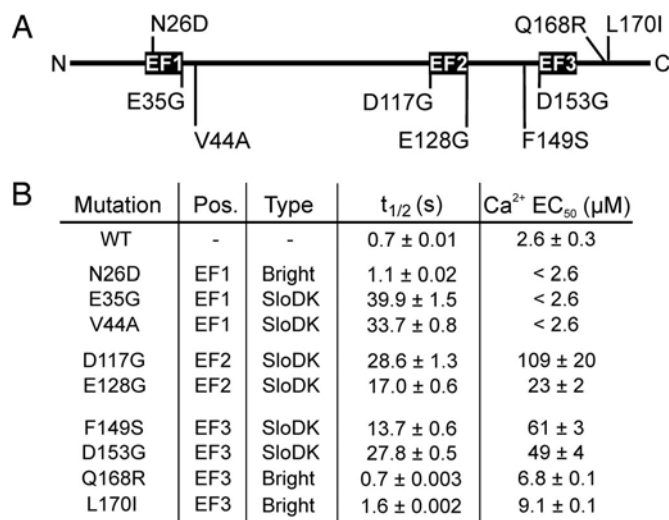
The three mutants of the EF1 region showed a higher sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  than WT aequorin. The effect of N<sup>26</sup>D likely results from an increased EF1 affinity, consistent with the replacement of the polar  $\text{Ca}^{2+}$ -binding asparagine residue by a negatively charged residue. The effect of E<sup>35</sup>G seems paradoxical, given that this mutation removes an essential  $\text{Ca}^{2+}$ -binding side chain (8, 17). This can be resolved by assuming that EF1 has lower  $\text{Ca}^{2+}$  affinity than EF2 and EF3, and that E<sup>35</sup>G impairs

Conflict of interest statement: No conflicts declared.

\*L.T. and K.T. contributed equally to this work.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: bertrand.lambolez@snv.jussieu.fr.

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA



**Fig. 1.** Bright and SloDK aequorin mutants. (A) Bright (top) and SloDK (bottom) mutations of apoaequorin were located inside EF hands (■) or nearby. (B) Times to reach half of initial light ( $t_{1/2}$ ) obtained at saturating  $[\text{Ca}^{2+}]$  for WT and mutant aequorins reflect luminescence decay kinetics.  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{EC}_{50}$  values were derived from curves of  $[\text{Ca}^{2+}]$ -dependent luminescence intensities.

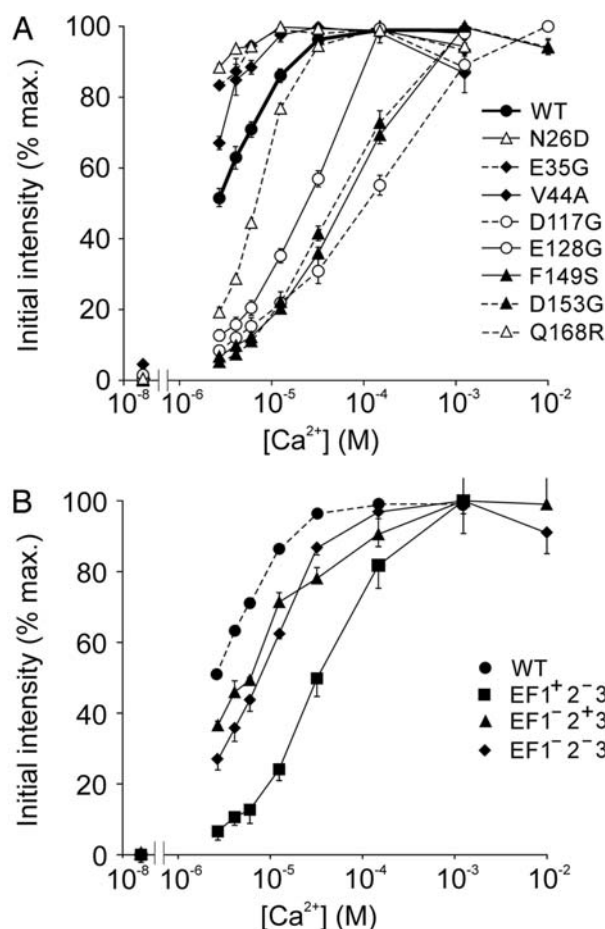
EF1 contribution to the response to  $\text{Ca}^{2+}$ . Similarly, V44A may also impair contribution of EF1 to bioluminescence, thus increasing the relative contribution of the high affinity EF2 and EF3. Indeed, V44 interacts with the A<sup>40</sup> coelenterazine-binding residue (11).

Mutants of the EF2 and EF3 domains exhibited a lower  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity than WT aequorin. The effects of D117G, E128G, and D153G are consistent with inactivation of either of the high-affinity EF2 or EF3 because of removal of an essential  $\text{Ca}^{2+}$ -binding side chain. The effect of F149S, which suppresses a bond that links EF3 to the W<sup>129</sup> coelenterazine-binding residue (16), presumably results from impairment of EF3 contribution to bioluminescence. The effect of Q168R likely results from interactions of arginine with several  $\text{Ca}^{2+}$  binding residues of EF3 (16).

These results are consistent with EF1 having a lower affinity to  $\text{Ca}^{2+}$  than EF2 and EF3. Analyses of double EF-hand mutants combining E35G, E128G, and D153G substitutions (Fig. 2B) confirmed the differences in EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$  affinities and indicate that a single EF hand is sufficient to trigger bioluminescence. For these mutants, where only one EF hand was left intact,  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{EC}_{50}$  values were  $34 \pm 9 \mu\text{M}$  for EF1<sup>+</sup>2<sup>+</sup>3<sup>-</sup>,  $6.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$  for EF1<sup>+</sup>2<sup>-</sup>3<sup>-</sup>, and  $7.6 \pm 0.6 \mu\text{M}$  for EF1<sup>-</sup>2<sup>-</sup>3<sup>+</sup>. The  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivities of EF1<sup>+</sup>2<sup>-</sup>3<sup>-</sup> or EF1<sup>-</sup>2<sup>-</sup>3<sup>+</sup>, lower than that of WT, suggest that mutation of either EF hand of the EF2,3 pair reduced the affinity of the remaining EF hand, as reported for other  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins (8, 17). Hence, affinities of WT EF2 and EF3 are presumably higher than suggested by the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivities of EF1<sup>+</sup>2<sup>-</sup>3<sup>-</sup> or EF1<sup>-</sup>2<sup>-</sup>3<sup>+</sup> mutants.

These results indicate that the three EF hands are endowed with different  $\text{Ca}^{2+}$  affinities, and all contribute to the sensitivity of WT aequorin to  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

**Luminescence Decay Kinetics and Light Integral.** Luminescence decays were next analyzed to examine the relationships of the decay rate and light integral with the intensity of the response to  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 3). Decays of WT and mutant aequorins were best fitted with two exponentials (see supporting information). Time constants of these fast and slow exponentials ( $\tau_F$  and  $\tau_S$ , respectively) and their light integrals ( $\Sigma_F$  and  $\Sigma_S$ , respectively) were determined and plotted together with total light integral ( $\Sigma_T = \Sigma_F + \Sigma_S$ ) and initial

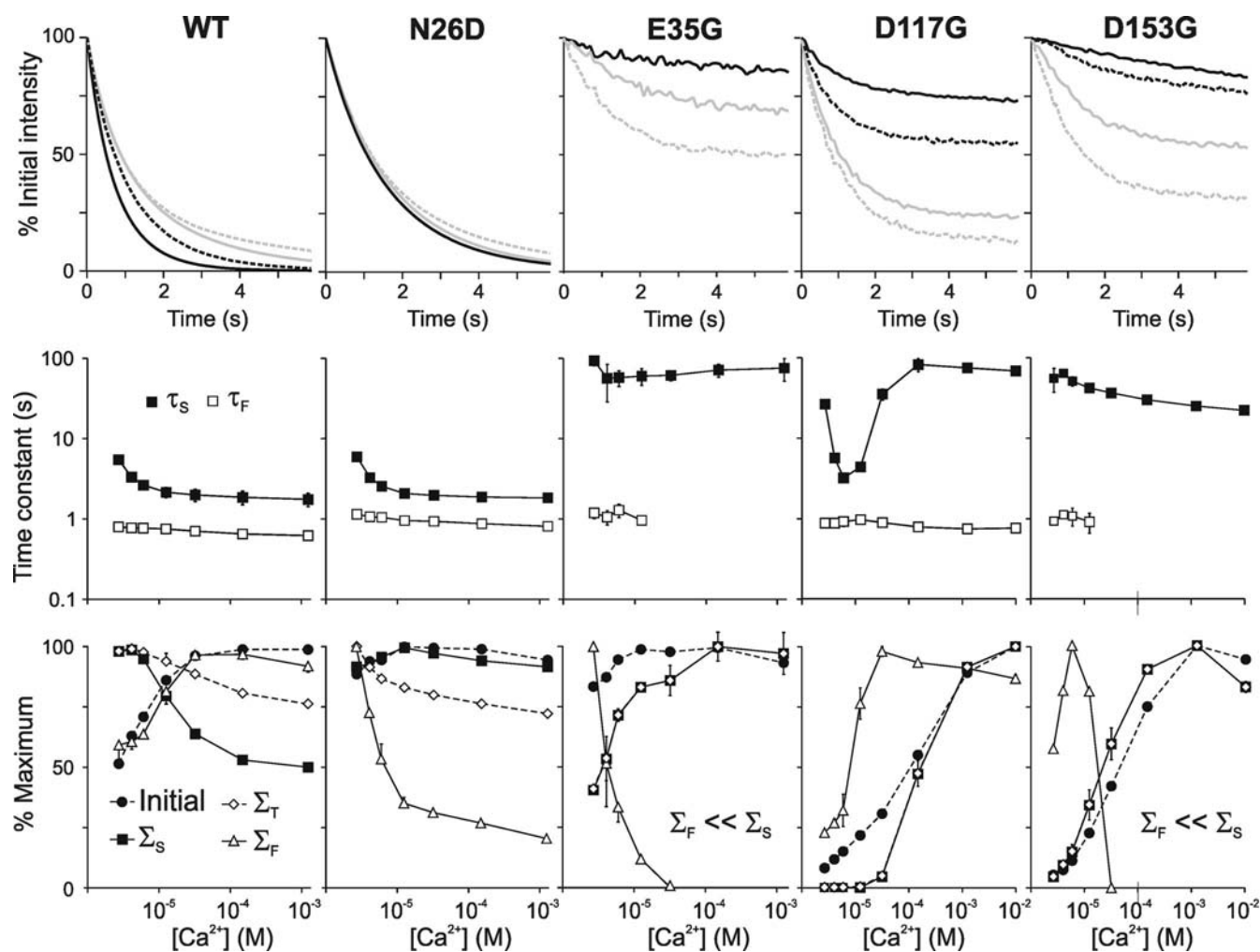


**Fig. 2.** Initial maximum intensity against  $[\text{Ca}^{2+}]$  of mutant and WT aequorins. (A) Bright and SloDK mutants. The plot of the L170I Bright mutant (not shown) was almost identical to that of Q168R. (B) Double EF-hand mutants. EF1<sup>+</sup>2<sup>-</sup>3<sup>-</sup>, EF1<sup>-</sup>2<sup>+</sup>3<sup>-</sup>, and EF1<sup>-</sup>2<sup>-</sup>3<sup>+</sup> correspond to the E128G and D153G, E35G and D153G, and E35G and D128G double mutants, respectively.

maximum intensity. Because kinetics of SloDK mutants for a given EF hand (e.g., E35G and V44A for EF1) were similar, only one example is displayed per EF hand. Kinetics of Q168R and L170I Bright mutants (not shown) were similar to WT, except for a shift toward higher  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Similar results were obtained on WT aequorin and the D153G mutant by using a fast-mixing stopped-flow apparatus (see supporting information).

For WT aequorin, the decay rate increased with  $[\text{Ca}^{2+}]$  (Fig. 3 Top), whereas  $\Sigma_T$  was maximal at low  $[\text{Ca}^{2+}]$  and remained roughly constant (Fig. 3 Bottom). Indeed, correction for the lag preceding the activity measurement (see Materials and Methods and supporting information) yielded a  $\Sigma_T$  value at 1.24 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , which was decreased to only 91.5% of maximum. Variations of the decay rate thus determined the increase of initial intensity. The curves of initial intensity and  $\Sigma_F$  were almost superimposed, indicating that variations of  $\tau_S$  contributed little to the increase of the decay rate. Hence, the increase of luminescence intensity was driven primarily by the  $\Sigma_F/\Sigma_T$  ratio (not shown), which increased from  $25.5 \pm 2.2\%$  at 2.7  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  to  $51.2 \pm 0.4\%$  at 1.24 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

N26D essentially differed from WT in that  $\Sigma_F$  decreased with increasing  $[\text{Ca}^{2+}]$ , whereas  $\Sigma_S$  remained roughly constant. As a consequence, N26D exhibited a much smaller increase of decay rate and thus of initial intensity than WT. In contrast with WT and Bright mutants, the luminescence decay rates of SloDK mutants decreased with increasing  $[\text{Ca}^{2+}]$ . These mutants ex-



**Fig. 3.** Decay kinetics of WT aequorin and EF-hand mutants. (*Top*) Unitary recordings show variations of decay kinetics between low (dotted gray), medium low (gray), medium high (dotted black), and high (black)  $[Ca^{2+}]$ . (*Middle*) Plots of the time constants of fast ( $\tau_F$ ) and slow ( $\tau_S$ ) exponentials vs.  $[Ca^{2+}]$  (x axis as in *Bottom*). In  $E^{35}G$  and  $D^{153}G$ ,  $\tau_F$  values could not be determined above  $12.5 \mu M$   $Ca^{2+}$  because of breakdown of  $S_F$ . (*Bottom*) Light integrals of the fast ( $\Sigma_F$ ) and slow ( $\Sigma_S$ ) exponentials and of total light emitted ( $\Sigma_T = \Sigma_F + \Sigma_S$ ) vs.  $[Ca^{2+}]$ . Initial intensities are plotted for comparison.

hibited high  $\tau_S$  and  $\Sigma_S/\Sigma_T$  values and extensive variations of  $\Sigma_T$ , which determined to a large extent the increase of initial intensity.

The  $\tau_F$  value varied little with  $[Ca^{2+}]$  or between WT and mutants, suggesting it is an intrinsic constant of aequorin luminescence. In WT,  $\tau_F$  was  $615 \pm 21$  ms at  $1.24$  mM  $Ca^{2+}$ , close to the  $833$  ms reported assuming monoexponential decay (15). In contrast, other kinetic parameters appeared to depend on EF-hand domains. All SloDK mutations resulted in high  $\tau_S$  and  $\Sigma_S/\Sigma_T$  values and altered their variations. Hence, these parameters did not rely on any single EF hand.  $\Sigma_F$  showed a critical dependence on both EF1 and EF3. Indeed,  $\Sigma_F/\Sigma_T$  was negligible in  $E^{35}G$  and  $D^{153}G$  (maximum,  $1.1 \pm 0.4\%$  and  $3.6 \pm 1.1\%$ , respectively).  $EF2^-$  SloDK mutants exhibited a markedly different behavior. In these latter mutants,  $\Sigma_F$  persisted throughout the whole  $[Ca^{2+}]$  range (maximum,  $\Sigma_F/\Sigma_T$ ;  $42.8 \pm 5.2\%$  at  $12.5 \mu M$   $Ca^{2+}$  for  $D^{117}G$ ), whereas  $\tau_S$  first decreased (in the range of EF3 affinity) and then increased (in the range of EF1 affinity) with increasing  $[Ca^{2+}]$ . This observation suggests a distinctive role for EF2, perhaps in the functional coupling between EF1 and EF3 domains.

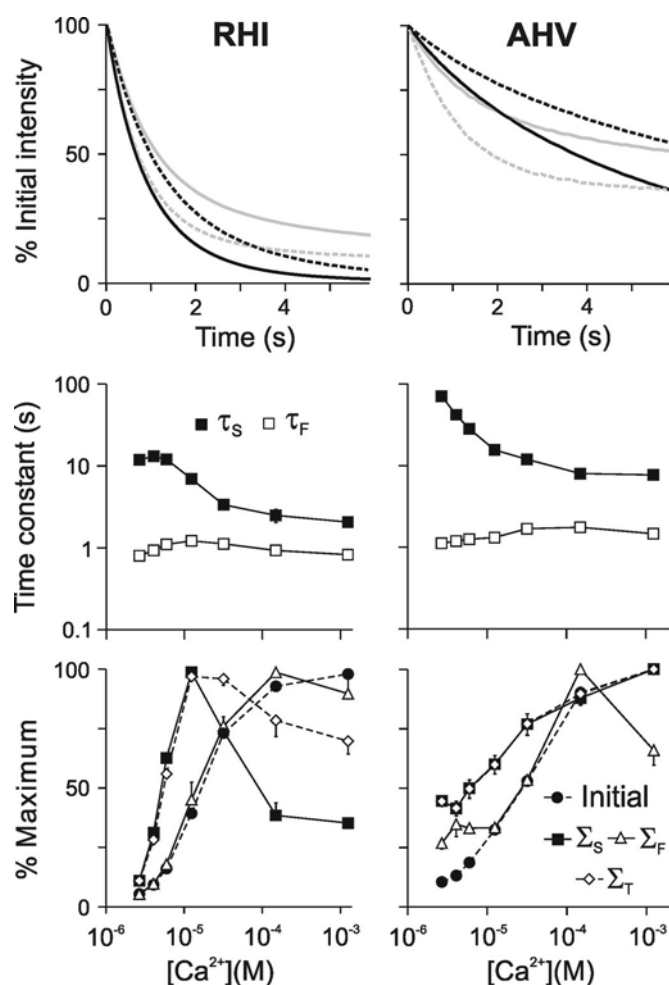
Decays of double EF-hand mutants (not shown) analyzed at saturating  $[Ca^{2+}]$  exhibited both a fast and a slow component, confirming these are intrinsic to aequorin luminescence. Values

of  $\tau_F$  were  $5.9 \pm 0.1$  s,  $5.5 \pm 0.3$  s, and  $8.4 \pm 0.5$  s and of  $\tau_S$  were  $122 \pm 6$  s,  $275 \pm 7$  s, and  $341 \pm 28$  s for  $EF1^+2^-3^-$ ,  $EF1^-2^+3^-$ , and  $EF1^-2^-3^+$  mutants, respectively. Decays of these mutants were governed by the slow component ( $\Sigma_S/\Sigma_T > 98\%$ ).

The present data suggest that in WT aequorin, all EF hands contribute to the decay rate increase by modulating the  $\Sigma_F/\Sigma_T$  ratio, which in turn determines the increase of peak intensity at constant light integral.

**Contribution of  $Q^{168}$  and  $L^{170}$  to Decay Kinetics.** The QHL[168–170] residues interact with both the  $E^{164}$   $Ca^{2+}$ -binding residue of EF3 and coelenterazine (via the  $E^{164}$ - $Q^{168}$  and  $H^{169}$ -coelenterazine bonds; see ref. 11) and may help trigger bioluminescence (16). These interactions provide a rationale for the lower  $Ca^{2+}$  sensitivity of  $Q^{168}R$  and  $L^{170}I$  mutants and suggests these residues contribute to decay kinetics. Indeed, screening of a library of random  $Q^{168}$  and  $L^{170}$  mutants resulted in the isolation of mutants exhibiting a large range of decay rates (see supporting information). Among selected clones, the  $Q^{168}A$  and  $L^{170}V$  mutant (designated AHV) and the mutant combining  $Q^{168}R$  and  $L^{170}I$  Bright mutations (designated RHI) were characterized in detail. Indeed, their  $Ca^{2+}$  sensitivities were reduced to a similar extent ( $EC_{50}$  values:  $28 \pm 2$  and  $16.5 \pm 0.6 \mu M$  for AHV and RHI, respectively), but their decay rates differed markedly (Fig. 4).

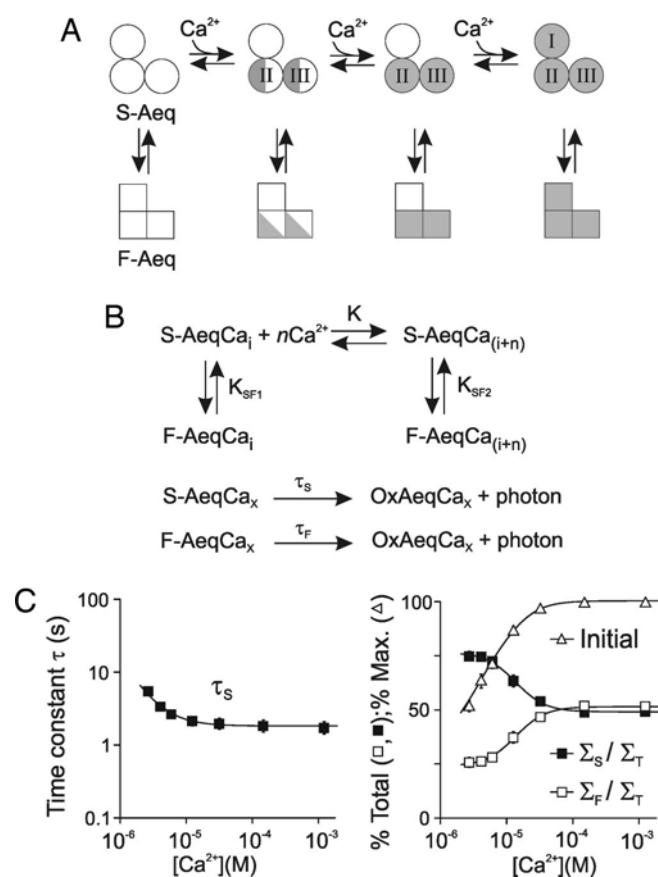




**Fig. 4.** Decay kinetics of Q<sup>168</sup> and L<sup>170</sup> double mutants. RHI, Q<sup>168</sup>R and L<sup>170</sup>I; AHV, Q<sup>168</sup>A and L<sup>170</sup>V. (Top) Unitary recordings show decay kinetics at low (dotted gray line), medium low (gray line), medium high (dotted black line), and high (black line) [Ca<sup>2+</sup>]. (Middle) Time constants of fast ( $\tau_F$ ) and slow ( $\tau_S$ ) exponentials vs. [Ca<sup>2+</sup>] (x axis as in Bottom). (Bottom) Light integrals of the fast ( $\Sigma_F$ ) and slow ( $\Sigma_S$ ) exponentials, of total light emitted ( $\Sigma_T = \Sigma_F + \Sigma_S$ ), and of initial intensity vs. [Ca<sup>2+</sup>].

RHI bioluminescence exhibited all of the key features of WT but shifted toward higher [Ca<sup>2+</sup>]. This shift allowed the initial increases of  $\Sigma_F$ ,  $\Sigma_S$ , and  $\Sigma_T$ , which occurred below 2.7  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> for WT, to be observed above this concentration for RHI. In this initial phase,  $\Sigma_S$  and  $\Sigma_T$  increased in parallel and reached a maximum at 12.5  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>. Beyond this point,  $\Sigma_T$  remained close to its maximum (corrected  $\Sigma_T$  for lag between injection and measurement, 84.2% at 1.24 mM Ca<sup>2+</sup>), whereas kinetics varied extensively. As for WT, most of the increase of RHI initial intensity with [Ca<sup>2+</sup>] resulted from an increase of  $\Sigma_F$ . Hence, RHI mutations reduced EF3 Ca<sup>2+</sup> affinity but left the transduction of Ca<sup>2+</sup> induced conformational changes to bioluminescence unaffected.

In contrast, the slow decay kinetics of AHV suggests that the contribution of EF3 to the response to Ca<sup>2+</sup> was reduced in this mutant. Indeed, AHV kinetics exhibited high  $\tau_S$  and  $\Sigma_S/\Sigma_T$  values and  $\Sigma_T$  variations extending over a large [Ca<sup>2+</sup>] range, as found in EF3<sup>-</sup> SloDK mutants. This presumably resulted in part from the disruption of the E<sup>164</sup>–Q<sup>168</sup> interaction. However, the decrease of  $\tau_S$  and the persistence of  $\Sigma_F$  throughout the whole [Ca<sup>2+</sup>] range ( $\Sigma_F/\Sigma_T$ ,  $2.5 \pm 0.7\%$  at 1.24 mM Ca<sup>2+</sup>) suggest that, in contrast with EF3<sup>-</sup> SloDK mutants, the participation of EF3 to bioluminescence was not abolished in the AHV mutant.



**Fig. 5.** A model of WT aequorin Ca<sup>2+</sup> dependence. (A) Ca<sup>2+</sup>-binding pathways and interconversion between a slow (S) and a fast (F) light-emitting state. Ca<sup>2+</sup>-bound EF hands are shown in gray. (B Upper) Interconversion equilibria describing evolution of S and F state proportions with Ca<sup>2+</sup> binding. (B Lower) Kinetics of light emission from Ca<sup>2+</sup>-bound S and F states. (C) Comparison of experimental values of kinetic parameters (symbols) with the best fit of the model (curves).

These data confirm that slow decay kinetics result from the disruption of a link between a given EF-hand domain and coelenterazine-binding residues but not from the reduction of its calcium affinity.

**A Model of Aequorin Ca<sup>2+</sup> Dependence.** The present results suggest that the three EF hands contribute to luminescence, and that varying proportions of a slow and a fast light-emitting state (S-Aeq and F-Aeq, respectively) determine the increase of the decay rate and thus of light intensity. These findings are summarized in Fig. 5A, which postulates that EF1 has lower Ca<sup>2+</sup> affinity than EF2 and EF3. This scheme does not infer sequential Ca<sup>2+</sup> binding to the different EF hands but describes their occupancy with increasing [Ca<sup>2+</sup>].

None of the reaction schemes and models of aequorin luminescence proposed so far (15, 18) takes into account the variations of decay rate with [Ca<sup>2+</sup>] as a key determinant of light intensity. Hence, we investigated whether a model based on these variations may capture the essential features of aequorin responses to Ca<sup>2+</sup> (Fig. 5B; see equations in supporting information). This model postulates (i) an equilibrium between S-Aeq and F-Aeq whose interconversion constant ( $K_{SF}$ ) depends on the number of Ca<sup>2+</sup> bound; (ii)  $\Sigma_F/\Sigma_T$  and  $\Sigma_S/\Sigma_T$  vary with the binding of  $n$  Ca<sup>2+</sup> to an initial Ca<sup>2+</sup>-bound specie (S-AeqCa<sub>i</sub>); (iii)  $\tau_F$  is independent of [Ca<sup>2+</sup>] (set at mean experimental value), and  $\tau_S$  varies with the binding of Ca<sup>2+</sup> to  $m$  sites; and (iv)

light-emission efficiency  $\Sigma_T$  ( $\Sigma_F + \Sigma_S$ ) is constant for all  $\text{Ca}^{2+}$ -bound species.

Parameters of the equation describing theoretical  $\tau_S$  were optimized to fit experimental  $\tau_S$  values measured for WT aequorin (see supporting information). The best fit (see curve in Fig. 5C) was obtained with  $m = 1.5 \text{ Ca}^{2+}$ , binding with an apparent dissociation constant of  $3.8 \mu\text{M}$ . Hence, acceleration of  $\tau_S$  in WT aequorin requires binding of more than one  $\text{Ca}^{2+}$  in our model. Similar optimization was performed for theoretical  $\Sigma_S/\Sigma_T$ . The best fit (see  $\Sigma_S/\Sigma_T$  and  $\Sigma_F/\Sigma_T$  curves in Fig. 5C) was obtained with  $K_{\text{SF1}} = 0.3$ ,  $K_{\text{SF2}} = 1$ , and  $n = 1.9 \text{ Ca}^{2+}$  binding with an apparent dissociation constant of  $17 \mu\text{M}$ . These values imply that in our model, the proportion of molecules in the  $F$  state increases (because of  $K_{\text{SF2}} > K_{\text{SF1}}$ ) as a result of the binding of more than one  $\text{Ca}^{2+}$ . Because aequorin contains only three EF hands, the  $m$  and  $n$  values derived from the best fit predict that at least one EF hand is involved in both  $\tau_S$  and  $\Sigma_F/\Sigma_T$  variations, consistent with their overlapping  $[\text{Ca}^{2+}]$  ranges. Our model predicts that SloDK mutations have a major effect on  $K_{\text{SF}}$  interconversion constants. Although EF1<sup>−</sup> and EF3<sup>−</sup> mutations would decrease both  $K_{\text{SF1}}$  and  $K_{\text{SF2}}$ , EF2<sup>−</sup> mutations would leave  $K_{\text{SF1}}$  relatively unaffected.

Finally, evolution of the theoretical initial intensity with  $[\text{Ca}^{2+}]$  was calculated from  $\Sigma_S/\Sigma_T$ ,  $\Sigma_F/\Sigma_T$ , and  $\tau_S$  values derived from the best fit, with constant  $\tau_F$  (see supporting information). The good match observed between theoretical and experimental values (Fig. 5C Right) indicates that the present model of WT aequorin adequately describes the parallel increases of light intensity and decay rate with  $[\text{Ca}^{2+}]$  occurring at constant light integral.

## Discussion

The contribution of aequorin EF-hand domains to bioluminescence was dissected by using mutants of decay kinetics and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity. All EF-hand domains contributed to  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity, with EF1 showing lower affinity than EF2 and EF3, and each individual EF hand was able to trigger luminescence. Decay kinetics of WT aequorin consisted of a slow and a fast component whose variations determined those of luminescence intensity in a large  $[\text{Ca}^{2+}]$  range where the light integral was constant. All EF-hand domains contributed to these variations. These findings were used to design a model that adequately described the  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of WT aequorin.

**SloDK Mutations Impair Transduction of  $\text{Ca}^{2+}$  Binding to Bioluminescence.** In EF-hand-based  $\text{Ca}^{2+}$  sensors like aequorin and calmodulin,  $\text{Ca}^{2+}$  binding induces conformational changes that trigger activity (8). Although Bright mutations essentially shifted  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity curves, SloDK ones additionally decreased the rate of light emission, presumably by disrupting a structural link that allows a given EF hand to trigger luminescence. Indeed, D/E to G substitutions at EF1–EF3 extremities likely uncouple the EF hand from the protein scaffold by increasing the flexibility of its joint to the adjacent  $\alpha$ -helix. The V<sup>44</sup>A and F<sup>149</sup>S mutations do not affect  $\text{Ca}^{2+}$ -binding residues and may thus specifically impair conformational changes. Such a case has been reported for calmodulin, where the EF3-neighboring mutation F<sup>92</sup>A impairs conformational changes without reducing  $\text{Ca}^{2+}$  affinity (19). The F<sup>149</sup>S mutation suppresses a link of EF3 to the W<sup>129</sup> coelenterazine-binding residue (16). Moreover, the V<sup>44</sup>A mutation may affect the interaction of V<sup>44</sup> with the A<sup>40</sup> coelenterazine-binding residue (11). Interestingly, corresponding residues of the photoprotein obelin both interact with coelenterazine (A<sup>46</sup> and I<sup>50</sup>; see supporting information and ref. 20). Finally, RHI and AHV mutants provide an example of mutations at the same positions that resulted in similar  $\text{Ca}^{2+}$  EC<sub>50</sub>s but very different decay rates. Part of this difference can be attributed to disruption of the E<sup>164</sup>–Q<sup>168</sup> bond that links EF3 conformational

changes to bioluminescence (16). It thus appears that SloDK mutants all disrupt a structural link that allows  $\text{Ca}^{2+}$  binding to trigger bioluminescence.

**Functional Domains of Aequorin.** The structures of photoproteins suggest that each of the three EF-hand domains forms a functional unit (11, 20). Indeed, results with double EF-hand mutants indicate that each individual EF hand is able to trigger aequorin bioluminescence. Nonetheless, distinctive functional properties could be assigned to each of the three EF-hand domains, based on the different effects of their respective mutations. These differences appear very significant, given the high similarity between the effects of the two SloDK mutations found for each EF hand. Our results define a low  $\text{Ca}^{2+}$  affinity EF1 domain and a high-affinity domain comprising the EF2,3 pair, consistent with a previous report showing that aequorin binds two  $\text{Ca}^{2+}$  with a high affinity and an additional  $\text{Ca}^{2+}$  with 22 times lower affinity (21). The N- and C-terminal domains of calmodulin similarly exhibit low and high  $\text{Ca}^{2+}$  affinity, respectively (17). Interestingly, the cooperativity between aequorin EF2,3 for  $\text{Ca}^{2+}$  binding, suggested by the low affinity of EF1<sup>−</sup>2<sup>+</sup>3<sup>−</sup> or EF1<sup>−</sup>2<sup>−</sup>3<sup>+</sup> mutants as compared to WT, is also observed for the C-terminal EF-hand pair of calmodulin (17). Finally,  $[\text{Ca}^{2+}]$  dependence of kinetic properties relied heavily on EF1 and EF3 but less on EF2 (see  $\Sigma_F$  and  $\tau_S$  in EF2<sup>−</sup> mutants), which may be preferentially involved in the coupling between the low-affinity EF1 and the high-affinity EF3. Previous studies reported that aequorin bioluminescence involves the binding of two or more  $\text{Ca}^{2+}$  (18, 21). Our results indicate that, although each individual EF hand is sufficient to trigger luminescence, all three EF hands participate in the dependence of WT aequorin luminescence on  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

**Decay Kinetics, Light Integral, and Initial Maximum Intensity.** Our data show that in WT aequorin, both the light intensity and the decay rate are greater at higher  $[\text{Ca}^{2+}]$ , such that the total light (integral,  $\Sigma_T$ ) is the same at different  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. Although the  $[\text{Ca}^{2+}]$  dependence of the decay rate has been reported early (15), the present study reveals that it results from variations of a fast and a slow component. The fast and slow components coexisted across mutants and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations and were even observed in double EF-hand mutants where only one EF hand is left unaffected. Our results thus suggest that the slow and fast light-emitting states coexist, and that their proportions evolve concomitantly, rather than sequentially along a single linear pathway. In any sequential model,  $\tau_F$  and  $\tau_S$  would evolve in the same  $[\text{Ca}^{2+}]$  range as  $\Sigma_F/\Sigma_T$  and  $\Sigma_S/\Sigma_T$ , which is in contradiction with our observations. In contrast, our parallel model allows dissociating variations of the different kinetic parameters and adequately describes variations of light intensity with  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

A key feature of WT aequorin is that  $\Sigma_T$  reached a maximum at low  $[\text{Ca}^{2+}]$  and remained roughly constant in a wide  $[\text{Ca}^{2+}]$  range where major variations of decay kinetics occurred. Given the existence of only three EF hands in aequorin (6, 7, 13), this observation suggests that  $\Sigma_T$  variations rely primarily on the binding of only one  $\text{Ca}^{2+}$ , as postulated in the present model, whereas the three EF hands are involved in variations of decay rate and thus of peak intensity. It is likely that the light-emission rate resulting from single EF-hand occupancy is higher in WT aequorin, where the rigidity of the photoprotein scaffold is unaffected, than in double EF-hand mutants.

**Aequorin Luminescence as a Biological Signal.** The fast kinetics of photoprotein luminescence provides a sensitive means of studying the early steps, which lead from calcium binding to activation of EF-hand-based calcium sensors. The structural homology among various photoproteins suggests that their  $[\text{Ca}^{2+}]$  depen-



## SUPPORTING INFORMATION

This supplement contains:

- Supporting Methods
- Supporting Results
- Supporting References
- Supporting Figure Legends
- Supporting Figures

## SUPPORTING MATERIALS AND METHODS

### ***Luminescence assays using a fast mixing stopped-flow apparatus***

WT and mutant aequorins were reconstituted as described in main text (EDTA, 10  $\mu$ M) and diluted in a decalcified Tris (pH8), 50mM solution (final EDTA, 0.6  $\mu$ M). Decalcified Tris solutions were prepared with a column packed with chelex-100 resin (Biorad, Hercules, CA) according to manufacturer's instructions. Decay kinetics of bioluminescence were recorded in a SF 300 stopped-flow device (Biologic, Grenoble, France) equipped with a photomultiplier. Light emission was initiated in the stopped-flow apparatus by mixing 60  $\mu$ l of the photoprotein solution with 140  $\mu$ l of a Tris (pH8), 50mM solution containing variable  $\text{CaCl}_2$  concentrations. Data were acquired at 100 Hz. Each value represents the mean of two experiments with at least four shots per  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Complete data is available by e-mail on request.

### ***A model of aequorin calcium sensitivity***

Following equations describe reaction schemes in figure 5B (main text) and derive from Hill and MWC formalisms (1,2). Experimental ratios of  $\Sigma_S/\Sigma_T$  were fitted to the following theoretical expression using the Origin 5.0 software (Microcal, Northampton, MA, USA).

$$\Sigma_S / \Sigma_T = \frac{K^n + [\text{Ca}^{2+}]^n}{K^n(1 + K_{SF1}) + (1 + K_{SF2})[\text{Ca}^{2+}]^n}$$

K is the apparent dissociation constant of  $\text{Ca}^{2+}$  binding, n is the corresponding Hill coefficient, and  $K_{SF1}$  and  $K_{SF2}$  are interconversion constants between the slow (S) and fast (F) emitting forms at low ( $K_{SF1}$ ) and high ( $K_{SF2}$ )  $[\text{Ca}^{2+}]$ . These equilibrium constants are defined by the following equations:

$$K^n = \frac{[\text{SAeqCa}_i][\text{Ca}]^n}{[\text{SAeqCa}_{(i+n)}]}; K_{SF1} = \frac{[\text{FAeqCa}_i]}{[\text{SAeqCa}_i]}; K_{SF2} = \frac{[\text{FAeqCa}_{(i+n)}]}{[\text{SAeqCa}_{(i+n)}]}$$

Experimental  $\tau_s$  values were fitted to:

$$\tau_s = \tau_0 \frac{K_0^m + [Ca^{2+}]^m}{[Ca^{2+}]^m}$$

where  $K_0$  is the apparent dissociation constant of  $Ca^{2+}$  binding,  $m$  is the corresponding Hill coefficient, and  $\tau_0$  is the time constant at saturating  $[Ca^{2+}]$ .

#### *Determination of theoretical initial maximum intensity*

Theoretical initial amplitudes of the fast and slow components were calculated from  $\Sigma_S/\Sigma_T$ ,  $\Sigma_F/\Sigma_T$ ,  $\tau_F$  and  $\tau_S$  values derived from the best fit of the model with experimental data, according to equations:

$$I_{fast} = \frac{\Sigma_F / \Sigma_T}{\tau_F} \quad \text{and} \quad I_{slow} = \frac{\Sigma_S / \Sigma_T}{\tau_S}$$

Theoretical initial activity ( $I$ ) was calculated from corrected initial amplitudes ( $I_{fast}^*$  and  $I_{slow}^*$ ) to take into account the lag of 365 ms between the beginning of  $Ca^{2+}$  injection and activity measurement in our experimental setup, according to equation:

$$I = I_{fast}^* + I_{slow}^* = I_{fast} e^{-\frac{0.365}{\tau_S}} + I_{slow} e^{-\frac{0.365}{\tau_F}}$$



## SUPPORTING RESULTS

### ***Screening random Q<sup>168</sup> and L<sup>170</sup> aequorin mutants for decay kinetics***

Construction of a library of random Q<sup>168</sup> and L<sup>170</sup> mutants and expression in *E. coli* has been described in a previous report (3). Bioluminescence was analyzed in a luminometer by applying a Ca<sup>2+</sup>-triton solution onto intact bacteria (3). Analysis of 500 clones showed that the mean bioluminescence intensity was reduced to 5.2 % of WT, indicating that most Q<sup>168</sup> or L<sup>170</sup> substitutions disrupt aequorin function, consistently with a direct role of QHL<sup>[168-170]</sup> residues in bioluminescence. Subsequently, 3840 clones were screened for both resistance to a 30 min heat shock at 55°C and for decay kinetics of light emission. Characterization of thermostability of the mutants has been previously reported (3). The light emitted during the first 2 seconds after injection (L<sub>0-2</sub>) and during the 2 following seconds (L<sub>2-4</sub>) was measured. As aequorin flash bioluminescence follows an exponential decay, the L<sub>2-4</sub>/L<sub>0-4</sub> ratio is an index of decay kinetics. Among 191 heat resistant clones, 29 were selected for sequence analysis that showed a range of kinetics (supporting figure 3, left) similar to that of the population of 191 clones. Mutants at the QHL<sup>[168-170]</sup> triplet are designated by aminoacid sequence (e.g. the AHV is the double Q<sup>168</sup>A & L<sup>170</sup>V mutant). Amino acids found at position 168 were R, S, K or A and were I, V, F M or L at position 170. Only hydrophobic residues were detected at position 170. Both positions influenced kinetics with, from slow to fast: A, K, R at position 168 and I, V, F, L at position 170 (supporting figure 3, right). The fast RHL mutant corresponds to the Bright Q<sup>168</sup>R whose decay kinetics were similar to WT aequorin. Characterizations of the AHV mutant that presented slowest decay kinetics and of the RHI mutant whose kinetics were intermediate between AHV and RHL are described in main text.

## SUPPORTING REFERENCES

1. Hill, A. V. (1910) *J. Physiol. Lond.* **40**, 4-7
2. Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J. P. (1965) *J. Mol. Biol.* **12:88-118.**, 88-118
3. Tsuzuki, K., Tricoire, L., Courjean, O., Gibelin, N., Rossier, J. & Lambolez, B. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 34324-34331
4. Illarionov, B. A., Bondar, V. S., Illarionova, V. A. & Vysotski, E. S. (1995) *Gene* **153**, 273-274
5. Inouye, S. & Tsuji, F. I. (1993) *FEBS Lett.* **315**, 343-346
6. Fagan, T. F., Ohmiya, Y., Blinks, J. R., Inouye, S. & Tsuji, F. I. (1993) *FEBS Lett.* **333**, 301-305
7. Head, J. F., Inouye, S., Teranishi, K. & Shimomura, O. (2000) *Nature* **405**, 372-376
8. Liu, Z.J., Vysotski, E.S., Chen, C.J., Rose, J.P., Lee, J. & Wang, B.C. (2000) *Protein Sci.* **9**, 2085-2093

## SUPPORTING FIGURE LEGENDS

### Supporting Figure 1

Multiple alignment of aequorin, obelin (4), clytin (5) and mitrocomin (6) primary sequences. Gray boxes indicate EF hands. Blue boxes denote aminoacid residues forming the coelenterazine binding pocket, as reported from the crystal structure of WT aequorin (7) and obelin (8). Twenty-one out of 23 coelenterazine binding residues belong to  $\alpha$ -helices adjacent to EFs (7,8). Orange boxes show positions of Bright and SloDK mutations and conserved residues at corresponding positions in other photoproteins.

### Supporting Figure 2

Analysis of decay kinetics. **A.** Logarithmic plots of WT and mutant aequorins bioluminescence decays shown in figure 3, main text. For WT and N<sup>26</sup>D, the arrows indicate the slope of luminescence decay at the beginning of the recording of their response to high [Ca<sup>2+</sup>]. Note that decays were not linear and thus cannot be described by a single exponential. **B.** Comparison of luminescence decay of WT aequorin and SloDK D<sup>117</sup>G mutant (colored lines) with results of fit by two decaying exponentials (dotted lines). WT and mutant aequorin decay kinetics were best fitted with the sum of two decaying exponentials according to the formula  $[I_S \exp(-t/\tau_S) + I_F \exp(-t/\tau_F)]$ , where  $I_S$  and  $I_F$  represent their intensities at  $t=0$ , and  $\tau_S$  and  $\tau_F$  represent their time constants. The light integrals corresponding to these exponentials ( $\Sigma_S$  and  $\Sigma_F$ ) were calculated from the products  $I_S \cdot \tau_S$  and  $I_F \cdot \tau_F$ .

### Supporting Figure 3

Decay kinetics of WT aequorin luminescence obtained with a fast mixing stopped-flow apparatus. **A.** Responses to low (red), medium (green) and high (black) [Ca<sup>2+</sup>]. **B.** Logarithmic plots of luminescence decays shown in A. The arrows indicate the slope of luminescence decays 100ms after the peak. Note that decays were not linear and thus cannot be described by a single exponential. **C.** Plots of the time constants of slow ( $\tau_S$ ) and fast ( $\tau_F$ ) exponentials versus [Ca<sup>2+</sup>]. **D.** Plots of maximum peak intensity, light integrals of the fast ( $\Sigma_F$ ) and slow ( $\Sigma_S$ ) exponentials and of total light emitted ( $\Sigma_T = \Sigma_F + \Sigma_S$ ) versus [Ca<sup>2+</sup>]. **E.** Plots of the contribution of the slow and fast components of luminescence decay to the total light integral ( $\Sigma_S/\Sigma_T$  and  $\Sigma_F/\Sigma_T$  respectively).

#### Supporting Figure 4

Decay kinetics of D<sup>153</sup>G aequorin mutant luminescence obtained with a fast mixing stopped-flow apparatus. **A.** Responses to low (red), medium (green) and high (black) [Ca<sup>2+</sup>]. **B.** Logarithmic plots of luminescence decays shown in A. The arrows indicate the slope of luminescence decays 100ms after the peak. Note that decays were not linear and thus cannot be described by a single exponential. **C.** Plots of the time constants of slow ( $\tau_s$ ) and fast ( $\tau_f$ ) exponentials versus [Ca<sup>2+</sup>]. **D.** Plots of maximum peak intensity, light integrals of the fast ( $\Sigma_f$ ) and slow ( $\Sigma_s$ ) exponentials and of total light emitted ( $\Sigma_T = \Sigma_f + \Sigma_s$ ) versus [Ca<sup>2+</sup>]. **E.** Plots of the contribution of the slow and fast components of luminescence decay to the total light integral ( $\Sigma_s/\Sigma_T$  and  $\Sigma_f/\Sigma_T$  respectively).

#### Supporting Figure 5

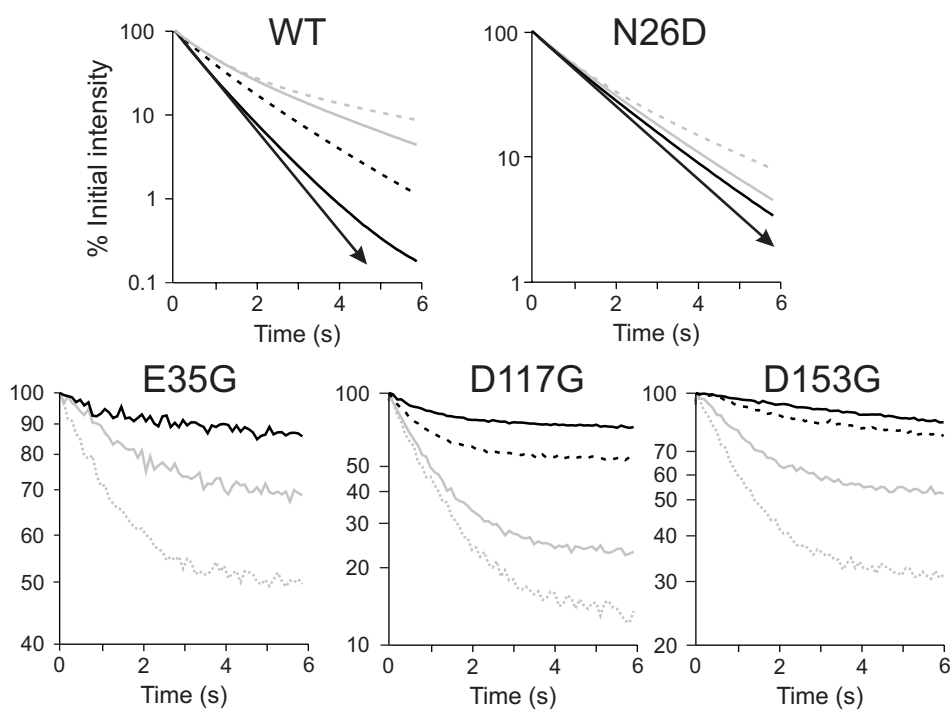
**Left panel:** Bioluminescence decay rates ( $L_{2-4}/L_{0-2}$ ) of bacterial clones expressing Q<sup>168</sup> and L<sup>170</sup> aequorin mutants. These mutants are designated by their aminoacid sequence at the QHL<sup>[168-170]</sup> triplet (e.g. the AHV is the double Q<sup>168</sup>A & L<sup>170</sup>V mutant). High  $L_{2-4}/L_{0-2}$  values denote slow decay kinetics. **Right panel** shows the influence of various aminoacid substitutions at positions 168 and 170 on decay rate.

# Supporting figure 1

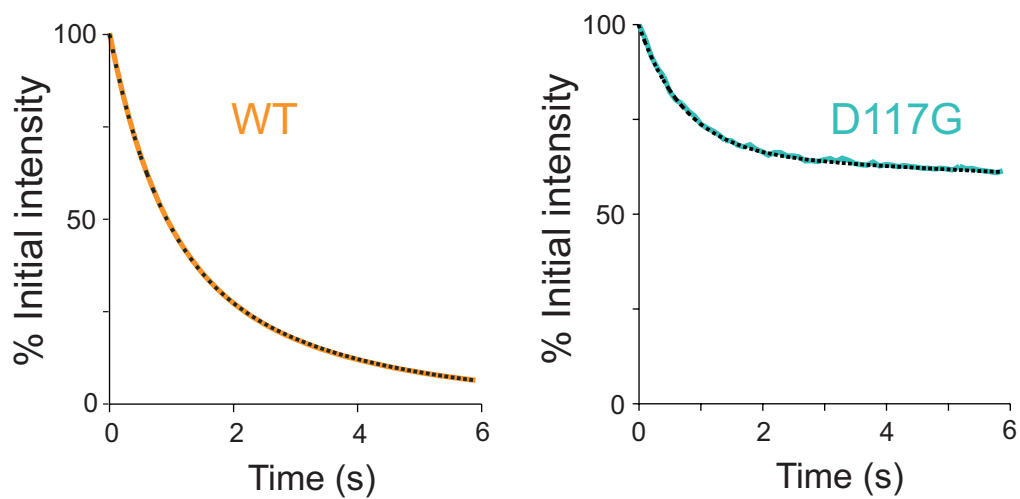
	EF1	EF2	EF3
Aequorin	MLYDVPDYASLKLTSDFDNPRWIGRHHKHMNFFLDVNHNKGKISLDEMVVKASDII	TPEQAKRHHKDAVEAFFGGAGMKYGVETDWPAYIEGWKKLATDELEKYAKNEPTLIRIWGD	ALFDIVDKDQNGAIIITLDEWKAYTKAAGIIQSSDCEETFRVCDIDESGQLDVDEMTQHL
Obelin	---MSSKYAVKLKTDFDNPRWIKRHHKHMDFDLIDINGNGKITLDEIVSKASDDICAKLEA	TPEQTKRHQVCVEAFFRGCGMEYGKEIAFPQFLDQWKQLATSELKKWARNEPTLIREWGD	AVFDIFDKDGSGITLDEWKAYGKISGISPSQEDCEATFRHCDLDNSGDLVDVDEMTQHL
Clytin	-MADTASKYAVKLRPNFDNPKWVNRHKKFMFNFLDINGDGKITLDEIVSKASDDICAKLGA	TPEQTKRHQDAVEAFFKKIGMDYGKEVEFFPAFVDGWKELANYDLKLWSQNKKSIIIRDWGE	AVFDIFDKDGSGISLDEWKAYGRISGICSSDEDAEKTFKHCDLDNSGKLDVDEMTQHL
Mitrocomin	--MSMGSRYAVKLTTDFDNPKWIARHHKHMNFFLDINSNGQINLNEMVHKASNIICKKLGA	TEEQTKRHQKCVEDFFGGAGLEYDKDTTWPEYIEGWKRLAKTELEHRSKNQVTTLIRIWGD	ALFDIIDDKDRNGSVSLDEWIIQYTHCAGIIQQSRGQCEATFAHCDLDGDKGLDVDEMTQHL
Aequorin			
Obelin			
Clytin			
Mitrocomin			
Aequorin			
Obelin			
Clytin			
Mitrocomin			

# Supporting figure 2

A

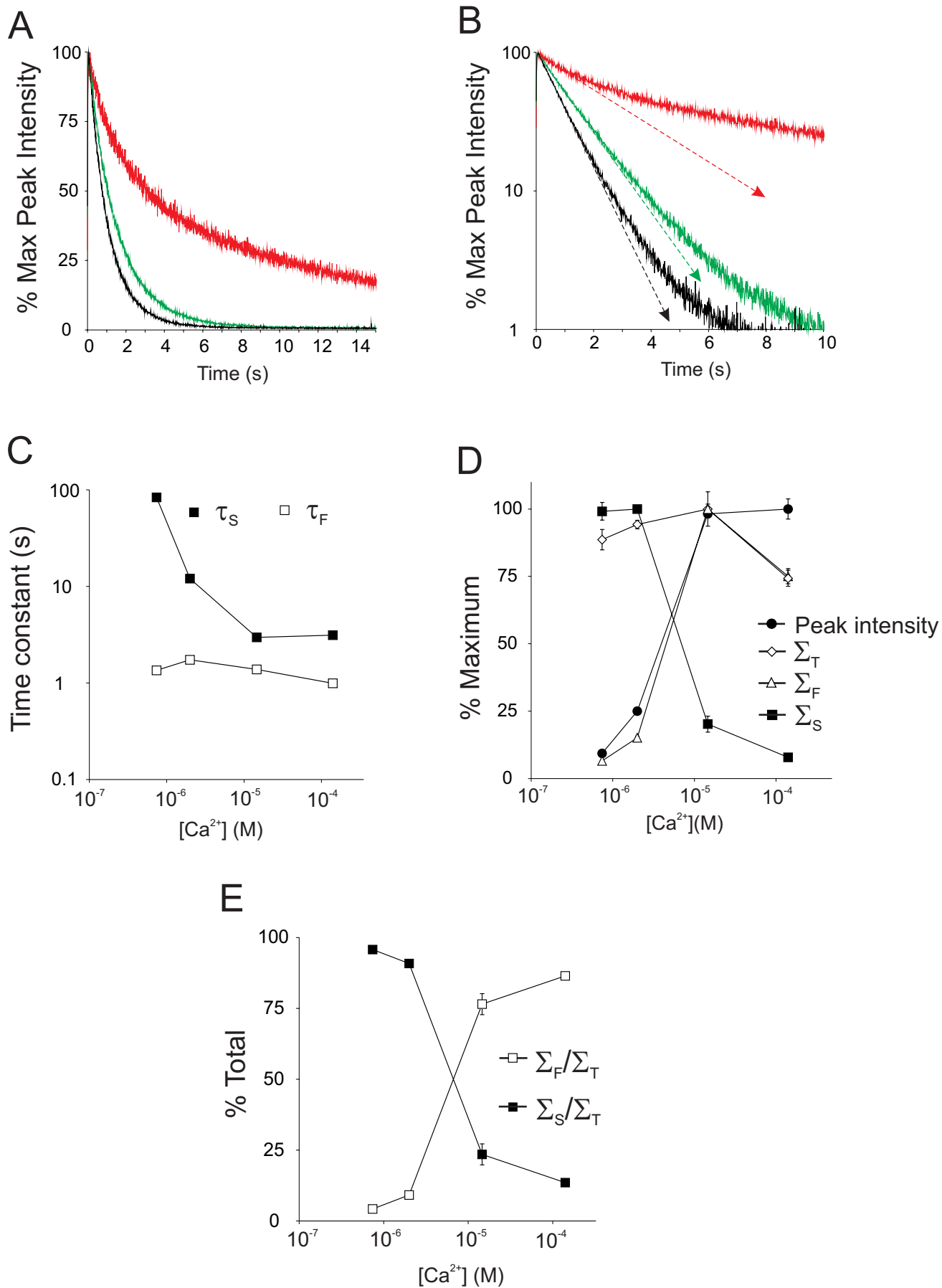


B



# Supporting Figure 3

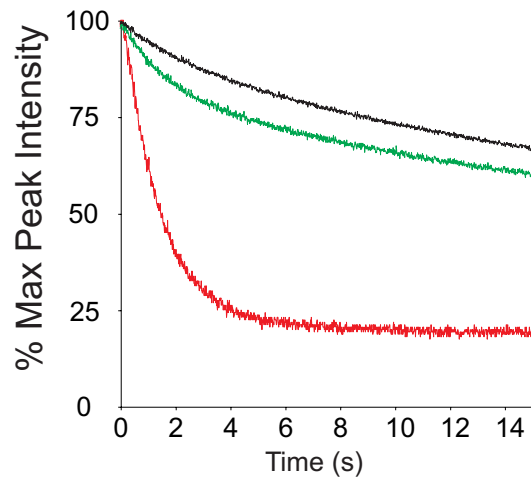
WT



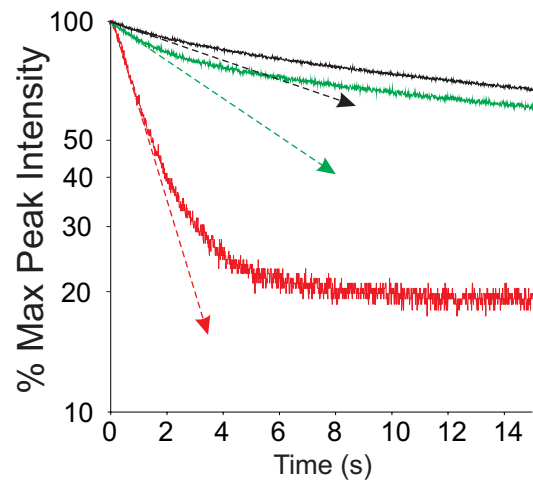
# Supporting Figure 4

## D153G

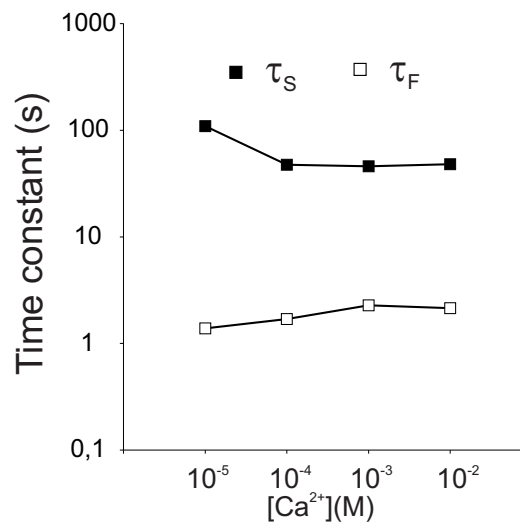
**A**



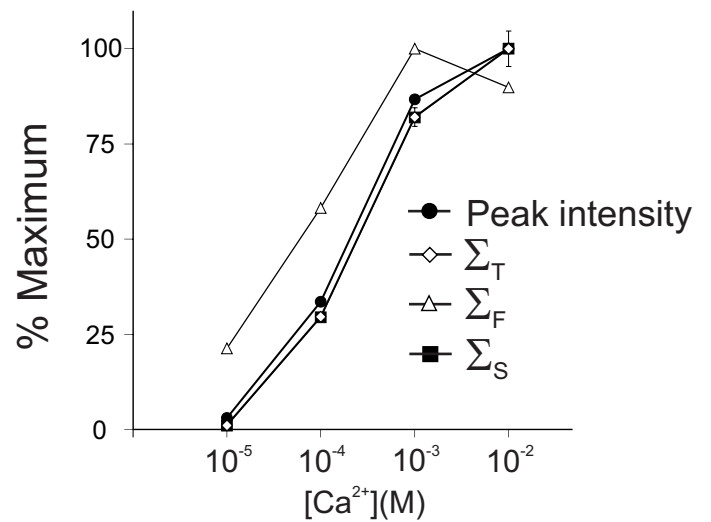
**B**



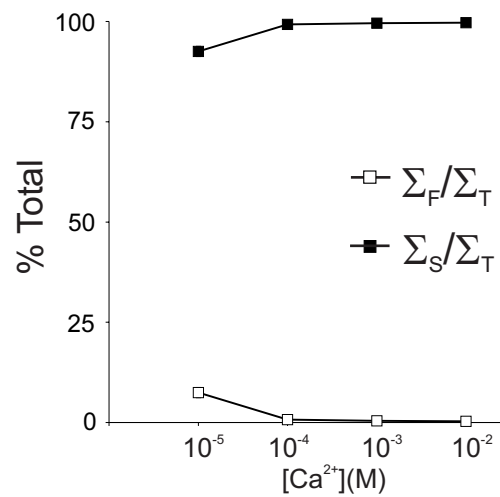
**C**



**D**

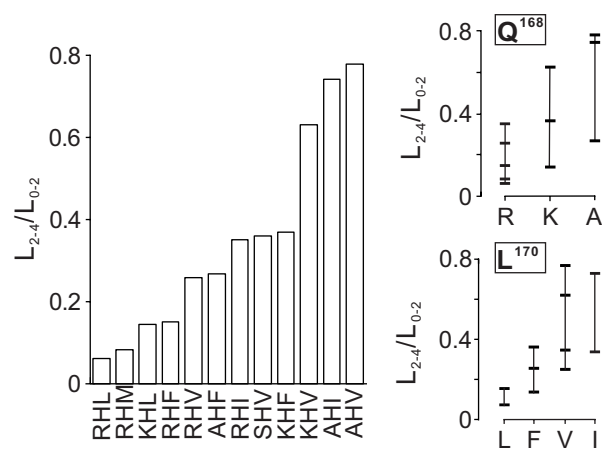


**E**





## Supporting figure 5



## 2.3 REMARQUES GENERALES

L'approche que nous avons utilisée s'est avérée très complémentaire des études structurales par cristallographie. Il aurait été très difficile d'obtenir par une approche dirigée les mutations Bright et SloDK qui présentent des phénotypes marqués mais restent bien fonctionnels. Réciproquement, l'interprétation de nos résultats a été grandement facilitée par la connaissance de la structure de l'aequorine et de l'obéline. Nos résultats ont permis de mieux comprendre le rôle des EF-hands dans la sensibilité calcique. Ils sont applicables aux autres photoprotéines qui sont très homologues et peut-être également aux autres membres de la superfamille des protéines à EF-hands comme la calmoduline.

L'aequorine est un transducteur naturel qui transforme le signal calcique en un signal lumineux. Pour tous les mutants présentés dans ce travail, tout gain de fonction est associé avec une perte de fonction telle que la modification de la stabilité, de la sensibilité calcique ou de la cinétique. Cela suggère que la flexibilité de l'espace des aequorines fonctionnelles permet des gains de fonction via les relations entre ces trois propriétés fonctionnelles fondamentales pour la bioluminescence. Le fait qu'aucun mutant ne présente un rendement quantique plus élevé que le WT suggère que l'apoequorine WT est optimisée pour un rendement maximal fixé par les propriétés physico-chimiques de la coelentérazine.

Dans les systèmes biologiques, les signaux calciques sont de nature transitoire. La bioluminescence de l'aequorine dépend de manière complexe de phénomènes cinétiques, ce qui rend difficile la détermination de la  $[Ca^{2+}]$  comme l'ont discuté Hastings et collaborateurs en 1969. Ces auteurs suggèrent que l'aequorine est mieux adaptée à la détection des augmentations de calcium qu'à la détermination de la  $[Ca^{2+}]$  au cours du temps. Dans la seconde partie de mon travail de thèse, j'ai utilisé l'aequorine comme gène rapporteur pour visualiser les variations de calcium associées aux activités neuronales.

**IMAGERIE DES ACTIVITES NEURONALES  
PAR BIOLUMINESCENCE AEQUORINE**

# IMAGERIE DES ACTIVITES NEURONALES PAR BIOLUMINESCENCE AEQUORINE

---

## 1. INTRODUCTION

---

### 1.1 UTILISATION DE L'AEQUORINE COMME SENSEUR CALCIQUE

C'est en 1882 que Sydney Ringer a montré pour la première fois que l'ion calcium intervient dans les processus biologiques. Lorsqu'il plongeait des cœurs de rat dans une solution saline préparée avec de l'eau du robinet (dureté élevée), les cœurs continuaient à battre. En revanche, lorsqu'il les plongeait dans de l'eau distillée, ils s'arrêtaient de battre au bout de 20 minutes. Il constata qu'en ajoutant du sel de calcium à l'eau distillé, les cœurs continuaient alors de battre (Ringer, 1882). Depuis, de nombreuses données ont été accumulées montrant que le calcium est l'un des plus importants seconds messagers impliqué dans les processus de signalisation cellulaire et ce, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux.

#### 1.1.1 HISTORIQUE

L'aequorine a été le premier senseur calcique utilisé pour étudier le rôle du calcium dans des processus physiologiques. Sa première utilisation a été réalisée par Ridgway et Ashley sur la fibre musculaire géante de balane (Ridgway et Ashley, 1967). La photoprotéine avait été introduite dans ces cellules par microinjection. Cette technique a été ensuite utilisée dans des cellules plus petites comme les oocytes, les myocytes et les hépatocytes (Cobbald et Rink, 1987). En neurobiologie, l'injection d'aequorine dans la terminaison présynaptique de la synapse géante de calmar a notamment permis à Llinas et coll. (1972) de corrélérer l'augmentation de calcium intracellulaire à la transmission synaptique (voir aussi Llinas et Nicholson, 1975). De telles expériences ont également permis de montrer que ces augmentations de la  $[Ca^{2+}]$  (200-300 $\mu$ M) étaient restreintes à des microdomaines (Llinas et coll., 1992 ; Llinas et coll., 1995).

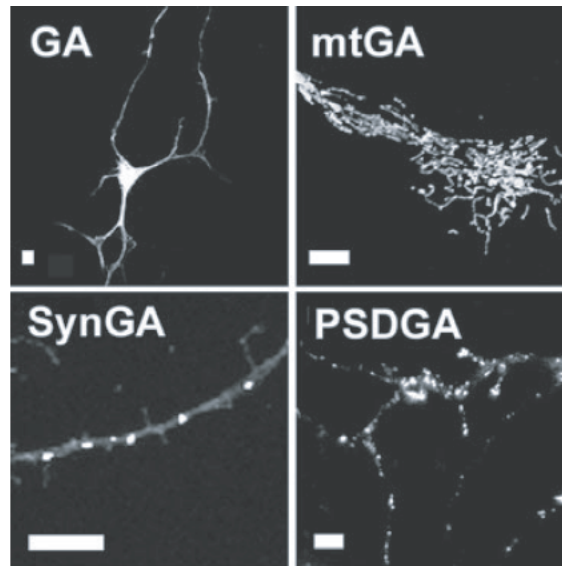
Le clonage de l'aequorine a permis son expression recombinante dans plusieurs systèmes d'expression hétérologue. Les premières mesures de signaux calciques avec une aequorine recombinante ont été effectuées en 1991 pour des réponses à des stimuli mécaniques ou thermiques (plantes, Knight et coll., 1991a), l'effet du complément (bactéries, Knight et coll., 1991b) ou les hormones d'accouplement (levures, Nakajima-Shimada et coll., 1991). En 1993, Button et Brownstein ont décrit le premier test cellulaire utilisant une lignée de cellule qui exprimait de façon stable l'apoequorine. Cela a permis le

développement de système de criblage pharmacologique portant sur les récepteurs membranaires (Dupriez et coll., 2002).

La connaissance de la séquence de la photoprotéine a également permis d'étudier la physiologie calcique dans des compartiments subcellulaires grâce à l'adjonction de séquences d'adressage (Figure 2.1). Ainsi, en 1992, Pozzan et ses collaborateurs ont utilisé l'aequorine adressée dans la mitochondrie pour montrer que l'activation de récepteurs couplés à la synthèse du second messenger inositol-1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) provoquait une augmentation de la  $[Ca^{2+}]$  mitochondriale supérieure à celle ayant lieu dans le cytoplasme (Rizzuto et coll., 1992). A la suite de ce travail, les variations de la  $[Ca^{2+}]$  dans d'autres compartiments subcellulaires comme le noyau et le réticulum endoplasmique ont été étudiées (pour revue, Chiesa et coll., 2001). Dans certains compartiments où la  $[Ca^{2+}]$  est supérieure à la gamme de sensibilité de l'aequorine, une forme mutante de l'aequorine (mutation D119A), qui présente une plus faible affinité calcique (Kendall et coll., 1992), a été utilisée. Une autre alternative est d'utiliser des analogues de coelentératine qui confère une faible sensibilité à l'aequorine (ex : coelentératine n). Elles permettent de mesurer des concentrations dans la gamme du millimolaire (Barrero et coll., 1997).

Plusieurs organismes transgéniques exprimant l'aequorine ont été décrits tels que les plantes du tabac *Nicotiana glauca* (Knight et coll., 1991a) et l'arabette des dames *Arabidopsis thaliana* (Sedbrook et coll., 1996), la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* (Créton et coll., 1997). Des souris transgéniques ont été développées par le groupe de Philippe Brûlet dans lesquelles l'expression d'une protéine de fusion GFP-aequorine cytosolique ou mitochondriale est régulée par l'activité de promoteurs spécifiques comme celui de la *CamKII $\alpha$* . Ce promoteur permet d'étudier les variations de calcium intracellulaire spécifiquement dans la sous-population des cellules glutamatergiques de l'hippocampe (données non publiées).

L'aequorine a été utilisée pour la mesure de la  $[Ca^{2+}]$ . Malgré les limitations introduites par la dépendance au calcium de la cinétique de bioluminescence de l'aequorine évoquées au chapitre précédent, un modèle numérique a été développé afin de convertir les valeurs d'intensité lumineuse en  $[Ca^{2+}]$  (Allen et Blinks, 1978).



**Figure 2.1 : Adressage de la GFP-aequorine**

Image confocale des différents chimères GFP-aequorine (GA) adressées à la mitochondrie (mtGA), la terminaison synaptique (Synaptotagmin I, synGA) et la densité postsynaptique (PSD-95, PSDGA). (d'après Rodgers et coll, 2005)

### 1.1.2 LA PROTEINE DE FUSION GFP-AEQUORINE

Dans mon travail de thèse, j'ai utilisé une protéine de fusion GFP-aequorine (GA) similaire à celle décrite par le groupe de Philippe Brûlet (Baubet et coll., 2000). Cette chimère a été exprimée dans les neurones de tranches de néocortex par transfert de gène. Ce senseur protéique est bifonctionnel. Le site d'expression de l'aequorine est difficile à localiser sur tissus vivants car celle-ci n'est pas fluorescente. La GFP permet ainsi de visualiser son site d'expression par fluorescence et la bioluminescence de l'aequorine permet de détecter les augmentations de calcium intracellulaire (Figure 2.1). Cette protéine de fusion a permis pour la première fois d'utiliser l'aequorine recombinante afin de visualiser les signaux calciques résultant de l'activité neuronale avec une résolution cellulaire et une résolution temporelle proche des phénomènes bioélectriques (Baubet et coll., 2000).

Cette chimère possède une bioluminescence supérieure à l'aequorine seule en système d'expression eucaryote, peut-être en raison d'une meilleure stabilité de la partie aequorine (Baubet et coll., 2000). En effet, l'aequorine seule, exprimée dans le cytoplasme, est dégradée rapidement (Badminton et coll., 1995). De plus, nos mesures ont montré que la cinétique de décroissance de la bioluminescence émise par GA est plus rapide que celle de l'aequorine seule (données non publiées). Cela signifie qu'elle émet plus de lumière par unité de temps et donc détecte mieux les transitoires calciques. Le spectre d'émission de GA présente un pic d'émission à 510 nm qui correspond au pic de fluorescence de la GFP. Ce décalage par rapport à l'émission de l'aequorine ( $\lambda_{\text{max}}=469\text{nm}$ ) résulte d'un transfert d'énergie par BRET entre l'aequorine et la GFP (Baubet et coll., 2000).

### 1.1.3 AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Les principaux avantages de l'aequorine résident dans le fait qu'elle est utilisable en transfert de gène et qu'elle permet une détection non invasive des signaux calciques. A la différence des sondes fluorescentes, elle n'induit donc pas de phototoxicité. Cela m'a permis d'effectuer des enregistrements de plusieurs heures en continu au cours de ma thèse. Une des principales limitations de l'aequorine est qu'un seul photon peut être émis par molécule d'aequorine. Ceci limite la détection en tissus épais et requiert l'utilisation d'un système de détection adapté aux faibles niveaux de luminescence. Le faible nombre de photons émis n'autorise pas les méthodes de sectionnement optique et limite la résolution spatiale et temporelle de cette technique. Ce problème est en partie résolu par le bruit de fond quasi nul de la bioluminescence (en l'absence de calcium, il n'y a pas d'émission de lumière). De plus, L'aequorine peut, en principe, être exprimée grâce aux techniques de

transfert de gènes dans un type cellulaire spécifique ou un compartiment subcellulaire particulier.

L'aequorine s'avère être un bon rapporteur du calcium car elle n'est pas toxique pour la cellule qui l'exprime et affecte peu la physiologie de la cellule car elle tamponne faiblement le calcium intracellulaire. En effet, l'aequorine recombinante est exprimée habituellement à une concentration d'environ 0,1-1 $\mu$ M, ce qui est de deux à trois ordres de grandeur plus bas que la concentration à laquelle sont utilisés les colorants chimiques fluorescents (Brini et coll., 1999).

La capacité de l'aequorine à détecter les transitoires calciques rapides est limitée par la cinétique de la phase de montée de sa bioluminescence ( $\tau \sim 10$ ms). Celle-ci est bien plus lente que les temps de réponse des colorants chimiques fluorescents ( $\sim 1$ ms), en raison des changements conformationnels nécessaires pour déclencher l'émission de lumière. Elle ne permet donc pas de suivre les activités neuronales à l'échelle de temps des potentiels d'action ( $\sim 1$ ms) comme j'ai pu le constater au cours de ma thèse. Il faut noter que ce désavantage est partagé les sondes protéiques fluorescentes disponibles à ce jour (Pologruto et coll., 2004) dont les temps de réponse sont plus élevés que celui de l'aequorine (pour revue, Knopfel et coll., 2006).

## **1.2 MODULATION CHOLINERGIQUE DANS LE NEOCORTEX**

Le néocortex est impliqué dans des processus cognitifs aussi complexes que la reconnaissance des formes, le langage, ou le contrôle volontaire du mouvement. Ses nombreuses afférences sensorielles et connections internes réciproques font de lui un centre important d'intégration et de traitement de l'information. Ces fonctions sont sous l'influence de systèmes modulateurs extracorticaux tels que le système cholinergique. Ce dernier est étroitement impliqué dans les processus d'éveil, d'attention, de perception sensorielle et d'apprentissage. Durant mon travail de thèse, je me suis intéressé à la modulation des activités corticales par l'acétylcholine.

### **1.2.1 ARCHITECTURE DU RESEAU NEOCORTICAL**

#### **1.2.1.1 Anatomie**

Le néocortex est la partie la plus rostrale du télencéphale et constitue à proprement parler l'écorce du cerveau. C'est également l'une des structures cérébrales les plus récentes d'un point de vue phylogénétique, apparue au cours de l'évolution avec les mammifères (Bear M.F. et coll., 1997).



## Régionalisation

D'une manière générale, chez les mammifères supérieurs, le néocortex est divisé en quatre lobes anatomiquement délimités par des scissures et des sillons. Le lobe frontal, formant la partie la plus antérieure du cerveau comprend notamment l'aire motrice principale, responsable de la genèse des mouvements volontaires. Le lobe temporal inclut l'aire auditive principale. Le lobe pariétal contient l'aire somesthésique principale. Enfin, le lobe occipital, qui forme la partie la plus postérieure du cerveau, est impliqué dans la vision. Certaines de ces aires ont leur équivalent chez les mammifères plus primitifs tels que les rongeurs : à titre d'exemple, aux aires motrices et somesthésiques de l'homme, correspond l'aire sensorimotrice du rat.

## Structure laminaire

Le néocortex est constitué de deux formations superposées : la substance grise située à la surface du cerveau, juste en dessous de la pie-mère, et la substance blanche délimitée par la substance grise, les ventricules et le striatum. La substance grise est constituée d'un grand nombre de corps cellulaires. La substance blanche est quant à elle essentiellement formée de fibres nerveuses myélinisées. Par la suite, nous nous intéresserons uniquement à la substance grise du néocortex. L'observation de la substance grise par des marquages histochimiques comme la coloration des fibres myélinisées, la coloration de Nissl, ou l'imprégnation à l'argent de Golgi, révèle une hétérogénéité de la substance grise. Sur la base des densités et des tailles des corps cellulaires, six couches parallèles à la surface du néocortex ont pu être décrites.

La couche I, la plus superficielle est également appelée couche moléculaire ou couche plexiforme. Elle est principalement constituée de fibres nerveuses. On y trouve toutefois les corps cellulaires de quelques neurones. Les couches II et III, contiennent de nombreuses cellules pyramidales. La couche II contient des cellules pyramidales plus petites que celles de la couche III.. La couche granulaire interne, ou couche IV, contient une forte densité de cellules étoilées. Cette couche est par ailleurs dépourvue de cellules pyramidales. La couche V contient les grandes cellules pyramidales du néocortex. Enfin, la couche VI ou couche polymorphe, contient des cellules pyramidales de formes irrégulières et de plus petites tailles que celles de la couche V. L'épaisseur relative de ces couches n'est pas constante suivant les aires corticales considérées. Par exemple, la couche IV devient importante dans les aires sensorielles primaires, où elle peut se subdiviser en sous-couches, alors qu'elle est presque inexistante dans les aires motrices. Au contraire, la couche V est particulièrement développée dans le cortex moteur.

## Organisation en colonnes

En plus de sa structure laminaire, le néocortex est également organisé en colonnes. Ces colonnes sont matérialisées par l'organisation verticale des éléments corticaux. Elles sont visibles par les techniques de coloration des gaines de myélines ou des cellules. Ces colonnes s'étendent sur toute l'épaisseur du cortex, et présentent un diamètre de 300 à 500 µm. Ces unités morphologiques correspondent en outre à des unités fonctionnelles. Mountcastle a remarqué, dans le néocortex de chat *in vivo*, que les cellules répondant à la stimulation d'une même classe de récepteurs, ainsi que les cellules répondant à la stimulation des récepteurs d'une même région de la peau, sont organisées en colonnes (Kandel E.R., Jessel T.M., 1991; Bear M.F. et coll., 1997). Cette organisation en colonne se retrouve notamment dans le cortex visuel et auditif de nombreuses espèces. Suivant les espèces et les zones corticales considérées la forme des colonnes corticales peut varier, mais cette organisation reste un principe général au niveau du cortex.

### 1.2.1.2 Constituants cellulaires

Dans le néocortex, on rencontre deux grands types de cellules : les cellules gliales (ou glies) et les cellules nerveuses (ou neurones).

#### 1.2.1.2.1 Les Cellules Gliales.

Les cellules gliales constituent le type cellulaire le plus abondant du système nerveux puisqu'on estime qu'il y a entre 10 et 50 fois plus de glies que de neurones (Kandel E.R., 1991). Les cellules gliales occupent des fonctions essentielles dans la physiologie du système nerveux telles que l'isolation électrique des axones, l'homéostasie du potassium, l'élimination des neurotransmetteurs de la fente synaptique. Les glies se subdivisent en deux types : les microglies et les macroglies. Les microglies sont des phagocytes recrutés lors de lésions ou de maladies. Il existe deux types de macroglies dans le néocortex : les oligodendrocytes et les astrocytes (pour revue, voir Vaughan, 1984). Les oligodendrocytes entourent les axones d'une gaine de myéline et assurent ainsi une isolation électrique permettant une conduction rapide de l'influx nerveux. On trouve les oligodendrocytes dans la substance blanche et dans la substance grise du néocortex. Les astrocytes jouent un rôle dans la régulation du métabolisme neuronal et dans la transmission synaptique. Ces derniers peuvent être identifiés grâce au marqueur GFAP (glial fibrillary acidic protein).

#### 1.2.1.2.1 Les neurones

La grande diversité des cellules nerveuses qui peuplent le néocortex a donné lieu à des études systématiques, visant à classifier ces neurones sur la base de leurs propriétés

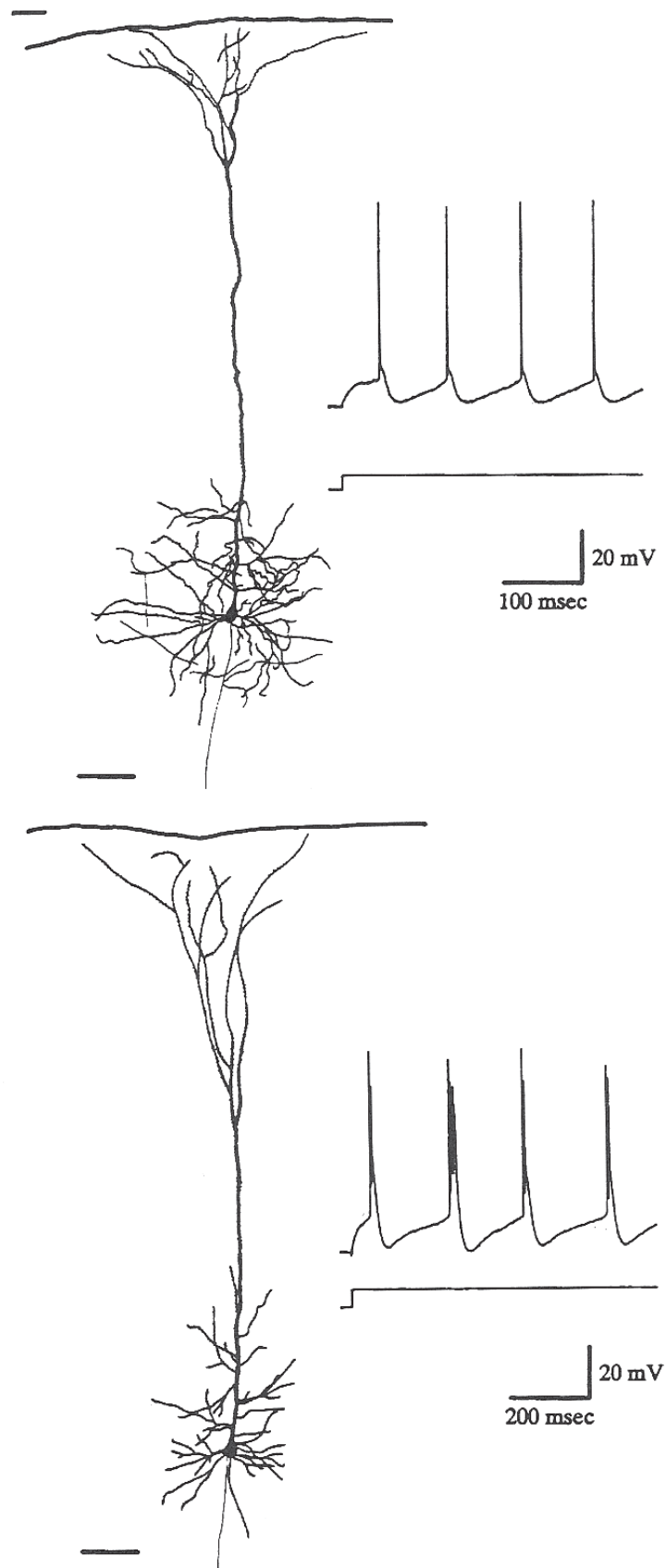
morphologiques. Ainsi Santiago Ramón y Cajal (1911) a dressé un véritable catalogue des neurones néocorticaux grâce à la méthode de coloration argentique mise au point par Camillo de Golgi (1873). Le développement des techniques d'immunocytochimie et d'hybridation in situ et la mise au point de la technique de patch-clamp sur des tranches de cerveau maintenues en survie (Edwards et coll., 1989; Stuart et coll., 1993), ont permis l'étude systématique des comportements de décharge de potentiels d'action de ces différents types de neurones rencontrés dans le néocortex. Ces neurones sont classiquement divisés en deux grandes populations : les neurones excitateurs et neurones inhibiteurs, à axone court, encore regroupés sous le terme d'interneurones.

### Les neurones excitateurs

Les neurones excitateurs sont également appelés neurones épineux (« spiny neuron ») en raison de la présence d'épines (taille~1µm) qu'on observe au niveau de leurs dendrites. Ces neurones utilisent le glutamate comme neurotransmetteur (Baughman et Gilbert, 1981). Cette population cellulaire se subdivise en deux grandes classes : les cellules pyramidales et les cellules étoilées.

#### Cellules pyramidales

Les cellules pyramidales (Figure 2.2) représentent environ 70% des neurones néocorticaux (Sloper et coll., 1979, Powell, 1981). Les cellules pyramidales se distinguent facilement des autres types cellulaires par la forme triangulaire de leur soma, leur dendrite apicale proéminente qui s'étend verticalement vers la surface du néocortex, et leurs dendrites basales qui émergent latéralement de la base du corps cellulaire. La dendrite apicale s'étend généralement jusque dans la couche moléculaire où elle se ramifie abondamment pour former un bouquet terminal. Plusieurs dendrites basales émergent du soma et se ramifient rapidement. Leur arborisation est plus ou moins importante suivant les couches corticales (pour revue, voir Feldman, 1984; DeFelipe & Fariñas, 1992). L'axone des cellules pyramidales émerge généralement de la base du corps cellulaire ou d'une dendrite basale. Il plonge vers les couches profondes du néocortex et pénètre dans la substance blanche, avant de rejoindre d'autres aires néocorticales ou les structures sous-corticales. Tout au long de sa trajectoire, il donne naissance à de nombreuses collatérales horizontales ou ascendantes qui vont contacter d'autres cellules de la même région corticale. Chaque cellule constitue en cela une source majeure d'entrées excitatrices dans la région où elle se trouve et participe au circuit cortical local. D'autre part, les cellules pyramidales sont les neurones efférents du néocortex, elles sont de ce fait parfois nommées cellules principales.

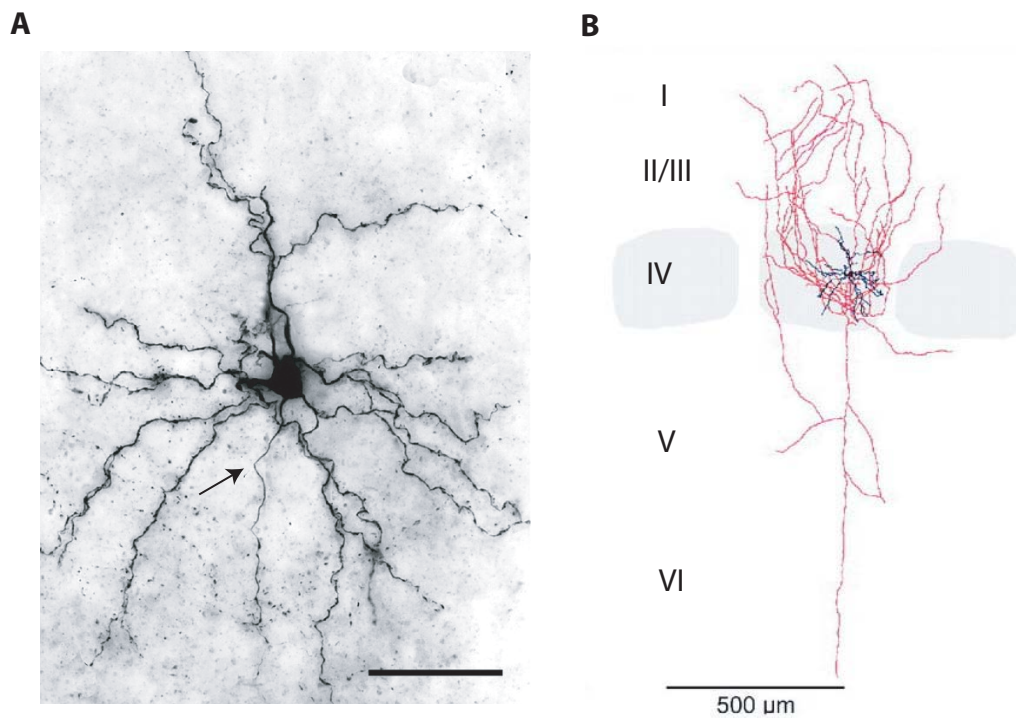


**Figure 2.2 : Propriétés morphologiques et électrophysiologiques des cellules pyramidales de la couche 5**

Les neurones ont été enregistrés *in vitro* en intracellulaire, stimulé avec un échelon de courant dépolarisant, et marqués à la biocytine.

A. Une cellule à décharge habituelle. B. Cellule à décharge en bouffée.

Echelle=100μm (D'après Silva et Connors, 1992)



**Figure 2.3. Propriétés morphologiques des cellules étoilées de la couche IV**

A. Cellules étoilées de la couche IV dans le champ de tonneaux, marquage à la biocytine. L'axone est indiqué par une flèche. Noter les nombreux boutons axonaux. Echelle=250µm.  
 B. Reconstitution neurolucida de l'arborisation axonale (rouge) de la même cellule étoilée. Les tonneaux sont indiqués en gris. (d'après Staiger et coll, 2004)

Le profil de décharge (Figure 2.2) des cellules pyramidales est caractérisé par une réduction rapide et marquée de la fréquence instantanée de décharge de potentiels d'action (ou adaptation de fréquence). Il existe également des cellules pyramidales à décharge en bouffées qui sont plus rares. Elles se situent au sein des couches IV et V.

#### Cellules étoilées

Ces cellules possèdent, par opposition aux cellules pyramidales, un axone court dont la trajectoire est limitée au circuit cortical local, et sont à ce titre des interneurons (Figure 2.3). A la différence des cellules pyramidales, elles ne présentent pas de dendrite apicale. Ce sont de petites cellules avec plusieurs dendrites. Elles reçoivent des afférences provenant directement du thalamus, et contactent les cellules pyramidales et les interneurons inhibiteurs (Hersch et White, 1981, Hornung et Garey, 1981, Freund et coll., 1985 ; Ahmed et coll., 1994). Du point de vue électrophysiologique, les cellules étoilées sont caractérisées par une décharge semblable à celle des cellules pyramidales (Agmon & Connors, 1992).

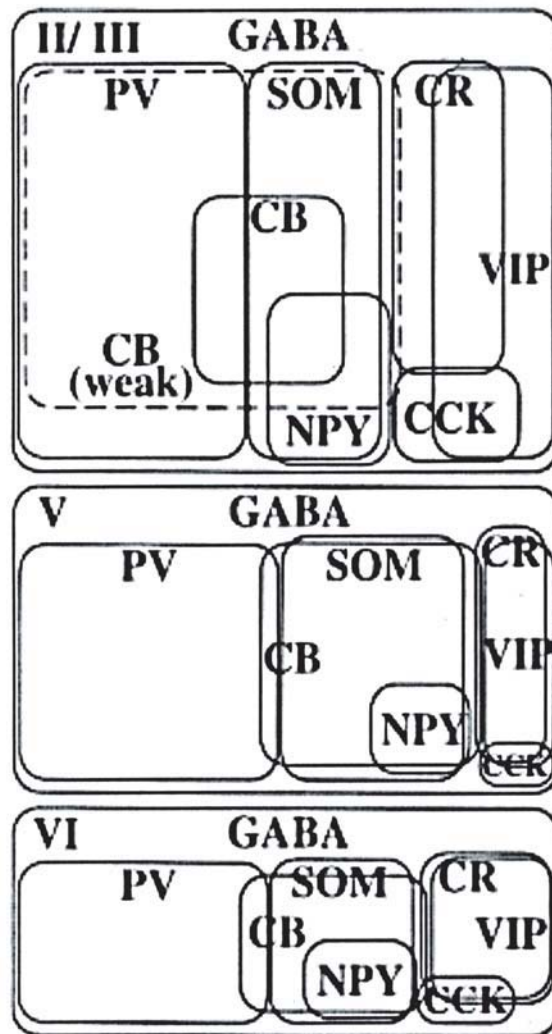
#### Les interneurons inhibiteurs

A l'instar des cellules étoilées, les interneurons inhibiteurs sont des neurones à projection locale. Cependant, ils libèrent l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) lors de la neurotransmission (Houser et al., 1983). Les interneurons GABAergiques sont présents dans toutes les couches corticales, y compris dans la couche moléculaire. Ils constituent environ 20% des neurones corticaux (Gabbott et Somogyi, 1986). Contrairement aux cellules pyramidales et étoilées, ces neurones sont quasiment dépourvus d'épines dendritiques. On les appelle également cellules lisses (« smooth neuron »). Ils présentent des caractéristiques morphologiques, neurochimiques et électrophysiologiques extrêmement hétérogènes (Figure 2.4, 2.5 et 2.6, pour revue, voir DeFelipe, 2002). Les différentes classifications issues de chacun de ces paramètres présentent seulement des recouvrements partiels. J'utiliserai donc ici la nomenclature résultant des études de classifications multiparamétriques effectuées au laboratoire (Cauli et coll., 2000, Gallopin et coll., 2005). Cette classification regroupe la majorité des interneurons en cinq grandes classes en accord avec les travaux de Kawaguchi et Kubota (1997). Cette nomenclature sera notamment la mieux adaptée pour décrire la sensibilité des types neuronaux aux agonistes cholinergiques.

- Les interneurons FS présentent une décharge de potentiels d'action de type « Fast Spiking » (décharge rapide sans adaptation de fréquence) et

constituent environ 30% des interneurones. La majorité de ces neurones exprime la parvalbumine (Cauli et coll., 1997 ; Kawaguchi, 1995). Ils présentent une arborisation dendritique multipolaire ou à double bouquet verticalement orienté, et leur arborisation axonale forme des contacts de type cellule à panier (axo-somatique) ou en chandelier (axo-axonique) (Kawaguchi et Kubota, 1997).

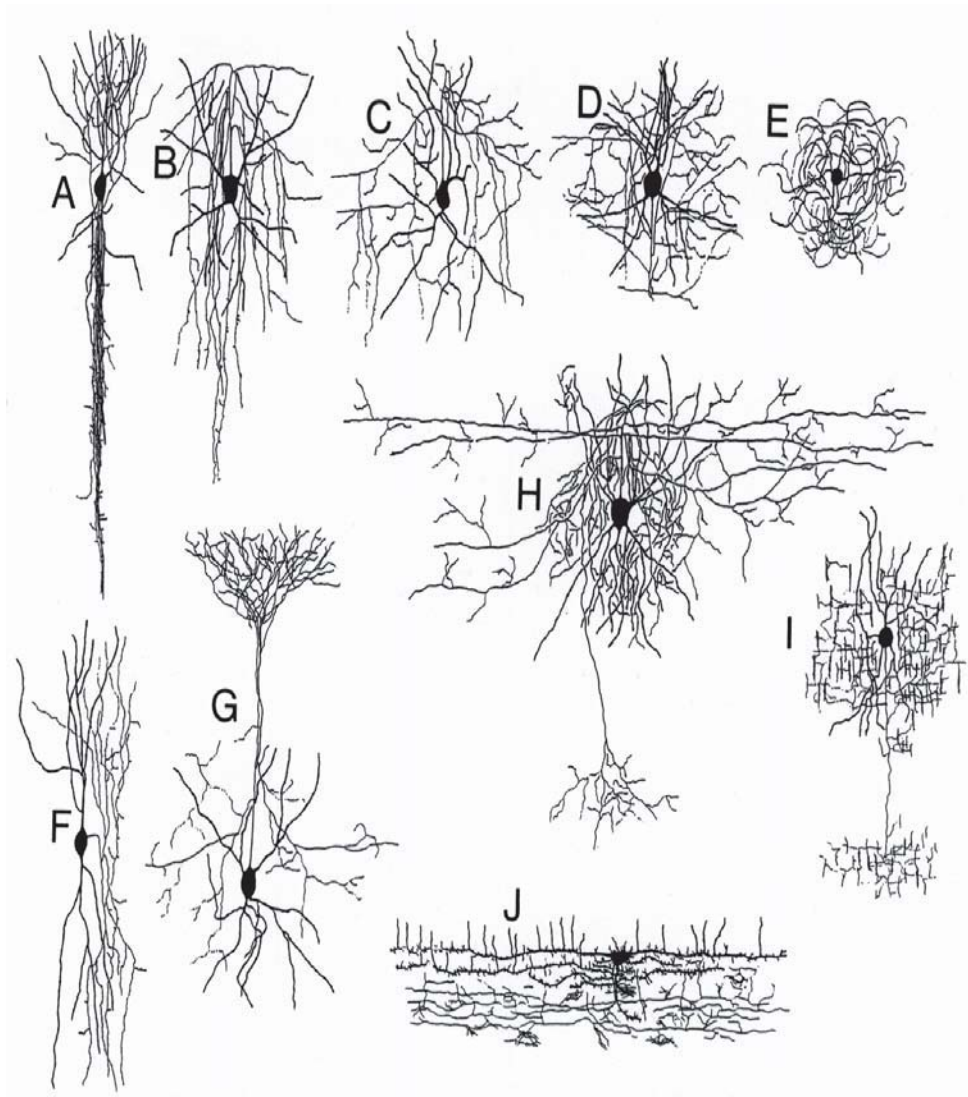
- Les interneurones VIP (qui expriment le Vasoactive Intestinal Peptide) présentent une décharge de potentiels d'action de type « regular spiking » (adaptation en fréquence) ou de type « irregular spiking » (bouffées de potentiels d'action émises à intervalles irréguliers). Ils constituent environ 20% des interneurones et présentent une arborisation dendritique verticale bipolaire ou à double bouquet. Leur arborisation axonale forme des contacts aux niveaux somatiques et dendritiques (Cauli et coll., 1997, Porter et coll., 1998, Kawaguchi et Kubota, 1997).
- Les interneurones SOM (qui expriment la somatostatine) présentent une décharge de potentiels d'action de type « regular spiking » (adaptation en fréquence) et constituent environ 20% des interneurones. Ils présentent une arborisation dendritique multipolaire ou à double bouquet verticalement orienté et une arborisation axonale ascendante (de type Martinotti) formant des contacts avec les dendrites distales (Cauli et coll., 1997 ; Kawaguchi et Kubota, 1997 ; Wang et coll., 2004) ;
- Les interneurones CCK (qui expriment la cholecystokinine) présentent une décharge de potentiels d'action de type « regular spiking » (adaptation en fréquence ; Kawaguchi et Kubota, 1997) ou de type « irregular spiking » (bouffées de potentiels d'action émises à intervalles irréguliers ; Galaretta et coll., 2004), et constituent environ 10% des interneurones. Ils présentent une arborisation dendritique multipolaire et leur arborisation axonale forme des contacts somatiques de type cellule à panier.
- Les interneurones NPY (qui expriment le neuropeptide Y) ont une décharge de potentiels d'action de type « regular spiking » (quoique présentant une faible adaptation en fréquence) souvent caractérisée par une latence initiale (« late spiking », Kawaguchi, 1995). Ils présentent fréquemment une morphologie de type neurogliaforme (Kawaguchi, 1997 ; Tamas et coll., 2003 ; Price et coll., 2005). Ils constituent une proportion importante des interneurones de la couche I (résultats non publiés du laboratoire).



**Figure 2.4 : Distribution de marqueurs neurochimiques parmi les interneurones GABAergiques du néocortex.**

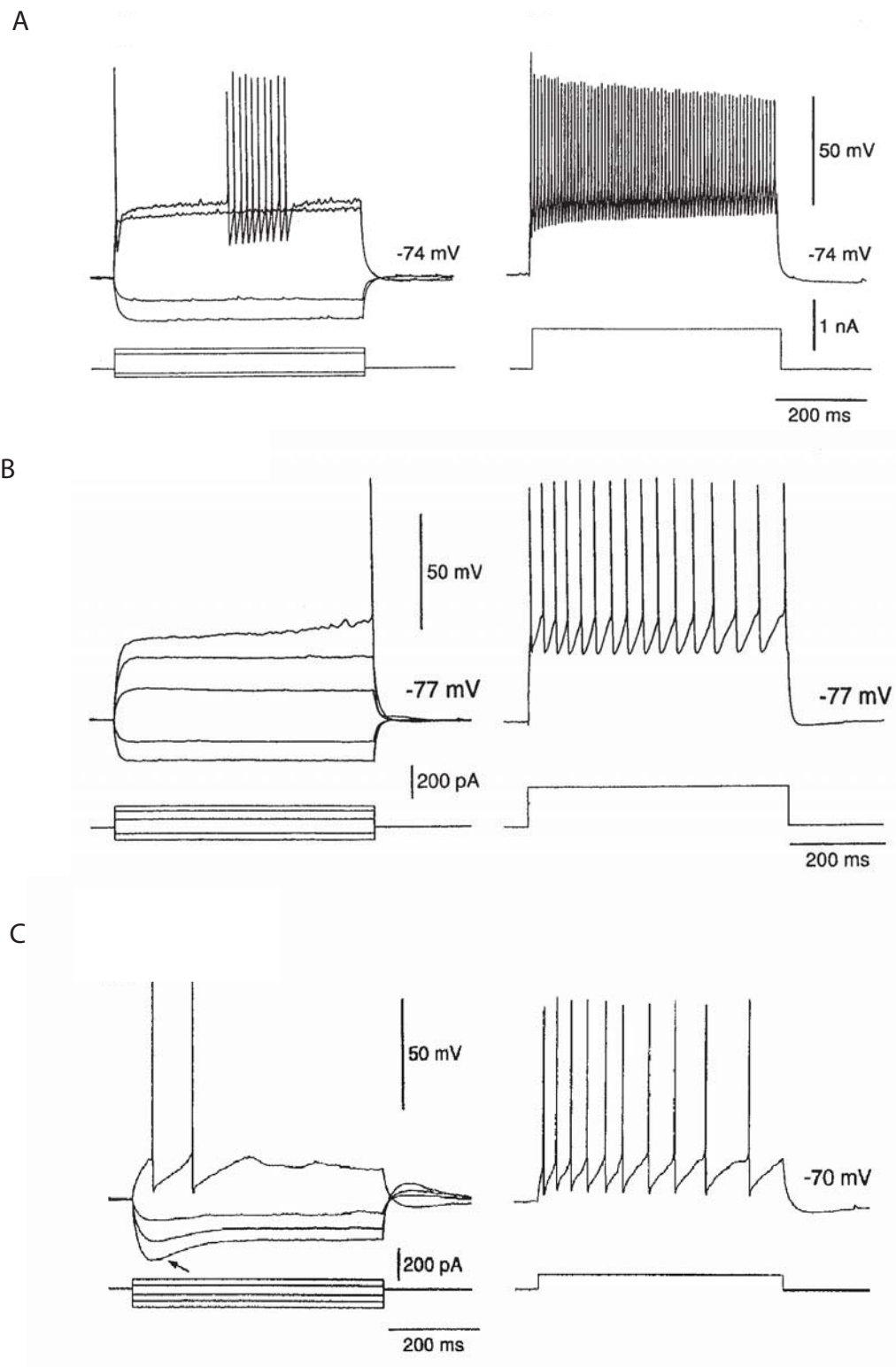
La surface des différentes aires est proportionnelle au nombre relatif de neurones immunoréactifs pour un marqueur biochimique. CB, calbindine; PV, parvalbumine; CR, calrétinine; NPY, neuropeptide Y; SOM, somatostatine; VIP, peptide vasoactif intestinal; CCK, cholecystokinine. (D'après Kawaguchi & Kubota, 1997)



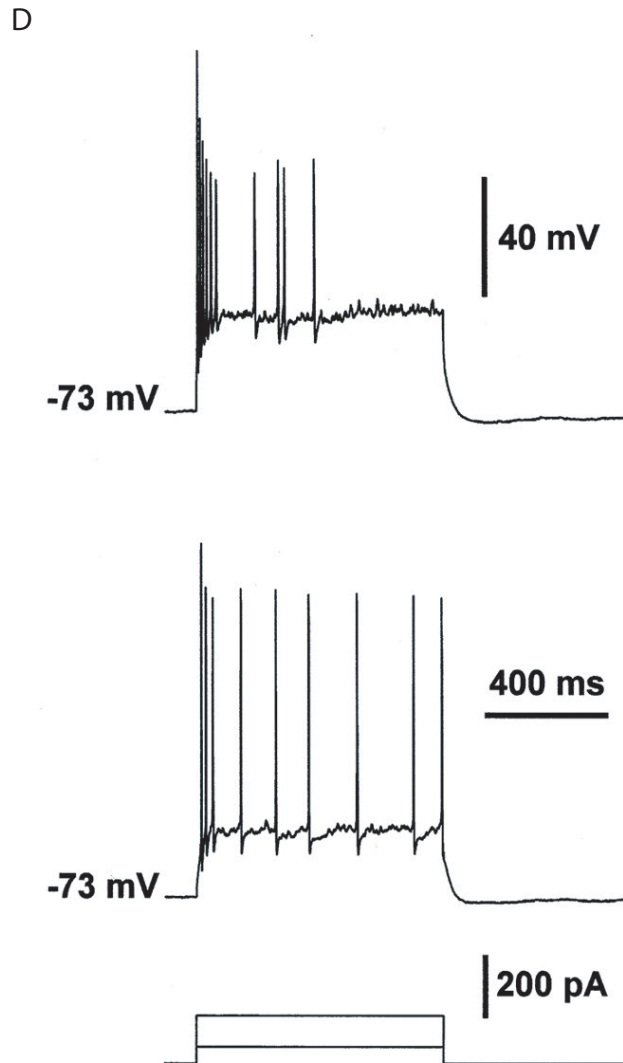


**Figure 2.5 : Morphologie des principaux types d'interneurones GABAergiques du néocortex.**

A,F : cellules à double bouquet dendritique. B,C : cellules avec une arborisation axonale extensive. D,H : petite et grande cellules en paniers. E : Cellule neurogliaforme. G : Cellule de Martinotti. I : Cellule en chandelier. J : Cellule de Cajal-Retzius. (D'après DeFelipe, 1993).



**Figure 2.6 : Profil de décharge des interneurones GABAergiques**



**Figure 2.6 (suite):**

A. *Décharge de type "fast Spiking"*. (gauche) Décharge de potentiels d'action induites par un courant dépolarisant proche du seuil d'émission des potentiels d'action. On note une AHP rapide et prononcée après chaque potentiel d'action. (droite) Décharge de potentiels d'action à haute fréquence induite par un fort courant dépolarisant (d'après Kawaguchi, 1995).

B. *Décharge de type "Late Spiking"*. (gauche) L'application d'un courant dépolarisant supraliminaire entraîne le développement d'une lente rampe dépolarisante avant la décharge d'un potentiel d'action (trace de gauche). (droite) Décharge répétitive de potentiels d'action induite par un fort courant dépolarisant (d'après Kawaguchi, 1995).

C. *Décharge de type "Regular Spiking"*. (gauche) L'application d'un fort courant hyperpolarisant induit une rectification entrante (flèche). (droite) L'application d'un courant dépolarisant entraîne une décharge répétitive de potentiels d'action avec une adaptation très marquée (d'après Kawaguchi, 1995).

D. *Décharge de type "Irregular Spiking"*. Décharges de potentiels d'action obtenues par injection de courants dépolarisants. Notez la bouffée initiale de potentiels d'action (D'après Cauli et coll, 1997)

Les interneurones GABAergiques inhibiteurs modulent l'activité des cellules pyramidales efférentes et peuvent donc contrôler les sorties corticales. L'influence de l'activité des interneurones sur ces efférences varie en fonction de la quantité et de la distribution des contacts synaptiques GABAergiques qu'ils forment sur les cellules pyramidales (Thomson et Deuchars, 1997 ; Somogyi et coll., 1998).

## 1.2.2 LES CONNEXIONS INTRACORTICALES ET ENTREES-SORTIES

### 1.2.2.1 Considérations sur le câblage dans le néocortex

L'un des principes les plus importants des circuits corticaux est d'économiser du « câble », c'est-à-dire de réduire la longueur des axones qui relient les neurones (Mead, 1990 ; Mitchison, 1992). Chaque millimètre cube de substance blanche contient environ 9m d'axone et un volume égal de substance grise en contient environ 3km. Le volume occupé par les axones serait fortement accru si chaque neurone devait connecter tous les autres neurones dans une région donnée ou bien si chaque neurone était mis en jeu dans des connexions à longue distances entre les aires corticales. Au lieu de cela, les principes de construction du cortex font que les neurones sont peu connectés, que la plupart des connexions sont locales et que seulement une proportion restreinte de neurones est impliquée dans des connexions à longue distance. La contrainte de volume conduit également à l'existence de plusieurs aires corticales. Si des aires séparées sont fusionnées en une seule aire qui conserve la même épaisseur, alors, les constituants des aires d'origine doivent s'étendre sur une plus grande surface (Mitchison, 1992). En effet, les connexions entre les neurones doivent maintenant parcourir de plus grandes distances et donc les axones occupent un plus grand volume pour le même nombre de neurones. Mitchison a montré que la fusion de 100 aires corticales conduit à une augmentation du volume cortical d'un facteur 10.

### 1.2.2.2 Transmission synaptique rapide

L'acide aminé glutamate constitue le principal neurotransmetteur excitateur dans le néocortex. Son action post synaptique peut être médiée par plusieurs types de récepteurs ionotropiques (NMDA et non NMDA) et métabotropiques. La majeure partie (65-85%) des synapses excitatrices sur les cellules pyramidales se trouve au niveau de leurs épines dendritiques et le reste sur la dendrite directement. Il n'y a aucune synapse excitatrice sur le soma des cellules pyramidales. Dans des paires pyramide-pyramide des couches II/III du cortex de rat, les connexions produisent généralement des PPSEs de faible amplitude d'environ 0,1-0,4 mV (Mason et coll., 1991) alors que des PPSEs de 1 à 2 mV sont observés dans la couche V (Thomson et coll., 1993 ; Markram et Tsodyks, 1996)

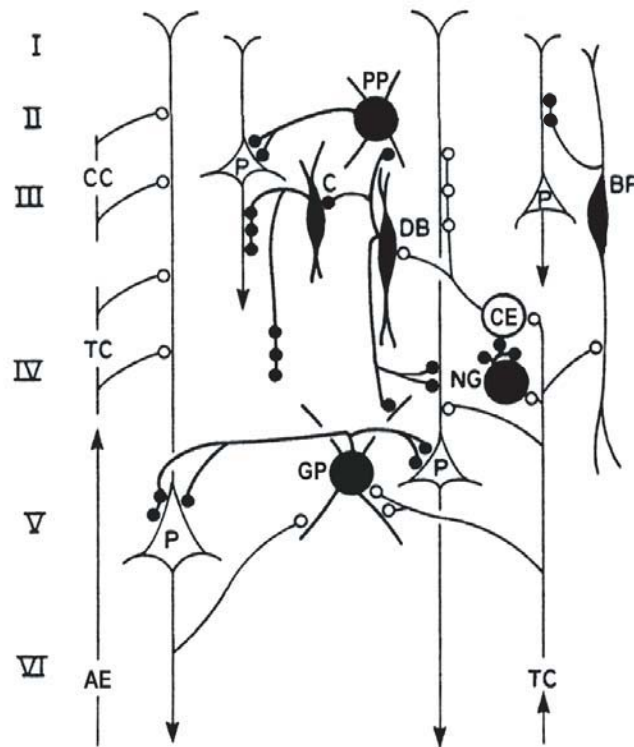
Le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur le plus important dans le cortex. Comme pour le glutamate, l'effet du GABA est médié par des récepteurs ionotropiques et métabotropiques. Le soma et les dendrites proximales sont les régions où des études anatomiques et immunocytochimiques ont montré la plus grande concentration de synapses GABAergiques (LeVay, 1973 ; Peters, 1987). L'application directe de GABA sur des neurones corticaux *in vitro* produit une hyperpolarisation biphasique. La phase précoce est sous tendue par l'activation des récepteurs ionotropiques GABA<sub>A</sub> et l'ouverture de conductance Cl<sup>-</sup>, et la phase tardive résulte de l'activation des récepteurs métabotropiques GABA<sub>B</sub> et de l'ouverture de canaux K<sup>+</sup> (Dutar et Nicoll, 1988). Cela a été confirmé par des enregistrements de paires interneurones-pyramide (Tamas et coll., 2003). De grands changements de conductances ont lieu transitoirement au début d'un IPSP évoqué électriquement et durent pendant 15-25ms. La phase longue de l'IPSP est associée avec un faible changement de conductance.

Dans le réseau synaptique intrinsèque du néocortex (Figure 2.7), le poids de l'inhibition est très élevé car les connexions interneurone-pyramide sont réciproques et nombreuses (Reyes et coll., 1998, Holmgren et coll., 2003) alors que les cellules pyramidales sont peu interconnectées (Markram et coll., 1997).

En plus des connections aux cellules pyramidales, chaque type d'interneurone établit de nombreuses connections avec les cellules du même type mais également avec d'autres types d'interneurones. Ainsi l'activation d'une population d'interneurones peut mettre en jeu une inhibition (des neurones excitateurs) et une disinhibition (inhibition des interneurones). Aussi, son effet net sur le réseau est-il difficile à prédire.

#### 1.2.2.3 Autres connexions

Des études ont montré également l'existence de couplages électriques de type jonction gap au sein des types d'interneurones (Galarreta et Hestrin, 1999 ; Gibson et coll. 1999 ; Tamas et coll., 2000 ; Blatow et coll., 2003), voire même entre des neurones appartenant à types neuronaux distincts (Venance et coll., 2000). Ces couplages électriques contribueraient à la synchronisation fine des interneurones (Beierlein et coll., 2000 ; Galarreta et Hestrin, 2001), qui participerait à la génération de rythmes variant selon les états de vigilance (Steriade, 1997 ; Fricker et Miles, 2001).



**Figure 2.7 : Connexions principales entre les éléments neuronaux du réseau néocortical**

Les interneurons GABAergiques inhibiteurs sont représentés en noir. Les neurones glutamatergiques excitateurs sont représentés en blanc. Les terminaisons GABAergiques et glutamatergiques sont représentées par des ronds noirs et blancs, respectivement.

C : cellule en chandelier, GP : grande cellule en panier, PP : petite cellule en panier, DB : cellule à double bouquet dendritique, NG : cellule neurogliaforme, BP : cellule bipolaire, P : cellule pyramidale, CE : cellule étoilée, AE : afférences extrinsèques, TC, fibres thalamo-corticales, CC : fibres cortico-corticales. Adapté (d'après Houser et coll., 1984).

A ce réseau intrinsèque de connexions rapides se superpose un système modulateur peptidergique lent. En effet, l'expression de nombreux neuropeptides et de leurs récepteurs au sein du néocortex suggère l'existence d'une régulation peptidergique intrinsèque de l'activité néocorticale qui reste mal connue. Parmi les neuropeptides exprimés dans le néocortex, on compte, outre les peptides classiquement utilisés comme marqueurs biochimiques de populations neuronales restreintes (NPY, SOM, VIP, CCK), les tachykinines, la corticolibérine (CRF) ou encore les peptides opioïdes dynorphine et enképhaline.

La diversité des constituants cellulaires et de leurs connexions rend difficile la prédiction d'activités spontanées ou évoquées du réseau et de leurs modulations.

#### 1.2.2.4 Afférences

##### Afférences thalamiques

Le réseau néocortical est avant tout une unité d'intégration. Toutes les aires corticales reçoivent des afférences glutamatergiques excitatrices provenant du thalamus (pour revue, voir Sherman & Guillery, 1996). Leur principale caractéristique est l'existence d'une ségrégation spatiale des informations sensorielles. En effet les afférences sensorielles sont organisées au niveau central d'une manière telle que l'arrangement topographique de la périphérie soit conservé. La précision de cette cartographie n'est cependant pas identique dans toutes les aires. Les aires sensorielles et motrices primaires présentent la précision la plus élevée. Cette précision diminue progressivement dans les aires corticales d'ordre supérieur (secondaire, tertiaire). Une des plus remarquables représentations corticales est celle des vibrisses du rat et de la souris. Chaque vibrisse a une représentation différente dans le cortex qui présente une forme de tonneau sur des coupes tangentielles de cortex somatosensoriel. (Woosley et Van der Loos, 1970). Le centre des tonneaux est formé par l'agrégation des afférences thalamiques qui véhiculent les entrées venant de chaque vibrisse. La carte corticale des vibrisses forme une représentation qui est topographiquement équivalente à l'arrangement des vibrisses sur le museau du rat ou de la souris.

Les fibres thalamo-corticales issues des noyaux thalamiques sensoriels transitent par la capsule interne et arrivent dans le néocortex via la substance blanche sous-corticale. Elles pénètrent ensuite dans la substance grise et remontent perpendiculairement à la surface du cortex. Elles terminent leur course en formant un plexus dense au niveau des

cellules étoilées et les cellules pyramidales de la couche IV et V où elles forment 5-10% des synapses de ces couches (LeVay et Gilbert, 1976 ; Ahmed et coll., 1994). Ces fibres présentent également des collatérales au niveau des couches I et VI (Jensen et Killackey, 1987 ; bernardo et Woolsey, 1987). De plus, différentes études ont rapporté l'innervation d'interneurones GABAergiques par les fibres thalamo-corticales (pour revue, voir White, 1986). Des stimulations des afférences sensorielles conduisent dans les cellules étoilées à une excitation brève suivie d'une forte inhibition. Tandis que l'excitation résulte d'une transmission monosynaptique entre les neurones thalamocorticaux glutamatergiques et les cellules étoilées, la réponse inhibitrice intervenant avec un faible délai, résulte d'une transmission disynaptique via les interneurones GABAergiques de la couche IV (Porter et coll., 2001). Le rôle de cette inhibition serait de limiter, par un effet de shunt, l'excitation récurrente qui pourrait se produire lors de l'activation des cellules étoilées par les fibres thalamocorticales.

### Les afférences cholinergiques

Bien que le thalamus soit la source principale d'entrées dans le néocortex, il n'en est pas la seule. Plus de vingt régions sous corticales différentes projetant dans le cortex ont été identifiées (Tigges et Tigges, 1985). Parmi elles, le néocortex reçoit des afférences neuromodulatrices telles que les afférences cholinergiques, sérotoninergiques, noradrenergiques ou dopaminergiques qui proviennent, respectivement, du télencéphale basal, des noyaux du raphé, du locus coeruleus et de l'aire tegmentale ventrale. Ces substances neuromodulatrices sont impliquées dans de nombreuses fonctions cognitives telles que l'attention, la motivation, l'apprentissage et la mémoire. Parmi celles-ci, l'acétylcholine est l'un des neurotransmetteurs les plus abondants dans le cerveau. On la trouve en plus grande concentration dans le cortex de rat que les autres monoamines (environ 10 fois plus que la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline). Elle est impliquée dans un grand nombre de fonctions cognitives telles que l'apprentissage, la mémoire et l'attention (Everitt et Robbins, 1997 ; Sarter et Bruno, 1994 ; 1999 ; McGaughy et coll., 2000) et participe à l'état d'éveil. Les démences associées à la maladie d'Alzheimer et à la maladie de Parkinson sont dues, au moins en partie, à la perte de l'innervation cholinergique du néocortex (Coyle et coll., 1983; Davies et Maloney, 1976; Ruberg et al., 1982).

L'acétylcholine est synthétisée au niveau des terminaisons à partir de la choline grâce à l'enzyme acétylcholine transferase (ChAT). Le groupement acétyle provient d'une molécule d'acetylcoenzyme A. L'acétylcholine est ensuite transférée dans des vésicules de

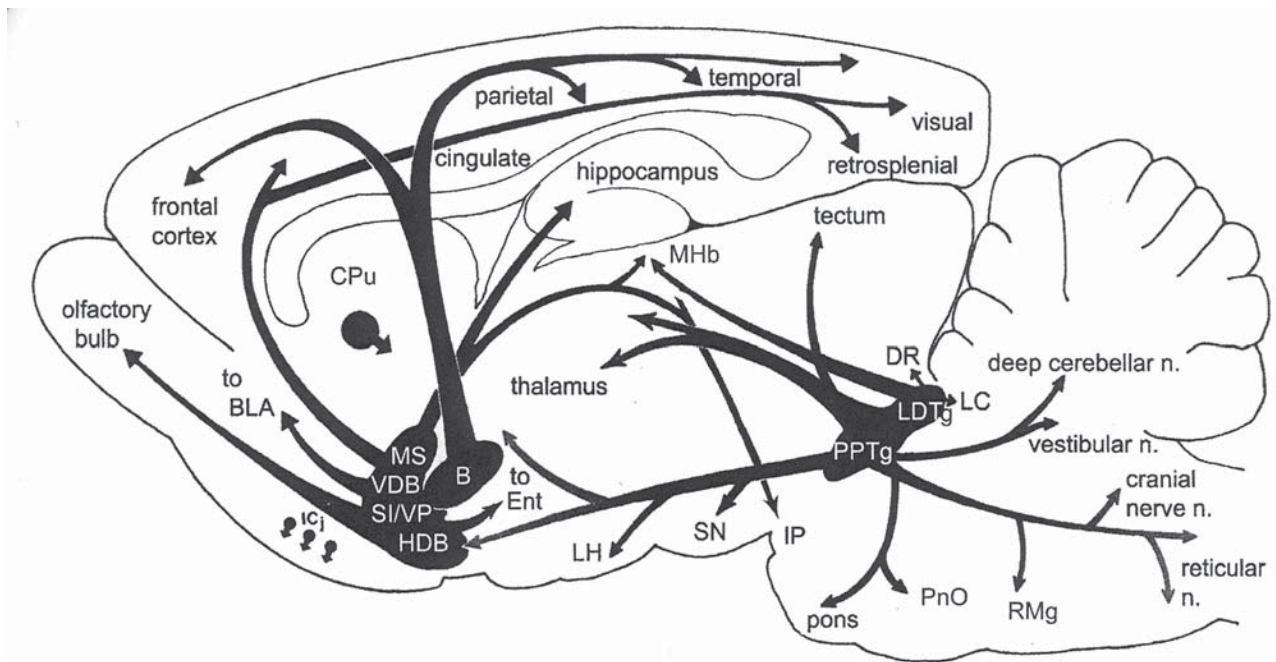


sécrétion grâce à un transporteur spécifique VACHT (vesicular acetylcholine transporter). Une fois libérée au niveau des terminaisons, elle est dégradée en choline par l'enzyme acétylcholinestérase (AChE). La choline est enfin recapturée dans la terminaison grâce à un transporteur spécifique pour être recyclée en acétylcholine. Parmi les enzymes du métabolisme de l'acétylcholine, c'est la ChAT qui est classiquement utilisée comme marqueur de neurones cholinergiques.

Les fibres cholinergiques (Figure 2.8) qui innervent le néocortex sont originaires pour la plupart du noyau basal magnocellulaire du télencéphale basal (aussi nommé noyau basal de Meynert chez l'homme, Johnston et coll., 1981 ; Mesulam et coll., 1983). Ces fibres projettent sur le néocortex de manière topographique, selon un gradient rostro-caudal, ventro-dorsal et medio-latéral (Figure 2.9 ; Luiten et coll., 1985 ; 1987). Elles pénètrent dans la substance grise et débutent leur trajectoire au niveau de la couche VI puis terminent leur course principalement au niveau des couches V puis au niveau de la couche I (Kristt et coll., 1985 ; Mechawar et coll., 2000). Cependant, les fibres cholinergiques sont présentes dans toutes les couches et toutes les aires corticales (Lysakowski et coll., 1989).

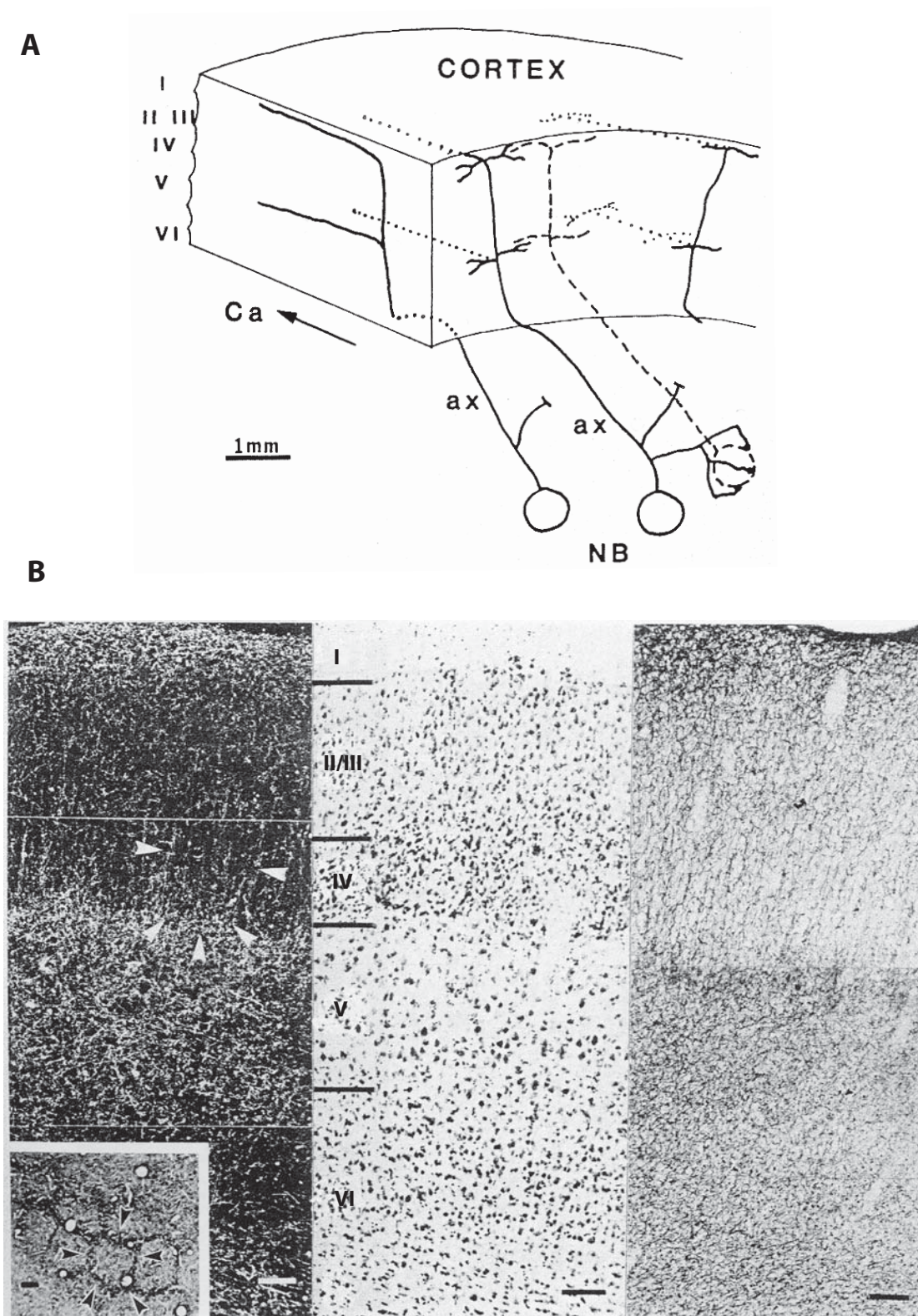
L'observation des terminaisons cholinergiques en microscopie électronique a révélé la présence de boutons axonaux au contact des cellules pyramidales et des interneurons GABAergiques du néocortex (Wainer et coll., 1984 ; De Lima & Singer, 1986 ; Beaulieu & Somogyi, 1991). Diverses études indiquent que ces boutons ne forment pas systématiquement de jonctions synaptiques. La proportion de varicosités axonales formant des synapses effectives variant selon les espèces [ $\approx 67$  % chez l'homme (Smiley et coll., 1997),  $\approx 44$  % chez le macaque (Mrzljak et coll., 1995), et seulement  $\approx 15$  % chez le rat (Umbriaco et coll., 1994)]. Cependant, ces résultats sont sujets à controverse, une prévalence de terminaisons synaptiques ayant été décrite récemment chez le rat par un marquage immunocytochimique du transporteur vésiculaire VChaT (Turrini et coll., 2001).

Par ailleurs, outre l'innervation du néocortex par les afférences du télencéphale basal, le marquage immunocytochimique de la ChaT a révélé la présence d'une innervation cholinergique intracorticale à partir de neurones situés principalement dans les couches II/III (Eckenstein & Thoenen, 1983; Levey et al., 1984). Ces neurones représentent environ 20-30% de l'activité ChaT (Johnston et coll., 1981) et fournissent à peu près 20% des terminaisons cholinergiques dans le néocortex (Eckenstein et Baughman, 1984). Ces neurones sont bipolaires sont de nature GABAergique et contiennent le neuropeptide VIP (Parnavelas et al., 1986; Chédotal et al., 1994; Bayraktar et al., 1997; Cauli et al., 1997; Porter et al., 1998). Ces neurones cholinergiques intracorticaux ne semblent pas présent chez les primates (Hedreen et coll., 1983 ; Mesulam et coll., 1992).



**Figure 2.8 : Projections des neurones cholinergiques télencéphaliques**

B basal nucleus (Meynert), BLA basolateral amygdaloid nucleus, CPu caudate putamen (striatum), DR dorsal raphe nucleus, ICj islands of Calleja, HDB nucleus of the horizontal limb of the diagonal band, IP interpeduncular nucleus, LC locus coeruleus, LDTg laterodorsal tegmental nucleus, LH lateral hypothalamic area, MHb medial habenular nucleus, MS medial septal nucleus, PnO pontine reticular nucleus, PPTg pedunculopontine tegmental nucleus, RMg raphe magnus nucleus, SI substantia innominata, VDB nucleus of the vertical limb of the diagonal band, VP ventral pallidum, SN substantia nigra



#### 1.2.2.5 Efférences

Tous les neurones de projection ont des collatérales récurrentes qui participent aux circuits locaux corticaux si bien qu'aucune couche n'a une fonction de sortie exclusivement. Les neurones de sortie du cortex sont généralement des cellules pyramidales. Ces mêmes cellules peuvent également être également des neurones d'entrée dans la mesure où ils peuvent recevoir des entrées directes du thalamus. Il y a une organisation couche spécifique de la sortie selon le lieu de leurs cibles. Les connexions corticocorticales proviennent principalement des couches superficielles et les projections sous corticales proviennent des couches profondes. Dans ces dernières, il y a une sortie vers les régions liées à la fonction motrice comme le colliculus supérieur, les ganglions de la base, les noyaux du tronc cérébral et la moelle épinière. Ces structures reçoivent leurs afférences corticales d'un relativement petit nombre de neurones pyramidaux de la couche V. Une des voies de sortie projette vers les noyaux relai du thalamus, qui sont la source des entrées sensorielles dans le cortex. Cette projection corticothalamique provient généralement des neurones pyramidaux de la couche VI.

Il existe cependant des exceptions à cette règle de base. Dans l'aire 4 chez l'homme (aire motrice primaire), les efférences qui forment le tractus pyramidal projetant vers le cordon médullaire et le cervelet proviennent à la fois de la couche V et de la couche III. De même, au sein d'une aire donnée, tous les neurones d'une même couche ne projettent pas vers une même région. Ainsi, les cellules pyramidales de la couche V du cortex visuel qui projettent vers le cortex contralatéral sont différentes sur le plan morphologique et électrophysiologique de celles qui projettent vers le colliculus supérieur (Kasper et coll., 1994).

#### 1.2.3. ACETYLCHOLINE DANS LE RESEAU NEOCORTICAL.

##### 1.2.3.1 Les Récepteurs Cholinergiques.

L'acétylcholine peut agir sur les neurones néocorticaux via l'activation de deux grands types de récepteurs : les récepteurs muscariniques et les récepteurs nicotiniques.

Les récepteurs nicotiniques appartiennent à la famille des récepteurs ionotropiques, ou récepteurs-canaux. Ils sont donc susceptibles d'intervenir dans une transmission rapide du signal. Leur structure est pentamérique, chaque sous-unité comportant 4 domaines transmembranaires (M1-M4). Les domaines M2 de chaque sous-unité contribuent à la

formation du pore du canal et sont donc responsables de la perméabilité aux ions cationiques ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , Galzi & Changeux, 1995).

Les récepteurs nicotiniques neuronaux comprennent deux types de sous-unités, les sous-unités  $\alpha$  et les sous-unités  $\beta$ . Douze gènes codant pour ces sous-unités ont été clonés à l'heure actuelle ( $\alpha_2$ - $\alpha_{10}$  ;  $\beta_2$ - $\beta_4$ ). Dans le système nerveux des mammifères, on distingue deux grands types de récepteurs nicotiniques :

- Les récepteurs homomériques formés de l'assemblage de cinq sous-unités  $\alpha_7$ , caractérisés par leur sensibilité à l' $\alpha$ -bungarotoxine.
- Les récepteurs formés par l'assemblage de deux sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  ou  $\alpha_6$ ) et de 3 sous-unités  $\beta$  ( $\beta_2$  ou  $\beta_4$ ), insensibles à l' $\alpha$ -bungarotoxine.

Ces récepteurs diffèrent en général par leurs cinétiques de désensibilisation, leurs états de conductance et leurs temps d'ouverture. Des expériences d'hybridation in situ ont révélé que les sous-unités  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_7$  et  $\beta_2$  sont exprimées dans le néocortex (Wada et al., 1989; 1990; Lena & Changeux, 1997)

Les récepteurs muscariniques sont des récepteurs métabotropiques à sept segments transmembranaires qui agissent via des protéines G. On dénombre 5 récepteurs muscariniques ( $M_{1-5}$ ) dont les gènes ont été clonés ( $M_{1-5}$ , Kubo et coll., 1986 ; Bonner et coll., 1987). Ces récepteurs sont séparés en deux groupes :

- Les récepteurs  $M_1$ ,  $M_3$ ,  $M_5$  couplés positivement à la phospholipase C via une protéine G insensible à la toxine pertussique ( $G_q$ ),
- Les récepteurs  $M_2$ ,  $M_4$  couplés négativement à l'adénylate cyclase via une protéine G sensible à la toxine pertussique ( $G_i$ , pour revue voir Caulfield, 1993).

Des études immunocytochimiques ont révélé la présence de tous ces récepteurs au sein du néocortex, avec toutefois des niveaux d'expression très variables. Le récepteur  $M_1$  est sans conteste le plus abondant, avec une densité particulièrement élevée au niveau des couches II et III. Les récepteurs  $M_2$  et  $M_4$  sont exprimés en moindre quantité (Levey et coll., 1991), suivis par le récepteur  $M_3$  (Levey et coll., 1994) et le récepteur  $M_5$  dont l'expression est la plus faible (Yasuda et coll., 1993). Il existe peu de données concernant la distribution précise de ces récepteurs parmi les différents types neuronaux qui constituent le réseau néocortical.



Plusieurs études ont montré que les récepteurs muscariniques étaient localisés aux niveaux péri-, extra-, pré- et post synaptiques dans des cellules pyramidales et des interneurons GABAergiques du néocortex. C'est le cas du récepteur M<sub>2</sub> dont l'ARNm est présent dans les deux types cellulaires avec des localisations subcellulaires différentes (Mzrljak et coll., 1998). Les récepteurs M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> sont colocalisés au niveau postsynaptique dans des synapses asymétriques (excitatrices) non cholinergiques (Mzrljak et coll., 1993).

#### 1.2.3.2 Importance de l'acétylcholine dans le néocortex

##### Facilitation du traitement de l'information sensorielle

Il a été proposé que le système cholinergique potentialise le traitement des informations sensorielles provenant du thalamus tout en inhibant la récupération des informations de type associatives (pour revue, Sarter et coll., 2005). En effet, plusieurs études ont montré que l'acétylcholine amplifiait ou laissait intacte les réponses aux stimulations d'origine thalamique tandis que les entrées d'origine intracorticales étaient supprimées (Gil et coll., 1997 ; Hasselmo, 1995 ; Hasselmo et Barkai, 1995 ; Hsieh et coll., 2000 ; Sato et coll., 1987). En effet la réponse à une stimulation de type sensorielle est plus importante en termes de décharge de potentiel d'action en présence d'acétylcholine et cet effet est souvent bloqué par des antagonistes muscariniques. Cela a été observé pour différentes modalités sensorielles (Rasmusson et Dykes, 1988 ; Metherate et coll., 1990). Les études ayant pour but de cartographier la représentation des stimuli dans les régions corticales sensorielles ont montré que l'application locale d'acétylcholine augmentait, et les antagonistes cholinergiques diminuaient, la taille des aires qui répondent au stimulus (Penschuck et coll., 2002).

Hasselmo et Bower (1993) ont suggéré que les effets de l'acétylcholine favorisent l'acquisition de nouvelles informations en facilitant les changements associés à de nouvelles informations et en supprimant les influences interférentes des informations précédemment acquises.

##### Relations avec l'attention

Le système cholinergique semble fortement impliqué dans les tâches nécessitant une attention soutenue (pour revue, Sarter et coll., 2005). Il a été montré que des stimuli sensoriels évoquent une augmentation d'acétylcholine spécifiquement dans l'aire corticale sensorielle associée avec la modalité stimulée (Fournier et coll., 2004). Ceci indique que le traitement de l'information sensorielle dépend de la présence d'acétylcholine dans l'aire corticale sensorielle concernée mais également que l'activation des neurones cholinergiques se fait en réponse au stimulus sensoriel. En d'autres termes, il existe des

mécanismes liés à l'attention qui activent les neurones cholinergiques attachés aux fonctions sensorielles et qui facilitent le traitement de l'information par le cortex sensoriel.

Il semble qu'un de ces mécanismes d'attention implique une boucle entre le cortex préfrontal, le télencéphale basal et le cortex sensoriel. En effet, le cortex préfrontal est considéré comme crucial dans les processus exécutifs complexes (Miller, 1999) et en particulier dans une forme de stockage à court terme de l'information liée à l'attention, appelée mémoire de travail (« working memory ») (Goldman-Rakic, 1995). Il est lui-même une des cibles les plus importantes des neurones cholinergiques du télencéphale basal. Il semble que les projections du cortex préfrontal vers le télencéphale basal stimulent les projections cholinergiques dans les aires sensorielles du cortex. La destruction de neurones cholinergiques du télencéphale basal se traduit ainsi par une diminution importante de l'attention soutenue (Sarter et coll., 2005).

Les stimuli distractifs ont pour effet de diminuer les performances des tâches nécessitant une attention soutenue. Ces stimuli provoquent l'activation des neurones cholinergiques qui projettent vers le cortex préfrontal ce qui suggère que le système cholinergique est impliqué dans la reconnaissance et l'élimination des informations distractives. La présentation d'un élément distractif conduit à une plus grande diminution des performances chez les animaux ne présentant plus de projections cholinergiques (Gill et coll., 2000).

#### Pathologies associées au système cholinergique dans le néocortex

La maladie d'Alzheimer (MA) est la pathologie neurodégénérative la plus répandue chez les personnes âgées (une personne atteinte sur 1000 avant 65 ans, une sur 20 après 65 ans, de l'ordre de une sur six après 85) provoquant une perte progressive de mémoire et des dysfonctionnements cognitifs (pour revue, Selkoe, 2001). Une caractéristique de la MA est la dégénérescence des neurones cholinergiques du télencéphale basal, ceux-ci mêmes qui projettent vers le cortex cérébral ce qui expliquerait les déficits mnésiques et cognitifs des patients. Les stratégies thérapeutiques les plus efficaces dans le traitement de la MA consistent en l'augmentation de la transmission cholinergique (Sitaram et coll., 1978). Plusieurs modèles de souris transgéniques ont été développés qui conduisent aux mêmes symptômes anatomiques et fonctionnels que ceux observés dans la MA (Games et coll., 1995 ; Hsiao et coll., 1996 ; Chapman et coll., 1999). Ces souris montrent notamment des déficits de la mémoire de travail. Il a été montré sur un de ces modèles transgéniques que la modulation de la transmission GABAergique via le récepteur de type  $M_1$  dans le cortex préfrontal était diminuée (Zhong et coll., 2003). Récemment un nouvel agoniste du récepteur  $M_1$ , l'AF267B, a été testé sur des modèles transgénique de MA et a permis de réduire des déficits cognitifs associés à la MA (Caccamo et coll., 2006).

### 1.2.3.3 Cibles cellulaires de l'acétylcholine

#### Cellules pyramidales

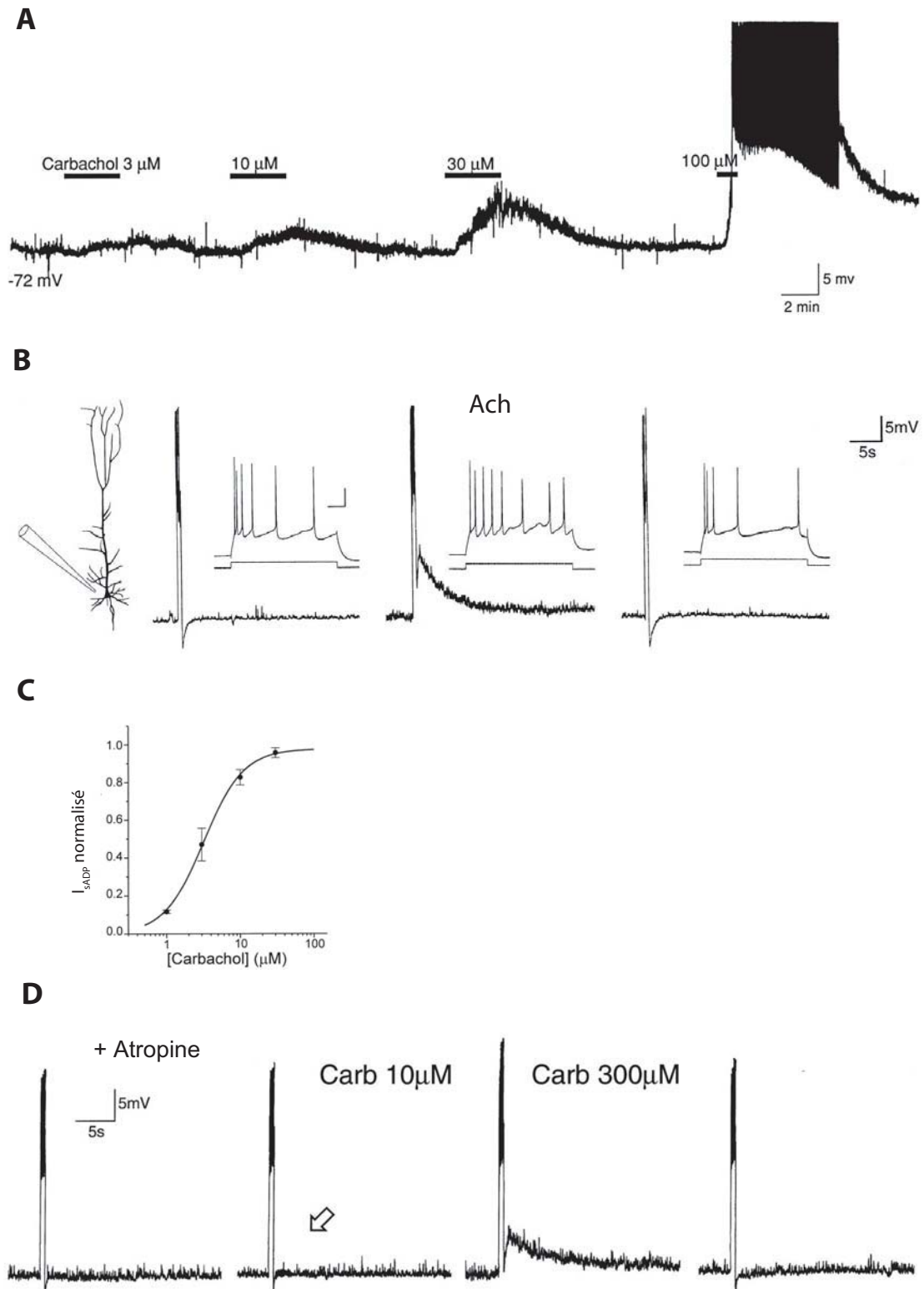
L'application d'acétylcholine provoque un effet biphasique sur les cellules pyramidales, consistant en une hyperpolarisation rapide suivie par une réponse excitatrice plus lente (McCormick et Prince, 1985). Plusieurs études ont montré que le blocage de la transmission GABAergique entraînait la disparition de la première composante inhibitrice, indiquant qu'elle est indirecte et résulte de l'activation d'interneurones inhibiteurs (McCormick et Prince, 1985, 1986).

La composante muscarinique de l'acétylcholine est excitatrice par modulation de nombreuses conductances (Figure 2.10), principalement de type potassique :

- le courant  $I_M$  (M pour muscarinique) à rectification sortante qui est dépendant du potentiel, insensible au  $Ca^{2+}$  et activé au potentiel de repos de la cellule.
- Le courant  $I_{AHP}$  (AHP pour afterhyperpolarisation) qui est dépendant du potentiel et du calcium. Il est responsable de la lente hyperpolarisation observée après une décharge de potentiels d'action.
- Le courant de fuite  $I_{leak}$ , indépendant du potentiel et du  $Ca^{2+}$ .

La fermeture de conductance de type M provoque une augmentation de la résistance d'entrée. Dans ces conditions la cellule est plus excitable et donc plus susceptible de déclencher un potentiel d'action suite à une faible stimulation excitatrice. Dans le cas du courant  $I_{AHP}$ , trois composantes ayant des décours temporels différents ont été décrites dans les cellules pyramidales du néocortex (Schwindt et coll., 1988). Seule la composante lente (sAHP, durée de quelques secondes) est modulée par les agonistes muscariniques. De faibles concentrations de muscarine provoquent une suppression complète de ce courant et des concentrations plus élevées ( $> 5\mu M$ ) lui substituent une dépolarisation lente (plusieurs secondes) et transitoire appelée ADP (pour « afterdepolarisation ») (Haj-Dahmane et Andrade, 1996).





**Figure 2.10 : Effets cholinergiques sur les cellules pyramidales du cortex**

A. Enregistrement en courant imposé. L'application en bain de carbachol induit une dépolarisation qui augmente avec la concentration de carbachol. (d'après Haj-Dahman et Andrade, 1996).

B. Réponse à un long pulse dépolarisant en condition contrôle (gauche), après une brève application d'acétylcholine (milieu) et après lavage (gauche); Insert: profil de décharge pendant le pulse. Echelle: 20mV, 2nA, 100ms.

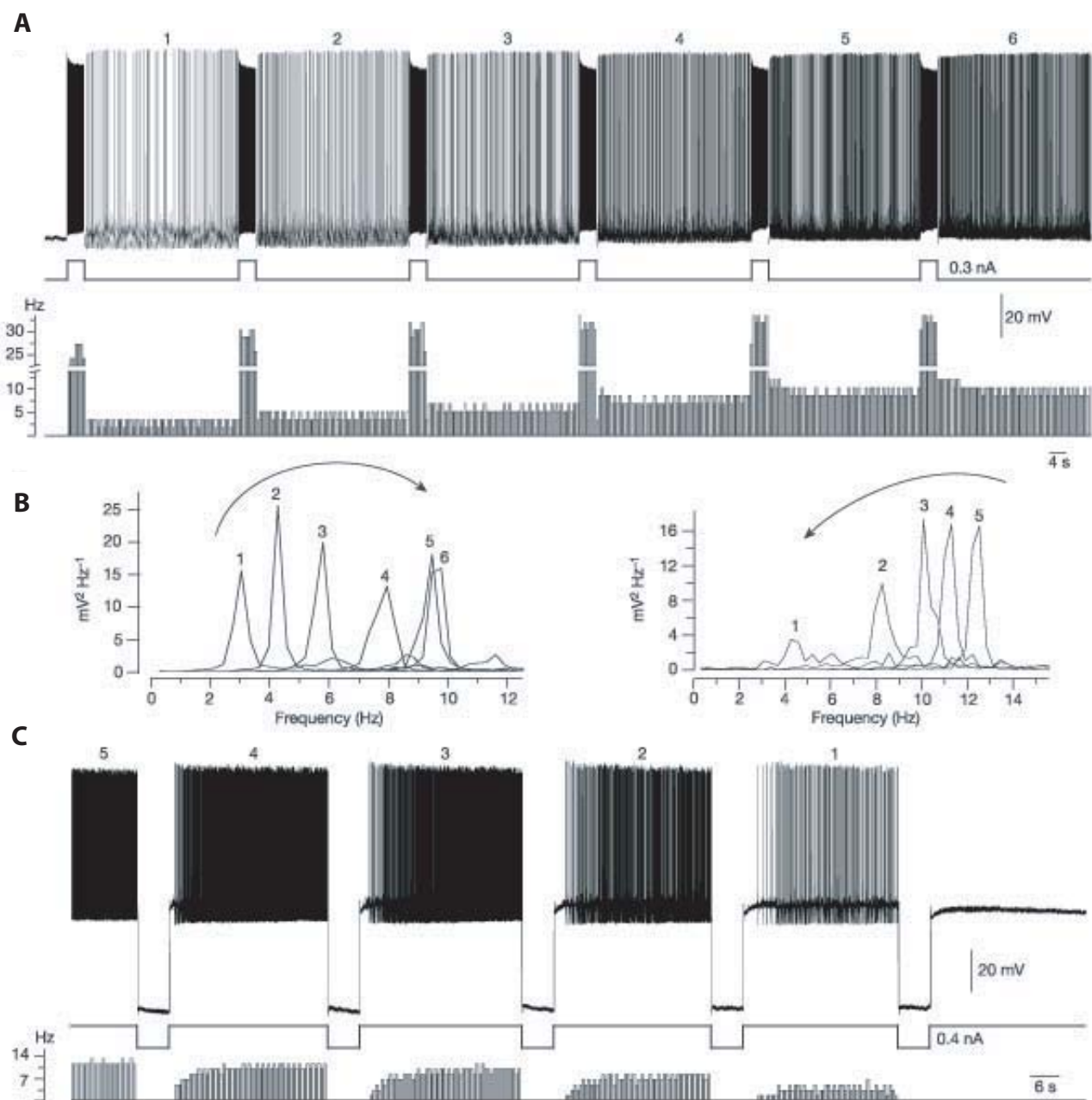
C. Courbe dose-réponse de l'amplitude du courant de l'ADP mesurée en potentiel imposé après une dépolarisation de 800ms entre -65 et -30mV.

D. Blocage de l'effet carbachol (10 $\mu$ M) en présence de l'antagoniste muscarinique atropine (100nM).(d'après Haj-Dahman et Andrade, 1998).

Les conductances responsables de cette ADP ne sont pas connues. Des études similaires effectuées sur des cellules pyramidales dans le cortex entorhinal ont donné des résultats identiques (Klink et Alonso, 1997 ; Magistretti et coll., 2004) et ont montré que cette ADP implique l'activation d'une conductance cationiques non spécifique et des canaux calciques de type L (Egorov et coll., 2002). Dans cette même structure il a été montré que lorsque les neurones pyramidaux sont suffisamment dépolarisés, l'ADP muscarinique sous-tend une décharge continue de potentiels d'action en réponse à une stimulation supraliminaire (Figure 2.11). La fréquence de cette décharge augmente graduellement après chaque répétition du même stimulus. De plus, la fréquence de la décharge continue n'est pas affectée par des stimuli subliminaux. Ces résultats ont conduit les auteurs à proposer que ce phénomène puisse être un substrat cellulaire de la mémoire de travail et de sa résistance aux stimuli distractifs (Egorov et coll., 2002).

Une étude récente a montré que l'acétylcholine est capable d'induire une hyperpolarisation au niveau postsynaptique chez les cellules pyramidales de la couche V en présence d'antagonistes des récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>, c'est-à-dire sans implication de la transmission GABAergique inhibitrice. Ces réponses sont sous-tendues par une augmentation de la conductance potassique activée par le calcium de type SK (Gulledge et Stuart, 2005).

L'étude de la distribution des récepteurs  $\alpha_7$  en microscopie électronique indique que ces récepteurs sont également présents au niveau des densités post-synaptiques des cellules excitatrices du néocortex (Lubin et coll., 1999; Levy & Aoki, 2002). Une étude menée par Chu et ses collaborateurs (2000) rapporte l'existence de courants post-synaptiques nicotiques au niveau de cellules pyramidales, qui pourraient résulter de l'activation de ces récepteurs  $\alpha_7$  post-synaptiques. Cependant, les cellules pyramidales ne sont pas directement dépolarisées lors de l'application d'agonistes nicotiques (Vidal & Changeux, 1993; Porter et al., 1999; Gil et al., 1997). La présence de ces récepteurs  $\alpha_7$  post-synaptiques dans les cellules excitatrices du néocortex reste donc à confirmer.



**Figure 2.11 : Activité persistante en présence d'agonistes cholinergiques**

A. Des stimulations répétées par injection de sauts de courant dépolarisant (durée: 4s) augmentent la fréquence de décharge (traces 1 à 6) en présence de carbachol (10 $\mu$ M). B. Analyse de Fourier des traces numérotées en A (gauche) et en C (droite). C. Des injections répétées de courant hyperpolarisant (durée: 6s) diminuent la fréquence de décharge (carbachol, 5 $\mu$ M). (d'après Egorov et coll, 2002)

## Les interneurones

Plusieurs études ont démontré l'expression de récepteurs nicotiques post-synaptiques au niveau de certaines populations d'interneurones GABAergiques (Xiang et al., 1998; Porter et al., 1999; Christophe et al., 2002 ; Ferezou et coll., 2002).

L'application d'agonistes nicotiques induit des réponses dépolarisantes excitatrices rapides dans les interneurones GABAergiques de type VIP des couches II, III et V (Porter et coll., 1999). En outre, cette étude a montré une expression majoritaire des sous-unités  $\alpha_5$ ,  $\alpha_4$  et  $\beta_2$  dans ces interneurones. Bien que la sous-unité  $\alpha_7$  ait été détectée dans ces interneurones, les expériences pharmacologiques confirment l'implication majoritaire de récepteurs de type non  $\alpha_7$  dans ces réponses nicotiques (Porter et coll., 1999). Ces neurones sont également activés par les agonistes muscariniques (Kawaguchi, 1997).

La grande majorité des neurones de la couche I du néocortex sont sensibles aux agonistes nicotiques (Christophe et coll., 2002). L'analyse moléculaire des interneurones de la couche I a révélé l'expression majoritaire des sous-unités  $\alpha_4$ ,  $\beta_2$  et  $\alpha_7$ . Ces résultats sont en adéquation avec les analyses pharmacologiques qui ont montré une composante  $\alpha_7$  et une composante  $\alpha_4 \beta_2$  dans les réponses nicotiques. Une étude récente du laboratoire a montré que ces interneurones sont du type NPY (données non publiées). Cependant, il semble que dans les autres couches la majorité des interneurones NPY ne réponde pas aux agonistes cholinergiques (B. Cauli, communication personnelle), comme en témoigne l'absence de réponse des neurones « Late Spiking » rapportée par d'autres auteurs (Kawaguchi, 1997).

Les interneurones de type SOM répondent aux agonistes muscariniques par une dépolarisation rapide conduisant à une décharge prolongée de potentiels d'action (Kawaguchi, 1997). Ces neurones sont insensibles aux agonistes nicotiques (Porter et coll., 1999).

Les interneurones de type CCK, l'activation des récepteurs muscariniques entraîne une hyperpolarisation suivie d'une dépolarisation qui ne résulte pas dans l'émission de potentiel d'action (Kawaguchi, 1997).

Enfin, les résultats concernant les interneurones de type FS, sont contradictoires, rapportant une absence de réponse à la muscarine (Kawaguchi, 1997), ou une réponse inhibitrice hyperpolarisante, induite par l'activation de conductances potassiques (Xiang et

coll., 1998). Ces neurones sont insensibles aux agonistes nicotiques (Xiang et coll., 1998, Porter et coll., 1999).

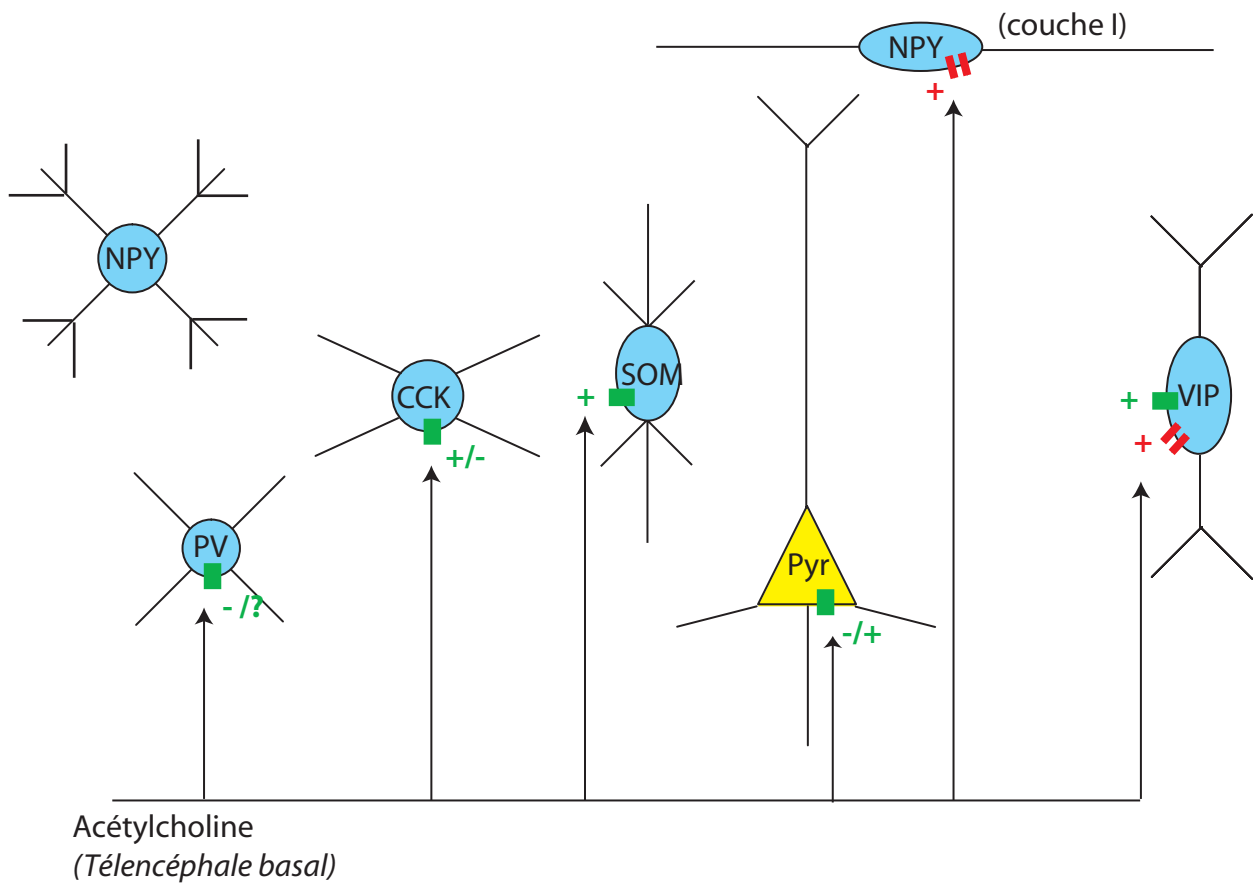
### Modulation de la transmission synaptique

L'activation de récepteurs muscariniques pré-synaptiques peut induire une modification de la transmission synaptique de type glutamatergique et GABAergique (Vidal & Changeux, 1993 ; Gil et coll., 1997, Kimura et Baughman, 1997). Une étude réalisée sur des neurones corticaux en culture a montré que l'inhibition de la transmission synaptique glutamatergique serait induit par l'activation de récepteur de type  $M_4$  tandis que l'inhibition de la transmission inhibitrice proviendrait de l'activation des récepteurs de type  $M_1$  (Kimura et Baughman, 1997). D'autres études ont également fait état d'une potentiation de la transmission glutamatergique dans le cortex et dans l'hippocampe via l'activation de récepteurs muscariniques post-synaptiques (Cox et coll., 1994 ; Marino et coll., 1998).

Dans le néocortex comme dans d'autres régions du cerveau, les récepteurs  $\alpha_7$ , présents au niveau de certaines terminaisons axonales excitatrices, semble moduler la libération de glutamate (Vidal & Changeux, 1993 ; McGehee et coll., 1995 ; Gray et coll., 1996 ; Role & Berg, 1996 ; MacDermott et coll., 1999). Cependant, ces résultats sont controversés puisqu'aucun effet de la nicotine n'a été observé sur les PPSEs d'origine intracorticale (Gil et coll., 1997).

L'acétylcholine régule donc l'activité du réseau néocortical de manière complexe en activant des récepteurs différents exprimés par diverses populations neuronales et en modulant la transmission synaptique (Figure 2.12). Au cours de mon travail de thèse, j'ai voulu en explorer la résultante de ces effets sur l'activité d'ensemble de neurones néocorticaux à l'aide de l'imagerie de bioluminescence aequorine. J'ai utilisé la protéine de fusion GFP-aequorine décrite par Baubet coll. (2000) car les résultats du groupe de Philippe Brûlet montrent qu'elle permet de visualiser les activités de neurones individuels avec une bonne résolution spatiale et temporelle (Baubet et coll., 2000 ; Rodgers et coll., 2005).

- Récepteur muscarinique
- ▬ Récepteur nicotinique



**Figure 2.12 : Effet de l'acétylcholine sur les neurones du cortex cérébral**

Les interneurones GABAergiques sont indiqués en bleu. Les cellules pyramidales (Pyr).

## 2. MATERIELS ET METHODES

---

### PREPARATION DE PSEUDOVIRION SINDBIS RECOMBINANT.

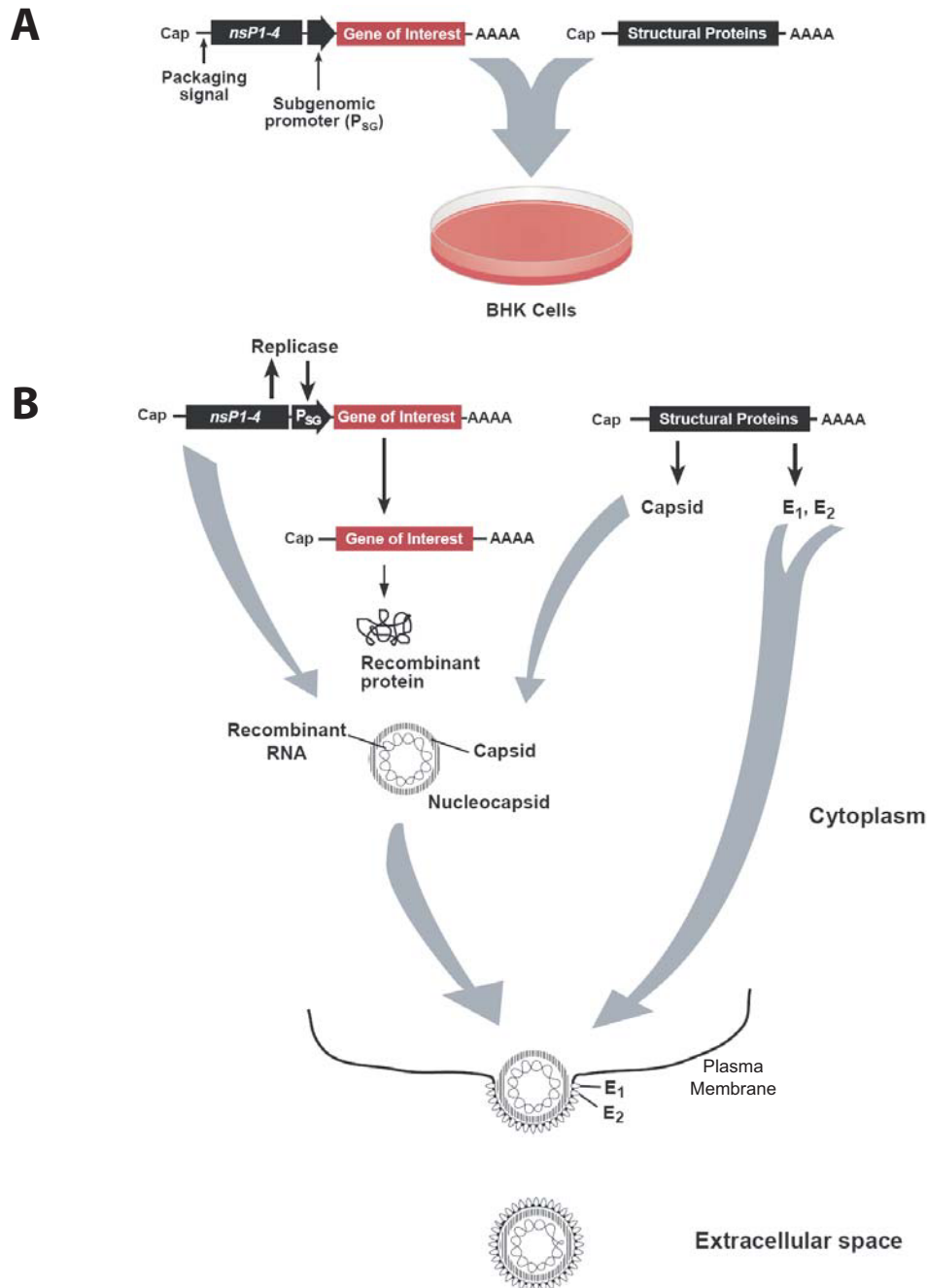
La fabrication de virus Sindbis recombinants nécessite la synthèse *in vitro* de deux ARN viraux dont l'un code pour le gène d'intérêt, ici la GA, et l'autre pour les protéines structurales. Ensuite ces ARNs sont cotransfectés dans des cellules BHK-21 qui vont ensuite fabriquer des particules virales dont l'ARN génomique code pour GA (voir figure).

#### Sous clonage et synthèse d'ARN viral *in vitro*

La séquence codante de GA a été clonée dans le plasmide pSinRep5 (Invitrogen) entre les sites SphI et Apal en aval du promoteur subgénomique (voir annexe pour les cartes des plasmides). Le plasmide recombinant ainsi que le plasmide helper pDH26S ont été linéarisés par digestion avec Pac I et Xho I respectivement. Après traitement à la protéinase K (0,2 mg/ml final) en présence de 0,5% SDS pendant 1h à 37°C, les ADNs linéarisés ont été purifiés par extraction au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. Ensuite, une réaction de transcription *in vitro* a été réalisée dans 20µl à partir d'un microgramme de chaque ADN linéarisé avec le kit Megascript SP6 (Ambion) pendant 4h à 37°C selon les recommandations du fournisseur.

#### Electroporation et récupération des virus

Les cellules BHK-21 ont été cultivées dans deux flasques de 175 cm<sup>2</sup> en DMEM, supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal, jusqu'à une confluence d'environ 75% (au total, un peu plus de 20 millions de cellules). Après lavage au PBS sans cation puis décrochage par traitement à la trypsine/EDTA, les cellules ont été resuspendues dans du PBS RNase free puis concentrées à 20.10<sup>6</sup> cellules/ml. Un millilitre de cellules, auxquelles ont été ajoutés de la RNAsin (40 U, Promega) ainsi que les deux réactions de transcription, a ensuite été transféré dans deux cuvettes d'électroporation (Biorad) et incubé 5 min sur la glace. Après avoir resuspendu les cellules, le choc électrique a été appliqué avec un électroporateur Gene Pulser II doté d'une extension de capacité (Biorad) avec les paramètres ddp=230V et capacité 950µF. Le contenu des cuvettes a ensuite été transféré dans 10ml de milieu de culture puis dans une boîte de Pétri et incubé à 37°C pendant 24h. le lendemain, le milieu de culture contenant les pseudovirions, appelés SIN-GA, a été centrifugé pour éliminer les débris cellulaires puis aliquoté et stocké à -80°C. Les cellules restées dans la boîte de pétri ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 20 min à température ambiante puis observées en fluorescence GFP pour vérifier l'expression du transgène. Le titre a été mesuré par comptage des cellules BHK fluorescentes après infection par des dilutions sériées de la suspension virale.



### Préparation de pseudovirions Sindbis recombinants

A. L'ARN vecteur, codant pour le transgène sous le contrôle du promoteur subgénomique ( $P_{SG}$ ), et l'ARN helper défectif, codant pour les protéines de structure, sont obtenus par transcription in vitro à partir de leur ADNc respectifs et cotransfectés dans des cellules BHK. B. Les ARNs vecteur et helper sont reconnus comme des ARN messagers par les cellules BHK et sont donc traduits. Ils sont amplifiés grâce aux protéines non structurales (nsP1-4) codées par l'ARN vecteur. Aussi, un ARN codant uniquement pour le transgène est synthétisé et traduit. Les protéines formant la nucléocapside et l'enveloppe (E1 et E2) sont codées par l'ARN helper. Seul l'ARN vecteur contient la séquence nécessaire à l'encapsidation dans la nucléocapside. Les nucléocapsides s'arriment à la membrane plasmique par l'intermédiaire des protéines E1 et E2 déjà insérées dans la membrane ensuite permettant ainsi le bourgeonnement des particules virales. Lors de l'infection d'une cellule, la nucléocapside est déchargée dans le cytoplasme et l'ARN vecteur est libéré. Les protéines nsP1-4 amplifient l'ARN vecteur, et le transgène est traduit en protéine recombinante. (d'après Ehrenguber et Lundstrom, 2000)



## **PREPARATION DES TRANCHES NEOCORTICALES**

Des tranches para-sagittales de néocortex de 300  $\mu\text{M}$  d'épaisseur ont été préparées à partir de rats Wistar mâles (10-16 jours). L'animal a été décapité rapidement et son crâne a été immédiatement immergé dans du liquide cérébro-spinal artificiel (LCSA) froid ( $4^{\circ}\text{C}$ ), saturé avec un mélange gazeux  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  (95 : 5), contenant (en mM) : 126 NaCl ; 2,5 KCl ; 1,25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ; 2  $\text{CaCl}_2$  ; 1  $\text{MgCl}_2$  ; 26  $\text{NaHCO}_3$  ; 20 D-glucose ; 5 Na pyruvate ; additionné de 1 mM de kynurénate. Le cerveau a été coupé au niveau du plan interhémisphérique et les hémisphères ont été retirés et gardés immergés. Un des hémisphères a été ensuite fixé par sa face médiane avec de la colle cyanoacrylate sur une platine inclinée de  $10^{\circ}$  par rapport à l'horizontale. Le bloc de tissu est orienté de telle manière à ce que la face dorsale de l'hémisphère soit perpendiculaire à l'axe de la pente. Les tranches ont été préparées avec un trancheur VT1000S (Leica) de telle manière que la lame de coupe arrive parallèlement à la surface dorsale de l'hémisphère. Ensuite, les tranches ont été incubées 30 minutes à température ambiante dans du LCSA, rincées dans du milieu de culture (50% MEM, 50% HBSS, glucose 6,5 g/l, pénicilline, streptomycine 100U/ml), transférées sur une membrane semi-poreuse (millicell CM, Millipore Corporation) en interface avec le milieu de culture et incubées 10 min à  $32^{\circ}\text{C}$  avant infection par SIN-GA. L'infection des tranches par SIN-GA a été réalisée par dépôt d'une goutte de 5  $\mu\text{l}$  de la solution virale ( $\sim 5 \cdot 10^4$  particules virales) sur chaque tranche. Les tranches ont été maintenues durant la nuit à  $32^{\circ}\text{C}$  en atmosphère humidifiée avec 5%  $\text{CO}_2$  afin de permettre l'expression de la protéine GA par les cellules infectées. La reconstitution du complexe aequorine fonctionnel a été réalisée par ajout de coelenterazine dans le milieu de culture (concentration finale, 10  $\mu\text{M}$ ) et incubation 3 h à  $32^{\circ}\text{C}$ . Les tranches ont été transférées dans du LCSA oxygéné et incubées 1 h à température ambiante avant le début des enregistrements.

## **ENREGISTREMENT DE LA BIOLUMINESCENCE**

Les tranches ont été placées dans la chambre d'enregistrement et perfusées à température ambiante avec du LCSA oxygéné à 1,2 ml/min. Préalablement à l'acquisition, les tranches ont été observées en fluorescence GFP avec un microscope optique droit BX51WI (Olympus) équipé d'objectifs à immersion x10 (NA=0.3), x20 (NA= 0.95) et x60 (NA=0.9). Les images ont été prises au moyen d'une caméra CCD intensifiée (768x576 pixels ; Photek, Royaume-Uni), montée sur le microscope, en mode « bright field ». L'acquisition du signal bioluminescent a été réalisée dans l'obscurité complète sans filtre d'émission avec la caméra CCD intensifiée en mode « binning slice » à une fréquence de 25 images /sec. Les données ont été stockées sur un PC et visualisées grâce au logiciel

IFS32 (Photek, Royaume-Uni). L'ensemble des enregistrements ont été effectués à température ambiante.

## ENREGISTREMENTS ELECTROPHYSIOLOGIQUES

Pour les expériences menées sur des tranches non infectées par SIN-GA, les tranches ont été utilisées dans un intervalle de temps de 1-6h après la dissection. Des pipettes de patch (2-4M $\Omega$ ) en verre borosilicate ont été préparées avec une étireuse PP-830 (Narishige, Japon) et remplies avec une solution interne contenant (en mM) : 123 K-gluconate, 21 KCl, 3 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 EGTA, 10 HEPES, 4 Na<sub>2</sub>-ATP et 0.4 Na<sub>2</sub>-GTP plus 2 mg/ml biocytine. Le pH a été ajusté à 7.2 et l'osmolarité à 285/295 mOsm. Cette solution a été utilisée pour étudier les propriétés de décharge des neurones en mode courant imposé. Dans les expériences d'enregistrement simultané patch-clamp/bioluminescence, l'EGTA a été omis. Pour les expériences sur l'effet des agonistes cholinergiques, le KCl a été remplacé par du K-gluconate (144mM final). Les enregistrements en cellule entière ont été réalisés sur des cellules pyramidales de la couche V, identifiées en vidéomicroscopie infrarouge avec une optique interférentielle de type Dodt, grâce à leur morphologie typique. Les signaux ont été amplifiés et collectés grâce à un amplificateur Multiclamp 700A, connecté à une carte d'acquisition digidata 1322A, et au logiciel pClamp 9 (Molecular Device). Les analyses ont été réalisées off-line avec le logiciel Clampfit 9 (Molecular Device). Le potentiel de repos a été mesuré juste après le passage en cellule entière. Les potentiels n'ont pas été corrigés pour le potentiel de jonction liquide. Les cellules ont été maintenues à un potentiel de -60mV par injection continue de courant. Le profil de décharge a été examiné par des injections de courants dépolarisants. Les paramètres électrophysiologiques ont été mesurés comme décrit précédemment (Cauli et coll, 1997). La résistance d'entrée a été déterminée à partir de la variation de potentiel induite par l'injection d'un courant hyperpolarisant (-12,5 pA) de 800 ms. La rhéobase a été déterminée en mesurant le potentiel auquel est observé un changement rapide de pente du potentiel entre la charge capacitive de la cellule et le déclenchement du 1<sup>er</sup> potentiel d'action. L'amplitude du 1<sup>er</sup> potentiel d'action et de l'AHP a été mesurée à partir de la rhéobase. La durée du potentiel d'action a été mesurée à mi-hauteur du pic.

Les stimulations électriques (un train de 5 pulses à 10 Hz ; intensité d'un pulse 0.5mA-1,5 mA ; durée d'un pulse 200  $\mu$ s) ont été réalisées grâce à une électrode bipolaire concentrique en tungstène (diamètre 100  $\mu$ m, model SNEX-100, Phymep) posé sur la tranche, avec une unité d'isolement DS3 (Digitimer, Royaume-Uni) contrôlée par un générateur de signal (Model 33120A, Hewlett Packard)

## ANALYSE DES DONNEES DE BIOLUMINESCENCE

Les valeurs moyennes sont données sous la forme moyenne  $\pm$  SEM. Le test T de Student a été utilisé pour calculer la significativité au seuil de 5%. Les données de bioluminescence ont été analysées avec les logiciels suivants : IFS32 (Photek, RU), Excel (Microsoft) et Clampfit 9 (Molecular Device) pour l'analyse des activités totales et des activités des zones individuelles. Des programmes ont été développés avec Matlab 7 (MathWorks) et Visilog 6 (Noesis, France) pour l'analyse de la répartition spatiale des activités unitaires. Les intensités de bioluminescence sont exprimées en coups par seconde (cps) mesurés par la caméra CCD.

La durée de la réponse à une stimulation a été calculée comme la durée entre l'instant correspondant au maximum de la réponse durant la stimulation et la fin de la réponse. La fin de la réponse à une stimulation électrique a été mesurée comme le premier instant où le signal de bioluminescence n'était plus significativement supérieur au signal moyen avant la stimulation (t-test ;  $p=0,01$ ).

Les carte de densité de bioluminescence ont été calculées à partir d'images intégrées sur 5s et en calculant la quantité totale de lumière dans un carré de 18x18 pixels autour de chaque pixel.

Afin de représenter les variations spatiotemporelles du signal de bioluminescence sur un intervalle de temps, le champ d'observation a été divisé en 432 régions d'analyse (RA) de 32x32 pixels formant une matrice de 18x24 RAs. Les régions ont été numérotées de gauche à droite et de haut en bas. Un tableau a été construit dans lequel chaque ligne correspond à une RA et chaque colonne un instant de l'intervalle de temps. Ensuite l'élément de la  $i^{\text{ème}}$  ligne situé dans la  $j^{\text{ème}}$  colonne de ce tableau a été rempli avec les valeurs d'intensité mesurées dans la  $i^{\text{ème}}$  RA et à l'instant  $j$ . Cette matrice a ensuite été convertie en image codée en nuance de gris.

L'index de persistance IP a été calculé pour chaque région du champ d'observation à partir de l'intensité totale mesurée pendant les 500ms de la stimulation ( $L_{stim}$ ) et les 500 ms suivantes ( $L_{après}$ ) suivant la formule :

$$IP = \frac{L_{après} - L_{stim}}{L_{après} + L_{stim}}$$

Afin de grouper les RAs présentant des décours temporels similaires, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée avec Matlab 7. L'ACP détermine un ensemble

de composantes principales comme une combinaison linéaire de paramètres, de telle sorte la première composante principale est dans la direction de la variance la plus élevée, la seconde composante est dans la direction de la variance restante la plus élevée, et ainsi de suite (Mardia et coll., 1979). Cette ACP a été réalisée à partir d'un jeu de 9 paramètres décrivant leur décours temporel :

- Pour chaque RA, l'intensité de bioluminescence a été sommée sur des intervalles de temps successifs de 2,8 s pendant et après la stimulation (7 variables correspondant à chaque intervalle)

- L'activité de base a été intégrée durant les 5.6s précédant immédiatement la stimulation.

- La valeur maximale de l'intensité au cours de la réponse.

## **HISTOCHIMIE**

Des tranches néocorticales infectées par SIN-GA ont été fixées dans du PBS 4% paraformaldéhyde sur la nuit à 4°C. Après lavage dans du PBS et perméabilisation avec PBS gélatine 0.2% Triton X-100 0.25% (PBS-GT), les tranches ont été incubées sur la nuit à température ambiante avec l'anticorps primaire diluée dans du PBS-GT. Après lavage avec du PBS Triton 0.05%, les tranches ont été incubées 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS-GT et lavées dans du PBS. Les anticorps primaires utilisés sont des anticorps de lapin dirigés contre la calbindine (Swant, 1/10000) et contre la calrétinine (Swant, 1/5000) ou des anticorps de souris dirigés contre la parvalbumine (Sigma, 1/10000) et contre NeuN (Chemicon, 1/200). Les anticorps secondaires utilisés sont des anticorps de chèvre anti-lapin ou anti-souris couplés au fluorochrome Cy3 (Jackson Laboratories, 1/200).

Pour le marquage intracellulaire, les tranches avec des cellules enregistrées en patch-clamp ont été fixées comme ci-dessus puis lavées dans du tampon phosphate pH 7.4 0.1M. Après perméabilisation avec du PBSGT pendant 3x10min, les tranches ont été incubées pendant 4h à température ambiante avec de la streptavidine conjuguée à l'Alexafluor 568 (Invitrogen, 1/500). Les tranches ont ensuite été lavées dans du PBS.

Les tranches ont été montées dans du Vectashield (Abcys) puis visualisées en fluorescence GFP et Cy3/Alexafluor 568 de manière séquentielle à l'aide d'un microscope confocal DMIRBE Leica SP1 avec un objectif x40. L'excitation laser a été réalisée à 488 (GFP) et 568 nm (Cy3/Alexafluor 568) et la lumière a été collectée entre 500 et 550nm (GFP) puis entre 580 et 650 nm (Cy3/Alexafluor 568). L'analyse de ces images a été réalisée avec ImageJ.

## **Produits chimiques**

Tous les sels et substances chimiques ont été obtenus chez Sigma Aldrich (France) à l'exception de la coelentérazine qui provient de Lux Biotech (Royaume-Uni). Toutes les substances pharmacologiques ont été préparées sous forme concentrée, stockées à -20 ou -80°C puis diluées dans le LCSA avant d'être appliquées en bain.

### **3. RESULTATS : ETUDE DE LA MODULATION CHOLINERGIQUE DANS LE NEOCORTEX PAR IMAGERIE DE BIOLUMINESCENCE AEQUORINE**

---

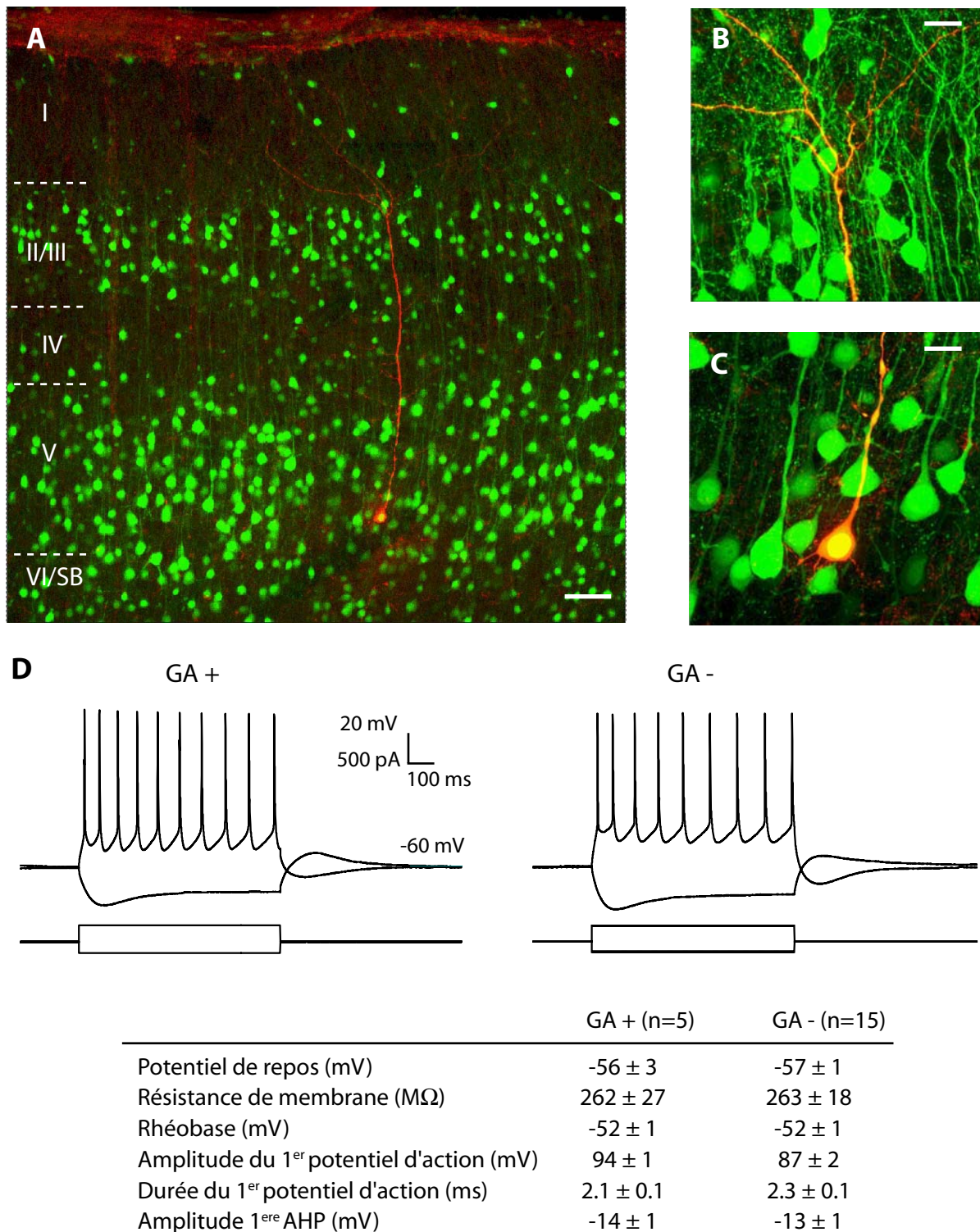
#### **CARACTERISATION DES REPONSES BIOLUMINESCENTES EN TRANCHES DE NEOCORTEX**

J'ai construit une protéine de fusion entre la GFP et l'aequorine, similaire à celle décrite par le groupe de Philippe Brûlet (G5A dans Baubet et coll., 2000). L'aequorine n'étant pas visible en fluorescence, la partie GFP permet de visualiser le site d'expression de la protéine de fusion. La séquence de l'aequorine a été entièrement modifiée pour remplacer les codons de la méduse *Aequorea victoria* par les codons les plus fréquents chez l'homme (non décrit ici). J'ai utilisé un vecteur viral Sindbis recombinant (SIN-GA) afin d'exprimer la protéine de fusion GFP-aequorine (GA) dans les neurones de tranches aiguës de néocortex. Afin de permettre l'expression du transgène, les tranches ont été transférées sur une membrane en interface avec du milieu de culture et incubées à 32°C. La fluorescence du transgène est détectée entre 8 et 12h après infection.

#### **EXPRESSION DE GA**

Les cellules exprimant GA (GA+) sont principalement situées dans les couches II-III et V-VI (Figure 1). Le faible marquage en couche I s'explique en partie par la faible densité neuronale. Le faible marquage dans la couche IV ne provient pas de la mortalité des neurones de cette couche dans nos conditions expérimentales car un contre-marquage de Nissl montre la présence de corps cellulaires dans les régions présentant peu de cellules GA+ (non illustré). Comme attendu par la nature cytosolique de la GFP et de l'aequorine et l'absence de tout signal d'adressage subcellulaire, la fluorescence de la GA est présente dans tout le cytoplasme des cellules qui l'expriment jusque dans les ramifications dendritiques et les épines, mais aussi dans le noyau (Figure 1).

La majorité des cellules exprimant GA présentent une morphologie neuronale de type pyramidale avec une longue dendrite apicale se terminant dans la couche I. Afin de vérifier que les neurones GA+ présentaient des propriétés électrophysiologiques normales, des cellules pyramidales fluorescentes de la couche V ont été enregistrées en patch-clamp en configuration cellule entière entre 18 et 24h après infection par SIN-GA et comparées avec les enregistrements effectués sur des cellules pyramidales de la même couche corticale dans des tranches aiguës non infectées. De manière similaire aux neurones contrôles, les cellules GA+ produisent une décharge de potentiels d'action avec une adaptation en fréquence en réponse à des sauts de courant dépolarisant supraliminaires (Figure 1). De plus, les neurones GA+ présentent une rectification entrante suite à un saut de courant hyperpolarisant. Plusieurs paramètres relatifs aux propriétés de membrane et de décharge ont été mesurés (voir méthodes).

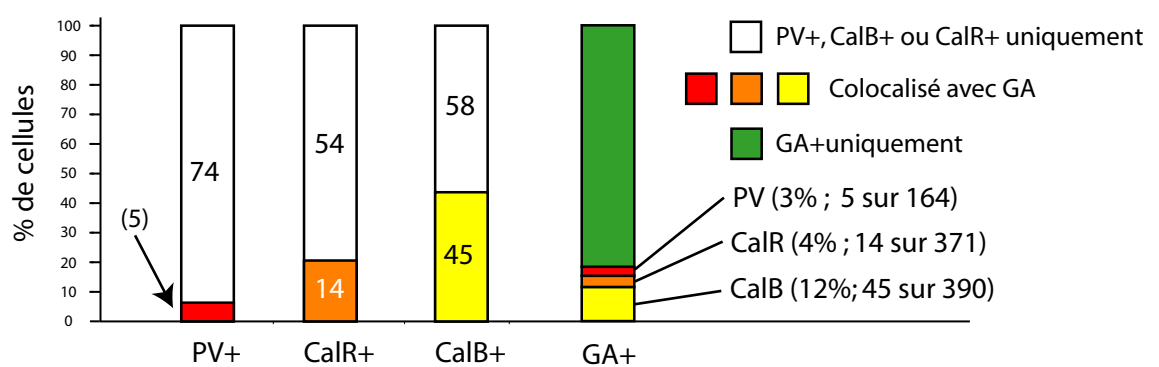
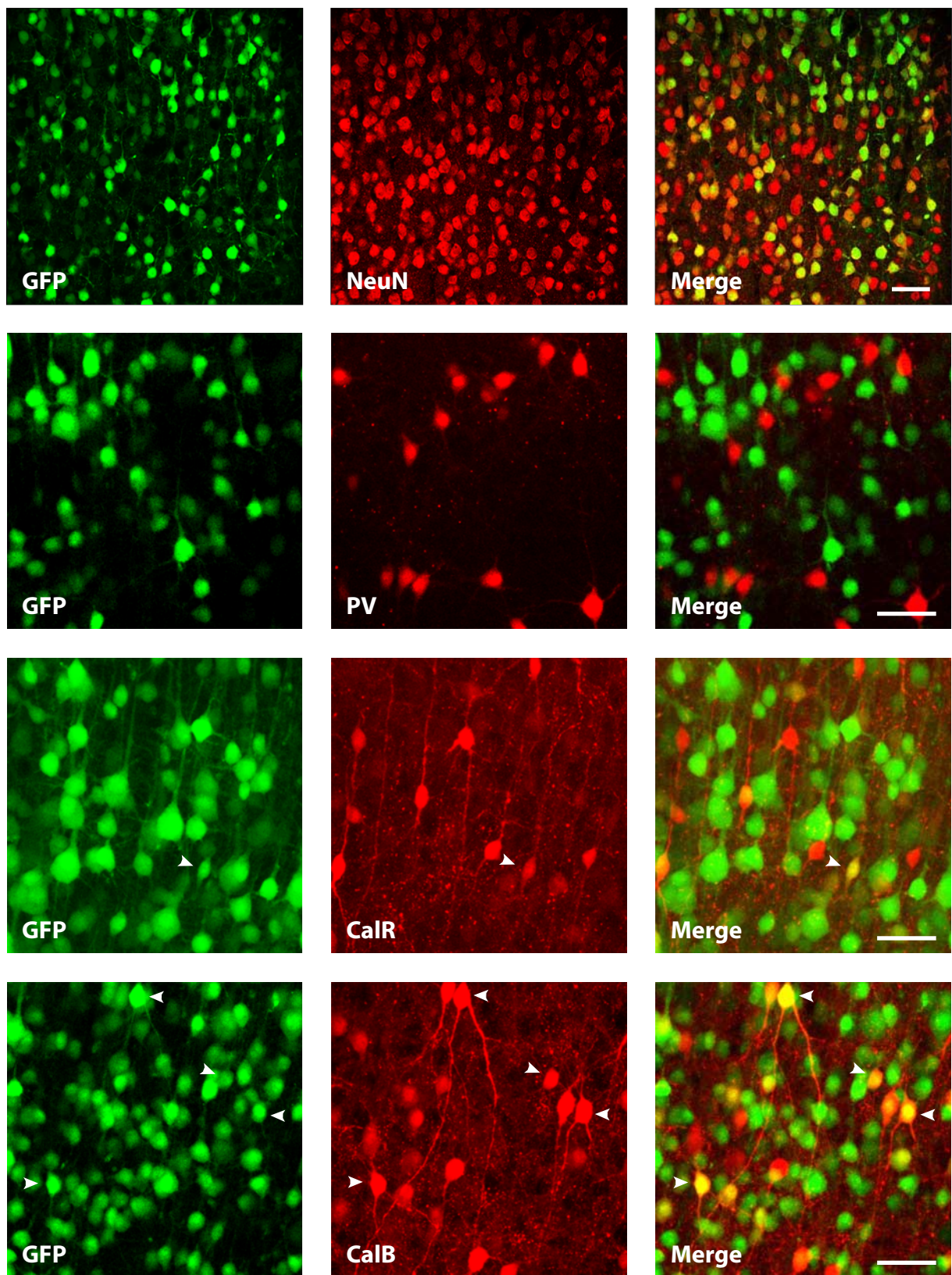


**Figure 1. Expression de la GFP-aequorine dans des tranches aigües de néocortex.**

**A.** Reconstruction confocale d'une tranche de néocortex montrant la distribution des cellules exprimant la GFP-aequorine (vert) 24h après infection par SIN-GA. Une cellule pyramidale de la couche V a été enregistrée en patch-clamp et marquée à la biocytine (en rouge). **B et C.** Agrandissement de l'image A. La cellule présente une morphologie normale. La GFP-aequorine est présente dans le soma (C), les dendrites (B et C) ainsi que dans les épines dendritiques (B). Echelle : 100  $\mu$ m (A) ou 20  $\mu$ m (B et C). **D.** Propriétés de décharge des neurones exprimant la GFP-aequorine (GA+). Enregistrement en courant imposé de la réponse de cellules pyramidales de la couche V suite à l'injection de courant (-200 pA et +300 pA). Le profil de décharge d'une cellule GA+ est similaire à celui d'une cellule n'exprimant pas GA (GA-) d'une tranche non infectée.

Tableau : Paramètres électrophysiologiques mesurés sur les cellules GA+ et GA-





**Figure 2. Expression préférentielle de GA dans les cellules pyramidales** (voir légende page suivante)



Les valeurs de ces paramètres dans les cellules GA<sup>+</sup> sont quasi identiques à celles trouvées dans les cellules pyramidales contrôles (Figure 1) et sont similaires aux valeurs précédemment publiées (Gallopín et coll., 2005).

Des marquages en immunofluorescence ont montré que toutes les cellules GA<sup>+</sup> étaient positives pour le marqueur neuronal NeuN ( $n = 3$  tranches, Figure 2). Ceci est cohérent avec le neurotropisme du virus Sindbis décrit dans le cerveau des rongeurs (Furuta et coll., 2001). Afin de vérifier que la forte occurrence de cellule GA<sup>+</sup> présentant une morphologie de type pyramidale n'était pas due à la mort des interneurons GABAergiques, j'ai effectué sur des tranches infectées par SIN-GA des marquages en immuno-fluorescence des protéines de liaison du calcium classiquement utilisées comme marqueurs d'interneurones (Kubota et coll., 1994 ; Cauli et coll., 1997) : la parvalbumine (PV), la calrétinine (CalR) et la calbindine (CalB). Les résultats de ces marquages ( $n = 3$  tranches par marqueur) sont présentés en figure 2. Les cellules PV, CalR et CalB positives sont présentes dans la plupart des couches corticales. Les cellules PV<sup>+</sup> et CalB<sup>+</sup> présentent généralement une morphologie multipolaire tandis qu'une fraction importante des cellules CR<sup>+</sup> a une forme bipolaire. Les résultats de ces marquages sont en accord avec les données publiées (Kubota et coll., 1994 ; Cauli et coll., 1997). Parmi les cellules PV<sup>+</sup>, très peu sont également fluorescentes en GFP, c'est-à-dire expriment GA (6%, 5 sur 79). Le pourcentage d'infection des cellules CalR<sup>+</sup> par SIN-GA est faible (21%, 14 sur 68), mais plus élevé que celui des cellules PV<sup>+</sup>. Enfin, environ une cellule CalB<sup>+</sup> sur deux est infectée par SIN-GA (44%, 45 sur 113). Cependant, les cellules immunoréactives pour PV, CalR et CalB ne représentent respectivement que 3%, 4% et 12% des cellules GA<sup>+</sup>. La faible proportion de neurones GA<sup>+</sup> immunoréactifs pour les protéines de liaison du calcium résulte probablement de la préférence du virus Sindbis pour les cellules pyramidales et CalB<sup>+</sup>. Ces données confirment que la grande majorité des cellules GA<sup>+</sup> sont des

---

**Figure 2. Expression préférentielle de GA dans les cellules pyramidales**

**A.** Immunomarquage du marqueur neuronal NeuN et des protéines de liaison du calcium dans des tranches néocorticales infectées par le virus SIN-GA. Les images de la première ligne sont des coupes confocales de 1  $\mu$ m d'épaisseur. Les images des trois lignes suivantes sont des projections de 24-40 coupes confocales sur 20-25  $\mu$ m d'épaisseur. CalB : calbindine ; CalR : calrétinine ; PV : parvalbumine. Toutes les cellules GA<sup>+</sup> sont NeuN<sup>+</sup>. Echelle : 50  $\mu$ m.

**B.** Répartition des cellules GA<sup>+</sup> parmi les cellules immunoréactives pour les protéines de liaison du calcium. 44% des cellules CalB positives expriment GA, alors que seulement 21% des cellules CR positives (voir flèche dans A) et 6% des cellules PV positives sont GA<sup>+</sup>. Cependant, les cellules coexprimant GA et les protéines de liaison du calcium ne représentent que 19% de toutes les cellules exprimant GA. Les chiffres indiqués dans les barres représentent le nombre de cellules comptées.

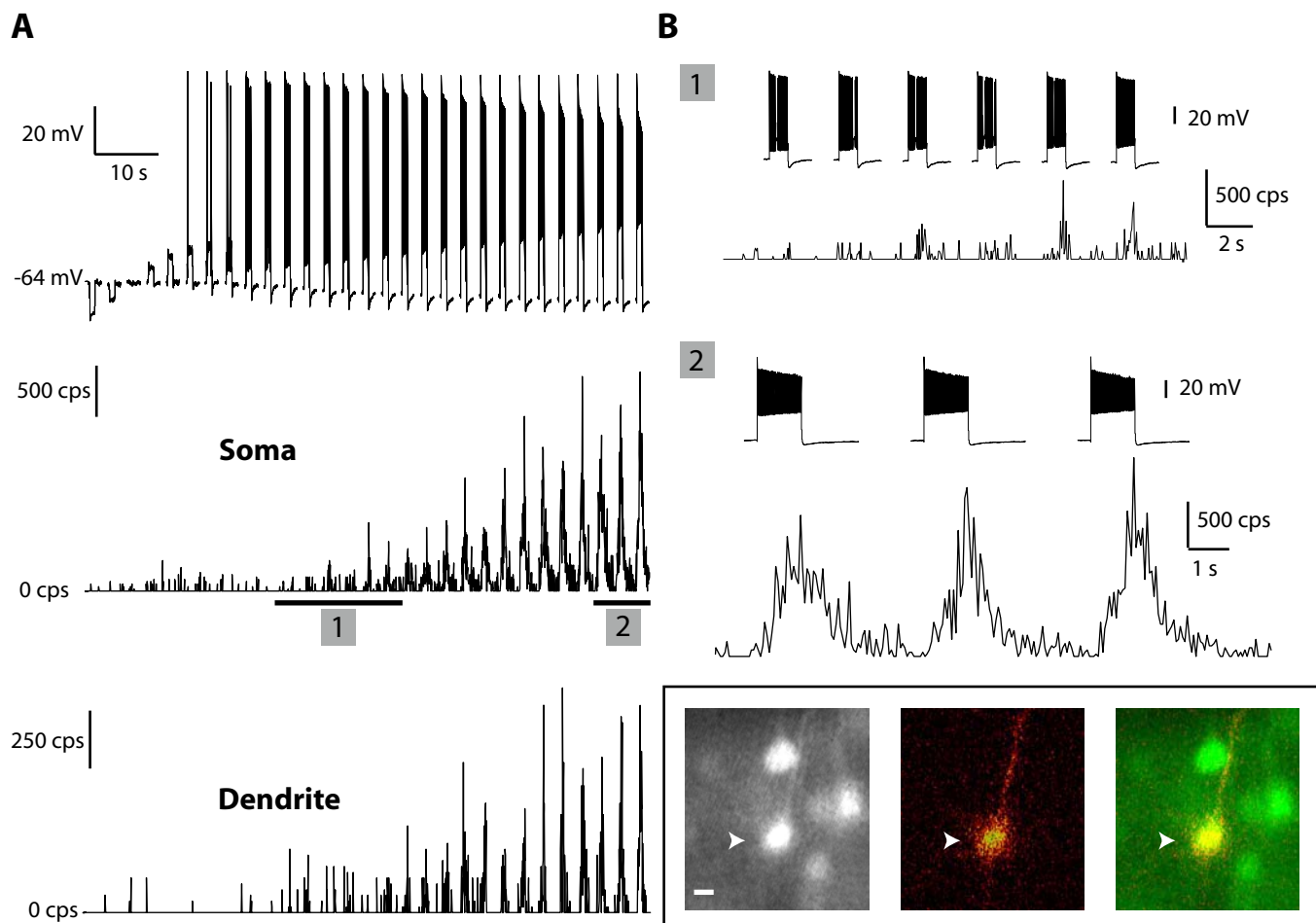
neurones pyramidaux et attestent de la bonne survie des interneurones GABAergiques dans les tranches de cortex infectées par SIN-GA.

Ces résultats montrent que les tranches de néocortex infectées par SIN-GA contiennent les principaux constituants du néocortex et que les neurones GA<sup>+</sup>, essentiellement des cellules pyramidales, possèdent des propriétés électriques normales.

#### REPONSES A LA STIMULATION D'UN SEUL NEURONE

Après reconstitution de l'aequorine en présence de son substrat, la coelentérazine, les tranches ont été observées en fluorescence GFP afin de choisir un champ d'expression de GA. La bioluminescence a ensuite été enregistrée (voir méthodes). En l'absence de stimulation, le signal de base mesuré au niveau du soma des neurones GA<sup>+</sup> est très faible ( $0.06 \pm 0.03$  cps,  $n=10$ ) et le signal mesuré sur le champ total d'observation est en moyenne de 150 cps (dont le bruit de la camera, 50 cps). Ceci confirme la quasi absence de bruit de fond de la bioluminescence aequorine. L'application d'antagonistes glutamatergiques 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX ; 10  $\mu$ M) et APV (50  $\mu$ M) ou de TTX (1  $\mu$ M) ne provoque pas de diminution du signal de base mesuré sur le champ total ( $n=3$ ). Ceci indique que l'activité spontanée des neurones est très faible en tranches néocorticales infectées, comme observé en tranches aiguës lors des études précédentes du laboratoire, en raison notamment du poids très élevé de l'inhibition dans cette structure (Holmgren et coll., 2003).

Afin d'estimer la sensibilité et la résolution de l'imagerie de bioluminescence, des cellules pyramidales de la couche V ( $n=3$ ) ont été enregistrées par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière et la bioluminescence émise a été enregistrée simultanément (Figure 3). Les cellules ont été soumises à des sauts de courant dépolarisant d'intensité croissante induisant des bouffées de potentiels d'action de fréquence croissante. Au delà d'une fréquence de décharge de  $30 \pm 4$  Hz, des pics de bioluminescence d'amplitude croissante ont été détectés en réponse à chaque stimulus au niveau du soma et de la dendrite proximale. On note que la luminescence provient uniquement du neurone stimulé ce qui, allié au faible bruit de fond de la technique, autorise l'enregistrement d'activités de neurones individuels. La luminescence augmente durant la décharge de potentiels d'action puis décroît lorsque l'injection de courant cesse. La cinétique de décroissance de la luminescence à la fin de chaque décharge de potentiel d'action ( $\tau = 157 \pm 16$  ms, mesurée au niveau du soma) est proche de celle observée *in vitro* lorsqu'on retire le calcium ( $\tau \sim 100$  ms, Hastings et coll., 1969).



### Figure 3. Relation entre l'activité électrique des neurones et la bioluminescence aequorine

**A.** L'injection de courant dépolarisant d'amplitude croissante dans une cellule pyramidale de la couche V évoque des trains de potentiels d'action de fréquence croissante (en haut). Les traces du milieu et du bas montrent l'enregistrement simultané de la bioluminescence au niveau du soma et de la dendrite proximale. L'encadré montre la fluorescence de ce neurone (à gauche), l'image de bioluminescence intégrée sur l'ensemble de l'enregistrement illustré (au milieu) et la superposition des images de fluorescence et de luminescence.

**B.** L'enregistrement de luminescence réalisé au niveau du soma est montré à une échelle de temps plus grande afin de visualiser le seuil de détection des activités bioléctriques (1) et le décours temporel des réponses observées à haute intensité de stimulation (2). Sur l'intervalle de temps 1, la réponse de bioluminescence montre une bonne corrélation avec les activités bioélectriques à partir du troisième train de potentiels d'action.

Echelle: 10  $\mu$ m

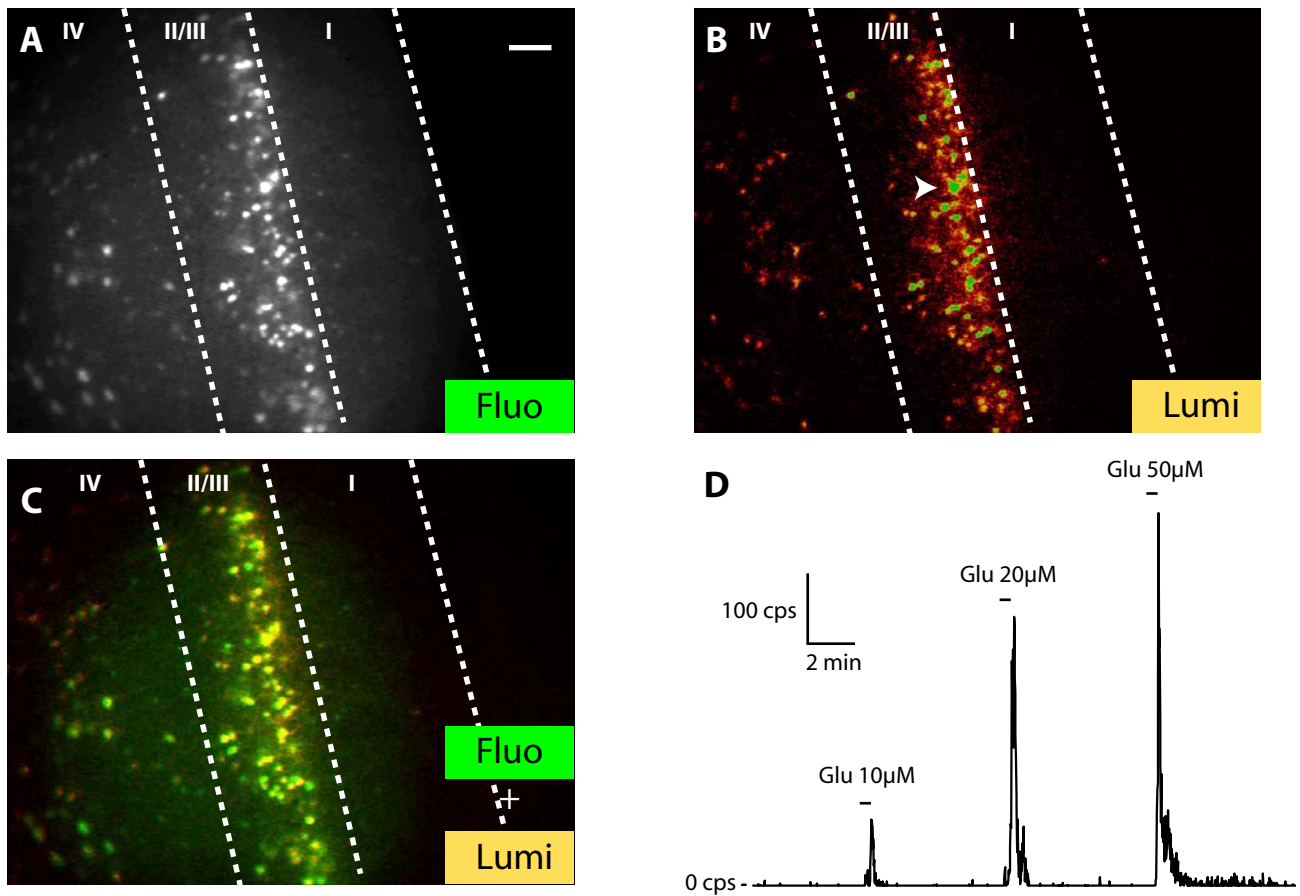
Ces expériences montrent que GA permet de détecter les activités bioélectriques lorsque celles-ci sont suffisamment intenses. Bien que dans nos conditions expérimentales, les réponses GA aient été sous-évaluées en raison de la dialyse de la sonde au cours de l'enregistrement, il est évident que son seuil de détection des transitoires calciques est nettement inférieur à celui des sondes chimiques.

#### REPONSES A L'APPLICATION DE GLUTAMATE

J'ai examiné la réponse aequorine des neurones activés par le glutamate. Chaque application en bain de glutamate (10-50  $\mu$ M) induit un pic de bioluminescence qui disparaît lorsque le glutamate est lavé (figure 4). La bioluminescence provient de régions discrètes qui correspondent aux somas des neurones GA<sup>+</sup> et l'amplitude des réponses augmente avec la concentration de glutamate. Des résultats similaires ont été obtenus dans 7 autres tranches. Etant donné que cette réponse persiste en présence de tétrodotoxine (TTX, 1  $\mu$ M), elle met en jeu une entrée de calcium par les récepteurs du glutamate. Ceci montre qu'il est possible de visualiser au niveau des cellules individuelles l'augmentation de calcium intracellulaire résultant de l'activation des récepteurs du glutamate. La réponse au glutamate en présence de TTX est supprimée par un antagoniste des récepteurs NMDA, l'acide D(-)-2- amino-5-phosphovalérique (APV, 20  $\mu$ M ; n=4). Ceci montre que l'entrée de calcium en réponse au glutamate est essentiellement due à l'activation des récepteurs NMDA.

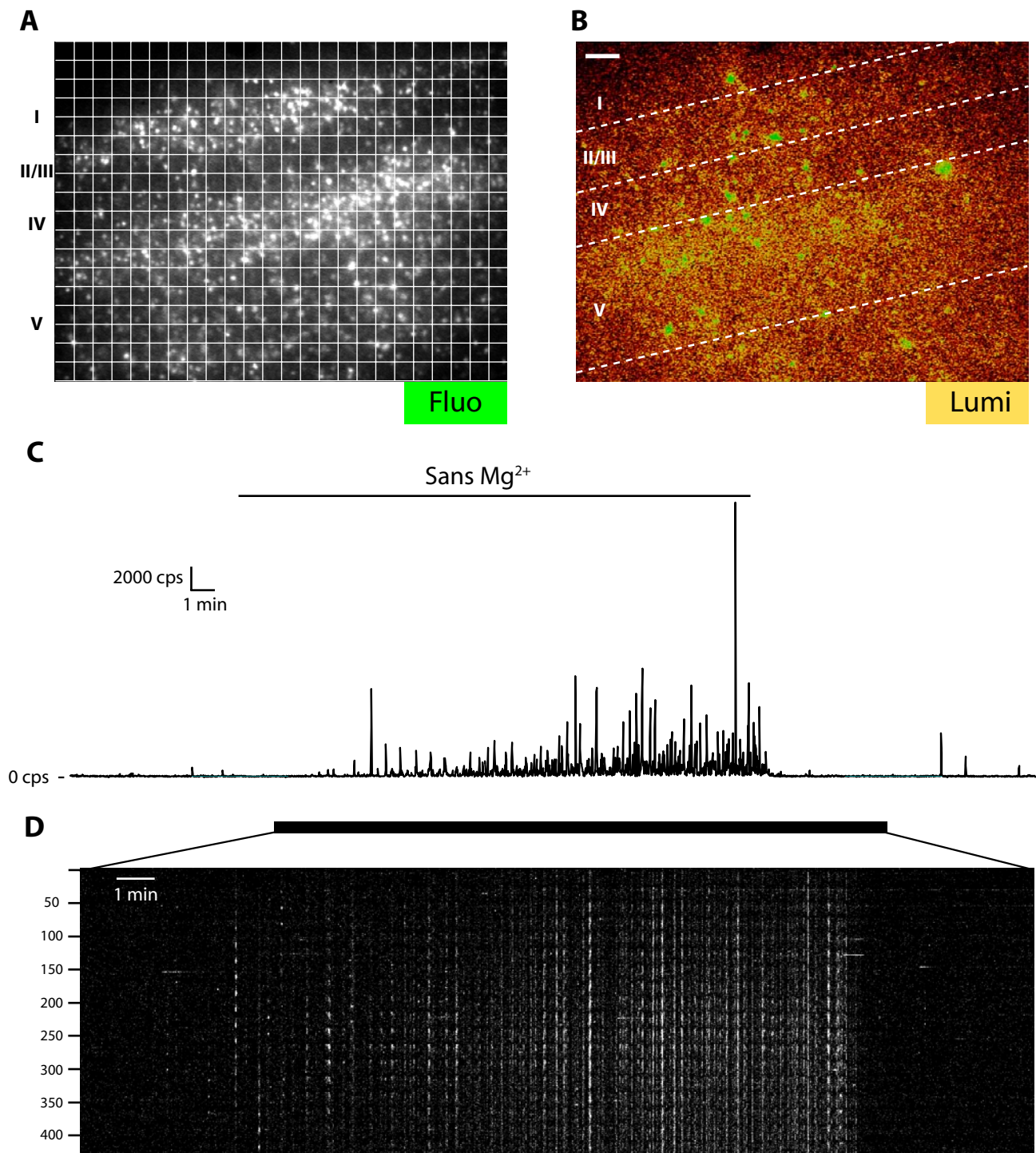
#### INTEGRITE DU RESEAU EXCITATEUR

L'intégrité des connexions excitatrices a été vérifiée en supprimant le magnésium extracellulaire (n=3 tranches). Ce protocole induit des épisodes d'activités synchronisées sous-tendus par l'activation des récepteurs NMDA (Thomson et West, 1986 ; Hegstad et coll., 1989 ; Silva et coll., 1991 ; Flint et Connors, 1996 ; Wu et coll., 1999 ; Kawaguchi, 2001). L'application en bain de LCSA sans magnésium induit l'apparition de pics de bioluminescence, environ 5 minutes après le début de l'application (Figure 5). La fréquence de ces pics augmente au cours de l'application. Ils disparaissent très rapidement lors du lavage en présence de magnésium. Les activités observées mettent en jeu des régions réparties sur l'ensemble du champ d'observation. Afin d'examiner la répartition spatiotemporelle des activités observées, le champ d'observation a été divisé en 432 régions d'analyse (RA) arrangées suivant un réseau de 18x24 RAs.



#### Figure 4. Réponse à l'application de glutamate

**A.** Tranche de néocortex exprimant GA observée en fluorescence GFP. **B.** Image intégrée de la bioluminescence aequorine émise lors de trois applications en bain de glutamate à des concentrations croissantes (10, 20, 50  $\mu\text{M}$ ). **C.** Superposition des images A (vert) et B (rouge). **D.** Signal lumineux mesuré au niveau d'une cellule de la couche II/III (pointe de flèche dans B). Echelle: 100  $\mu\text{m}$



**Figure 5. Effet de l'absence de magnésium extracellulaire**

**A.** Tranche de néocortex exprimant GA observée en fluorescence GFP. **B.** Image en bioluminescence aequorine intégrée sur toute la durée de l'enregistrement montré en C. **C.** Signal de bioluminescence mesuré sur le champ total d'observation. **D.** Intensité de bioluminescence au cours du temps de 432 régions d'analyse (RA) réparties sur le champ d'observation (voir damier dans A). La numérotation se fait de gauche à droite puis de haut en bas. La RA n°1 est en haut à gauche et la RA 432 est en bas à droite. Les valeurs d'intensité sont codées en nuance de gris (voir méthode). Les pics de luminescence observés en C reflètent des activités synchronisées de plusieurs régions. Echelle: 100  $\mu m$

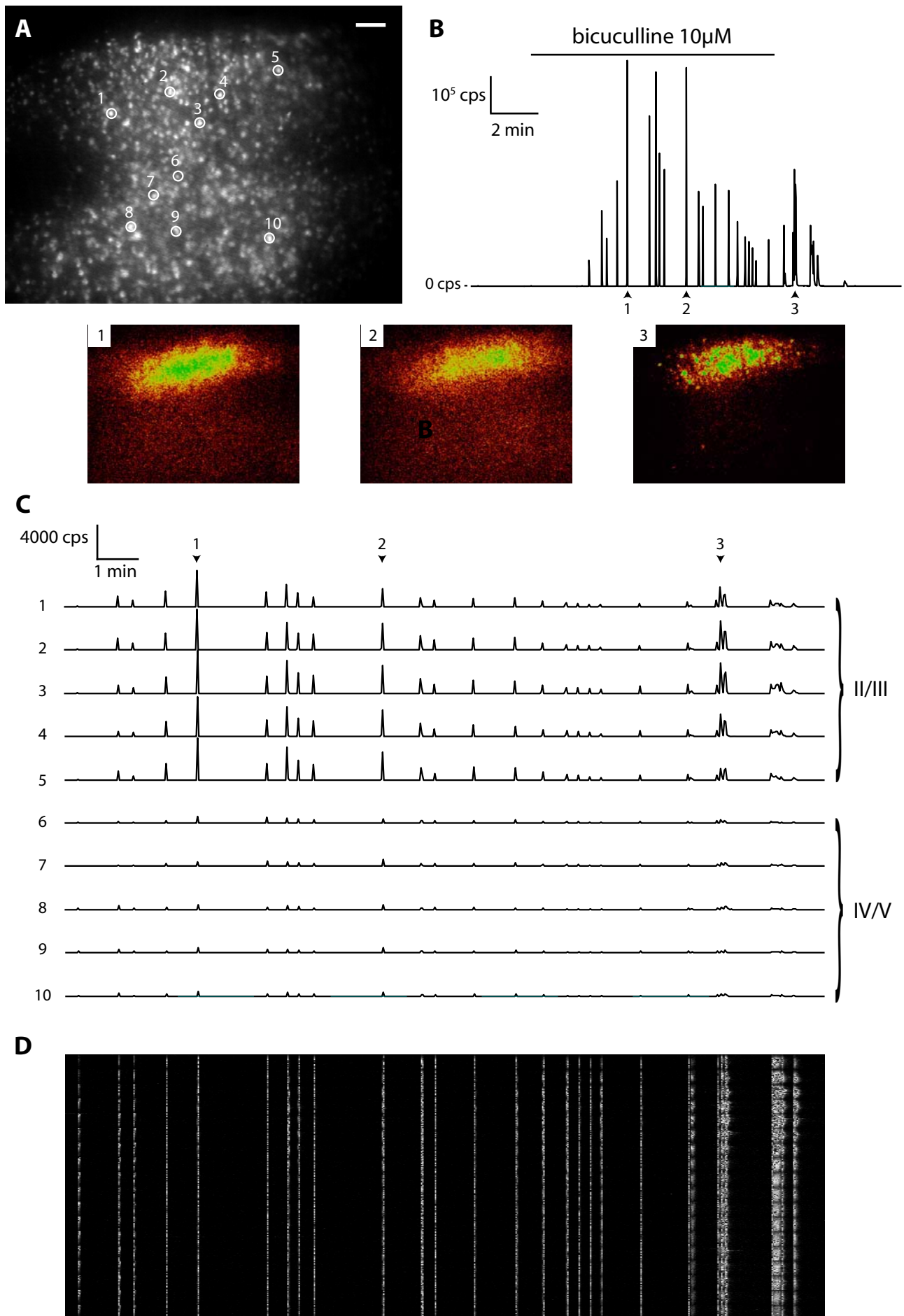
Avec un objectif x10, chaque RA représente un carré de 60  $\mu\text{m}$  de côté. Le signal d'une RA a été représenté sous la forme d'une ligne dont les pixels sont codés en fonction de l'intensité de bioluminescence au cours du temps. Les lignes correspondant à chaque RA ont été ensuite empilées pour former une image dans laquelle le temps est représenté de gauche à droite et les RAs de haut en bas (voir méthodes). On peut voir que les pics de bioluminescence résultent d'activités synchronisées tout d'abord au sein de foyers restreints, puis impliquant une grande partie du champ d'observation. Des activités de plus forte amplitude ont également été observées lorsque l'application de la solution sans magnésium dure plus de 20 minutes. Ces activités consistent en un plateau de forte amplitude et d'une durée de 2-3 minutes, surmonté de pics d'activité (n=2, non illustré).

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par électrophysiologie (Kawaguchi, 2001) et par imagerie (Wu et coll., 1999) dans les mêmes conditions. Les pics observés au début de l'application de LCSA sans magnésium correspondraient aux décharges synchronisées de potentiels d'action dues à la dépolarisation des cellules pyramidales (Kawaguchi, 2001). Le plateau observé au bout de 20 minutes correspondrait à une phase de forte dépolarisation des cellules pyramidales durant laquelle ces cellules produisent une décharge tonique de potentiels d'action à haute fréquence (Kawaguchi, 2001).

#### INTEGRITE DU RESEAU INHIBITEUR

L'intégrité du réseau inhibiteur a été testée en bloquant l'inhibition GABAergique avec la bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> qui provoque des épisodes d'activités synchronisés de type épileptiforme en tranche de néocortex (Gutnick et coll., 1982; Connors, 1984). L'application de bicuculline (10  $\mu\text{M}$ ) provoque des pics de bioluminescence qui disparaissent lorsque la bicuculline est lavée (Figure 6). La bioluminescence mesurée au niveau de neurones individuels montre que ces réponses sont sous tendues par des activités synchronisées qui sont principalement localisées dans les couches supérieures. L'analyse de la distribution spatiale de ces activités dans tout le champ d'observation indique quelles mettent en jeu tous les neurones GA<sup>+</sup> de la tranche même si l'amplitude de leurs réponses dépend de la couche où ils se trouvent (Figure 6). Lors de l'application de gabazine (300 nM), un autre antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> (n=3, non illustré), des réponses similaires ont été observées, impliquant toutes les couches corticales. Ces expériences montrent que l'inhibition corticale est bien fonctionnelle comme le laissait prévoir la présence des interneurones par immunofluorescence.





**Figure 6. Effet du blocage de l'inhibition par la bicuculline** (voir légende page suivante)



Ces résultats indiquent que les réseaux excitateurs et inhibiteurs des tranches néocorticales exprimant GA sont fonctionnels. Ils montrent également que la bioluminescence de l'aequorine permet de visualiser et d'analyser des comportements complexes de réseaux neuronaux tels que des activités synchronisées, aussi bien au niveau global qu'au niveau de régions restreintes.

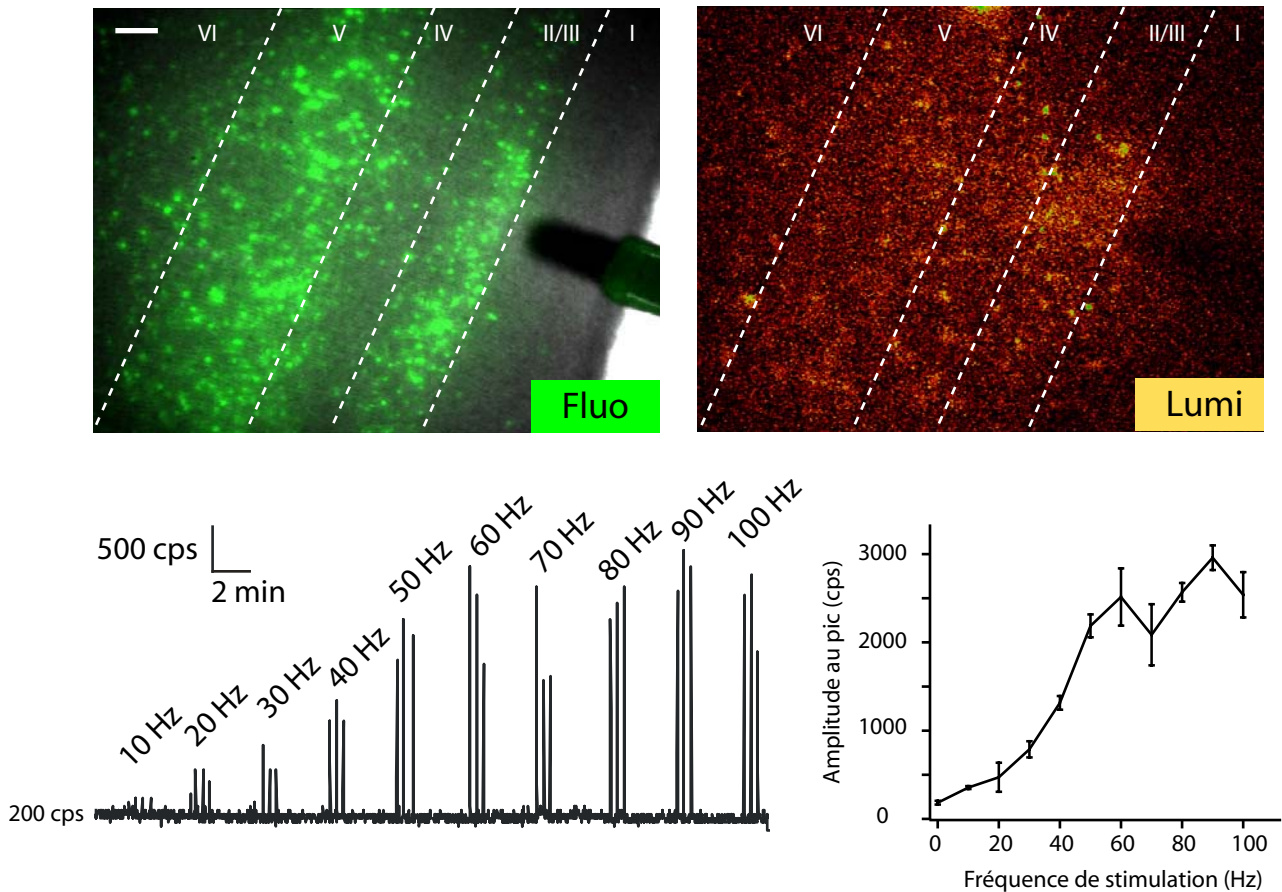
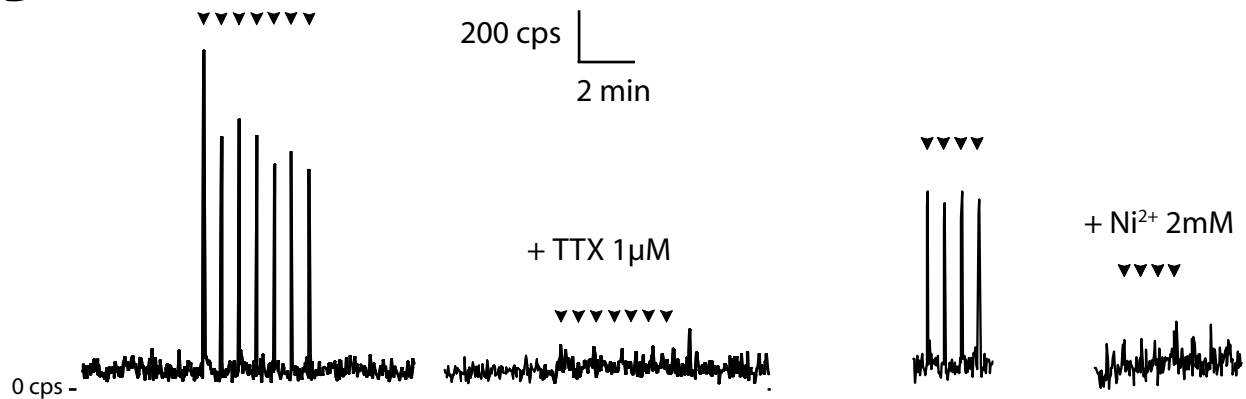
#### REPONSES DU RESEAU AUX STIMULATIONS ELECTRIQUES

Afin de stimuler le réseau néocortical de manière locale, des stimulations électriques ont été réalisées avec une électrode bipolaire concentrique au niveau de la couche I (stimulation CI, n=11 tranches) ou bien de la substance blanche sous corticale (stimulation SB, n=10 tranches). La couche I contient des fibres excitatrices de sources intra- et extracorticales mais aussi les dendrites des cellules pyramidales et des interneurons GABAergiques se trouvant dans les couches inférieures. Dans la substance blanche se trouvent des afférences thalamocorticales ainsi que les fibres efférentes du néocortex. Une stimulation électrique est constituée d'un train de pulses de courant de 200  $\mu$ s (durée totale : 500 ms). La réponse lumineuse à une stimulation CI est maximale au voisinage de l'électrode de stimulation, dans les couches supragranulaires, et s'étend à la fois verticalement vers les couches inférieures et latéralement par rapport à l'électrode de stimulation (Figure 7). Elle est observée en même temps que la stimulation et se termine avec la fin de la stimulation. Les stimulations SB donnent des réponses similaires, maximales au niveau des couches infragranulaires et qui s'étendent dans les couches supérieures. La réponse lumineuse évoquée augmente avec la fréquence des pulses de courant (Figure 7) et avec l'intensité du courant (non illustré). L'amplitude des réponses atteint un plateau à partir de 60 Hz.

---

#### **Figure 6. Effet du blocage de l'inhibition par la bicuculline**

- A.** Tranche de néocortex exprimant GA observée en fluorescence GFP.
- B.** Signal de bioluminescence mesuré sur le champ total d'observation.
- C.** Signaux lumineux mesurés au niveau de 10 cellules (1-10 ; voir A) localisées dans les couches II-V
- D.** Répartition de l'intensité de bioluminescence dans les RAs au cours du temps.

**A****B****Figure 7. Réponse à des stimulations électriques**

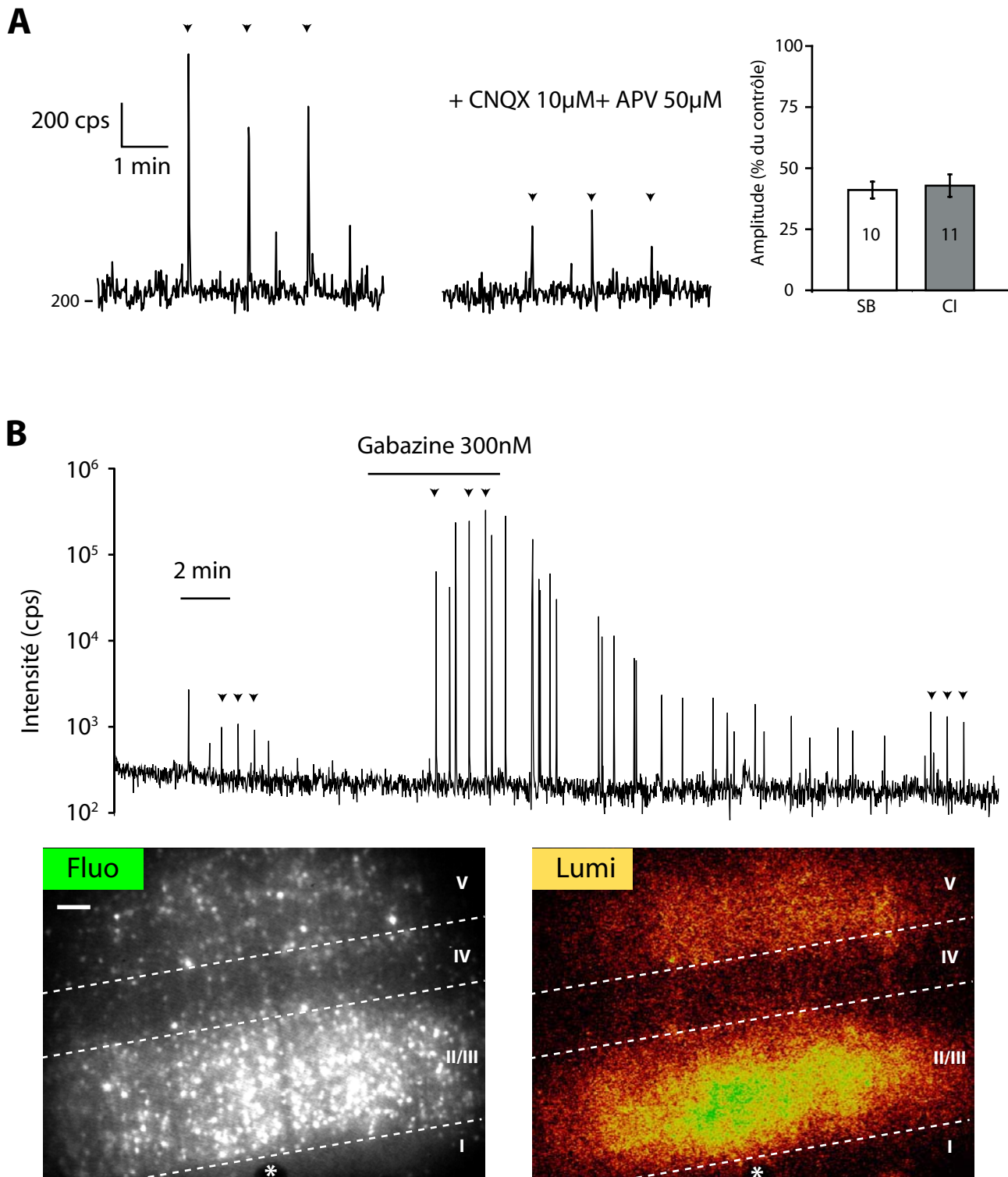
**A.** En haut à gauche, image de la tranche de néocortex exprimant GA observée en fluorescence GFP, superposée à l'image en lumière transmise. L'électrode de stimulation bipolaire est placée dans la couche I. En haut à droite, image de la réponse bioluminescente intégrée sur l'ensemble de la trace montrée en bas à gauche. La trace montre les réponses, mesurées sur le champ total d'observation, à des stimulations électriques de fréquence croissante. Chaque stimulation a consisté en un train de pulses de 100  $\mu$ s d'une durée totale de 500 ms. Pour chaque fréquence trois stimulations ont été effectuées. Le graphe montre la relation entre l'amplitude moyenne des réponses en bioluminescence et la fréquence de stimulation.

**B.** Inhibition de la réponse à des stimulations électriques à 50 Hz par la TTX et par le nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ). Les signaux sont mesurés sur le champ total.

Astérisque : position de l'électrode de stimulation. Pointe de flèche : stimulation électrique. Echelle: 100  $\mu$ m

L'application de TTX (1  $\mu$ M) supprime la réponse lumineuse à ces stimulations (n=3 ; Figure 7). Le même effet est obtenu par application de  $\text{Ni}^{2+}$  (2 mM, n=3 ; Figure 7) qui bloque les canaux calciques voltage-dépendants. De plus, les réponses sont réduites de manière importante en présence de CNQX-APV (voir figure 8 ;  $41 \pm 3$  % et  $43 \pm 5$  % du contrôle pour des stimulations SB et CI respectivement). Ces résultats montrent que les réponses aux stimulations électriques résultent à la fois de la transmission glutamatergique et de l'activation directe des neurones, soit par stimulation de leurs dendrites (CI) soit par stimulation antidromique (SB). L'amplitude de la réponse à une stimulation CI est augmentée d'au moins deux ordres de grandeur (voir figure 8) en présence de gabazine (300 nM, n=3). En présence de gabazine, les réponses impliquent une grande partie du champ d'observation. Cela montre que l'excitation évoquée par la stimulation électrique est limitée en amplitude et en extension spatiale par l'inhibition GABAergique.

En résumé de cette partie, la luminescence de GA permet d'étudier les activités neuronales en tranche de néocortex au niveau des neurones individuels et d'ensembles de neurones. La quantité d'aequorine active est largement suffisante pour conduire des expériences de plusieurs heures et enregistrer des activités de grande amplitude. Cette technique présente une absence de bruit de fond qui permet l'imagerie du champ entier et une large gamme dynamique qui permet d'apprécier l'intensité des activités neuronales. Cette gamme dynamique est très supérieure à celle des sondes chimiques (les réponses détectées vont de quelques cps à presque un million de cps) mais présente, à l'instar de ces dernières, une non-linéarité des réponses. Dans le cas de l'aequorine, cette non-linéarité rend difficile la détection d'activités neuronales associées à de faibles variations de  $[\text{Ca}^{2+}]$  (par exemple un potentiel d'action unique). Bien que la résolution spatiale de l'imagerie de luminescence soit suffisante pour visualiser l'activité de neurones individuels, le signal peut provenir d'autres neurones situés en dehors du plan focal et de leurs neurites. Pour cette raison, nos études des activités de réseau ne reposent pas sur l'analyse de neurones unitaires mais sur celle des « régions d'analyse », RA, définies précédemment.



**Figure 8. Contribution des transmissions synaptiques rapides glutamatergiques et GABAergiques**

**A.** Effet des antagonistes glutamatergiques CNQX (10 µM) et APV (50 µM) sur l'amplitude de la réponse aux stimulations électriques (10 Hz) dans la couche I. Signal mesuré sur le champ total. L'histogramme montre la diminution moyenne des amplitudes pour les stimulations en substance blanche (SB, n= 10) et en couche I (CI, n= 11).

**B.** La trace montre l'effet de la gabazine sur l'amplitude des réponses aux stimulations électriques CI (pointe de flèche, 10 Hz), mesurées sur le champ total d'observation. Notez que les intensités sont données en échelle logarithmique. En bas à gauche, image de la tranche exprimant GA, vue en fluorescence GFP. En bas à droite, image intégrée l'ensemble de l'enregistrement. Astérisque : position de l'électrode de stimulation. Echelle: 100 µm.

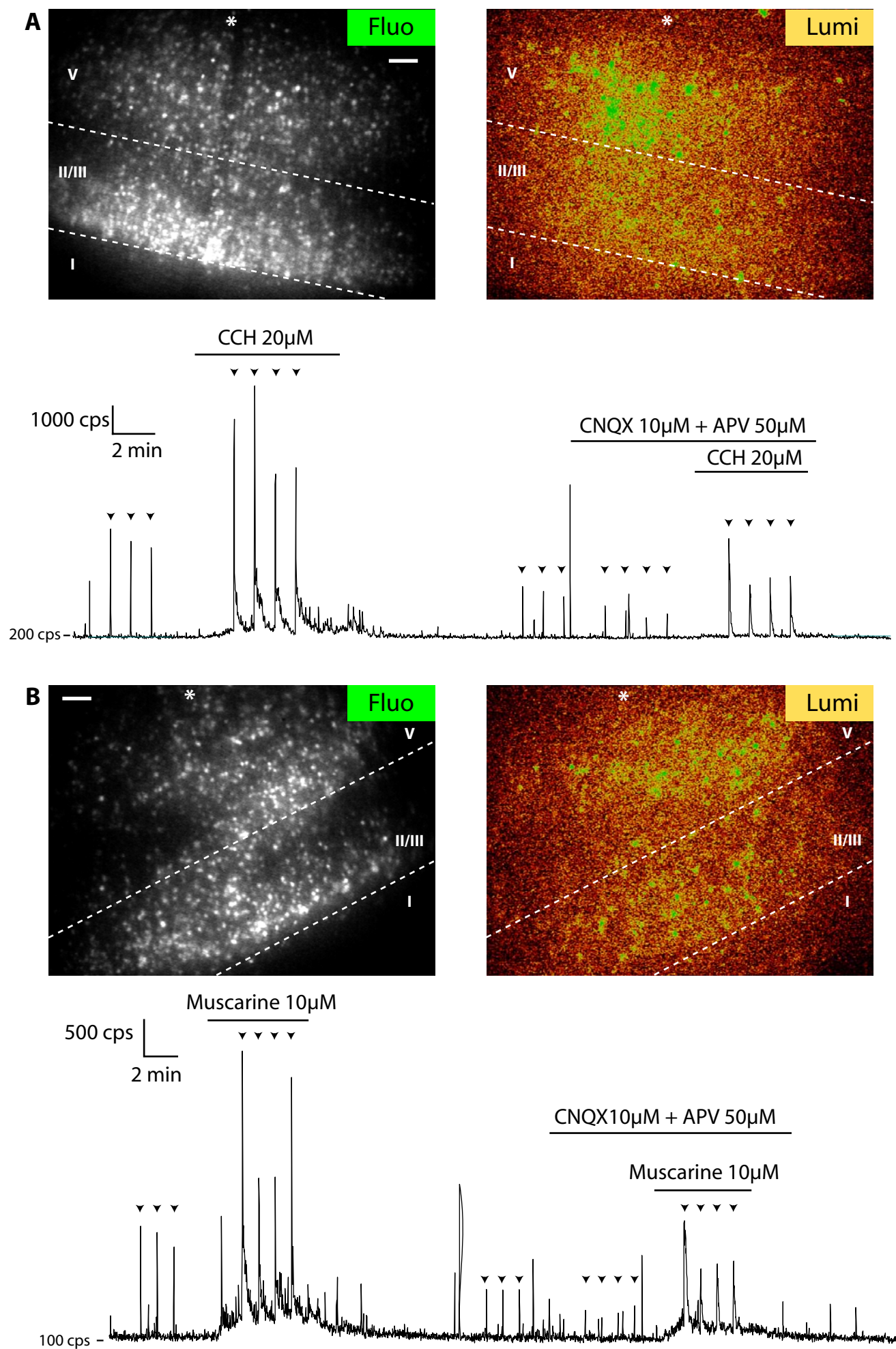
## MODULATION CHOLINERGIQUE DU RESEAU NEOCORTICAL

L'acétylcholine joue un rôle important dans l'intégration des informations sensorielles en augmentant l'excitabilité des neurones corticaux (McCormick et Prince, 1985) et en facilitant les réponses évoquées par des stimulations sensorielles *in vivo* (Sato et coll., 1987). Il a été suggéré que cette action était médiée par la composante muscarinique de l'acétylcholine (McCormick et Prince, 1985). J'ai utilisé l'imagerie calcique de bioluminescence aequorine pour étudier *in vitro* la modulation cholinergique d'activités évoquées par des stimulations électriques du néocortex.

### LES AGONISTES MUSCARINIQUES AUGMENTENT L'AMPLITUDE ET LA DUREE DES REPONSES EVOQUEES

En absence de stimulation électrique, l'application de carbachol (CCH, 20  $\mu$ M), agoniste mixte muscarinique et nicotinique, induit une réponse lente de faible amplitude (n=14 tranches, voir exemple en figure 9A). Ce résultat est cohérent avec le fait que les récepteurs muscariniques, bien que couplés à la phospholipase C, ne provoque pas d'augmentation de la  $[Ca^{2+}]$  basale en l'absence de stimulation électrique (Egorov et coll., 2003). D'autre part, les agonistes nicotiques activent sélectivement une sous-population d'interneurones (Porter et coll., 1999 ; Christophe et coll., 2002) qui sont peu infectés par SIN-GA puisqu'ils expriment fortement la calrétinine. Des stimulations électriques SB (n=6 tranches) ou CI (n=8 tranches) ont été réalisées (10 Hz). Les réponses évoquées ont d'abord été analysées sur le champ total d'enregistrement (Figures 9 et 10). En présence de CCH, l'amplitude des réponses aux stimulations SB augmente de  $320 \pm 112$  % et celle des réponses aux stimulations CI de  $686 \pm 155$  % par rapport aux réponses en condition contrôle. Le CCH induit également une forte augmentation de la durée des réponses, qui passe de  $0.6 \pm 0.1$  s en condition contrôle à  $29 \pm 3$  s (SB) et à  $23 \pm 2$  s (CI) (Figure 10). Pour les stimulations CI et SB, la cinétique de décroissance de la réponse est clairement biphasique avec apparition d'une inflexion qui sous-tend la phase de décroissance lente. Il faut noter que les effets du CCH sur les réponses aux stimulations CI et SB sont très similaires et semblent donc dériver des propriétés du réseau néocortical et non du type de stimulation effectuée.





**Figure 9. Modulation cholinergique de la réponse aux stimulations électriques** (voir légende page suivante)

L'augmentation de l'amplitude en présence de CCH est également observée en présence d'antagonistes glutamatergiques CNQX (10  $\mu$ M) et APV (50  $\mu$ M) (+414  $\pm$  172 % pour stimulation CI, n=4 ; +319  $\pm$  124 % pour stimulation SB, n= 5 ; Figure 10). Bien que supérieure à la durée des réponses en condition contrôle, les réponses en présence d'antagonistes sont beaucoup plus brèves que les réponses en présence de CCH seul (11  $\pm$  1 s pour stimulation CI, n=3 ; 12  $\pm$  2 s pour stimulation SB, n= 4 ; Figure 10). Ces antagonistes atténuent nettement le caractère biphasique de la cinétique de décroissance des réponses observées en présence de CCH seul (Figure 10). Cela suggère qu'une partie de l'effet du CCH sur l'amplitude et la durée résulte d'une potentialisation de la réponse des neurones individuels indépendamment de la mise en jeu du réseau excitateur. En effet, il a été montré que les agonistes muscariniques augmentent très largement l'amplitude et la durée du signal calcique associé au potentiel d'action dans les cellules pyramidales (Beier et coll., 2000, Yamamoto et coll., 2000).

L'ensemble des effets du CCH est reproduit par la muscarine (10  $\mu$ M) dans des proportions comparables (Figure 9 et 10). En absence de stimulation électrique, l'application de muscarine induit une réponse lente de faible amplitude (n= 12 tranches, voir exemple en figure 9B). Des stimulations électriques SB (n= 8 tranches) ou CI (n= 4 tranches) ont été réalisées (10Hz). En présence de muscarine, l'amplitude des réponses aux stimulations SB augmente de 160  $\pm$  114% et celle des réponses aux stimulations CI de 448  $\pm$  113 % par rapport aux réponses en condition contrôle. A l'instar du CCH, la muscarine augmente la durée de la réponse qui présente alors une cinétique biphasique. La présence d'antagonistes glutamatergiques écourte la réponse en présence de muscarine (stimulation SB ; n=4) qui reste plus grande qu'en condition contrôle (non illustré).

---

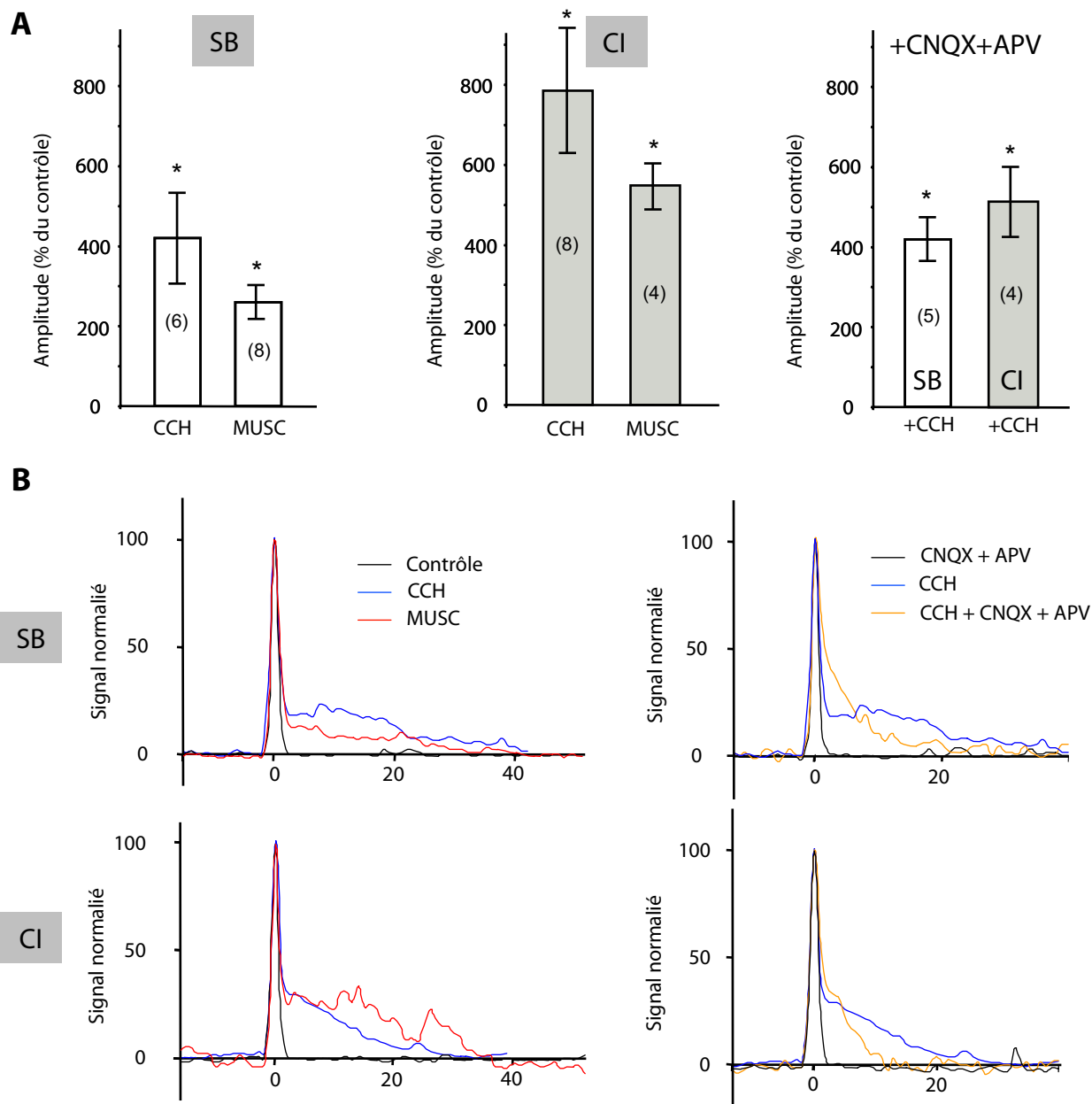
**Figure 9. Modulation cholinergique de la réponse aux stimulations électriques**

A. Effets du carbachol (20  $\mu$ M). Stimulation électrique (10 Hz) dans la substance blanche.

B. Effets de la muscarine. Stimulation électrique (10 Hz) dans la substance blanche.

Les traces représentent le signal en bioluminescence mesuré sur le champ total. Les images de bioluminescence sont intégrées sur la durée des traces montrées sous les images correspondantes.

Astérisque : position de l'électrode de stimulation ; Pointe de flèche : stimulation électrique.



**Figure 10. Amplitude et cinétique des réponses évoquées par stimulation électrique en présence d'agonistes cholinergiques**

Les mesures ont été faites à partir des signaux mesurés sur le champ total. Les amplitudes (A) sont exprimés en pourcentage de la réponse contrôle. Le nombre d'expériences dans chaque condition est donné par les chiffres présents dans les barres. Les traces en B représentent la moyenne des décours temporels des réponses, normalisées par rapport au signal de base avant la stimulation et par rapport à l'intensité maximale. Même nombre d'expériences qu'en A.

CI : Stimulation électrique (10 Hz) dans la couche I ; SB : Stimulation électrique (10 Hz) dans la substance blanche.

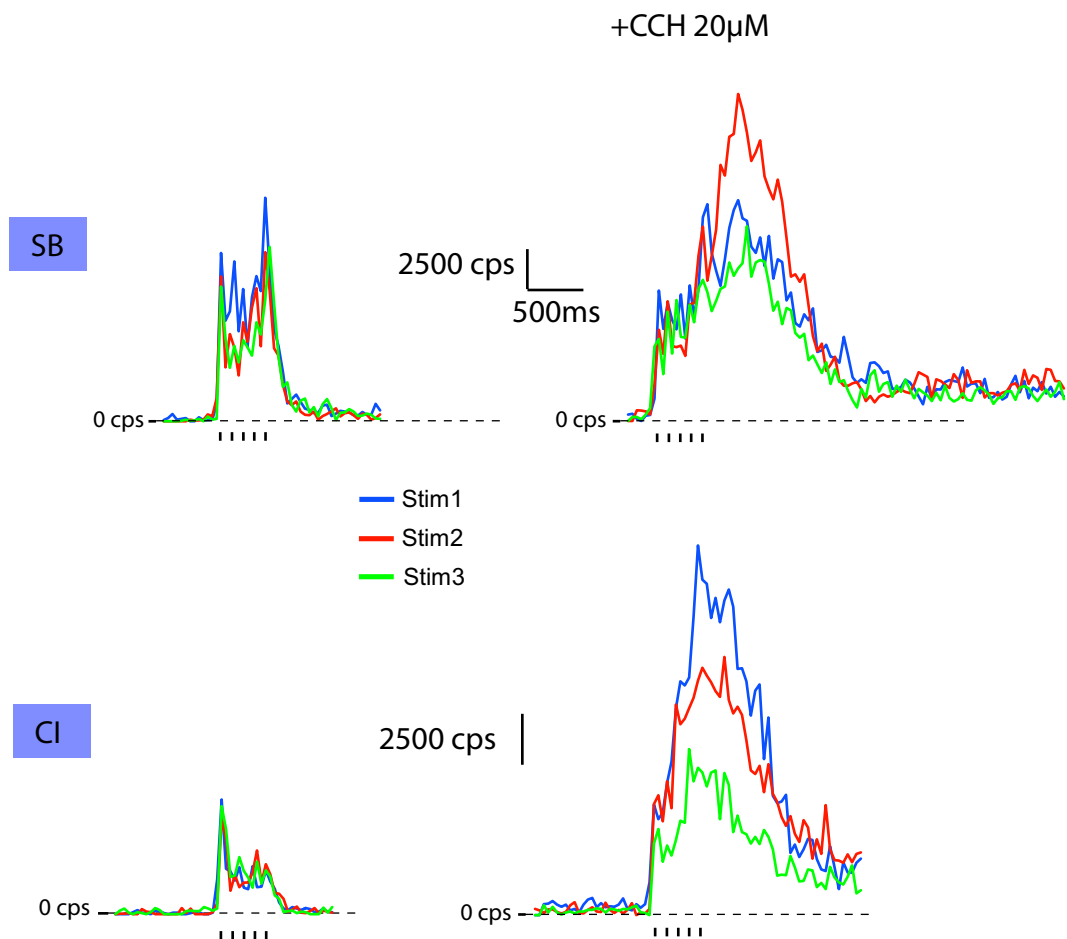


L'application de l'agoniste nicotinique DMPP (100  $\mu$ M ; n=5) n'induit pas de modification de l'activité de base en absence de stimulation électrique. Le DMPP n'affecte pas significativement l'amplitude des réponses aux stimulations CI et SB (stimulation SB :  $+21 \pm 12$  %, n=2 ; Stimulation CI :  $+10 \pm 21$  %, n=3). Aucun effet du DMPP n'a été observé sur la cinétique des réponses (non illustré). Ceci montre que, dans nos conditions expérimentales, l'effet du CCH sur la réponse aux stimulations électriques passe par l'activation des récepteurs muscariniques.

#### AUGMENTATION D'AMPLITUDE DES REPONSES EVOQUEES

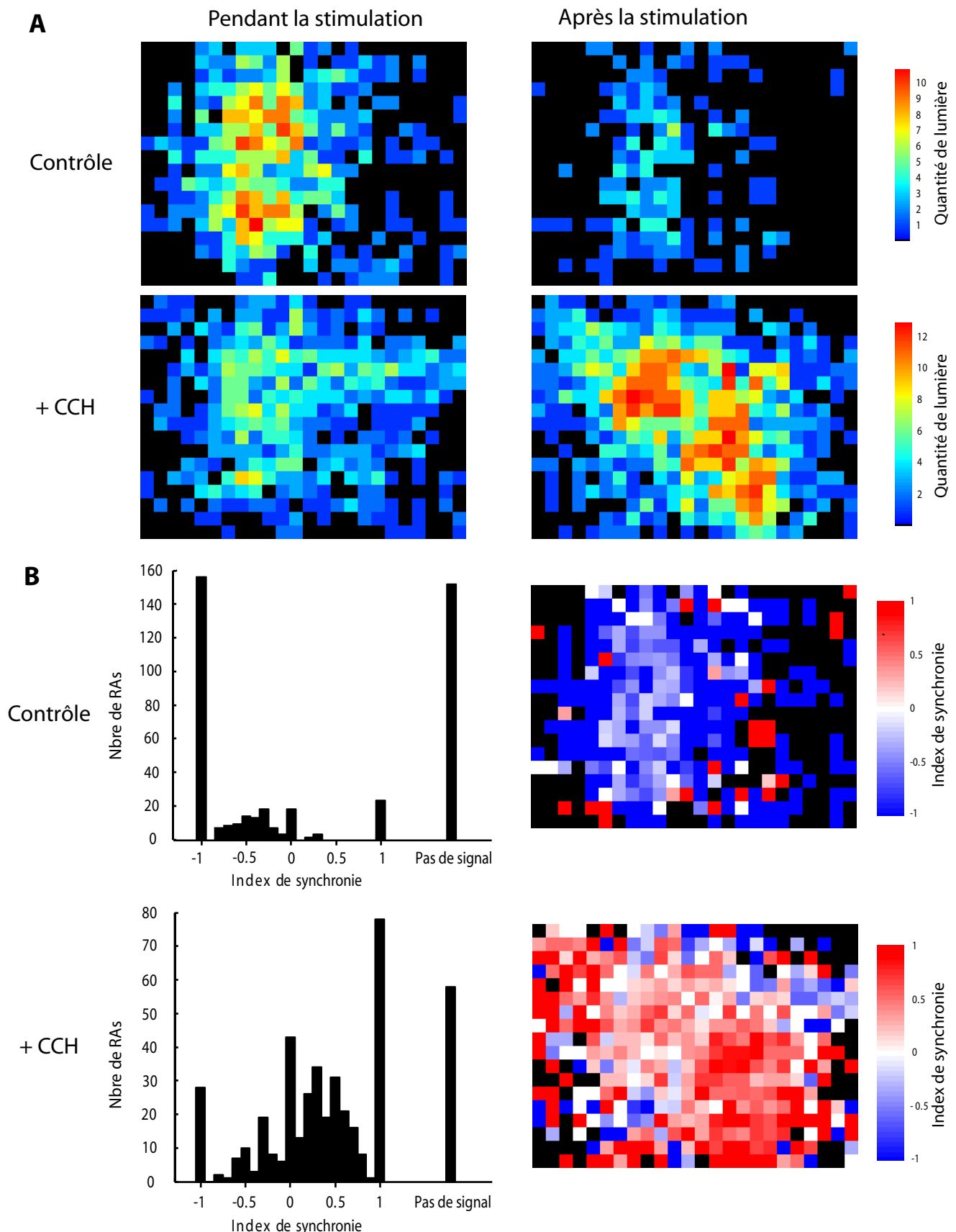
L'analyse de la première phase des réponses aux stimulations électriques révèle que l'augmentation d'amplitude des réponses en présence de CCH est due à une modification de leur déroulement temporel (Figure 11). En effet, en condition contrôle, la réponse mesurée sur le champ total décroît très rapidement à la fin de la stimulation électrique. En revanche, en présence de CCH, la réponse lumineuse augmente au cours de la stimulation et persiste après l'arrêt de la stimulation (Figure 11). Cette modification par le CCH du profil temporel de la réponse a été observée aussi bien avec des stimulations CI que SB. Elle apparaît également dans les réponses mesurées au niveau des RAs (Figure 12A). En effet, en condition contrôle, l'intensité lumineuse dans la majorité des RAs est plus élevée pendant la stimulation qu'après. Par contre, en présence de CCH, l'intensité des RAs est plus importante après la stimulation que pendant. Cette analyse révèle en outre que le CCH augmente l'extension spatiale de la réponse.

Afin de quantifier le déroulement spatiotemporel de la réponse et sa modification par le CCH, j'ai utilisé un index de synchronie (IS) qui permet de comparer, au niveau de chaque RA, l'activité pendant les 500 ms de la stimulation électrique et pendant les 500 ms suivantes. Le calcul de l'IS est basé sur la quantité de lumière émise dans chaque RA pendant et après la stimulation (voir méthodes). Lorsque cet index est égal à +1, cela signifie que la réponse à la stimulation s'est produite uniquement après la fin de la stimulation. A l'inverse, lorsque l'IS vaut -1, la réponse est uniquement observée pendant la stimulation. Les valeurs intermédiaires entre -1 et +1 reflètent une activité de la RA pendant et après la stimulation, les valeurs négatives indiquant une activité plus élevée pendant la stimulation et les valeurs positives indiquant une activité plus élevée après la stimulation. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la figure 12B. En condition contrôle, environ un tiers des RAs sont actives uniquement pendant la stimulation (IS= -1). Un tiers des RAs ne présente pas de signal en réponse à la stimulation.



**Figure 11. Effet du carbachol sur le profil temporel de la réponse à une stimulation électrique**

Réponses de bioluminescence (temps d'intégration : 40 ms) à trois stimulations électriques (constituées chacune de 5 pulses ; traits noirs sous les traces), dans la couche I (CI) et en substance blanche (SB), en condition contrôle (gauche) et en présence de carbachol.



**Figure 12. Extension spatiale des réponses immédiatement après la stimulation**

**A.** Distribution de l'intensité de bioluminescence dans les RAs pendant les 500 ms de la stimulation dans la substance blanche (à gauche) et durant les 500 ms suivantes (à droite) en condition contrôle (en haut) et en présence de CCH. Les échelles des couleurs sont normalisées à l'intensité maximale dans chaque condition (contrôle ou CCH).

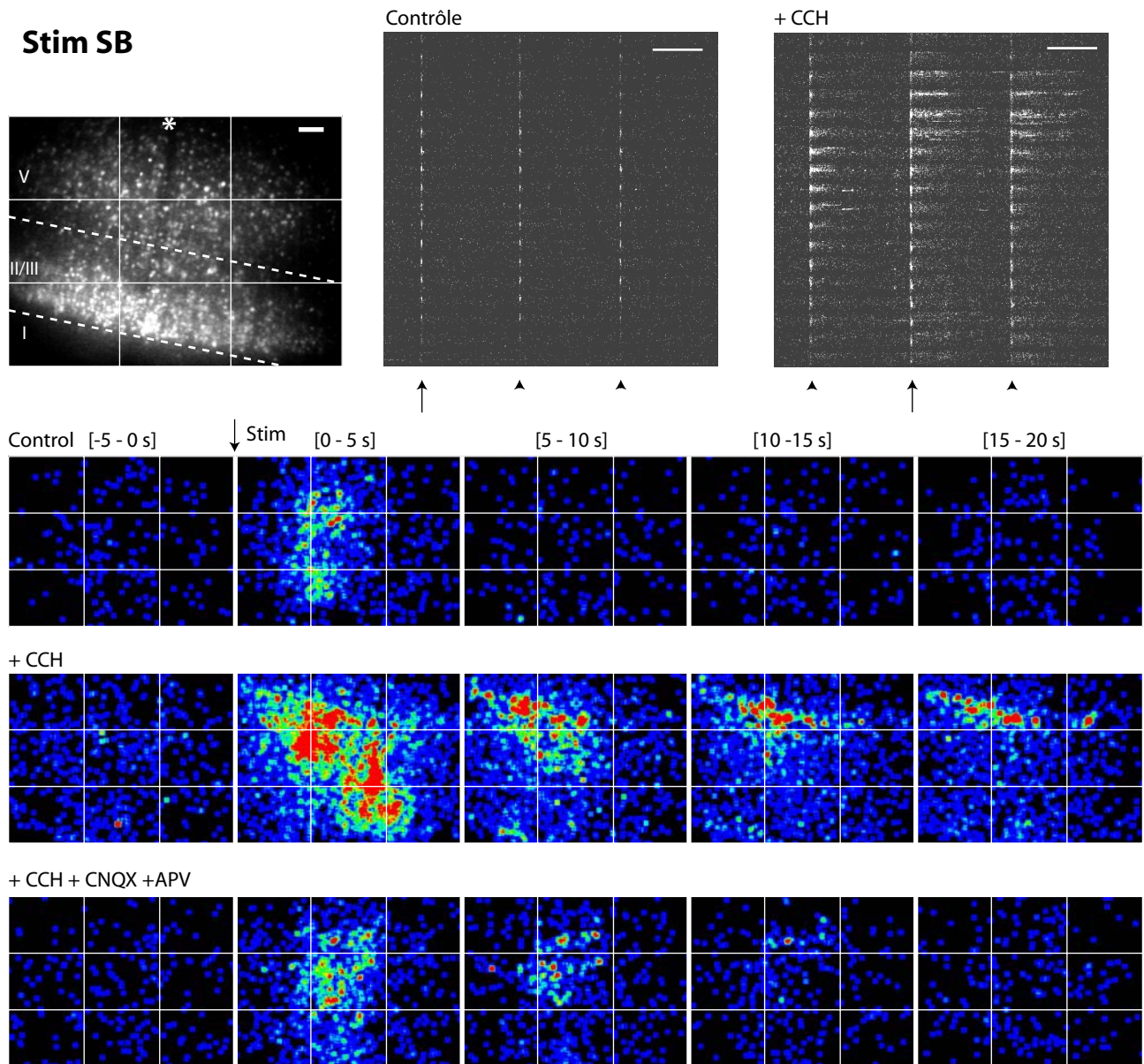
**B.** Histogramme distribution spatiale de ces index de synchronie (IS) calculés à partir de la même expérience qu'en A.

Le dernier tiers des RAs présente des valeurs d'IS comprises entre -1 et +1 dont la majorité correspond à une activité plus élevée pendant la stimulation ( $-1 \leq IS \leq 0$ ). En présence de CCH, la catégorie de RAs qui présente le plus grand effectif est celle dont la réponse se produit majoritairement après la stimulation ( $0 \leq IS \leq +1$ ). Le nombre de RAs dont l'activité est plus élevée pendant la stimulation ( $-1 \leq IS \leq 0$ ) est très inférieur à celui obtenu en condition contrôle. Il en est de même du nombre de RAs ne répondant pas à la stimulation. Ainsi, en présence de CCH, la réponse à la stimulation électrique se produit d'abord à la verticale de l'électrode de stimulation et se propage ensuite vers des secteurs qui étaient peu ou pas actifs lors de la stimulation.

L'augmentation d'amplitude des réponses en présence de CCH résulte donc d'une augmentation de leur durée et de leur extension spatiale. Cette extension spatiale étant postérieure à la stimulation, elle semble donc impliquer l'intervention du réseau exciteur intracortical.

#### ACTIVITES PERSISTANTES EN COUCHE V

J'ai également analysé les phases plus tardives des réponses en présence de CCH, qui persistent quelques dizaines de secondes après la stimulation électrique. L'examen de la distribution spatiale des activités évoquées par une stimulation SB montre que des régions, essentiellement situées dans la couche V, restent actives durant plus de 15 s après la stimulation électrique (Figure 13). En présence de CNQX-APV, le nombre de régions montrant une activité post-stimulation est faible et leur réponse diminue rapidement dans les 5 s suivant la stimulation, ce qui est compatible avec les durées mesurées sur la réponse du champ total (voir figure 10). Ceci suggère que le réseau exciteur intracortical est nécessaire à la persistance de l'activité en couche V. Des résultats similaires ont été observés avec les stimulations CI montrant que les activités persistantes étaient essentiellement localisées dans la couche V (Figure 14).

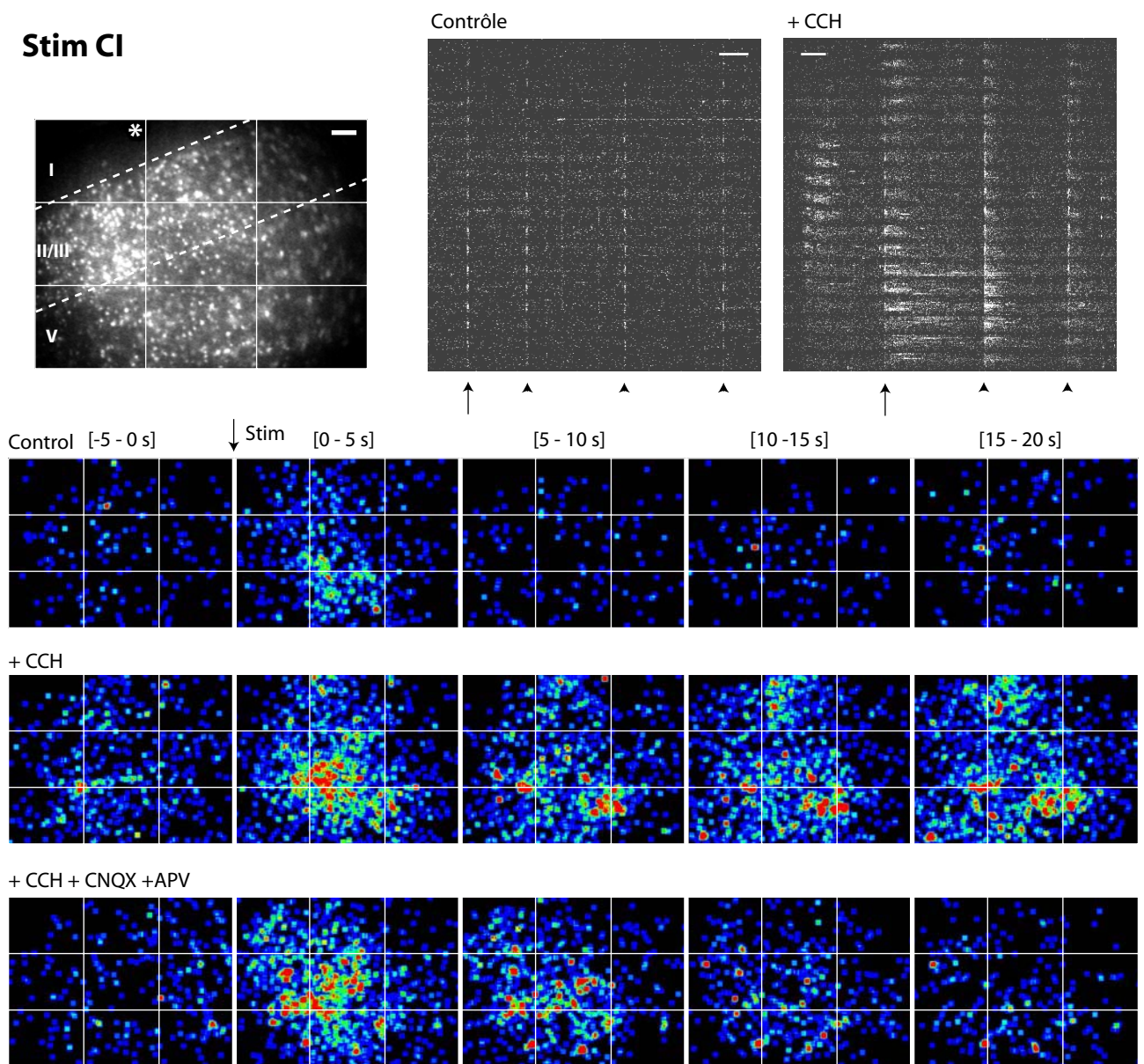


**Figure 13. Répartition spatiotemporelle des réponses aux stimulations électriques dans la substance blanche.**

En haut, image en fluorescence GFP de la tranche de néocortex exprimant GA (gauche) et répartition de l'intensité de bioluminescence dans les RAs au cours du temps. L'instant des stimulations électriques est indiqué sous les images (flèches et pointes de flèche), les flèches indiquent les stimulations dont la distribution spatiale est montrée dans la partie inférieure de la figure. Echelle : 30 s.

En bas, carte de densité de bioluminescence en réponse à une stimulation électrique en condition contrôle, en présence de carbachol (20  $\mu$ M), et en présence de carbachol + CNQX + APV. Chaque image représente le signal lumineux intégré sur 5 s. Chaque ligne correspond à une séquence continue. L'intensité est codée en fausses couleurs avec par ordre croissant : noir, bleu, vert, jaune, rouge. Toutes les images sont à la même échelle de couleurs. Une grille blanche a été superposée sur les images afin de mieux repérer les coordonnées spatiales des activités.

Astérisque : position de l'électrode de stimulation



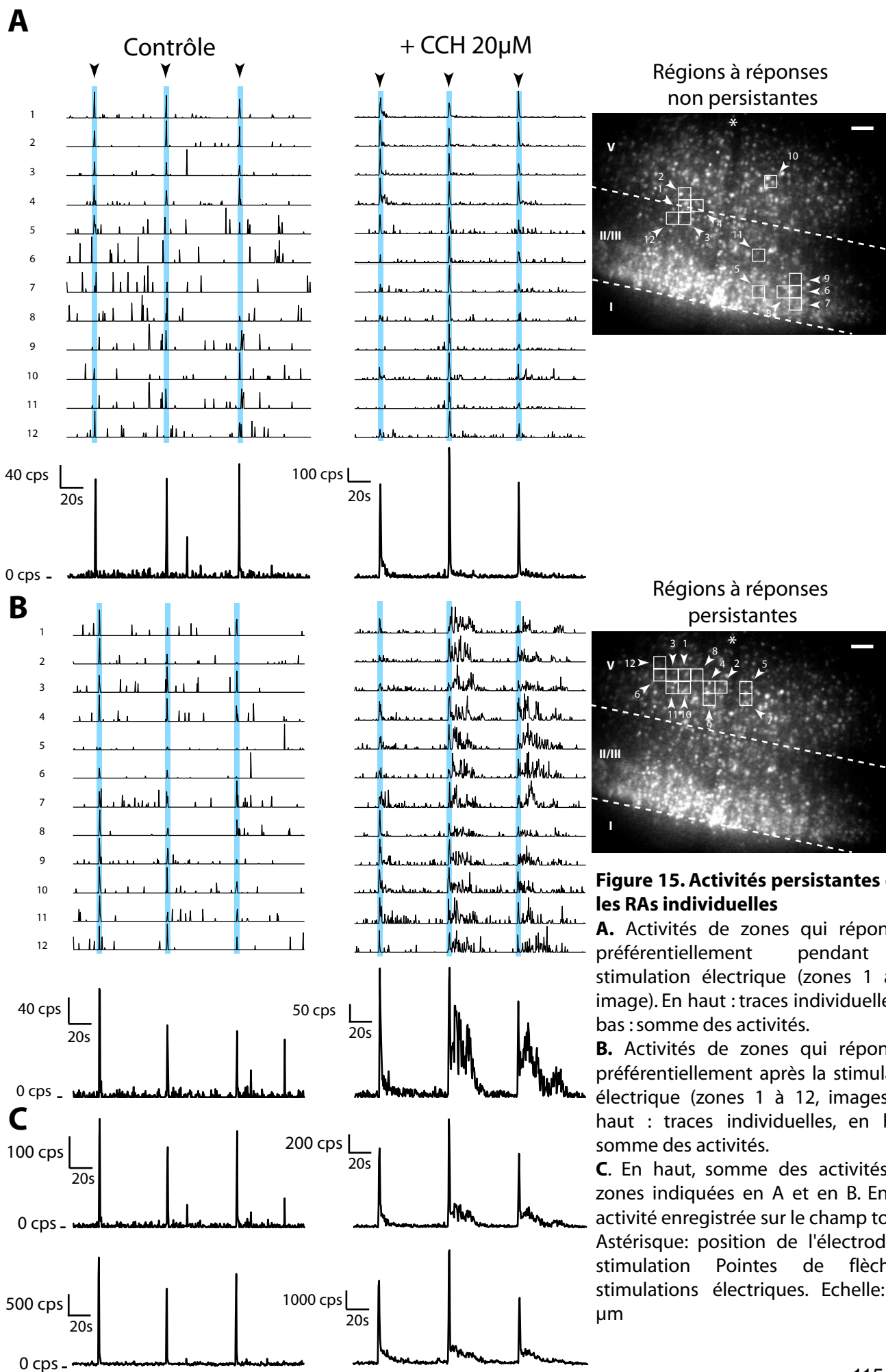
**Figure 14. Répartition spatiotemporelle des réponses aux stimulations électriques dans la couche I**  
Même légende que figure 13



Il apparaît clairement que la réponse globale en présence de CCH résulte de la sommation des activités de RAs présentant des décours temporels très différents. J'ai effectué une analyse statistique sur l'ensemble des RAs lors d'une stimulation afin d'identifier de manière non-supervisée les comportements individuels qui sous-tendent la réponse globale. J'ai utilisé une analyse en composante principale (ACP) à partir de paramètres décrivant le décours temporel de leur réponse. Ces paramètres rendent compte du signal avant, pendant et après la stimulation. Ils incluent également l'intensité maximale durant la réponse à la stimulation (voir méthodes). Cette ACP a été réalisée sur la réponse à la deuxième stimulation en présence de CCH montrée en figure 15. Les résultats de l'ACP (non illustré) indiquent que le paramètre associé au signal avant la stimulation n'était pas discriminant, ce qui indique que l'activité avant la stimulation n'influe pas sur le type de réponse à la stimulation. D'autre part, les paramètres associés à l'activité post-stimulation (corrélés entre eux) se discriminaient des paramètres associés à l'activité pendant la stimulation et à l'intensité maximale (corrélés entre eux). Ces résultats indiquent que l'activité persistante tend à être continue durant la période post-stimulation. Ces résultats indiquent également que les RAs présentant une forte réponse durant la stimulation présentent peu d'activité persistante, comme illustré en figure 15A. Ils indiquent enfin qu'en général, les RAs présentant une réponse persistante répondent peu durant la stimulation, comme illustré en figure 15B. On note que les RAs présentant une activité persistante marquée sont localisées en couche V. Ces résultats montrent qu'il est possible de discriminer deux types de réponse des RAs, et donc des neurones qui les composent, sur la base de leur activité de bioluminescence. La figure 15C montre que la sommation des activités de ces quelques RAs présentant deux types de réponse très différentes reflète l'activité enregistrée sur le champ total.

#### CORRESPONDANCE AVEC L'ACTIVITE ELECTROPHYSIOLOGIQUE

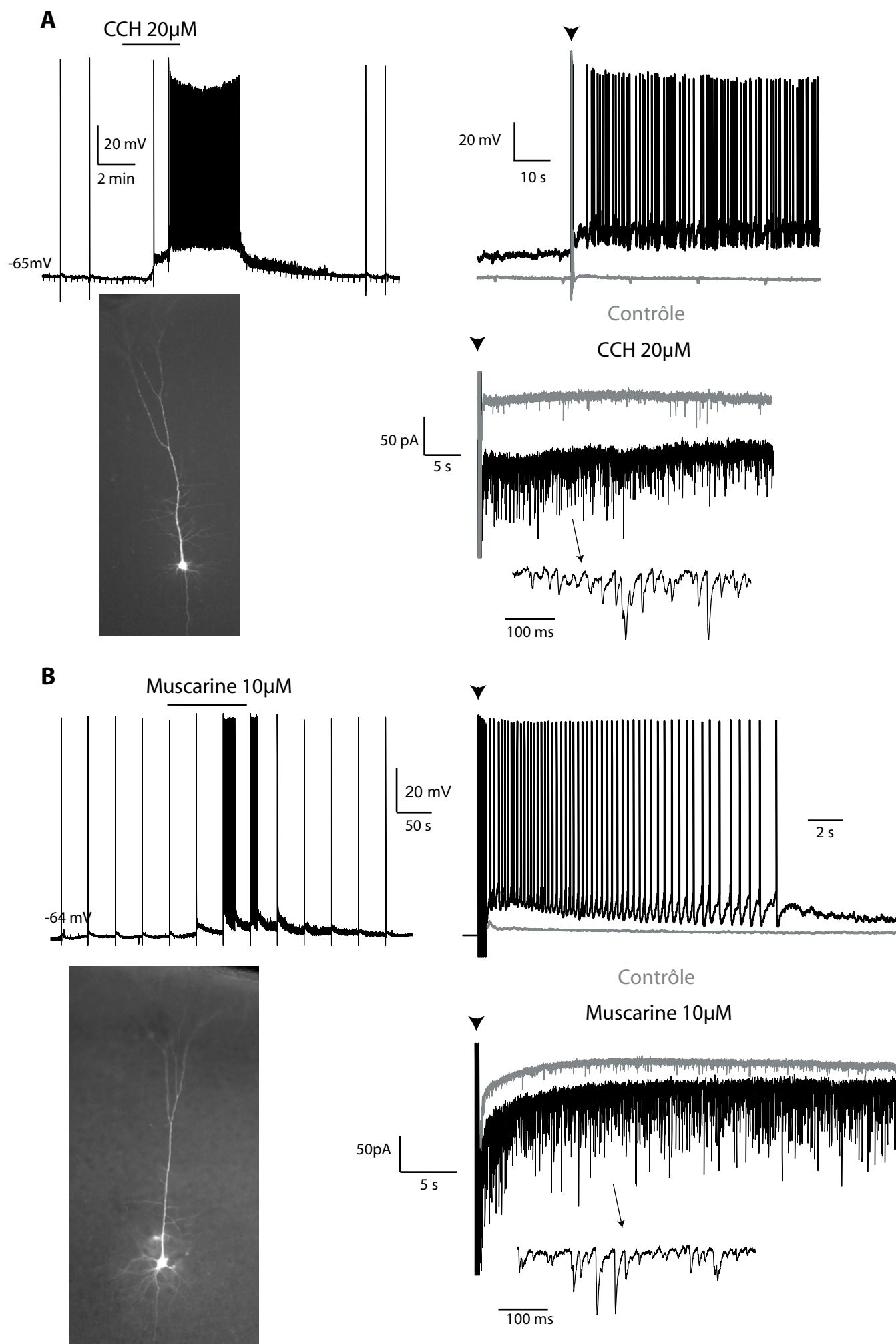
Afin d'étudier les activités électrophysiologiques qui sous-tendent la réponse persistante en présence de CCH, j'ai examiné en patch-clamp la réponse de cellules pyramidales de la couche V à des stimulations CI (n=10). Ces expériences ont été réalisées sur des tranches non infectées par SIN-GA. En condition contrôle, les cellules pyramidales répondent à la stimulation par une bouffée de potentiels d'action qui se termine à la fin de la stimulation (figure 16). L'application de CCH (20  $\mu$ M ; n= 7) provoque une dépolarisation lente des cellules. En présence de CCH, la bouffée de potentiel d'action est suivie par un plateau dépolarisant (afterdischarge depolarizing potential, ADP) qui dure une dizaine de secondes.





Dans 4 cellules sur les 7 testées, cet ADP était suffisant pour déclencher une décharge de potentiels d'action de plusieurs dizaines de secondes (voir exemple en figure 16). En présence de CCH, la stimulation induit un bombardement de potentiels postsynaptiques excitateurs qui persistent longtemps après la stimulation électrique. Les enregistrements en potentiel imposé à -80 mV (potentiel d'inversion des courants GABA<sub>A</sub> dans nos conditions expérimentales) confirment la nature excitatrice de ces événements postsynaptiques qui perdurent après la stimulation en présence de CCH et dont la fréquence est beaucoup plus élevée qu'en condition contrôle. L'ensemble des effets du CCH est reproduit par la muscarine (10  $\mu$ M ; n= 3) comme le montre la figure 16B. Ces résultats sont en accord avec les expériences montrant que les agonistes muscariniques entraînent une activation persistante des cellules pyramidales. Cette activité persistante serait sous tendue par un ADP résultant de l'ouverture de conductances cationiques en réponse à une stimulation supraliminaire (Egorov et coll, 2002). De plus, ces résultats montrent que l'excitation glutamatergique récurrente pourrait également contribuer à l'entretien de l'activité persistante. Ceci est en accord avec les études montrant que le réseau cortical est capable de produire des activités persistantes via des connexions réciproques entre cellules pyramidales (McCormick et coll, 2003).

En résumé de cette partie, les agonistes muscariniques augmentent l'extension spatiale et la durée des réponses aux stimulations électriques. La seconde phase de ces réponses est liée à l'apparition de foyers d'activité persistante essentiellement localisés dans la couche V. Les résultats indiquent que ces effets observés en imagerie pourraient être sous-tendus par un ADP, qui constitue une propriété intrinsèque des neurones, mais aussi par l'activité prolongée du réseau excitateur.



**Figure 16. Effet des agonistes cholinergiques sur les réponses électrophysiologiques** (voir légende page suivante)

---

**Figure 16. Effet des agonistes cholinergiques sur les réponses électrophysiologiques**

**A.** En haut à gauche, enregistrement en courant imposé d'une cellule pyramidale de la couche V. L'application de carbachol induit une dépolarisation. La cellule décharge de manière prolongée lors de la deuxième stimulation en présence de carbachol. On note que les stimulations s'accompagnent d'un bombardement prolongé de potentiels postsynaptiques excitateurs. La trace en haut à droite montre la superposition de la réponse à la deuxième stimulation en présence de carbachol à une réponse en condition contrôle de la même cellule. En présence de carbachol, la stimulation électrique est suivie d'un ADP qui provoque une décharge de potentiels d'action. L'ADP n'est pas présente en condition contrôle.

En bas à droite, enregistrement en potentiel imposé ( $V = -80$  mV) de la même cellule de la réponse de la même cellule à une stimulation électrique. En présence de carbachol, la fréquence des événements postsynaptiques excitateurs (voir agrandissement) est plus élevée qu'en condition contrôle. En bas à gauche, morphologie de la cellule enregistrée après la révélation du marquage à la biocytine.

**B** Effet de la muscarine. Même légende qu'en A.

## 4. DISCUSSION

---

Jusqu'à présent, GA a été utilisée en lignée cellulaire ou en culture de neurones (Baubet et coll., 2000 ; Rodgers et coll., 2005). Dans cette étude, j'ai montré tout d'abord que l'expression de GA en tranche de néocortex permet d'étudier les activités de neurones individuels et d'ensembles de neurones par imagerie de bioluminescence. Cette technique m'a permis de montrer que les agonistes muscariniques augmentent l'extension spatiale et la durée des réponses du réseau néocortical à des stimulations électriques.

### IMAGERIE DE BIOLUMINESCENCE AEQUORINE

La bioluminescence aequorine a été utilisée dans ce travail afin de détecter les activités neuronales et non d'étudier la signalisation calcique intracellulaire. Pour ce type d'étude, elle présente l'avantage d'être codée génétiquement et donc de pouvoir être exprimée spécifiquement dans les neurones. Elle permet donc en principe de visualiser l'activité de types neuronaux spécifiques de manière non invasive. Afin d'évaluer les capacités de la bioluminescence aequorine à réaliser une imagerie semi-quantitative des activités d'ensembles neuronaux, nous avons utilisé le virus Sindbis qui permet une expression forte et rapide des transgènes. Nous avons ainsi pu travailler sur tranche de néocortex en survie (nos résultats ont été obtenus environ 20 heures après dissection du cerveau). Le patron d'expression de GA nous a permis d'enregistrer essentiellement l'activité des cellules pyramidales qui sont les principaux neurones de sortie du réseau néocortical et reflètent donc ses propriétés d'intégration. Nos résultats suggèrent que l'expression de GA laisse relativement intactes les propriétés cytoarchitecturales et fonctionnelles du réseau néocortical dans nos conditions expérimentales.

Grace à l'absence de bruit de fond et de toxicité de l'imagerie de bioluminescence, nous avons enregistré en continu les signaux sur le champ entier d'observation (la figure 9 montre des enregistrements de quasiment 1 heure). Comme je l'ai déjà souligné, le signal de bioluminescence en un point peut provenir de plusieurs neurones ou neurites présents dans l'épaisseur de la tranche ce qui limite la capacité à résoudre les signaux provenant de neurones individuels. Ce type d'imagerie présente néanmoins un avantage par rapport aux méthodes par balayage où le signal de chaque région n'est collecté que durant une fraction du temps nécessaire à l'acquisition de l'image totale. La limite de résolution temporelle de l'imagerie GA est fixée par sa cinétique d'activation ( $\tau \sim 10$  ms ; Hastings et coll., 1969), comme c'est le cas pour les autres senseurs protéiques du calcium (Pologruto et coll., 2004). Il faut noter qu'à l'inverse de ces sondes, la cinétique d'activation de l'aequorine ne dépend pas de la  $[Ca^{2+}]$  (Hastings et coll., 1969) : par comparaison, le  $\tau$  d'activation de la

sonde fluorescente GCamP varie de 200 à 3 ms entre 0.2 et 1  $\mu\text{M}$  de calcium (Nakai et coll., 2001).

Nos résultats montrent que GA ne permet pas de détecter les transitoires calciques des cellules pyramidales associés à de faibles fréquences de potentiels d'action. En effet, les cinétiques de luminescence, aussi bien pour la phase de montée (voir ci-dessus) que pour la cinétique d'émission de lumière (donnée par le  $\tau_{\text{decay}} = 1,25$  s pour  $[\text{Ca}] = 2,6 \mu\text{M}$  ; Tricoire et coll., 2006) sont probablement trop lentes pour détecter le faible signal calcique associé à un seul potentiel d'action sodique dans les neurones pyramidaux du néocortex ( $[\text{Ca}]_{\text{max}} = 250$  nM,  $\tau_{\text{decay}} < 78$  ms ; Helmchen et coll., 1996). C'est également le cas des autres sondes calciques protéiques (Pologruto et coll., 2004). De plus, dans ces cellules, la densité de canaux calciques voltage dépendants, maximale au niveau du bouquet dendritique apical, est faible au niveau du soma et des dendrites proximales (Zhu, 2000 ; Larkum et Zhu, 2002). Enfin ces canaux calciques, qui sont très sensibles à la température, sont probablement peu mis en jeu lors de nos expériences effectuées à température ambiante (McAllister-Williams et Kelly, 1995 ; Coulter et coll., 1989). Il faut noter que la sensibilité des senseurs calciques bioluminescents peut, en principe, être améliorée en utilisant d'autres photoprotéines dont les cinétiques de luminescence sont plus rapides comme l'obéline (Illarionov et coll., 2000 ; Markova et coll., 2002).

Il faut noter que la bioluminescence de GA, comme c'est le cas des autres senseurs calciques, ne permet de déterminer l'origine de l'augmentation du calcium intracellulaire. Dans notre étude, les signaux de bioluminescence peuvent avoir de multiples causes : canaux calciques voltage dépendant, récepteurs NMDA, conductances cationiques liées à l'ADP, et libération intracellulaire de calcium.

## **LES EFFETS MUSCARINIQUES SUR L'EXTENSION SPATIALE**

Nos résultats montrent que les agonistes muscariniques provoquent une augmentation de l'extension spatiale des réponses évoquées par des stimulations électriques. Ces résultats sont cohérents avec l'observation que ces agonistes augmentent la taille des aires corticales répondant à un stimulus sensoriel *in vivo* (Kilgard et Merzenich, 1998 ; Penschuck et coll., 2002). Ceci est lié à l'augmentation de l'excitabilité du réseau néocortical observée aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. En effet, l'acétylcholine et les agonistes muscariniques facilitent les réponses à des stimuli électriques et sensoriels (Sillito et Kemp, 1983 ; Sato et coll., 1987 ; Rasmusson et Dykes, 1988). De plus, les agonistes muscariniques augmentent l'excitabilité intrinsèque des cellules pyramidales *in vitro* (McCormick et Prince, 1985 ; Haj-Dahmane et Andrade, 1996, 1998 ; Klink et Alonso,

1997 ; Egorov et coll., 2002). Cette augmentation d'excitabilité intrinsèque est très certainement responsable d'une partie de l'augmentation d'amplitude des réponses observées en bioluminescence. En effet, cette augmentation d'excitabilité intrinsèque repose sur l'ADP, qui provoque un influx de calcium (Egorov et coll., 2003). De plus, cet ADP génère des potentiels d'action dont le signal calcique associé est augmenté en présence d'agonistes muscariniques (Beier et coll., 2000, Yamamoto et coll., 2000). Le déroulement temporel de l'ADP observé au cours de nos expériences d'électrophysiologie est compatible avec le rebond de luminescence observé immédiatement après la stimulation. Cependant, nos études de la distribution spatiale de la phase précoce des réponses montrent que ce rebond d'activité est sous-tendu par des RAs préférentiellement actives après la stimulation. Ceci suggère donc que l'augmentation d'amplitude des réponses résulte d'une propagation de l'activité postérieure à la stimulation, qui impliquerait l'intervention du réseau excitateur intracortical. Nos résultats d'électrophysiologie montrent en effet que la transmission excitatrice intracorticale est très largement augmentée par les stimulations électriques en présence de CCH. Il semble donc que l'augmentation d'extension spatiale des réponses évoquées résulte d'une boucle d'amplification impliquant à la fois l'augmentation d'excitabilité intrinsèque des neurones pyramidaux et la transmission synaptique excitatrice.

Nos résultats, qui présentent une bonne correspondance entre les données d'électrophysiologie et de bioluminescence, sont donc en accord avec la majorité de ceux obtenus par d'autres auteurs. Nos résultats sont cependant en contradiction avec une étude réalisée en imagerie de sonde fluorescente voltage sensible sur des tranches de néocortex, qui décrit une réduction de l'extension spatiale de l'excitation produite par une stimulation électrique (Kimura et coll., 1999). Il faut noter que dans cette étude, l'acétylcholine a été utilisée à une concentration de 10 mM (environ 1000 fois supérieure à nos concentrations d'agonistes), et est donc susceptible d'induire d'autres effets sur le réseau qui seront discutés plus loin. D'autre part, les sondes utilisées sont présentes à la fois dans les neurones et dans les cellules gliales. L'acétylcholine produit une hyperpolarisation des cellules gliales aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Hösli et coll., 1988 ; Hösli et Hösli, 1993 ; Seigneur et coll., 2006). Il est donc possible que l'hyperpolarisation des cellules gliales masque la dépolarisation des neurones pyramidaux qui est attestée par l'ensemble des travaux cités ci-dessus.

## **LES EFFETS MUSCARINIQUES SUR LA DUREE**

Les réponses du réseau néocortical aux stimulations électriques en présence de CCH sont biphasiques et présentent une phase tardive qui persiste quelques dizaines de

secondes après la stimulation. Cette phase tardive est sous-tendue par des activités essentiellement localisées en couche V, aussi bien pour les stimulations CI que SB. L'allongement des réponses en présence de CCH est corrélé avec l'apparition de l'ADP dans les cellules pyramidales, qui dure également quelques dizaines de secondes dans nos conditions expérimentales. Les cellules pyramidales de la couche V présentent un ADP beaucoup plus marqué et prolongé que celles des couches II/III (Klink et Alonso, 1997 ; Egorov et coll., 2002 ; Magistretti et coll., 2004). Ceci permet d'expliquer que l'activité persistante de longue durée soit principalement localisée en couche V. Les antagonistes glutamatergiques, qui affectent peu la durée de la première phase des réponses en présence de CCH, suppriment la phase tardive. Ceci suggère que la phase tardive, comme la première phase, implique à la fois l'augmentation d'excitabilité intrinsèque des neurones pyramidaux et l'activité des circuits excitateurs récurrents observées par électrophysiologie. L'ADP des cellules pyramidales est insensible aux antagonistes glutamatergiques (Egorov et coll., 2002). Cependant, cet ADP dépend de l'intensité de la stimulation (Egorov et coll., 2002) qui est réduite en présence d'antagonistes glutamatergiques dans nos conditions expérimentales. Pour mettre en évidence l'éventuelle intervention du réseau exciteur dans l'activité persistante, nous effectuerons une analyse similaire à celle réalisée avec les index de synchronie (IS) en comparant cette fois-ci l'activité immédiatement après la stimulation avec l'activité persistante afin de déterminer si l'activité se déplace au cours du temps.

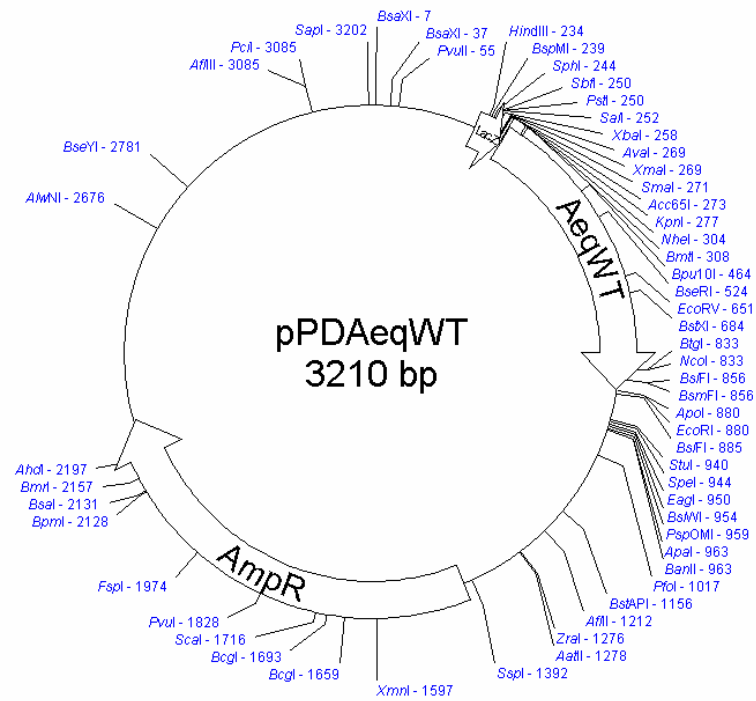
Nos analyses indiquent que les RAs qui répondent fortement durant la phase de stimulation présentent peu d'activité durant les phases suivant de la réponse. Il est peu probable que cette extinction soit liée à des mécanismes intrinsèques limitant la durée de l'ADP dans les cellules pyramidales. En effet, celle-ci augmente jusqu'à de fortes intensités de stimulation (0.8 nA par injection intracellulaire, Egorov et coll., 2002). Ceci suggère que l'extinction des RAs les plus actives résulte de l'activation des interneurones inhibiteurs, soit par stimulation directe, soit par l'intermédiaire des cellules pyramidales. En effet, les connections pyramide-interneurone sont souvent réciproques et très puissantes, et leur probabilité décroît rapidement avec la distance (Gupta et coll., 2000 ; Reyes et coll., 1998 ; Holmgren et coll., 2003). De plus, les interneurones dont l'arborisation axonale présente la plus grande extension latérale (FS et CCK) sont peu ou pas sensibles aux agonistes cholinergiques et sont probablement moins recrutés que les neurones pyramidaux ou les interneurones SOM qui projettent verticalement (Kawaguchi et Kubota, 1997 ; Wang et coll., 2004). La mise en jeu des interneurones est donc propre à éteindre localement l'excitation des zones les plus actives.

## L'ACÉTYLCHOLINE A-T-ELLE UN EFFET BIPHASIQUE INHIBITEUR/EXCITATEUR SUR RESEAU CORTICAL ?

Nos résultats ont été obtenus en présence continue d'agonistes cholinergiques appliqués dans le bain de perfusion. Ils montrent qu'à cette échelle de temps, l'acétylcholine augmente l'extension spatiale et la durée des réponses du réseau néocortical aux stimulations électriques. Ces effets, qui passent par l'activation tonique des récepteurs muscariniques mettent principalement en jeu deux éléments du réseau, les neurones pyramidaux (augmentation de l'ADP et de la transmission excitatrice) et les interneurones SOM (Kawaguchi, 1997). Ces résultats mettent en évidence une augmentation de l'excitabilité du réseau néocortical par les agonistes cholinergiques. Ce protocole expérimental ne reflète pas la situation physiologique où l'acétylcholine est présente de manière transitoire avec des pics de concentration plus élevée que celle que nous avons utilisée pour nos agonistes. Il est possible que dans ces conditions, l'acétylcholine ait d'abord un effet inhibiteur à court terme sur le réseau, suivi de l'effet excitateur que nous avons observé. Cet effet inhibiteur serait dû à la mise en jeu des interneurones sensibles aux agonistes nicotiniques et à l'existence d'une inhibition muscarinique à court terme des cellules pyramidales. Du fait de la désensibilisation des récepteurs nicotiniques, l'application rapide d'acétylcholine produit une activation phasique beaucoup plus importante de ces interneurones que l'application en bain d'agonistes (Porter et coll., 1999 ; Christophe et coll., 2002). D'autre part, l'acétylcholine produit, via l'activation des récepteurs muscariniques, une brève hyperpolarisation des neurones pyramidaux suivie d'une dépolarisation prolongée (McCormick et Prince, 1985 ; Gullledge et Stuart, 2005). Cette hyperpolarisation est suffisante pour interrompre la décharge de ces neurones (Gullledge et Stuart, 2005). Un effet biphasique de l'acétylcholine permettrait de réconcilier deux observations contradictoires. En effet, ce neurotransmetteur augmente l'excitabilité du réseau néocortical, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant son effet physiologique, lié aux mécanismes d'attention, est d'augmenter la sélectivité des réponses aux stimuli sensoriels. Un effet inhibiteur à court terme pourrait permettre de limiter spatialement l'aire de réponse à un stimulus et la seconde phase permettrait de maintenir l'excitabilité de la zone stimulée.







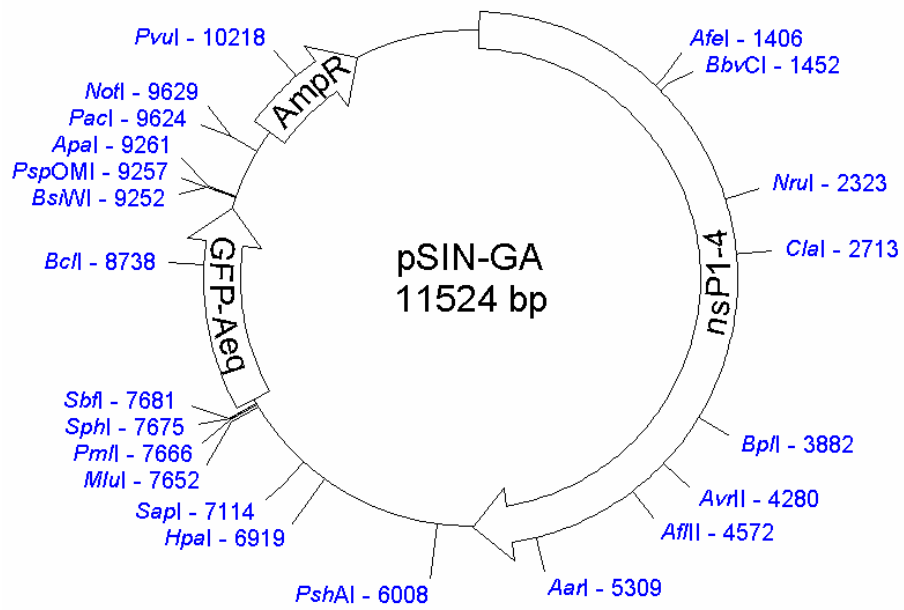
Carte de restriction du plasmide pPD AeqWT pour l'expression dans *E. coli*. Seuls sont indiqués les sites uniques. AmpR : gène de résistance à l'ampicilline.

## Séquence nucléique et peptidiques de la GFP-aequorine

		M	V	S	K	G	E	E	L	F	T	G	V	V	P	I	L	16
GGTACC	ATG	GTG	AGC	AAG	GGC	GAG	GAG	CTG	TTC	ACC	GGG	GTG	GTG	CCC	ATC	CTG	55	
V	E	L	D	G	D	V	N	G	H	K	F	S	V	S	G	E	G	34
GTC	GAG	CTG	GAC	GGC	GAC	GTA	AAC	GGC	CAC	AAG	TTC	AGC	GTG	TCC	GGC	GAG	GGC	109
E	G	D	A	T	Y	G	K	L	T	L	K	F	I	C	T	T	G	52
GAG	GGC	GAT	GCC	ACC	TAC	GGC	AAG	CTG	ACC	CTG	AAG	TTC	ATC	TGC	ACC	ACC	GGC	163
K	L	P	V	P	W	P	T	L	V	T	T	L	T	Y	G	V	Q	70
AAG	CTG	CCC	GTG	CCC	TGG	CCC	ACC	CTC	GTG	ACC	ACC	CTG	ACC	TAC	GGC	GTG	CAG	21
C	F	S	R	Y	P	D	H	M	K	Q	H	D	F	F	K	S	A	88
TGC	TTC	AGC	CGC	TAC	CCC	GAC	CAC	ATG	AAG	CAG	CAC	GAC	TTC	TTC	AAG	TCC	GCC	271
M	P	E	G	Y	V	Q	E	R	T	I	F	F	K	D	D	G	N	106
ATG	CCC	GAA	GGC	TAC	GTC	CAG	GAG	CGC	ACC	ATC	TTC	TTC	AAG	GAC	GAC	GGC	AAC	325
Y	K	T	R	A	E	V	K	F	E	G	D	T	L	V	N	R	I	124
TAC	AAG	ACC	CGC	GCC	GAG	GTG	AAG	TTC	GAG	GGC	GAC	ACC	CTG	GTG	AAC	CGC	ATC	379
E	L	K	G	I	D	F	K	E	D	G	N	I	L	G	H	K	L	142
GAG	CTG	AAG	GGC	ATC	GAC	TTC	AAG	GAG	GAC	GGC	AAC	ATC	CTG	GGG	CAC	AAG	CTG	433
E	Y	D	Y	N	S	H	N	V	Y	I	M	A	D	K	Q	K	N	160
GAG	TAC	GAC	TAC	AAC	AGC	CAC	AAC	GTC	TAT	ATC	ATG	GCC	GAC	AAG	CAG	AAG	AAC	487
G	I	K	A	N	F	K	T	R	H	N	I	E	D	G	G	V	Q	178
GGC	ATC	AAG	GCG	AAC	TTC	AAG	ACC	CGC	CAC	AAC	ATC	GAG	GAC	GGC	GGC	GTG	CAG	541
L	A	D	H	Y	Q	Q	N	T	P	I	G	D	G	P	V	L	L	196
CTC	GCC	GAC	CAC	TAC	CAG	CAG	AAC	ACC	CCC	ATC	GGC	GAC	GGC	CCC	GTG	CTG	CTG	595
P	D	N	H	Y	L	S	T	Q	S	A	L	S	K	D	P	N	E	214
CCC	GAC	AAC	CAC	TAC	CTG	AGC	ACC	CAG	TCC	GCC	CTG	AGC	AAA	GAC	CCC	AAC	GAG	649
K	R	D	H	M	V	L	L	E	F	V	T	A	A	G	I	T	L	232
AAG	CGC	GAT	CAC	ATG	GTC	CTG	CTG	GAG	TTC	GTG	ACC	GCC	GCC	GGG	ATC	ACT	CTC	703
G	M	D	E	L	Y	K	L	E	S	G	G	S	G	S	G	G	Q	250
GGC	ATG	GAC	GAG	CTG	TAC	AAG	CTC	GAG	TCC	GGC	GGG	AGC	GGC	TCC	GGC	GGC	CAG	757
S	G	G	S	G	S	G	G	Q	S	G	G	S	G	S	G	G	Q	268
TCC	GGC	GGG	AGC	GGA	TCC	GGC	GGC	CAG	TCC	GGG	GGA	TCT	GGC	AGC	GGA	GGA	CAG	811
S	G	G	S	G	S	G	G	Q	S	G	G	S	G	S	G	G	Q	286
TCC	GGG	GGA	TCT	GGC	AGC	GGC	GGC	CAG	AGC	GGC	GGA	TCT	GGC	AGC	GGC	GGC	CAG	865
S	G	E	L	L	Y	D	V	P	D	Y	A	S	L	K	L	T	S	304
AGC	GGC	GAG	CTC	CTG	TAC	GAC	GTG	CCC	GAC	TAC	GCC	AGC	CTG	AAG	CTG	ACC	AGC	919
D	F	D	N	P	R	W	I	G	R	H	K	H	M	F	N	F	L	322
GAC	TTC	GAC	AAC	CCC	CGC	TGG	ATC	GGC	CGC	CAC	AAG	CAC	ATG	TTC	AAC	TTC	CTG	973
D	V	N	H	N	G	K	I	S	L	D	E	M	V	Y	K	A	S	340
GAC	GTG	AAC	CAC	AAC	GGC	AAG	ATC	AGC	CTG	GAC	GAG	ATG	GTG	TAC	AAG	GCC	AGC	1027
D	I	V	I	N	N	L	G	A	T	P	E	Q	A	K	R	H	K	358
GAC	ATC	GTG	ATC	AAC	AAC	CTG	GGC	GCC	ACC	CCC	GAG	CAG	GCC	AAG	CGC	CAC	AAG	1081
D	A	V	E	A	F	F	G	G	A	G	M	K	Y	G	V	E	T	376
GAC	GCC	GTG	GAG	GCC	TTC	TTC	GGC	GGC	GCC	GGC	ATG	AAG	TAC	GGC	GTG	GAG	ACC	1135
D	W	P	A	Y	I	E	G	W	K	K	L	A	T	D	E	L	E	394
GAC	TGG	CCC	GCC	TAC	ATC	GAG	GGC	TGG	AAG	AAG	CTG	GCC	ACC	GAC	GAG	CTG	GAG	1189

K	Y	A	K	N	E	P	T	L	I	R	I	W	G	D	A	L	F	412
AAG	TAC	GCC	AAG	AAC	GAG	CCC	ACC	CTG	ATC	CGC	ATC	TGG	GGC	GAC	GCC	CTG	TTC	1243
D	I	V	D	K	D	Q	N	G	A	I	T	L	D	E	W	K	A	430
GAC	ATC	GTG	GAC	AAG	GAC	CAG	AAC	GGC	GCC	ATC	ACC	CTG	GAC	GAG	TGG	AAG	GCC	1297
Y	T	K	A	A	G	I	I	Q	S	S	E	D	C	E	E	T	F	448
TAC	ACC	AAG	GCC	GCC	GGC	ATC	ATC	CAG	AGC	AGC	GAG	GAC	TGC	GAG	GAG	ACC	TTC	1351
R	V	C	D	I	D	E	S	G	Q	L	D	V	D	E	M	T	R	466
CGC	GTG	TGC	GAC	ATC	GAC	GAG	AGC	GGC	CAG	CTG	GAC	GTG	GAC	GAG	ATG	ACC	CGC	1405
Q	H	L	G	F	W	Y	T	M	D	P	A	C	E	K	L	Y	G	484
CAG	CAC	CTG	GGC	TTC	TGG	TAC	ACC	ATG	GAC	CCC	GCC	TGC	GAG	AAG	CTG	TAC	GGC	1459
G	A	V	P	*														491
GGC	GCC	GTG	CCC	TGA	GAATTC	C												1481

La séquence de la GFP et de l'aequorine sont représentées respectivement en vert et en bleu. En gras sont indiqués les sites KpnI (5') et EcoRI (3'). Les codons de début et de fin de traduction sont encadrés. Le linker répété (Baubet et coll, 2000) est situé entre les sites Xho I et Sac I (soulignés).



Carte de restriction du plasmide pSINGA pour la préparation de virus Sindbis. Seuls sont indiqués les sites uniques. AmpR : gène de résistance à l'ampicilline. nsP1-4 : protéines non structurales du virus.

## REFERENCES

---

- Agmon, A., and Connors, B. W. (1992). Correlation between intrinsic firing patterns and thalamocortical synaptic responses of neurons in mouse barrel cortex. *J Neurosci* 12, 319-329.
- Ahmed, B., Anderson, J. C., Douglas, R. J., Martin, K. A., and Nelson, J. C. (1994). Polyneuronal innervation of spiny stellate neurons in cat visual cortex. *J Comp Neurol* 341, 39-49.
- Allen, D. G., and Blinks, J. R. (1978). Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle. *Nature* 273, 509-513.
- Allen, D. G., Blinks, J. R., and Prendergast, F. G. (1977). Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration--a calcium-independent component. *Science* 195, 996-998.
- Badminton, M. N., Sala-Newby, G. B., Kendall, J. M., and Campbell, A. K. (1995). Differences in stability of recombinant apoaequorin within subcellular compartments. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 950-957.
- Barrero, M. J., Montero, M., and Alvarez, J. (1997). Dynamics of  $[Ca^{2+}]$  in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study. *J Biol Chem* 272, 27694-27699.
- Baubet, V., Le Mouellic, H., Campbell, A. K., Lucas-Meunier, E., Fossier, P., and Brulet, P. (2000). Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent  $Ca^{2+}$  reporters at the single-cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7260-7265.
- Baughman, R. W., and Gilbert, C. D. (1981). Aspartate and glutamate as possible neurotransmitters in the visual cortex. *J Neurosci* 1, 427-439.
- Bayraktar, T., Staiger, J. F., Acsady, L., Cozzari, C., Freund, T. F., and Zilles, K. (1997). Co-localization of vasoactive intestinal polypeptide, gamma-aminobutyric acid and choline acetyltransferase in neocortical interneurons of the adult rat. *Brain Research* 757, 209-217.
- Bear, M. F., Connors, B. W., and Paradisio, M. A. (1997). Neurosciences à la découverte du cerveau. In, W. Wilkins, ed. (Paris, Masson), pp. 152-185.
- Beaulieu, C., and Somogyi, P. (1991). Enrichment of cholinergic synaptic terminals on GABAergic neurons and coexistence of immunoreactive GABA and choline

acetyltransferase in the same synaptic terminals in the striate cortex of the cat. *J Comp Neurol* 304, 666-680.

Beier, S. M., and Barish, M. E. (2000). Cholinergic stimulation enhances cytosolic calcium ion accumulation in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurones during short action potential trains. *J Physiol* 526 Pt 1, 129-142.

Beierlein, M., Gibson, J. R., and Connors, B. W. (2000). A network of electrically coupled interneurons drives synchronized inhibition in neocortex. *Nat Neurosci* 3, 904-910.

Bernardo, K. L., and Woolsey, T. A. (1987). Axonal trajectories between mouse somatosensory thalamus and cortex. *J Comp Neurol* 258, 542-564.

Black, D. J., Tikunova, S. B., Johnson, J. D., and Davis, J. P. (2000). Acid pairs increase the N-terminal  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of CaM by increasing the rate of  $\text{Ca}^{2+}$  association. *Biochemistry* 39, 13831-13837.

Blatow, M., Rozov, A., Katona, I., Hormuzdi, S. G., Meyer, A. H., Whittington, M. A., Caputi, A., and Monyer, H. (2003). A novel network of multipolar bursting interneurons generates theta frequency oscillations in neocortex. *Neuron* 38, 805-817.

Bonner, T. I., Buckley, N. J., Young, A. C., and Brann, M. R. (1987). Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237, 527-532.

Brini, M., Pinton, P., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1999). Targeted recombinant aequorins: tools for monitoring  $[\text{Ca}^{2+}]$  in the various compartments of a living cell. *Microsc Res Tech* 46, 380-389.

Button, D., and Brownstein, M. (1993). Aequorin-expressing mammalian cell lines used to report  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. *Cell Calcium* 14, 663-671.

Caccamo, A., Oddo, S., Billings, L. M., Green, K. N., Martinez-Coria, H., Fisher, A., and LaFerla, F. M. (2006). M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* 49, 671-682.

Campbell, A. K., and Herring, P. J. (1990). *Mar Biol* 104, 219-225.

Caulfield, M. P. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58, 319-379.

Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M. C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S., and Rossier, J. (1997). Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal

cells. *JNeurosci* 17, 3894-3906.

Cauli, B., Porter, J. T., Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., Quenet, B., and Audinat, E. (2000). Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *ProcNatlAcadSciUSA* 97, 6144-6149.

Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V. J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M. A., Bliss, T. V., Hyman, B. T., et al. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2, 271-276.

Charbonneau, H., Walsh, K. A., McCann, R. O., Prendergast, F. G., Cormier, M. J., and Vanaman, T. C. (1985). Amino acid sequence of the calcium-dependent photoprotein aequorin. *Biochemistry* 24, 6762-6771.

Chédotal, A., Cozzari, C., Faure, M. P., Hartman, B. K., and Hamel, E. (1994). Distinct choline acetyltransferase (ChAT) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) bipolar neurons project to local blood vessels in the rat cerebral cortex. *Brain Research* 646, 181-193.

Chiesa, A., Rapizzi, E., Tosello, V., Pinton, P., de Virgilio, M., Fogarty, K. E., and Rizzuto, R. (2001). Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling. *Biochem J* 355, 1-12.

Christophe, E., Roebuck, A., Staiger, J. F., Lavery, D. J., Charpak, S., and Audinat, E. (2002). Two types of nicotinic receptors mediate an excitation of neocortical layer I interneurons. *J Neurophysiol* 88, 1318-1327.

Chu, Z. G., Zhou, F. M., and Hablitz, J. J. (2000). Nicotinic acetylcholine receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex. *Brain Res* 887, 399-405.

Cobbold, P. H., and Rink, T. J. (1987). Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J* 248, 313-328.

Connors, B. W. (1984). Initiation of synchronized neuronal bursting in neocortex. *Nature* 310, 685-687.

Cormier, M. J. (1978). *Comparative biochemistry of animal systems.*, London:Academic).

Coulter, D. A., Huguenard, J. R., and Prince, D. A. (1989). Calcium currents in rat thalamocortical relay neurones: kinetic properties of the transient, low-threshold current. *J*



Physiol 414, 587-604.

Cox, C. L., Metherrate, R., and Ashe, J. H. (1994). Modulation of cellular excitability in neocortex: muscarinic receptor and second messenger-mediated actions of acetylcholine. *Synapse* 16, 123-136.

Coyle, J. T., Price, D. L., and DeLong, M. R. (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219, 1184-1190.

Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E., and Stemmer, W. P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* 14, 315-319.

Creton, R., Steele, M. E., and Jaffe, L. F. (1997). Expression of apo-aequorin during embryonic development; how much is needed for calcium imaging? *Cell Calcium* 22, 439-446.

Davies, P., and Maloney, A. J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2, 1403.

De Lima, A. D., and Singer, W. (1986). Cholinergic innervation of the cat striate cortex: a choline acetyltransferase immunocytochemical analysis. *J Comp Neurol* 250, 324-338.

DeFelipe, J. (2002). Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* 2002;136:215-38 136, 215-238.

DeFelipe, J., and Farinas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39, 563-607.

Deng, L., Vysotski, E. S., Markova, S. V., Liu, Z. J., Lee, J., Rose, J., and Wang, B. C. (2005). All three Ca<sup>2+</sup>-binding loops of photoproteins bind calcium ions: the crystal structures of calcium-loaded apo-aequorin and apo-obelin. *Protein Sci* 14, 663-675.

Dunlap, K., Takeda, K., and Brehm, P. (1987). Activation of a calcium-dependent photoprotein by chemical signalling through gap junctions. *Nature* 325, 60-62.

Dupriez, V. J., Maes, K., Le Poul, E., Burgeon, E., and Detheux, M. (2002). Aequorin-based functional assays for G-protein-coupled receptors, ion channels, and tyrosine kinase receptors. *Receptors Channels* 8, 319-330.

Dutar, P., and Nicoll, R. A. (1988). Pre- and postsynaptic GABAB receptors in the

hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1, 585-591.

Eckenstein, F., and Baughman, R. W. (1984). Two types of cholinergic innervation in cortex, one co-localized with vasoactive intestinal polypeptide. *Nature* 309, 153-155.

Eckenstein, F., and Thoenen, H. (1983). Cholinergic neurons in the rat cerebral cortex demonstrated by immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *NeurosciLett* 36, 211-215.

Eckert, R., and Reynolds, G. T. (1967). The subcellular origin of bioluminescence in *Noctiluca miliaris*. *J Gen Physiol* 50, 1429-1458.

Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B., and Takahashi, T. (1989). A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch* 414, 600-612.

Egorov, A. V., Angelova, P. R., Heinemann, U., and Muller, W. (2003).  $Ca^{2+}$ -independent muscarinic excitation of rat medial entorhinal cortex layer V neurons. *Eur J Neurosci* 18, 3343-3351.

Egorov, A. V., Hamam, B. N., Fransen, E., Hasselmo, M. E., and Alonso, A. A. (2002). Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature* 420, 173-178.

Everitt, B. J., and Robbins, T. W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *AnnuRevPsychol* 48:649-84., 649-684.

Fagan, T. F., Ohmiya, Y., Blinks, J. R., Inouye, S., and Tsuji, F. I. (1993). Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the  $Ca(2+)$ -binding photoprotein, mitrocomin. *FEBS Lett* 333, 301-305.

Feldman, M. L. (1984). Morphology of the neocortical pyramidal neuron. In *Cerebral Cortex. Cellular Components of the Cerebral Cortex*, J. Peters, ed. (New York & London, Plenum Press), pp. 123-200.

Ferezou, I., Cauli, B., Hill, E. L., Rossier, J., Hamel, E., and Lambolez, B. (2002). 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J Neurosci* 22, 7389-7397.

Flint, A. C., and Connors, B. W. (1996). Two types of network oscillations in neocortex mediated by distinct glutamate receptor subtypes and neuronal populations. *J Neurophysiol* 75, 951-957.

- Fournier, G. N., Semba, K., and Rasmusson, D. D. (2004). Modality- and region-specific acetylcholine release in the rat neocortex. *Neuroscience* 126, 257-262.
- Freund, T. F., Martin, K. A., Somogyi, P., and Whitteridge, D. (1985). Innervation of cat visual areas 17 and 18 by physiologically identified X- and Y- type thalamic afferents. II. Identification of postsynaptic targets by GABA immunocytochemistry and Golgi impregnation. *J Comp Neurol* 242, 275-291.
- Fricker, D., and Miles, R. (2001). Interneurons, spike timing, and perception. *Neuron* 32, 771-774.
- Furuta, T., Tomioka, R., Taki, K., Nakamura, K., Tamamaki, N., and Kaneko, T. (2001). In vivo transduction of central neurons using recombinant Sindbis virus: Golgi-like labeling of dendrites and axons with membrane-targeted fluorescent proteins. *J Histochem Cytochem* 49, 1497-1508.
- Gabbott, P. L., and Somogyi, P. (1986). Quantitative distribution of GABA-immunoreactive neurons in the visual cortex (area 17) of the cat. *Exp Brain Res* 61, 323-331.
- Galarreta, M., Erdelyi, F., Szabo, G., and Hestrin, S. (2004). Electrical coupling among irregular-spiking GABAergic interneurons expressing cannabinoid receptors. *J Neurosci* 24, 9770-9778.
- Galarreta, M., and Hestrin, S. (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402, 72-75.
- Galarreta, M., and Hestrin, S. (2001). Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *NatRevNeurosci* 2, 425-433.
- Gallop, T., Geoffroy, H., Rossier, J., and Lambolez, B. (2005). Cortical Sources of CRF, NKB, and CCK and Their Effects on Pyramidal Cells in the Neocortex. *Cereb Cortex*.
- Galzi, J. L., and Changeux, J. P. (1995). Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* 34, 563-582.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., and et al. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527.
- Gibson, J. R., Beierlein, M., and Connors, B. W. (1999). Two networks of electrically

coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 402, 75-79.

Gil, Z., Connors, B. W., and Amitai, Y. (1997). Differential regulation of neocortical synapses by neuromodulators and activity. *Neuron* 19, 679-686.

Gill, T. M., Sarter, M., and Givens, B. (2000). Sustained visual attention performance-associated prefrontal neuronal activity: evidence for cholinergic modulation. *J Neurosci* 20, 4745-4757.

Goldman-Rakic, P. S. (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron* 14, 477-485.

Golgi, C. (1873). Sulla struttura della sostanza grigia dell cervello. *Gazz Med Ital Lombardia* 6, 244-246.

Gorokhovatsky, A. Y., Marchenkov, V. V., Rudenko, N. V., Ivashina, T. V., Ksenzenko, V. N., Burkhardt, N., Semisotnov, G. V., Vinokurov, L. M., and Alakhov, Y. B. (2004). Fusion of *Aequorea victoria* GFP and aequorin provides their Ca(2+)-induced interaction that results in red shift of GFP absorption and efficient bioluminescence energy transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 703-711.

Gray, R., Rajan, A. S., Radcliffe, K. A., Yakehiro, M., and Dani, J. A. (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383, 713-716.

Gulledge, A. T., and Stuart, G. J. (2005). Cholinergic inhibition of neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 25, 10308-10320.

Gupta, A., Wang, Y., and Markram, H. (2000). Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287, 273-278.

Gutnick, M. J., Connors, B. W., and Prince, D. A. (1982). Mechanisms of neocortical epileptogenesis in vitro. *J Neurophysiol* 48, 1321-1335.

Haddock, S. H., Rivers, T. J., and Robison, B. H. (2001). Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11148-11151.

Haddock, S. H. D., and Case, J. F. (1994). *Nature* (London) 367, 225-226.

Haj-Dahmane, S., and Andrade, R. (1996). Muscarinic activation of a voltage-dependent cation nonselective current in rat association cortex. *J Neurosci* 16, 3848-3861.

Haj-Dahmane, S., and Andrade, R. (1998). Ionic mechanism of the slow

afterdepolarization induced by muscarinic receptor activation in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 80, 1197-1210.

Harvey, E. N. (1921). *Biol Bull* 41, 280–287.

Hasselmo, M. E. (1995). Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. *Behav Brain Res* 67, 1-27.

Hasselmo, M. E., and Barkai, E. (1995). Cholinergic modulation of activity-dependent synaptic plasticity in the piriform cortex and associative memory function in a network biophysical simulation. *J Neurosci* 15, 6592-6604.

Hasselmo, M. E., and Bower, J. M. (1993). Acetylcholine and memory. *Trends Neurosci* 16, 218-222.

Hastings, J. W., and Dunlap, J. C. (1986). Cell-free components in dinoflagellate bioluminescence. The particulate activity: scintillons; the soluble components: luciferase, luciferin, and luciferin-binding protein. *Meth Enzymol* 133, 307–323.

Hastings, J. W., and Gibson, Q. H. (1963). Intermediates in the bioluminescent oxidation of reduced flavin mononucleotide. *J Biol Chem* 238, 2537-2554.

Hastings, J. W., and Morin, J. G. (1969). Calcium-triggered light emission in *Renilla*. A unitary biochemical scheme for coelenterate bioluminescence. *Biochem Biophys Res Commun* 37, 493-498.

Head, J. F., Inouye, S., Teranishi, K., and Shimomura, O. (2000). The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature* 405, 372-376.

Hedreen, J. C., Bacon, S. J., Cork, L. C., Kitt, C. A., Crawford, G. D., Salvaterra, P. M., and Price, D. L. (1983). Immunocytochemical identification of cholinergic neurons in the monkey central nervous system using monoclonal antibodies against choline acetyltransferase. *NeurosciLett* 43, 173-177.

Hegstad, E., Langmoen, I. A., and Hablitz, J. J. (1989). Zinc and glycine do not modify low-magnesium-induced epileptiform activity in the immature neocortex in vitro. *Epilepsy Res* 3, 174-177.

Helmchen, F., Imoto, K., and Sakmann, B. (1996).  $\text{Ca}^{2+}$  buffering and action potential-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in dendrites of pyramidal neurons. *Biophys J* 70, 1069-1081.

Hersch, S. M., and White, E. L. (1981). Quantification of synapses formed with apical dendrites of Golgi-impregnated pyramidal cells: variability in thalamocortical inputs, but consistency in the ratios of asymmetrical to symmetrical synapses. *Neuroscience* 6, 1043-1051.

Herzberg, O., and James, M. N. (1985). Common structural framework of the two  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  binding loops of troponin C and other  $\text{Ca}^{2+}$  binding proteins. *Biochemistry* 24, 5298-5302.

Holmgren, C., Harkany, T., Svennenfors, B., and Zilberter, Y. (2003). Pyramidal cell communication within local networks in layer 2/3 of rat neocortex. *J Physiol* 551, 139-153.

Hornung, J. P., and Garey, L. J. (1981). The thalamic projection to cat visual cortex: ultrastructure of neurons identified by Golgi impregnation or retrograde horseradish peroxidase transport. *Neuroscience* 6, 1053-1068.

Hosli, E., and Hosli, L. (1993). Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 40, 477-506.

Hosli, L., Hosli, E., Della Briotta, G., Quadri, L., and Heuss, L. (1988). Action of acetylcholine, muscarine, nicotine and antagonists on the membrane potential of astrocytes in cultured rat brainstem and spinal cord. *Neurosci Lett* 92, 165-170.

Houser, C. R., Hendry, S. H., Jones, E. G., and Vaughn, J. E. (1983). Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory-motor cortex. *J Neurocytol* 12, 617-638.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102.

Hsieh, C. Y., Cruikshank, S. J., and Metherate, R. (2000). Differential modulation of auditory thalamocortical and intracortical synaptic transmission by cholinergic agonist. *Brain Res* 880, 51-64.

Illarionov, B. A., Bondar, V. S., Illarionova, V. A., and Vysotski, E. S. (1995). Sequence of the cDNA encoding the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima*. *Gene* 153, 273-274.

Illarionov, B. A., Frank, L. A., Illarionova, V. A., Bondar, V. S., Vysotski, E. S., and Blinks, J. R. (2000). Recombinant obelin: cloning and expression of cDNA purification, and characterization as a calcium indicator. *Methods Enzymol* 305, 223-249.

Inouye, S. (2004). Blue fluorescent protein from the calcium-sensitive photoprotein aequorin is a heat resistant enzyme, catalyzing the oxidation of coelenterazine. *FEBS Lett* 577, 105-110.

Inouye, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., Takagi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S., and Tsuji, F. I. (1985). Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3154-3158.

Inouye, S., and Tsuji, F. I. (1993). Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-activated photoprotein, clytin. *FEBS Lett* 315, 343-346.

Jensen, K. F., and Killackey, H. P. (1987). Terminal arbors of axons projecting to the somatosensory cortex of the adult rat. II. The altered morphology of thalamocortical afferents following neonatal infraorbital nerve cut. *J Neurosci* 7, 3544-3553.

Johnston, M. V., McKinney, M., and Coyle, J. T. (1981). Neocortical cholinergic innervation: a description of extrinsic and intrinsic components in the rat. *Exp Brain Res* 43, 159-172.

Kandel, E. R. (1991). *Principles of Neural Science* (Norwalk, Appleton & Lange).

Kandel, E. R., and Jessel, T. M. (1991). *Principles of Neural Science* (Norwalk, Appleton & Lange).

Kasper, E. M., Larkman, A. U., Lubke, J., and Blakemore, C. (1994). Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. I. Correlation among cell morphology, intrinsic electrophysiological properties, and axon targets. *J Comp Neurol* 339, 459-474.

Kawaguchi, Y. (1995). Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J Neurosci* 15, 2638-2655.

Kawaguchi, Y. (1997). Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J Neurophysiol* 78, 1743-1747.

Kawaguchi, Y. (2001). Distinct firing patterns of neuronal subtypes in cortical synchronized activities. *J Neurosci* 21, 7261-7272.

Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7, 476-486.

Kemple, M. D., Ray, B. D., Jarori, G. K., Rao, B. D., and Prendergast, F. G. (1984). Electron paramagnetic resonance of spin-labeled aequorin. *Biochemistry* 23, 4383-4390.

Kendall, J. M., Sala-Newby, G., Ghalaut, V., Dormer, R. L., and Campbell, A. K. (1992). Engineering the CA(2+)-activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 187, 1091-1097.

Kilgard, M. P., and Merzenich, M. M. (1998). Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity. *Science* 279, 1714-1718.

Kimura, F., and Baughman, R. W. (1997). Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *J Neurophysiol* 77, 709-716.

Kimura, F., Fukuda, M., and Tsumoto, T. (1999). Acetylcholine suppresses the spread of excitation in the visual cortex revealed by optical recording: possible differential effect depending on the source of input. *Eur J Neurosci* 11, 3597-3609.

Klink, R., and Alonso, A. (1997). Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 77, 1829-1843.

Knight, M. R., Campbell, A. K., Smith, S. M., and Trewavas, A. J. (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352, 524-526.

Knight, M. R., Campbell, A. K., Smith, S. M., and Trewavas, A. J. (1991). Recombinant aequorin as a probe for cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 282, 405-408.

Knopfel, T., Diez-Garcia, J., and Akemann, W. (2006). Optical probing of neuronal circuit dynamics: genetically encoded versus classical fluorescent sensors. *Trends Neurosci* 29, 160-166.

Kretsinger, R. H., and Nockolds, C. E. (1973). Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem* 248, 3313-3326.

Kristt, D. A., McGowan, R. A., Jr., Martin-MacKinnon, N., and Solomon, J. (1985). Basal forebrain innervation of rodent neocortex: studies using acetylcholinesterase histochemistry, Golgi and lesion strategies. *Brain Res* 337, 19-39.

Kubo, T., Fukuda, K., Mikami, A., Maeda, A., Takahashi, H., Mishina, M., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kangawa, K., and . (1986). Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 323, 411-416.

Kubota, Y., Hattori, R., and Yui, Y. (1994). Three distinct subpopulations of



GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res* 649, 159-173.

Kubota, Y., and Kawaguchi, Y. (1994). Three classes of GABAergic interneurons in neocortex and neostriatum. *JpnJPhysiol* 44 Suppl 2:S145-8., S145-S148.

Larkum, M. E., and Zhu, J. J. (2002). Signaling of layer 1 and whisker-evoked Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> action potentials in distal and terminal dendrites of rat neocortical pyramidal neurons *in vitro* and *in vivo*. *J Neurosci* 22, 6991-7005.

Lena, C., and Changeux, J. P. (1997). Pathological mutations of nicotinic receptors and nicotine-based therapies for brain disorders. *CurrOpinNeurobiol* 7, 674-682.

LeVay, S. (1973). Synaptic patterns in the visual cortex of the cat and monkey. Electron microscopy of Golgi preparations. *J Comp Neurol* 150, 53-85.

LeVay, S., and Gilbert, C. D. (1976). Laminar patterns of geniculocortical projection in the cat. *Brain Res* 113, 1-19.

Levey, A. I., Edmunds, S. M., Heilman, C. J., Desmond, T. J., and Frey, K. A. (1994). Localization of muscarinic m3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neuroscience* 63, 207-221.

Levey, A. I., Kitt, C. A., Simonds, W. F., Price, D. L., and Brann, M. R. (1991). Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *JNeurosci* 11, 3218-3226.

Levey, A. I., Wainer, B. H., Rye, D. B., Mufson, E. J., and Mesulam, M. M. (1984). Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons intrinsic to rodent cortex and distinction from acetylcholinesterase-positive neurons. *Neuroscience* 13, 341-353.

Levy, R. B., and Aoki, C. (2002). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors occur at postsynaptic densities of AMPA receptor-positive and -negative excitatory synapses in rat sensory cortex. *JNeurosci* 22, 5001-5015.

Liu, Z. J., Stepanyuk, G. A., Vysotski, E. S., Lee, J., Markova, S. V., Malikova, N. P., and Wang, B. C. (2006). Crystal structure of obelin after Ca<sup>2+</sup>-triggered bioluminescence suggests neutral coelenteramide as the primary excited state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2570-2575.

Liu, Z. J., Vysotski, E. S., Chen, C. J., Rose, J. P., Lee, J., and Wang, B. C. (2000). Structure of the Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure. *Protein Sci* 9, 2085-2093.

- Llinas, R., Blinks, J. R., and Nicholson, C. (1972). Calcium transient in presynaptic terminal of squid giant synapse: detection with aequorin. *Science* 176, 1127-1129.
- Llinas, R., and Nicholson, C. (1975). Calcium role in depolarization-secretion coupling: an aequorin study in squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 187-190.
- Llinas, R., Sugimori, M., and Silver, R. B. (1992). Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256, 677-679.
- Llinas, R., Sugimori, M., and Silver, R. B. (1995). The concept of calcium concentration microdomains in synaptic transmission. *Neuropharmacology* 34, 1443-1451.
- Lubin, M., Erisir, A., and Aoki, C. (1999). Ultrastructural immunolocalization of the alpha 7 nAChR subunit in guinea pig medial prefrontal cortex. *AnnNYAcadSci* 868:628-32., 628-632.
- Luiten, P. G., Gaykema, R. P., Traber, J., and Spencer, D. G., Jr. (1987). Cortical projection patterns of magnocellular basal nucleus subdivisions as revealed by anterogradely transported *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *Brain Res* 413, 229-250.
- Luiten, P. G., Spencer, D. G., Jr., Traber, J., and Gaykema, R. P. (1985). The pattern of cortical projections from the intermediate parts of the magnocellular nucleus basalis in the rat demonstrated by tracing with *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin. *NeurosciLett* 57, 137-142.
- Lysakowski, A., Wainer, B. H., Bruce, G., and Hersh, L. B. (1989). An atlas of the regional and laminar distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in rat cerebral cortex. *Neuroscience* 28, 291-336.
- MacDermott, A. B., Role, L. W., and Siegelbaum, S. A. (1999). Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *AnnuRevNeurosci* 22:443-85., 443-485.
- Magistretti, J., Ma, L., Shalinsky, M. H., Lin, W., Klink, R., and Alonso, A. (2004). Spike patterning by Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of a muscarinic cation current in entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 92, 1644-1657.
- Marino, M. J., Rouse, S. T., Levey, A. I., Potter, L. T., and Conn, P. J. (1998). Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11465-11470.
- Markova, S. V., Vysotski, E. S., Blinks, J. R., Burakova, L. P., Wang, B. C., and Lee,

J. (2002). Obelin from the bioluminescent marine hydroid *Obelia geniculata*: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins. *Biochemistry* 41, 2227-2236.

Markram, H., Lubke, J., Frotscher, M., Roth, A., and Sakmann, B. (1997). Physiology and anatomy of synaptic connections between thick tufted pyramidal neurones in the developing rat neocortex. *J Physiol* 500 ( Pt 2), 409-440.

Markram, H., and Tsodyks, M. (1996). Redistribution of synaptic efficacy between neocortical pyramidal neurons. *Nature* 382, 807-810.

Marsden, B. J., Hodges, R. S., and Sykes, B. D. (1988). <sup>1</sup>H-NMR studies of synthetic peptide analogues of calcium-binding site III of rabbit skeletal troponin C: effect on the lanthanum affinity of the interchange of aspartic acid and asparagine residues at the metal ion coordinating positions. *Biochemistry* 27, 4198-4206.

Mason, A., Nicoll, A., and Stratford, K. (1991). Synaptic transmission between individual pyramidal neurons of the rat visual cortex *in vitro*. *J Neurosci* 11, 72-84.

McAllister-Williams, R. H., and Kelly, J. S. (1995). The temperature dependence of high-threshold calcium channel currents recorded from adult rat dorsal raphe neurones. *Neuropharmacology* 34, 1479-1490.

McCapra, F., and Chang, Y. C. (1967). Chemiluminescence of a Cypridina luciferin analogue. *Chem Commun* 19, 1011-1012.

McCormick, D. A., and Prince, D. A. (1985). Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons. *ProcNatlAcadSciUSA* 82, 6344-6348.

McCormick, D. A., and Prince, D. A. (1986). Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex *in vitro*. *JPhysiol* 375:169-94., 169-194.

McCormick, D. A., Shu, Y., Hasenstaub, A., Sanchez-Vives, M., Badoual, M., and Bal, T. (2003). Persistent cortical activity: mechanisms of generation and effects on neuronal excitability. *Cereb Cortex* 13, 1219-1231.

McGaughy, J., Everitt, B. J., Robbins, T. W., and Sarter, M. (2000). The role of cortical cholinergic afferent projections in cognition: impact of new selective immunotoxins. *BehavBrain Res* 115, 251-263.

McGehee, D. S., Heath, M. J., Gelber, S., Devay, P., and Role, L. W. (1995). Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors.

Science 269, 1692-1696.

Mead, C. (1990). Neuromorphic electronic systems. *Proc IEEE* 86, 1629-1636.

Mechawar, N., Cozzari, C., and Descarries, L. (2000). Cholinergic innervation in adult rat cerebral cortex: a quantitative immunocytochemical description. *JComp Neurol* 428, 305-318.

Mesulam, M. M., Hersh, L. B., Mash, D. C., and Geula, C. (1992). Differential cholinergic innervation within functional subdivisions of the human cerebral cortex: a choline acetyltransferase study. *JComp Neurol* 318, 316-328.

Mesulam, M. M., Mufson, E. J., Wainer, B. H., and Levey, A. I. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10, 1185-1201.

Metherate, R., and Weinberger, N. M. (1990). Cholinergic modulation of responses to single tones produces tone-specific receptive field alterations in cat auditory cortex. *Synapse* 6, 133-145.

Miller, E. K. (1999). The prefrontal cortex: complex neural properties for complex behavior. *Neuron* 22, 15-17.

Minshull, J., and Stemmer, W. P. (1999). Protein evolution by molecular breeding. *Curr Opin Chem Biol* 3, 284-290.

Mitchison, G. (1992). Axonal trees and cortical architecture. *Trends Neurosci* 15, 122-126.

Morin, J. G., and Hastings, J. W. (1971). Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J Cell Physiol* 77, 305-312.

Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H., and Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13, 2656-2662.

Mrzljak, L., Levey, A. I., Belcher, S., and Goldman-Rakic, P. S. (1998). Localization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor protein and mRNA in cortical neurons of the normal and cholinergically deafferented rhesus monkey. *J Comp Neurol* 390, 112-132.

Mrzljak, L., Levey, A. I., and Goldman-Rakic, P. S. (1993). Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission. *Proc*

Natl Acad Sci U S A 90, 5194-5198.

Mrzljak, L., Pappay, M., Leranth, C., and Goldman-Rakic, P. S. (1995). Cholinergic synaptic circuitry in the macaque prefrontal cortex. *J Comp Neurol* 357, 603-617.

Musicki, B., Kishi, Y., and Shimomura, O. (1986). Structure of the functional part of photoprotein aequorin. *J Chem Soc Chem Commun*, 1566-1568.

Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19, 137-141.

Nakajima-Shimada, J., Iida, H., Tsuji, F. I., and Anraku, Y. (1991). Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin cDNA expression system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6878-6882.

Nomura, M., Inouye, S., Ohmiya, Y., and Tsuji, F. I. (1991). A C-terminal proline is required for bioluminescence of the Ca(2+)-binding photoprotein, aequorin. *FEBS Lett* 295, 63-66.

Ohashi, W., Inouye, S., Yamazaki, T., and Hirota, H. (2005). NMR analysis of the Mg2+-binding properties of aequorin, a Ca2+-binding photoprotein. *J Biochem (Tokyo)* 138, 613-620.

Ohmiya, Y., Kurono, S., Ohashi, M., Fagan, T. F., and Tsuji, F. I. (1993). Mass spectrometric evidence for a disulfide bond in aequorin regeneration. *FEBS Lett* 332, 226-228.

Ohmiya, Y., and Tsuji, F. I. (1993). Bioluminescence of the Ca(2+)-binding photoprotein, aequorin, after histidine modification. *FEBS Lett* 320, 267-270.

Parnavelas, J. G., Kelly, W., Franke, E., and Eckenstein, F. (1986). Cholinergic neurons and fibres in the rat visual cortex. *J Neurocytol* 15, 329-336.

Penschuck, S., Chen-Bee, C. H., Prakash, N., and Frostig, R. D. (2002). In vivo modulation of a cortical functional sensory representation shortly after topical cholinergic agent application. *J Comp Neurol* 452, 38-50.

Peters, A. (1987). Number of neurons and synapses in the primary visual cortex. In *Cerebral cortex. Further aspects of cortical function, including hippocampus*, P. Press, ed. (New York), pp. 267-294.

Pologruto, T. A., Yasuda, R., and Svoboda, K. (2004). Monitoring neural activity and

[Ca<sup>2+</sup>] with genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *J Neurosci* 24, 9572-9579.

Porter, J. T., Cauli, B., Staiger, J. F., Lambolez, B., Rossier, J., and Audinat, E. (1998). Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur J Neurosci* 10, 3617-3628.

Porter, J. T., Cauli, B., Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J., and Audinat, E. (1999). Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J Neurosci* 19, 5228-5235.

Porter, J. T., Johnson, C. K., and Agmon, A. (2001). Diverse types of interneurons generate thalamus-evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 21, 2699-2710.

Powell, T. P. (1981). certain aspect of the intrinsic organisation of the cerebral cortex. In *Brain Mechanisms and Perceptual Awareness*, O. Pompeiano, and C. Ajmone-Marsan, eds. (New York, Raven Press), pp. 1-19.

Prasher, D., McCann, R. O., and Cormier, M. J. (1985). Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 126, 1259-1268.

Price, C. J., Cauli, B., Kovacs, E. R., Kulik, A., Lambolez, B., Shigemoto, R., and Capogna, M. (2005). Neurogliaform neurons form a novel inhibitory network in the hippocampal CA1 area. *J Neurosci* 25, 6775-6786.

Procyshyn, R. M., and Reid, R. E. (1994). A structure/activity study of calcium affinity and selectivity using a synthetic peptide model of the helix-loop-helix calcium-binding motif. *J Biol Chem* 269, 1641-1647.

Ramón y Cajal, S. (1904). *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados* (Madrid, Moya).

Rasmusson, D. D., and Dykes, R. W. (1988). Long-term enhancement of evoked potentials in cat somatosensory cortex produced by co-activation of the basal forebrain and cutaneous receptors. *Exp Brain Res* 70, 276-286.

Rasmusson, D. D., and Dykes, R. W. (1988). Long-term enhancement of evoked potentials in cat somatosensory cortex produced by co-activation of the basal forebrain and cutaneous receptors. *Exp Brain Res* 70, 276-286.

Ray, B. D., Ho, S., Kemple, M. D., Prendergast, F. G., and Nageswara Rao, B. D.

- (1985). Proton NMR of aequorin. Structural changes concomitant with calcium-independent light emission. *Biochemistry* 24, 4280-4287.
- Reid, R. E. (1990). Synthetic fragments of calmodulin calcium-binding site III. A test of the acid pair hypothesis. *J Biol Chem* 265, 5971-5976.
- Reid, R. E., and Hodges, R. S. (1980). Co-operativity and calcium/magnesium binding to troponin C and muscle calcium binding parvalbumin: an hypothesis. *J Theor Biol* 84, 401-444.
- Reyes, A., Lujan, R., Rozov, A., Burnashev, N., Somogyi, P., and Sakmann, B. (1998). Target-cell-specific facilitation and depression in neocortical circuits. *Nat Neurosci* 1, 279-285.
- Ridgway, E. B., and Ashley, C. C. (1967). Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun* 29, 229-234.
- Ringer, S. (1883). A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol* 4, 29-43.
- Rizzuto, R., Simpson, A. W., Brini, M., and Pozzan, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* 358, 325-327.
- Rogers, K. L., Stinnakre, J., Agulhon, C., Jublot, D., Shorte, S. L., Kremer, E. J., and Brulet, P. (2005). Visualization of local  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics with genetically encoded bioluminescent reporters. *Eur J Neurosci* 21, 597-610.
- Role, L. W., and Berg, D. K. (1996). Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16, 1077-1085.
- Ruberg, M., Ploska, A., Javoy-Agid, F., and Agid, Y. (1982). Muscarinic binding and choline acetyltransferase activity in Parkinsonian subjects with reference to dementia. *Brain Res* 232, 129-139.
- Sarter, M., and Bruno, J. P. (1999). Abnormal regulation of corticopetal cholinergic neurons and impaired information processing in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci* 22, 67-74.
- Sarter, M., Hasselmo, M. E., Bruno, J. P., and Givens, B. (2005). Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 98-111.

- Sarter, M. F., and Bruno, J. P. (1994). Cognitive functions of cortical ACh: lessons from studies on trans-synaptic modulation of activated efflux. *Trends Neurosci* 17, 217-221.
- Sato, H., Hata, Y., Hagihara, K., and Tsumoto, T. (1987). Effects of cholinergic depletion on neuron activities in the cat visual cortex. *J Neurophysiol* 58, 781-794.
- Sato, H., Hata, Y., Masui, H., and Tsumoto, T. (1987). A functional role of cholinergic innervation to neurons in the cat visual cortex. *J Neurophysiol* 58, 765-780.
- Schwindt, P. C., Spain, W. J., Foehring, R. C., Chubb, M. C., and Crill, W. E. (1988). Slow conductances in neurons from cat sensorimotor cortex *in vitro* and their role in slow excitability changes. *J Neurophysiol* 59, 450-467.
- Sedbrook, J. C., Kronebusch, P. J., Borisy, G. G., Trewavas, A. J., and Masson, P. H. (1996). Transgenic AEQUORIN reveals organ-specific cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses to anoxia and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol* 111, 243-257.
- Seigneur, J., Kroeger, D., Nita, D. A., and Amzica, F. (2006). Cholinergic action on cortical glial cells *in vivo*. *Cereb Cortex* 16, 655-668.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766.
- Sherman, S. M., and Guillery, R. W. (1996). Functional organization of thalamocortical relays. *J Neurophysiol* 76, 1367-1395.
- Shimomura, O. (1986). Isolation and properties of various molecular forms of aequorin. *Biochem J* 234, 271-277.
- Shimomura, O. (1995). Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochem Biophys Res Commun* 211, 359-363.
- Shimomura, O., Goto, T., and Johnson, F. H. (1977). Source of oxygen in the CO(2) produced in the bioluminescent oxidation of firefly luciferin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2799-2802.
- Shimomura, O., Inoue, S., Johnson, F. H., and Haneda, Y. (1980). *Comp Biochem Physiol* 65B, 435-437.
- Shimomura, O., and Inouye, S. (1996). Titration of recombinant aequorin with calcium chloride. *Biochem Biophys Res Commun* 221, 77-81.



Shimomura, O., Inouye, S., Musicki, B., and Kishi, Y. (1990). Recombinant aequorin and recombinant semi-synthetic aequorins. Cellular  $\text{Ca}^{2+}$  ion indicators. *Biochem J* 270, 309-312.

Shimomura, O., and Johnson, F. H. (1969). Properties of the bioluminescent protein aequorin. *Biochemistry* 8, 3991-3997.

Shimomura, O., and Johnson, F. H. (1970). Calcium binding, quantum yield, and emitting molecule in aequorin bioluminescence. *Nature* 227, 1356-1357.

Shimomura, O., and Johnson, F. H. (1975). Regeneration of the photoprotein aequorin. *Nature* 256, 236-238.

Shimomura, O., Johnson, F. H., and Morise, H. (1974). Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin. *Biochemistry* 13, 3278-3286.

Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-239.

Shimomura, O., Kishi, Y., and Inouye, S. (1993). The relative rate of aequorin regeneration from apoequorin and coelenterazine analogues. *Biochem J* 296 ( Pt 3), 549-551.

Shimomura, O., Musicki, B., and Kishi, Y. (1988). Semi-synthetic aequorin. An improved tool for the measurement of calcium ion concentration. *Biochem J* 251, 405-410.

Shimomura, O., Musicki, B., and Kishi, Y. (1989). Semi-synthetic aequorins with improved sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  ions. *Biochem J* 261, 913-920.

Shimomura, O., Musicki, B., Kishi, Y., and Inouye, S. (1993). Light-emitting properties of recombinant semi-synthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium. *Cell Calcium* 14, 373-378.

Shimomura, O., and Teranishi, K. (2000). Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine. *Luminescence* 15, 51-58.

Sillito, A. M., and Kemp, J. A. (1983). Cholinergic modulation of the functional organization of the cat visual cortex. *Brain Res* 289, 143-155.

Silva, L. R., Amitai, Y., and Connors, B. W. (1991). Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science* 251, 432-435.

Sitaram, N., Weingartner, H., and Gillin, J. C. (1978). Human serial learning: enhancement with arecholine and choline impairment with scopolamine. *Science* 201, 274-276.

Sloper, J. J., Hiorns, R. W., and Powell, T. P. (1979). A qualitative and quantitative electron microscopic study of the neurons in the primate motor and somatic sensory cortices. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 285, 141-171.

Smiley, J. F., Morrell, F., and Mesulam, M. M. (1997). Cholinergic synapses in human cerebral cortex: an ultrastructural study in serial sections. *ExpNeurol* 144, 361-368.

Somogyi, P., Tamas, G., Lujan, R., and Buhl, E. H. (1998). Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain ResBrain ResRev* 26, 113-135.

Steriade, M. (1997). Synchronized activities of coupled oscillators in the cerebral cortex and thalamus at different levels of vigilance. *CerebCortex* 7, 583-604.

Strynadka, N. C., and James, M. N. (1989). Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem* 58, 951-998.

Stuart, G. J., Dodt, H. U., and Sakmann, B. (1993). Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch* 423, 511-518.

Tamas, G., Buhl, E. H., Lorincz, A., and Somogyi, P. (2000). Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *NatNeurosci* 3, 366-371.

Tamas, G., Lorincz, A., Simon, A., and Szabadics, J. (2003). Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science* 299, 1902-1905.

Teranishi, K., Ueda, K., Hisamatsu, M., and Yamada, T. (1995). Synthesis of a model for the functional part of photoprotein aequorin. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 59, 104-107.

Teranishi, K., Ueda, K., Nakao, H., Hisamatsu, M., and Yamada, T. (1994). Synthesis of hydroperoxide via photooxygenation for a model

aequorin bioluminescence. *Tetrahedron Lett* 35, 8181-8184.

Thomson, A. M., and Deuchars, J. (1997). Synaptic interactions in neocortical local circuits: dual intracellular recordings *in vitro*. *CerebCortex* 7, 510-522.

Thomson, A. M., Deuchars, J., and West, D. C. (1993). Large, deep layer pyramid-

pyramid single axon EPSPs in slices of rat motor cortex display paired pulse and frequency-dependent depression, mediated presynaptically and self-facilitation, mediated postsynaptically. *J Neurophysiol* 70, 2354-2369.

Thomson, A. M., and West, D. C. (1986). N-methylaspartate receptors mediate epileptiform activity evoked in some, but not all, conditions in rat neocortical slices. *Neuroscience* 19, 1161-1177.

Thomson, C. M., Herring, P. J., and Campbell, A. K. (1997). The widespread occurrence and tissue distribution of the imidazolopyrazine luciferins. *J Biolumin Chemilumin* 12, 87-91.

Tigges, J., and Tigges, M. (1985). Subcortical sources of direct projections to visual cortex. In *Cerebral cortex*, P. press, ed. (New York), pp. 351-378.

Tricoire, L., Tsuzuki, K., Courjean, O., Gibelin, N., Bourout, G., Rossier, J., and Lambolez, B. (2006). Calcium dependence of aequorin bioluminescence dissected by random mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9500-9505.

Tsuji, F. I., Ohmiya, Y., Fagan, T. F., Toh, H., and Inouye, S. (1995). Molecular evolution of the Ca(2+)-binding photoproteins of the Hydrozoa. *Photochem Photobiol* 62, 657-661.

Turrini, P., Casu, M. A., Wong, T. P., De Koninck, Y., Ribeiro-da-Silva, A., and Cuello, A. C. (2001). Cholinergic nerve terminals establish classical synapses in the rat cerebral cortex: synaptic pattern and age-related atrophy. *Neuroscience* 105, 277-285.

Umbriaco, D., Watkins, K. C., Descarries, L., Cozzari, C., and Hartman, B. K. (1994). Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex: an electron microscopic study in serial sections. *JComp Neurol* 348, 351-373.

Vaughan, D. W. (1984). The structure of neuroglial cells. Chapitre 10. In *Cerebral Cortex. Functional Properties of Cortical Cells*. (New York & London, Plenum Press), pp. 285-298.

Venance, L., Rozov, A., Blatow, M., Burnashev, N., Feldmeyer, D., and Monyer, H. (2000). Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. *ProcNatlAcadSciUSA* 97, 10260-10265.

Vidal, C., and Changeux, J. P. (1993). Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex *in vitro*. *Neuroscience* 56, 23-32.

- Vysotski, E. S., and Lee, J. (2004). Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism. *Acc Chem Res* 37, 405-415.
- Wada, E., McKinnon, D., Heinemann, S., Patrick, J., and Swanson, L. W. (1990). The distribution of mRNA encoded by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family (alpha 5) in the rat central nervous system. *Brain Res* 526, 45-53.
- Wada, E., Wada, K., Boulter, J., Deneris, E., Heinemann, S., Patrick, J., and Swanson, L. W. (1989). Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 284, 314-335.
- Wainer, B. H., Bolam, J. P., Freund, T. F., Henderson, Z., Totterdell, S., and Smith, A. D. (1984). Cholinergic synapses in the rat brain: a correlated light and electron microscopic immunohistochemical study employing a monoclonal antibody against choline acetyltransferase. *Brain Res* 308, 69-76.
- Wang, Y., Toledo-Rodriguez, M., Gupta, A., Wu, C., Silberberg, G., Luo, J., and Markram, H. (2004). Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* 561, 65-90.
- Ward, W. W., and Cormier, M. J. (1979). An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the Renilla green-fluorescent protein. *J Biol Chem* 254, 781-788.
- Watkins, N. J., and Campbell, A. K. (1993). Requirement of the C-terminal proline residue for stability of the Ca(2+)-activated photoprotein aequorin. *Biochem J* 293 ( Pt 1), 181-185.
- Waud, J. P., Bermudez Fajardo, A., Sudhaharan, T., Trimby, A. R., Jeffery, J., Jones, A., and Campbell, A. K. (2001). Measurement of proteases using chemiluminescence-resonance-energy-transfer chimaeras between green fluorescent protein and aequorin. *Biochem J* 357, 687-697.
- Wilson, T., and Hastings, J. W. (1998). Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 197-230.
- Woolsey, T. A., and Van der Loos, H. (1970). The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res* 17, 205-242.
- Wu, J. Y., Guan, L., and Tsau, Y. (1999). Propagating activation during oscillations

and evoked responses in neocortical slices. *J Neurosci* 19, 5005-5015.

Wu, X., and Reid, R. E. (1997). Structure/calcium affinity relationships of site III of calmodulin: testing the acid pair hypothesis using calmodulin mutants. *Biochemistry* 36, 8649-8656.

Xia, N. S., Luo, W. X., Zhang, J., Xie, X. Y., Yang, H. J., Li, S. W., Chen, M., and Ng, M. H. (2002). Bioluminescence of *Aequorea macrodactyla*, a common jellyfish species in the East China Sea. *Mar Biotechnol* (NY) 4, 155-162.

Xiang, Z., Huguenard, J. R., and Prince, D. A. (1998). Cholinergic switching within neocortical inhibitory networks. *Science* 281, 985-988.

Yamamoto, K., Hashimoto, K., Isomura, Y., Shimohama, S., and Kato, N. (2000). An IP3-assisted form of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in neocortical neurons. *Neuroreport* 11, 535-539.

Yasuda, R. P., Ciesla, W., Flores, L. R., Wall, S. J., Li, M., Satkus, S. A., Weisstein, J. S., Spagnola, B. V., and Wolfe, B. B. (1993). Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *MolPharmacol* 43, 149-157.

Zhong, P., Gu, Z., Wang, X., Jiang, H., Feng, J., and Yan, Z. (2003). Impaired modulation of GABAergic transmission by muscarinic receptors in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 278, 26888-26896.

Zhu, J. J. (2000). Maturation of layer 5 neocortical pyramidal neurons: amplifying salient layer 1 and layer 4 inputs by Ca<sup>2+</sup> action potentials in adult rat tuft dendrites. *J Physiol* 526 Pt 3, 571-587.