



Mécanismes moléculaires de la stabilisation synaptique des récepteurs du glutamate de type kaïnate dans les cellules pyramidales de CA3

Sabine Fievre

► To cite this version:

Sabine Fievre. Mécanismes moléculaires de la stabilisation synaptique des récepteurs du glutamate de type kaïnate dans les cellules pyramidales de CA3. Neurobiologie. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0226 . tel-01246362

HAL Id: tel-01246362

<https://theses.hal.science/tel-01246362>

Submitted on 18 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE PRESENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

École Doctorale
Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Neurosciences

Par Sabine Kahina FIÈVRE

**Mécanismes moléculaires de la stabilisation synaptique
des récepteurs du glutamate de type kaïnate dans les
cellules pyramidales de CA3**

Sous la direction de : Christophe MULLE

Soutenue publiquement le 19 novembre 2015

Membres du jury :

M. Olivier THOUMINE	Directeur de recherche, CNRS	Président
Mme Valérie CREPEL	Directrice de recherche, INSERM	Rapporteur
M. Stéphane MARTIN	Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur
M. Geoffrey SWANSON	Professeur, Northwestern Univ. USA	Examineur
M. Christophe Mulle	Directeur de recherche, CNRS	Directeur de Thèse

A mon père,

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de m'honorer de leur présence : le Dr Valérie Crépel, le Dr Stéphane Martin, le Pr Geoffrey Swanson et le Dr Olivier Thoumine.

Je remercie également Christophe Mulle, mon directeur de thèse de m'avoir accueilli dans son laboratoire dès ma première année de Master. Merci de m'avoir permis de travailler dans ton équipe sur autant de techniques et de modèles expérimentaux allant de la HEK à la tranche de cerveau, de l'application ultrarapide de glutamate au décaageage focalisé de glutamate. Ces quatre années de doctorat furent riches en apprentissages théoriques et pratiques.

Merci à la Fondation pour la Recherche Médicale et au Labex Brain pour leur soutien financier.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mario Carta. J'ai énormément appris auprès de toi. Tu as été un véritable mentor pour moi durant ces quatre dernières années et je ne te remercierai jamais assez pour cela.

Je souhaite remercier Nathalie Sans pour m'avoir donné l'opportunité de collaborer sur les projets Scribble1 et Vangl2. Merci également à Steve et Nicolas avec qui j'ai eu plaisir à travailler.

Un grand merci à Vincent, mon grand poto, dire que tu as fini docteur avant moi, Pfff... En tout cas on peut dire qu'on s'est bien marré tous les deux. Notre complicité de tous les instants m'a manqué au cours de cette dernière année. Je te souhaite de mener tes projets à bien et de trouver ton équilibre professionnel et personnel.

Merci à toi, Audrey, en te rencontrant j'ai découvert une personne de grande valeur et une amie. En surtout, n'oublie jamais les baleines... Next step : CALIFORNIA !!

Merci à Virginie, tu es une des personnes les plus adorables que j'ai pu rencontrer. Je suis heureuse d'avoir eu l'occasion de travailler avec toi et je te remercie de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de l'imagerie. Bien sûr comment ne pas remercier aussi le duo Biomol Séverine et Julie Rumi, sans oublier Sandrine, Noelle, Thierry, Isa, Camille et Julie Angibaud. J'ai passé d'excellents moments à vos côtés que se soit au labo ou en

dehors. Ce fut un plaisir de travailler à vos côtés. Je remercie tout particulièrement Sandrine, toujours de bon conseil et qui m'a supporté comme voisine de bureau pendant la rédaction de la thèse... pas facile.

Je remercie tous les membres de l'équipe « Physiologie des synapses glutamatergiques » présents ou passés que j'ai eu le bonheur de connaître : Adam a super funny desk neighbour, Christophe Blanchet le sage, Julien Véran mon premier mini chef, Silvia, Gaël, Benoit SDF mon premier mini moi, Bernat, Marilena, Jimmy, Pei et Meryl.

I would like to thank Andrew for being the best electrophysiology setup neighbour ever (with Mario). You always have time to teach your knowledge and it was a privilege to learn from you.

Bien sûr je n'oublie pas les PIVés : Amandine, Mélissa et Florian qui ont pris si grand soin de mes petits GluK2. Merci également à Pierre Costet et Anh.

Merci au BIC, en particulier Sébastien et Christel pour leurs conseils. Merci également à Federico Trigo pour son aide en matière de décageage de glutamate.

Merci à Estelle Toulmé que j'ai eu beaucoup de plaisir à côtoyer depuis bientôt deux ans. Merci à Rémi, grâce à qui le labo tourne comme une horloge et Emeline en présence de qui les heures passées en pièce de culture semblaient passer bien vite. Un grand merci à Marie-France, ce fut un plaisir de t'avoir comme voisine de bureau. Ta jovialité et ta gentillesse me manqueront. I want to thank Jennifer for our doggy-kitty-animals discussions. It was a pleasure to meet you.

Merci à mon amie depuis plus de 15 ans, Nadou qui a toujours été là pour moi.

Bien sûr, je ne peux pas oublier mes supers copines Céline et Marion. Chaque moment passé ensemble n'a été que pur bonheur.

En bien entendu, il y a la famille. Mon Papou qui a toujours été là, Arnaud, Patricia, Hélène et Lucas. Je vous aime tous très fort.

Enfin, par ce travail, je tiens à faire remarquer au grand Empereur des Goulus à quel point la supériorité scientifique du peuple Moulou surpasse celle de tous les autres peuples intergalactiques. Vous avez peut être l'Art mais nous nous avons le Savoir (et le

café). Puisse cette nouvelle page de mon existence ouvrir une ère de paix et de fraternité entre nos peuples. Vive les Moulus.

Résumé

Les récepteurs ionotropiques du glutamate peuvent être compartimentés de manière très spécifique au niveau des différentes afférences synaptiques d'un neurone. Dans les neurones pyramidaux de CA3, les récepteurs de type kaïnate (rKA) post-synaptiques sont localisés à la synapse formée entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3 (synapse FM-CA3) mais ils sont totalement absents des autres afférences glutamatergiques sur ce même neurone. Nous avons cherché à comprendre les mécanismes moléculaires, de cette compartimentation subcellulaire. En réalisant une cartographie fonctionnelle des récepteurs du glutamate par décageage focalisé de glutamate dans les cellules pyramidales de CA3, nous avons montré que les rKA présentent une localisation subcellulaire strictement confinée dans les excroissances épineuses, éléments post-synaptiques des synapses FM-CA3, et sont exclus des compartiments somato-dendritiques contrairement aux récepteurs AMPA. Nous avons identifié une séquence du domaine C-terminal de GluK2a nécessaire pour la stabilisation des rKA. Cette séquence est responsable d'une interaction avec la protéine d'adhérence N-cadhérine. L'altération de la fonction de la N-cadhérine dans les cellules pyramidales de CA3 entraîne une déstabilisation des rKA à la synapse FM-CA3. Ces travaux suggèrent que plusieurs mécanismes participent à la compartimentation des rKA à la synapse FM-CA3 impliquant le recrutement et la stabilisation des rKA par les N-cadhérines.

Mots clés : spécification synaptique - ségrégation subcellulaire - récepteur kaïnate - CA3 - N-cadhérine

Abstract

Distinct subtypes of ionotropic glutamate receptors can be segregated to specific synaptic inputs in a given neuron. In CA3 pyramidal cells (PCs), kainate receptors (KARs) are present at mossy fiber (mf) synapses and absent from other glutamatergic inputs. The mechanisms for such a constrained subcellular segregation is not known. We have investigated the molecular determinants responsible for the subcellular segregation of KARs at mf-CA3 synapses. Using functional mapping of glutamate receptors by focal glutamate uncaging we show that KARs display a strictly confined expression on thorny excrescences, the postsynaptic elements of mf-CA3 synapses, being excluded from extrasynaptic somatodendritic compartments, at variance with AMPA receptors. We have identified a sequence in the GluK2a C-terminal domain necessary for restricted expression of KARs which is responsible for GluK2a interaction with N-Cadherin. Targeted deletion of N-Cadherin or overexpression of a dominant negative N-Cadherin in CA3 PCs greatly induce a destabilization of KARs at the mf-CA3 synapses. Our findings suggest that multiple mechanisms combine to control the compartmentalization of KARs at mf-CA3 synapses, including a stringent control of the amount of GluK2 subunit in CA3 PCs, a limited number of slots for KARs, and the recruitment/stabilization of KARs by N-Cadherins.

Key words: Synapse specification - subcellular segregation - kainate receptors - CA3 - N-Cadherin

Avant-propos

Cette thèse a été menée à l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences à Bordeaux, au sein de l'équipe « Physiologie des synapses glutamatergiques », sous la direction de Monsieur Christophe Mulle.

L'une des problématiques abordées dans le laboratoire est la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la ségrégation des récepteurs du glutamate de type kainate (rKA) post-synaptiques dans les cellules pyramidales de CA3. En effet, dans ces cellules, ces récepteurs sont strictement compartimentés et ségrégués à la synapse formée entre les fibres mossy (les axones des cellules en grain du gyrus denté) et les cellules pyramidales de CA3 (synapse FM-CA3).

La compréhension des mécanismes qui sous-tendent cette ségrégation nécessite d'évoquer les mécanismes généraux impliqués dans les phénomènes de spécifications cellulaires et synaptiques dans l'hippocampe et en particulier dans la région CA3.

Dans une première partie de l'introduction, je décrirai brièvement le fonctionnement des synapses excitatrices glutamatergiques.

Dans une seconde partie, je définirai les notions de spécifications cellulaires et synaptiques. Ces notions sont indissociables de la notion de diversité des neurones dans le système nerveux central. Dans ce chapitre, je m'intéresserai tout particulièrement à l'hippocampe et à la région CA3. En effet, les cellules pyramidales de CA3 représentent un modèle de choix pour cette étude. Les afférences sur ces neurones présentent une organisation laminaire stricte et certaines protéines synaptiques sont hautement compartimentées dans différentes synapses. Ainsi, les propriétés de transmission synaptique à chacune de ces synapses peuvent être très différentes. Je décrirai brièvement l'organisation du circuit hippocampique puis je m'attarderai sur la région CA3 de l'hippocampe, en particulier sur la synapse FM-CA3 qui présente une morphologie et des propriétés singulières de transmission synaptique.

La spécification cellulaire et synaptique est déterminée dès la neurogenèse. Au cours du développement de l'hippocampe s'établissent des sous-populations neuronales qui sont destinées à un programme de développement spécifique. Ce dernier définit le moment de la naissance, le mode de migration, la maturation, la connectivité et la

synaptogenèse. Ces sous-populations partagent une localisation spécifique et la présence de marqueurs moléculaires disposés en couches. Plus tardivement durant la neurogenèse, la formation des contacts synaptiques met en jeu des protéines d'adhérence. Il existe de multiples protéines pouvant être impliquées dans l'élaboration de nouveaux contacts synaptiques. Elles peuvent être exprimées de manière spécifique par certaines catégories de neurones et dans certaines sous-régions neuronales bien précises participant ainsi au guidage axonal très spécifique des différentes afférences puis à la synaptogenèse. Au cours de la croissance axonale, certaines protéines d'adhérence servent de senseurs moléculaires indispensables à un guidage axonal approprié. Ces protéines permettent ainsi l'attraction ou la répulsion de l'axone dans certaines sous-régions de la couche CA3 de l'hippocampe. Nous donnerons alors des exemples de protéines d'adhérence participant au guidage axonal des différentes afférences sur les cellules pyramidales de CA3.

Puis, au cours de la synaptogenèse, certaines protéines d'adhérence s'accumulent et s'activent au niveau de contacts axono-dendritiques. Des protéines cytosoliques interagissant avec ces protéines d'adhérence sont alors recrutées au niveau post-synaptique où elles forment un échafaudage sous-synaptique. Enfin, les récepteurs du glutamate sont recrutés et stabilisés à la synapse grâce à des interactions spécifiques avec ces protéines d'échafaudage ou directement avec des protéines d'adhérence. Ainsi, les protéines d'adhérence constituent une clé de voute essentielle à la mise en place de contacts neuronaux spécifiques au cours de la synaptogenèse puis à la spécification de ces contacts neuronaux jusqu'à l'âge adulte. A l'âge adulte, les différentes afférences sur les cellules pyramidales de CA3 sont hautement hiérarchisées et le profil d'expression des protéines synaptiques peut être très distinct d'une synapse à l'autre. Nous donnerons des exemples de l'interaction étroite entre les complexes protéiques d'adhérence et certaines protéines synaptiques.

Dans un troisième chapitre, je m'intéresserai en particulier aux rKA qui sont spécifiquement compartimentés dans la synapse FM-CA3 et sont totalement absents des autres afférences sur les cellules pyramidales de CA3 au niveau post-synaptique. Je décrirai la structure des rKA, les différentes sous-unités et les différents variants d'épissage pouvant s'assembler pour composer ces récepteurs. Les rKA interagissent avec de multiples interacteurs protéiques modulant principalement le trafic des rKA à la membrane. Ces protéines interagissant principalement avec le domaine C-terminal (DCT)

de ces récepteurs, je m'attarderai sur ces différentes interactions. Parmi ces interacteurs protéiques, on trouve le complexe trans-synaptique d'adhérence composé de la protéine d'adhérence N-cadhérine et de la β -caténine auquel je me suis intéressé dans notre étude.

Je décrirai ensuite les différentes modifications post-traductionnelles que peuvent subir les rKA ainsi que le rôle de sous-unités auxiliaires des rKA, les protéines Neto. Puis je m'intéresserai à la pharmacologie des rKA. Le profil d'expression des rKA est très hétérogène d'un type neuronal à l'autre. Dans l'hippocampe, ces récepteurs sont fortement exprimés mais chaque sous-unité présente un profil d'expression bien distinct. Les rKA peuvent être localisés dans les compartiments pré- et post-synaptiques et possèdent de nombreuses fonctions allant de la modulation de la libération de neurotransmetteur, à la modulation de l'excitabilité neuronale. Je décrirai le profil d'expression des différentes sous-unités des rKA dans le système nerveux central puis je m'attarderai sur la distribution subcellulaire des rKA dans l'hippocampe et leurs fonctions dans cette structure. Je donnerai également quelques exemples de la fonction des rKA dans d'autres structures du système nerveux central.

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la compartimentation et la stabilisation synaptique des rKA à la synapse FM-CA3 nous avons réalisé une cartographie fonctionnelle des rKA le long de l'arborisation dendritique des cellules pyramidales de CA3, en utilisant la technique de décageage focalisé de glutamate à une longueur d'onde de 405 nm, couplée à l'électrophysiologie en patch-clamp. Nous avons également effectué des manipulations génétiques de ces neurones en utilisant la technique d'électroporation sur cellule unique. Le choix de la méthodologie employée dans cette étude sera abordé dans un quatrième et dernier chapitre d'introduction.

Table des matières

Abréviations.....	14
Introduction	16
I. Les synapses excitatrices glutamatergiques.....	16
II. Mécanismes de spécification synaptique dans l'hippocampe	17
A. Les circuits synaptiques de l'hippocampe	18
B. Les cellules pyramidales de CA3	19
C. Développement de l'hippocampe.....	26
1) Migration neuronale et ségrégation des différents types neuronaux	26
2) Guidage axonal et organisation laminaire des fibres moussues.....	28
a) Serum response factor (SRF).....	29
b) Les N-CAM	29
c) Sémaforines, neuropilines, plexines et élagage axonal.....	30
d) Eph, éphrines et élagage axonal	32
e) Les nectines	33
f) Les cadhérines	33
D. Protéines d'adhérences et spécification synaptique	34
a) Les cadhérines et récepteurs AMPA	36
b) Eph/Ephrines et récepteurs NMDA	38
c) Neurexines/neuroligines et récepteurs NMDA.....	38
III. Les récepteurs du glutamate de type kaïnate	39
A. Généralité : les récepteurs du glutamate.....	39
1) Les récepteurs métabotropiques	39
2) Les récepteurs ionotropiques.....	40
a) Les récepteurs de type AMPA.....	40
b) Les récepteurs de type NMDA	41
B. Les récepteurs de type kaïnate	42
1) Clonage et structure.....	42
a) Clonage et structure primaire des sous-unités	42
b) Variants d'épissage	42
c) Variants d'édition	45
2) Assemblage	46
3) Trafic membranaire des récepteurs kaïnate : régulation par les interactions protéiques et les modifications post-traductionnelles	46
a) Trafic des récepteurs kaïnate et interactions protéiques	47
✓ Protéines de liaison à domaine PDZ	47

✓ Protéines cargos et protéines de transport vésiculaire	49
✓ Protéines associées au cytosquelette	50
✓ Protéines dépendantes du Ca^{2+}	51
✓ Complexes protéiques trans-synaptiques d'adhésion : N-cadhérine et β -caténines.....	51
b) Modifications post-traductionnelles des récepteurs kaïnate	52
✓ Phosphorylation des récepteurs kaïnate.....	52
✓ Palmitoylation des récepteurs kaïnate.....	55
✓ SUMOylation des récepteurs kaïnate	56
✓ Ubiquitination des récepteurs kaïnate	56
4) Sous-unités auxiliaires des récepteurs kaïnate : les protéines Neto	57
5) Pharmacologie des récepteurs kaïnate	61
a) Agonistes	61
b) Antagonistes	62
c) Modulateurs allostériques	63
6) Distribution et fonctions des récepteurs kaïnate	64
a) Distribution des récepteurs kaïnate dans le système nerveux central	64
b) Distribution subcellulaire des récepteurs kaïnate dans l'hippocampe	65
c) Fonction des récepteurs kaïnate dans l'hippocampe	67
✓ Les récepteurs kaïnate dans les cellules pyramidales de CA3	68
✓ Les récepteurs kaïnate dans les cellules pyramidales de CA1	72
✓ Les récepteurs kaïnate dans les interneurons de CA1	73
✓ Les récepteurs kaïnate dans le gyrus denté, implications dans l'épilepsie	76
d) Autres fonctions des récepteurs kaïnate dans le système nerveux central.....	78
✓ Le cortex somato-sensoriel.....	78
✓ Le cervelet.....	79

IV- Approches méthodologiques..... 80

A. Cartographie fonctionnelle des récepteurs du glutamate : décageage de glutamate.....	81
B. Mécanismes de transfert de gènes en neurosciences	85
1) Transfection basée sur l'utilisation de virus recombinants.....	86
a) Amplicon dérivé de l'Herpes simplex virus (HSV)	86
b) Adénovirus.....	87
c) Adeno-associated virus (AAV).....	87
d) Lentivirus	87
e) Virus Sindbis.....	88
2) Transfection chimique.....	89
a) Co-précipitation Ca^{2+} -phosphate/ADN.....	89
b) Lipofection	89
3) Transfection physique.....	90
a) Micro-injection	90
b) Transfection biolistique	90

4) Transfection par électroporation	91
a) Electroporation de cultures primaires dissociées	91
b) Electroporation <i>in-utero</i>	91
c) Electroporation focale <i>in vivo</i>	92
d) Electroporation sur cellule unique	92
Résultats-Discussion	94
Article : “Molecular determinants for the strictly compartmentalized expression of kainate receptors in CA3 pyramidal cells”	94
A. Problématique.....	94
B. Résultats	94
C. Discussion.....	127
Conclusion – Perspectives	131
Bibliographie	133
Annexes.....	155
Annexe 1	155
Annexe 2	156

Abréviations

2-AG : arachidinoylglycerol

ABP : AMPAR-binding protein

AHP : afterhyperpolarisation

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate

ARNm : ARN messenger

CA : Corne d'Ammon

CaMKII : Calmidulin-dependant kinase II

COPI : Coatomer Protein Complex I

CRMP2-4 : Collapsin Response Mediator Proteins 2-4

DLT : dépression à long terme

DPE : depolarization-induced potentiation of excitation

FM-CA3 : synapse formée entre les Fibres Moussues et les cellules pyramidales de CA3 de l'hippocampe

GABA : acide γ -aminobutyrique

GRIP : GluR-interacting protein

LBD : Ligand Binding Domain

MAGUK : Membrane-Associated guanylate Kinase

NFS : N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein

NMDA : N-methyl-D-aspartate

PA : potentiel d'action

PDZ : postsynaptic density protein (PSD-95), Drosophila disk large tumor suppressor (DLg1), zonula occludens-1 protein (zo-1)

PICK1 : protein interacting with C-kinase-1

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PLC : phospholipase C

PSD-95 : postsynaptic density-95 protein

PSD : postsynaptic density (densité postsynaptique)

PTX : toxine pertussique

PLT : Potentialisation à Long Terme

rAMPA : récepteur du glutamate de type AMPA

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

rKA : récepteur du glutamate de type kaïnate

rNMDA : récepteur du glutamate de type NMDA

SUMO : Small Ubiquitin-related Modifier

TARP : transmembrane AMPA receptor regulatory protein

VILIP1-3 : visin-like protein 1-3

Introduction

Introduction

I. Les synapses excitatrices glutamatergiques

Dans le système nerveux central, les neurones constituent un réseau permettant de coder l'information. Les neurones transfèrent les informations entre eux par l'intermédiaire de structures spécialisées appelées synapses. Ces synapses peuvent être classées en deux grandes catégories bien distinctes : les synapses chimiques et les synapses électriques. La majorité des échanges se fait par l'intermédiaire de synapses chimiques excitatrices ou inhibitrices. Le glutamate constitue le neurotransmetteur exciteur le plus abondant du système nerveux central des vertébrés. Les synapses excitatrices glutamatergiques sont des structures asymétriques constituées d'un compartiment pré-synaptique appelé bouton synaptique et contenant les vésicules de libération de glutamate et d'un compartiment post-synaptique contenant la densité post-synaptique (PSD). Ces structures sont séparées par la fente synaptique (**Figure 1**).

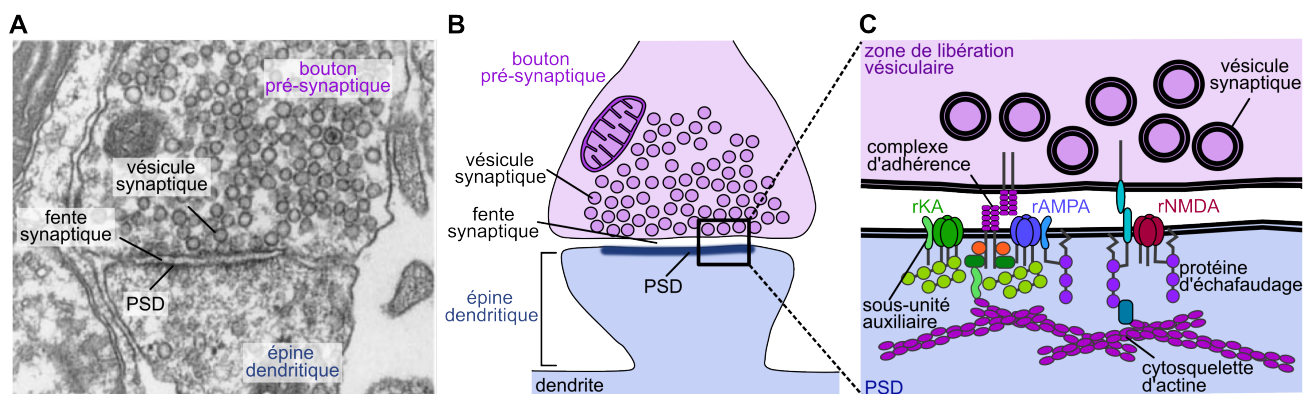


Figure 1 : Synapse excitatrice glutamatergique. (A) image en microscopie électronique d'une synapse excitatrice glutamatergique où l'on peut distinguer le bouton pré-synaptique, contenant la zone de libération vésiculaire, le compartiment post-synaptique situé sur une épine dendritique avec une zone plus dense aux électrons correspondant à la densité post-synaptique (PSD). Entre les compartiments pré- et post-synaptiques se trouve la fente synaptique (adapté de Schiavo et al., 2000). (B-C) Schémas représentant une synapse glutamatergique et la complexe composition de protéines post-synaptiques constituant la densité post-synaptique.

Les synapses glutamatergiques sont souvent formées sur des excroissances dendritiques appelées épines dendritiques tandis que les synapses inhibitrices sont localisées sur le tronc de la dendrite.

Le bouton synaptique contient la machinerie cellulaire nécessaire à la libération de glutamate à partir de stock de vésicules synaptiques. Une fois libéré dans la fente

synaptique, le glutamate peut activer deux catégories de récepteurs : des récepteurs métabotropiques et des récepteurs ionotropiques.

Les récepteurs ionotropiques sont divisés en trois groupes selon leurs propriétés pharmacologiques : les récepteurs de type AMPA (rAMPA), les récepteurs de type NMDA (rNMDA) et les récepteurs de type kaïnate (rKA) (Hollmann et Heinemann, 1994). De manière générale, les rAMPA sont considérés comme étant responsables d'une grande partie de la transmission excitatrice rapide entre neurones. Les rNMDA, jouent quant à eux un rôle clé dans certaines formes de plasticité comme la potentialisation à long terme (PLT) de la transmission synaptique. Les rKA modulent des fonctions pré- et post-synaptiques comme la libération de neurotransmetteurs ou l'excitabilité neuronale.

Les récepteurs du glutamate post-synaptiques sont intégrés dans un large complexe protéique formant la densité post-synaptique. Au cours de la synaptogenèse, des protéines d'adhérence s'accumulent et s'activent au niveau de contacts synaptiques. Des protéines cytosoliques interagissant avec ces protéines d'adhérence sont recrutées dans le compartiment post-synaptique où elles forment un échafaudage sous-synaptique. Enfin, les récepteurs du glutamate sont recrutés et stabilisés à la synapse grâce à des interactions spécifiques avec ces protéines d'échafaudage. Ainsi, la densité post-synaptique forme un domaine synaptique extrêmement riche en protéines, dense aux électrons en microscopie électronique.

II. Mécanismes de spécification synaptique dans l'hippocampe

Les neurones du système nerveux central font l'objet d'une remarquable diversité fonctionnelle et développementale. Ils peuvent ainsi être classés en différentes catégories en fonction de leur morphologie, des protéines qu'ils expriment, des cellules sur lesquelles ils projettent, des afférences qu'ils reçoivent, des caractéristiques de transmission synaptique qu'ils présentent et de leur historique développemental. Cette diversité reflète un premier niveau de spécification cellulaire. De plus, au sein d'un même neurone, toutes les protéines synaptiques ne sont pas exprimées de manière homogène dans toutes les synapses. La diversité fonctionnelle de la transmission synaptique reflète souvent cette diversité d'expression protéique. L'étude des mécanismes sous-tendant ces différents niveaux de spécification neuronale et synaptique permet de mieux appréhender la complexité des circuits qu'ils définissent.

De nombreuses structures du système nerveux central sont divisées en couches histologiques distinctes parallèles où chaque couche regroupe des populations de neurones aux caractéristiques similaires. Dans ce type de structure, des populations d'afférences axonales peuvent se projeter de manière hautement confinée sur l'arborisation dendritique des neurones cibles. Ainsi, dans certains neurones, les différentes afférences sont organisées de façon strictement laminaire, facilement identifiable. Ce type de structure constitue un modèle de choix pour l'étude des phénomènes de spécification cellulaire et synaptique. Parmi ces structures nous pouvons citer le cervelet, le néocortex ou encore l'hippocampe.

A. Les circuits synaptiques de l'hippocampe

L'hippocampe stricto sensu est divisé en deux principales sous-structures : le gyrus denté et la corne d'Ammon (CA). La corne d'Ammon peut être divisée en trois régions, CA1, CA2 et CA3, et présente une organisation laminaire (**Figure 2**). La formation hippocampique au sens large comprend le subiculum, le présubiculum, le parasubiculum et le cortex entorhinal. La connexion des différentes régions de la formation hippocampique forme une boucle appelée circuit tri-synaptique entre le cortex entorhinal et les cellules granulaires du gyrus denté (voie perforante), puis entre le gyrus denté et les cellules pyramidales de CA3 (fibres moussues), et entre les cellules de CA3 et les cellules pyramidales de CA1 (collatérales de Schaffer). Les cellules de CA1 projettent en retour vers le subiculum et vers le cortex entorhinal. La fonction de l'aire CA2 est longtemps restée mal connue mais des études récentes ont établi que les cellules pyramidales de CA2 reçoivent des afférences excitatrices en provenance directe des couches II et III du cortex entorhinal. Ces cellules projettent ensuite sur CA1, fournissant ainsi une forte connexion excitatrice pouvant être responsable d'une robuste potentialisation à long-terme (Chevalayre et Siegelbaum, 2010 ; Jones et McHungh, 2011).

La corne d'Ammon forme une structure laminaire organisée en sous-régions comprenant plusieurs types de neurones aux caractéristiques bien distinctes. Ces neurones diffèrent par leur morphologie, leur connectivité et leurs propriétés de transmission synaptique. Des études génomiques et neuro-anatomiques ont mis en évidence l'hétérogénéité cellulaire et la ségrégation des connexions entre les différentes sous-régions de l'hippocampe (Lein et al., 2004, 2007 ; Thompson et al., 2008).

Structure et connectivité de l'hippocampe

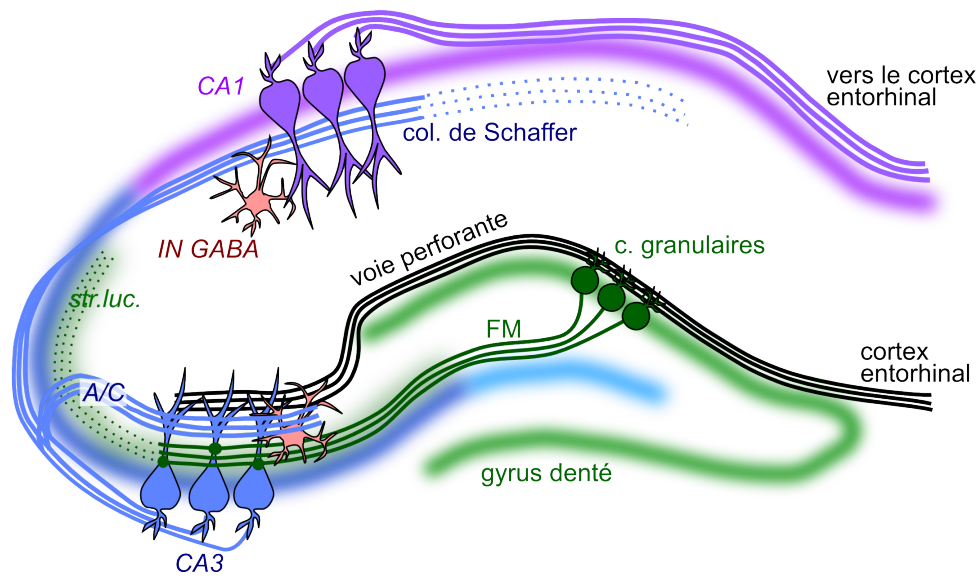


Figure 2 : L'hippocampe. Schéma illustratif de l'hippocampe représentant les projections du cortex entorhinal (en noir) vers les cellules granulaires du gyrus denté (en vert) et vers les cellules pyramidales de CA3 (en bleu). Les cellules granulaires envoient leurs axones, les fibres moussues (FM) sur les cellules de CA3 dans le stratum lucidum (str.luc.) et vers des interneurons GABAergiques (IN GABA). Les cellules pyramidales de CA3 projettent vers les cellules de CA1 via les collatérales de Schaffer et vers d'autres cellules de CA3 via la voie associative et commissurale (AC).

B. Les cellules pyramidales de CA3

La région CA3 de l'hippocampe a fait l'objet de très nombreuses études, du fait de son implication particulière dans des processus d'apprentissage et de sa susceptibilité à l'épilepsie et à la neuro-dégénérescence.

Les cellules pyramidales de CA3 reçoivent une grande quantité de connexions excitatrices récurrentes provenant d'autres neurones de CA3 ipsi- et contralatéraux, qui constituent respectivement les voies associatives et commissurales. Ces synapses se forment sur des dendrites distales des cellules pyramidales de CA3, au niveau d'une couche de l'hippocampe appelée *stratum radiatum* (**Figure 3**). Grâce à la présence de ce puissant réseau de connexions récurrentes (réseau auto-associatif), l'activation de quelques neurones par un élément de mémoire incomplet permettrait de réactiver un profil d'activité complet. Ce réseau auto-associatif pourrait participer ainsi au processus de récupération d'informations encodées lorsque la souris est confrontée à une information partielle (*pattern completion*) (Nakasawa et al., 2002 ; Gold et Kesner, 2005). Ces connexions forment un circuit impliqué dans le codage de la représentation spatiale et de la mémoire épisodique (O'Keefe et Nadel, 1978 ; Scoville et Milner, 1957 ; Rolls et Kesner, 2006).

Organisation laminaire de la région CA3

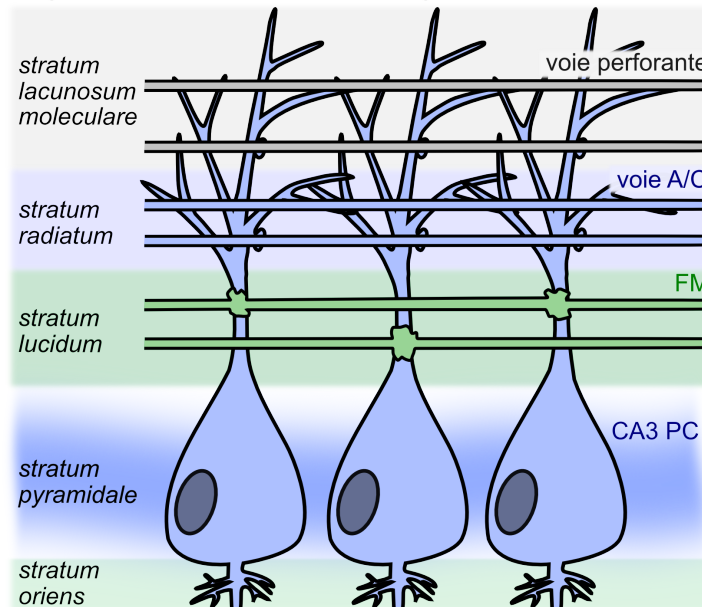
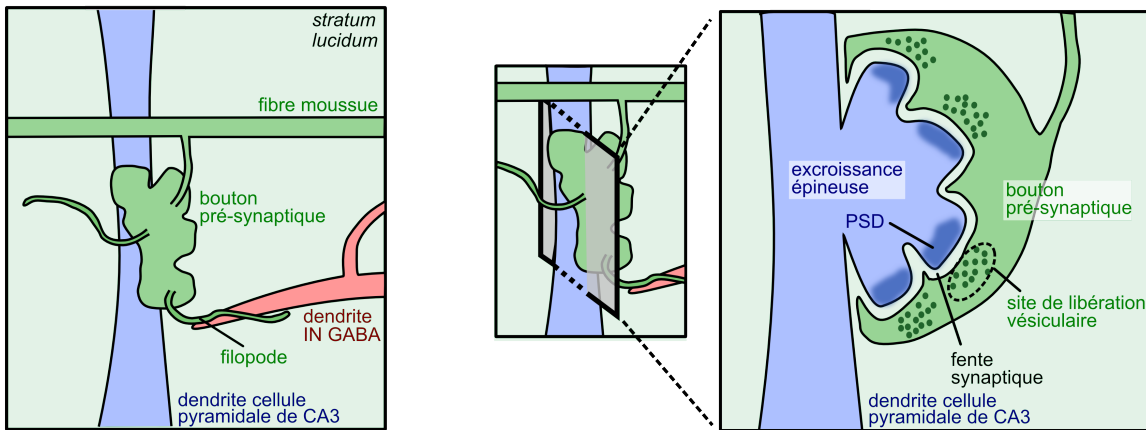


Figure 3 : La région CA3. Schéma représentant l'organisation laminaire de la région CA3. Les différentes afférences de CA3 sont organisées de manière très stricte sous forme de couches parallèles et distinctes. Les fibres moussues (FM) provenant du gyrus denté projettent sur la partie proximale des dendrites apicales des cellules pyramidales de CA3 dans le *stratum lucidum*. Les axones de CA3 qui constituent les voies associatives et commissurales (A/C) ont une localisation plus distale dans le *stratum radiatum*. La voie perforante, constituée par les axones des cellules pyramidales du cortex entorhinal projette sur CA3 dans le *stratum lacunosum moleculare*.

Les neurones de CA3 reçoivent également des projections provenant directement de la couche II du cortex entorhinal, formant ainsi la voie perforante sur les dendrites distales des cellules pyramidales de CA3 dans une couche appelée *stratum lacunosum moleculare*. Ils reçoivent également des informations en provenance indirecte du cortex par les axones des cellules granulaires du gyrus denté appelés fibres moussues. Les fibres moussues tirent leur nom de la forme particulière des boutons synaptiques situés le long de l'axone, observés par Ramon y Cajal en microscopie photonique. Cette apparence moussue s'explique par la taille importante de ces boutons (5 à 8 μm de diamètre), par leur complexité morphologique et par la présence de filopodes émanant de ces boutons (**Figure 4**). Ces boutons géants font synapses avec les cellules pyramidales de CA3 dans le *stratum lucidum* et avec des cellules moussues du l'hilus du gyrus denté, tandis que les filopodes contactent des interneurons GABAergiques dans le *stratum lucidum* de CA3 et dans le hilus (Acsády et al., 1998). Les synapses formées entre les filopodes et les interneurons GABAergiques sont impliqués dans un phénomène d'inhibition antérograde (« feedforward inhibition ») sur les cellules pyramidales de CA3 (Henze et al., 2000 ; Evstratova et Toth., 2014).

A La synapse FM-CA3**B** Fibres moussues

Excroissances épineuses

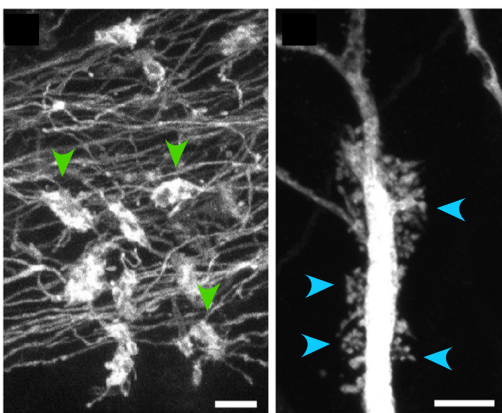
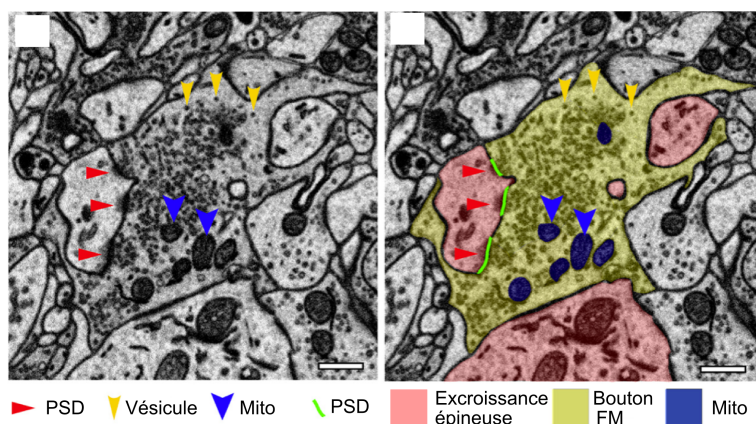
**C** La synapse FM-CA3 : microscopie électronique

Figure 4 : La synapse FM-CA3. (A) schéma illustratif d'un bouton géant issu d'une fibre moussue contactant une excroissance épineuse située sur la partie proximale d'une dendrite apicale d'une cellule pyramidale de CA3, et un filopode issu du bouton contactant un interneurone GABAergique (IN GABA). La dendrite de CA3 est représentée en bleu, la fibre moussue et le bouton en vert et l'interneurone en rose (PSD : densité post-synaptique). (B) Image de gauche : faisceau de fibres moussues marquées au Dil (flèches vertes : boutons pré-synaptiques) ; image de droite : neurone pyramidal de CA3 après un marquage au Lucifer Yellow (flèches bleues : excroissances épineuses) ; barre d'échelle : 5 µm. (C) Image de la synapse FM-CA3 en microscopie électronique d'un bouton pré-synaptique (coloré en jaune) et des excroissances épineuses contactées (colorées en rose) (PSD : densité post-synaptique ; Mito : mitochondrie) ; barre d'échelle : 500 nm. Adapté de Wilke et al., 2013.

Une fibre moussue contacte en moyenne 11 à 18 cellules pyramidales de CA3 (Claiborne et al., 1986 ; Acsàdy et al., 1998). Ces boutons géants font synapses dans le *stratum lucidum* sur la partie proximale des dendrites apicales des cellules pyramidales de CA3 au niveau d'épines dendritiques de grande taille présentant une morphologie complexe et appelées excroissances épineuses (Rollenhagen et al., 2007). Une des caractéristiques majeures des synapses formées entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3 (synapse FM-CA3) est la présence de multiples sites de libération de glutamate dans le bouton géant pré-synaptique faisant face à autant de densités post-synaptiques dans les excroissances épineuses. On rapporte la présence d'en moyenne quatorze zones actives par bouton, et chaque cellule de CA3 serait contactée par

cinquante fibres moussues (Amaral et al., 1990). Les synapses FM-CA3 sont localisées sur une distance de 100 μm de la base de la dendrite, ainsi, elles peuvent transmettre une forte excitation à proximité de la région somatique de génération des potentiels d'action dans la cellule pyramidale de CA3 (Stuart et al., 1997).

Les cellules pyramidales de CA3 font synapse avec différents neurones au sein même de l'hippocampe sur d'autres cellules de CA3 par les voies associatives et commissurales et sur les cellules pyramidales de CA1 à travers les collatérales de Schaffer. Ces cellules peuvent également projeter sur les cellules moussues situées dans le hilus. Les cellules moussues projettent elles mêmes sur les cellules granulaires permettant ainsi d'exercer un rétrocontrôle sur l'activité des cellules granulaires du gyrus denté (Scharfman et al., 2007 ; Myers et Scharfman, 2011). Les cellules pyramidales de CA3 envoient également des projections dans d'autres noyaux situés en dehors de l'hippocampe, comme les noyaux latéraux et médians du septum et la branche verticale de la bande diagonale de Broca qui fournit en retour une innervation cholinergique et GABAergique vers l'hippocampe (Gaykema et al., 1991 ; Risolt et Swanson, 1997).

La voie FM-CA3 est essentielle à la formation de la mémoire et se comporte comme un filtre passe-haut permettant de traduire des signaux codés de façon dense en provenance du cortex en signaux filtrés plus pertinents. Ainsi, la synapse FM-CA3 se comporte comme un « détonateur conditionnel » dépendant du patron d'activité pré-synaptique des cellules granulaires (Henze et al., 2002 ; Bischofberger et al., 2006). Le réseau impliquant cette synapse participe à l'encodage de profils d'activité de manière séparée pour chaque information distincte encodée. Cet encodage est appelé « pattern separation » (Guzowski et al., 2004 ; Treves et Rolls, 1992).

La fonction particulière de cette synapse dans le réseau hippocampique s'explique par les caractéristiques singulières de transmission synaptique et de plasticité synaptique dont elle dispose (Henze et al., 2000 ; Nicoll et Schmitz, 2005). En effet, cette synapse se distingue des autres synapses de l'hippocampe par ses caractéristiques de plasticité à court-terme comme la facilitation en paire et la facilitation en fréquence (Salin et al., 1996) (**Figure 5**). La réponse d'une synapse à des stimulations répétées diffère d'une synapse à l'autre et peut engendrer une dépression ou une facilitation à court-terme de la transmission synaptique. A la synapse FM-CA3, la facilitation en paire peut être trois fois plus importante que dans le cas d'une synapse classique présentant ce type de plasticité. La facilitation en fréquence est quant à elle absente des synapses classiques. A la

synapse FM-CA3, elle se traduit par une augmentation des réponses synaptiques lors du passage de faibles fréquences de stimulations (inférieur à 0.05 Hz) à des fréquences moyennes (1 Hz par exemple). L'amplitude des réponses synaptiques peut ainsi être multipliée par vingt au cours de cette forme de plasticité. Ces deux formes de facilitation, en paire et en fréquence, représentent des formes de plasticité à court-terme d'expression pré-synaptique. Les caractéristiques de plasticité pré-synaptique dépendent de la probabilité de libération de neurotransmetteur. A de faibles fréquences de stimulation, la probabilité de libération de glutamate est très faible à la synapse FM-CA3. Ces formes de facilitation sont permises par une augmentation de la probabilité de libération vésiculaire de glutamate lors de stimulations rapprochées de l'axone, se traduisant ensuite par une augmentation de l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs mesurés (Jonas et al., 1993 ; Lawrence et al., 2004).

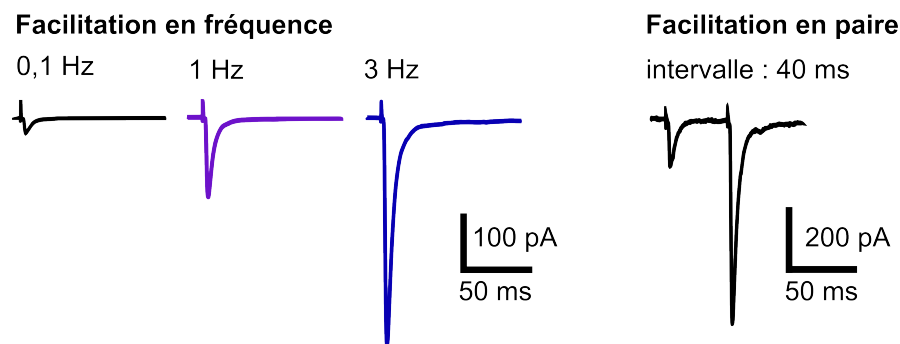


Figure 5 : Plasticité à court-terme à la synapse FM-CA3. Traces moyennées de courants post-synaptiques excitateurs après stimulation minimale d'une fibre moussue à 0,1 Hz, 1 Hz ou 3 Hz illustrant la facilitation en fréquence à la synapse FM-CA3, ou lors de 2 stimulations rapprochées illustrant la facilitation en paire (intervalle entre 2 stimulations : 40 ms).

Les synapses associatives et commissurales présentent elles aussi des propriétés de facilitation en paire mais bien moins prononcées que les synapse FM-CA3 (Salin et al., 1996 ; Dobrunz et al., 1999). Les terminaisons des fibres moussues sur les interneurons expriment une facilitation à court-terme de plus faible amplitude qu'à la synapse FM-CA3, voir parfois une dépression (Jonas et al., 1993 ; Toth et al., 2000).

Les différentes formes de plasticité synaptique dépendent de caractéristiques intrinsèques à chaque type de synapse. La transmission synaptique à la synapse FM-CA3 est fortement inhibée par l'activité tonique de protéines Gi/o dans le bouton synaptique liée à l'activation des récepteurs de l'adénosine de type A1 (Moore et al., 2003). L'inhibition des récepteurs A1 ou directement des protéines Gi/o permet d'augmenter la probabilité de libération de glutamate au cours de la transmission synaptique basale, entraînant une diminution de la facilitation à court-terme à cette synapse. Certains

autorécepteurs du glutamate sont également exprimés à la terminaison pré-synaptique des synapses FM-CA3 et participent aussi à la modulation de la transmission synaptique. Les récepteurs métabotropiques mGluR2 sont exprimés dans la zone préterminale de la terminaison synaptique, à distance de la zone active et de la fente synaptique. Une fois activés, ils inhibent fortement la transmission synaptique (Yokoi et al., 1996). Le mode d'activation de ces récepteurs est difficile à établir en raison de leur distance de la fente synaptique, mais leur activation pourrait avoir lieu lors de stimulations à fortes fréquences où la libération vésiculaire est facilitée et où le glutamate peut alors diffuser à distance des sites de libération (Toth et al., 2000 ; Scanziani et al., 1997), ou encore lors de l'activation de synapses voisines (Vogt et Nicoll, 1999). Les récepteurs mGluR2 sont également impliqués dans une forme de dépression à long-terme à la synapse FM-CA3, phénomène qui se traduit par une diminution de la probabilité de libération de glutamate (Kobayashi et al., 1994). Un autre type de récepteur du glutamate, les rKA, sont également exprimés dans la terminaison synaptique de la synapse fibre FM-CA3 (Wisden et Seeburg, 1993). Ces récepteurs participent aussi aux plasticités pré-synaptiques et leur activation permet d'augmenter la probabilité de libération de glutamate (voir chapitre III-B-6-c) (Contractor et al., 2000, 2001 ; Schmitz et al., 2000, Pinheiro et al., 2007). Lors de trains de stimulations à forte fréquence, des canaux potassiques peuvent être inhibés de façon dépendante de l'activité et permettent ainsi d'élargir les potentiels d'action pré-synaptiques, participant ainsi à la facilitation à court-terme de la transmission (Geiger et Jonas., 2000). Ces deux modes de facilitation permettent d'augmenter la transmission synaptique sur une échelle de temps comprise entre la milliseconde et la seconde.

A une échelle de temps intermédiaire, de l'ordre de la minute, la transmission synaptique à la synapse FM-CA3 peut être augmentée par la potentialisation post-tétanique ou par une autre forme de plasticité appelée DPE (depolarization-induced potentiation of excitation) (Carta et al., 2014). Cette DPE met en jeu un mécanisme de signalisation rétrograde dans laquelle l'activité post-synaptique induit la production d'acide arachidonique de façon dépendante du Ca^{2+} . L'acide arachidonique agit alors sur les terminaisons pré-synaptiques en inhibant des canaux potassiques, permettant ainsi l'élargissement des potentiels d'action et la facilitation de la transmission synaptique.

La synapse FM-CA3 est également le siège de formes de plasticité synaptique à long-terme telles que la potentialisation à long-terme (PLT). De manière générale, les synapses peuvent faire l'objet de plusieurs formes de PLT, ayant toutes pour

conséquence d'augmenter l'efficacité de la transmission synaptique à long-terme (pendant au minimum plusieurs dizaines de minutes). Ces formes de plasticité peuvent mettre en jeu de multiples mécanismes moléculaires d'induction et d'expression et peuvent impliquer les compartiments pré- et post-synaptiques. La forme de PLT la plus largement décrite dans la littérature est la PLT des synapses formées entre les collatérales de Schaffer et les cellules pyramidales de CA1. A ces synapses, comme dans beaucoup de synapses classiques du système nerveux central, l'induction de la PLT nécessite l'activation de récepteurs NMDA post-synaptiques et est exprimée dans le compartiment post-synaptique par l'augmentation du nombre de rAMPA à la synapse. Il en découle alors une augmentation de l'efficacité synaptique. La PLT des courants post-synaptiques excitateurs médiés par les rAMPA dépendante des rNMDA n'est pas observée aux synapses FM-CA3 (Nicoll et Schmitz, 2005) probablement du fait d'une moindre expression des rNMDA (Rebola et al., 2011). Néanmoins, il existe une autre forme de PLT d'expression post-synaptique à la synapse FM-CA3. Les courants médiés par les rNMDA peuvent être potentialisés de manière sélective par des bouffées de stimulations pré-synaptiques (Kwon et Castillo, 2008 ; Rebola et al., 2008). Cette PLT des rNMDA requiert l'activation des rNMDA, des récepteurs à l'adénosine A_{2A} et des récepteurs métabotropiques mGluR5. Elle nécessite également l'activation de la PKC et de Src. Cette PLT des rNMDA permet de rendre la synapse FM-CA3 compétente pour l'expression d'une PLT des courants médiés par les rAMPA dépendante des rNMDA (Rebola et al., 2011).

Aux synapses FM-CA3, la forme de PLT prédominante est induite et exprimée dans la terminaison pré-synaptique. Cette PLT est indépendante des rNMDA, et l'induction pourrait impliquer l'activation de canaux calciques de type R dépendants du voltage (Day et al., 1996 ; Breustedt et al., 2003 ; Dietrich et al., 2003) mais ne semble pas impliquer des canaux calciques de type P/Q et N (Castillo et al., 1994). L'induction de cette PLT est facilitée par l'activation de rKA pré-synaptiques (voir chapitre III-B-6-c). Cette PLT se traduit par une augmentation durable de la probabilité de libération de glutamate à la synapse (Zalutsky et Nicoll, 1990 ; Staubli et al., 1990 ; Xiang et al., 1994 ; Weisskopf et Nicoll, 1995). Cette dernière est dépendante de l'AMP cyclique et de l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Huang et al., 1994 ; Weisskopf et al., 1994). Certaines formes d'adenylylate cyclase activées par la Ca^{2+} /calmoduline (AC1 et AC8) sont justement impliquées dans ces PLT (Villacres et al., 1998 ; Wang et al., 2003).

Ainsi, les synapses FM-CA3 présentent une riche variété de plasticités synaptiques très différentes de celles retrouvées sur les autres afférences de CA3. Les disparités entre synapses concernent également leur morphologie et leur localisation sur l'arborisation dendritique. Ces caractéristiques peuvent être déterminées par le stock de protéines exprimées dans les compartiments pré- et post-synaptiques.

C. Développement de l'hippocampe

1) Migration neuronale et ségrégation des différents types neuronaux

La spécification cellulaire nécessaire à la détermination des différents types de neurones dans l'hippocampe se déroule au cours de l'embryogenèse. Au cours du développement de l'hippocampe s'établissent des sous-populations neuronales qui sont destinées à un programme de développement spécifique. Ce dernier définit le moment de la naissance, le mode de migration, la maturation, la connectivité et la synaptogenèse. Ces sous-populations partagent une localisation spécifique et la présence de marqueurs moléculaires disposés en couches. Ce programme de spécification neuronale et synaptique est étroitement lié à la fonction de l'hippocampe chez l'adulte (Deguchi et al., 2011). La spécification des différentes sous-régions de l'hippocampe se produit tôt au cours du développement, avant même l'expression de marqueurs spécifiques de chaque sous-région (Tole et Grove, 2001).

Le développement de l'hippocampe des rongeurs dans le télencéphale dorso-médian commence dès E10, au moment où des facteurs sont sécrétés d'une région appelée ourlet cortical (**Figure 6**). Ceux-ci permettent l'induction, la spécification et l'amplification du neuroépithélium pour la production du tissu cortical (Hoch et al, 2009 ; Subramanian et Tole, 2009). Au cours de la neurogenèse des neurones pyramidaux de l'hippocampe, comme dans le cortex, les cellules progénitrices du neuroépithélium (cellules gliales radiaires) des zones ventriculaires se divisent pour produire des neurones qui vont alors migrer sur un plan radial vers leurs régions respectives. Des processus cellulaires provenant de cellules gliales radiaires servent de guide à la migration de ces neurones dans une région nommée zone intermédiaire. Ces derniers se détachent ensuite de ces guides pour s'implanter dans leurs couches respectives (Gupta et al., 2002). Les cellules pyramidales de la corne d'Ammon sont générées à partir d'une large bande de neuroépithélium, tandis que les cellules granulaires du gyrus denté proviennent d'une étroite zone du neuroépithélium adjacent à la fimbria (Danglot et al., 2006). Les

interneurones de l'hippocampe sont quant à eux issus des éminences ganglionnaires médiales et caudales situées dans une partie ventrale plus lointaine du télencéphale, et nécessitent des temps de migration plus importants pour atteindre l'hippocampe (Marin et al., 2010). Des études moléculaires menées à des stades précoces ont mis en évidence que certains marqueurs spécifiques pour différentes régions de l'hippocampe sont déjà exprimés dès le stade de migration cellulaire de la zone ventriculaire vers la zone intermédiaire puis vers les couches respectives de l'hippocampe, et le seront jusqu'à l'âge adulte. Parmi ces marqueurs, on trouve notamment la sous-unité GluK4 des rKA dont l'expression est détectable dès E15 spécifiquement dans les neurones qui appartiendront à la couche pyramidale de CA3 de l'hippocampe (Tole et al., 1997).

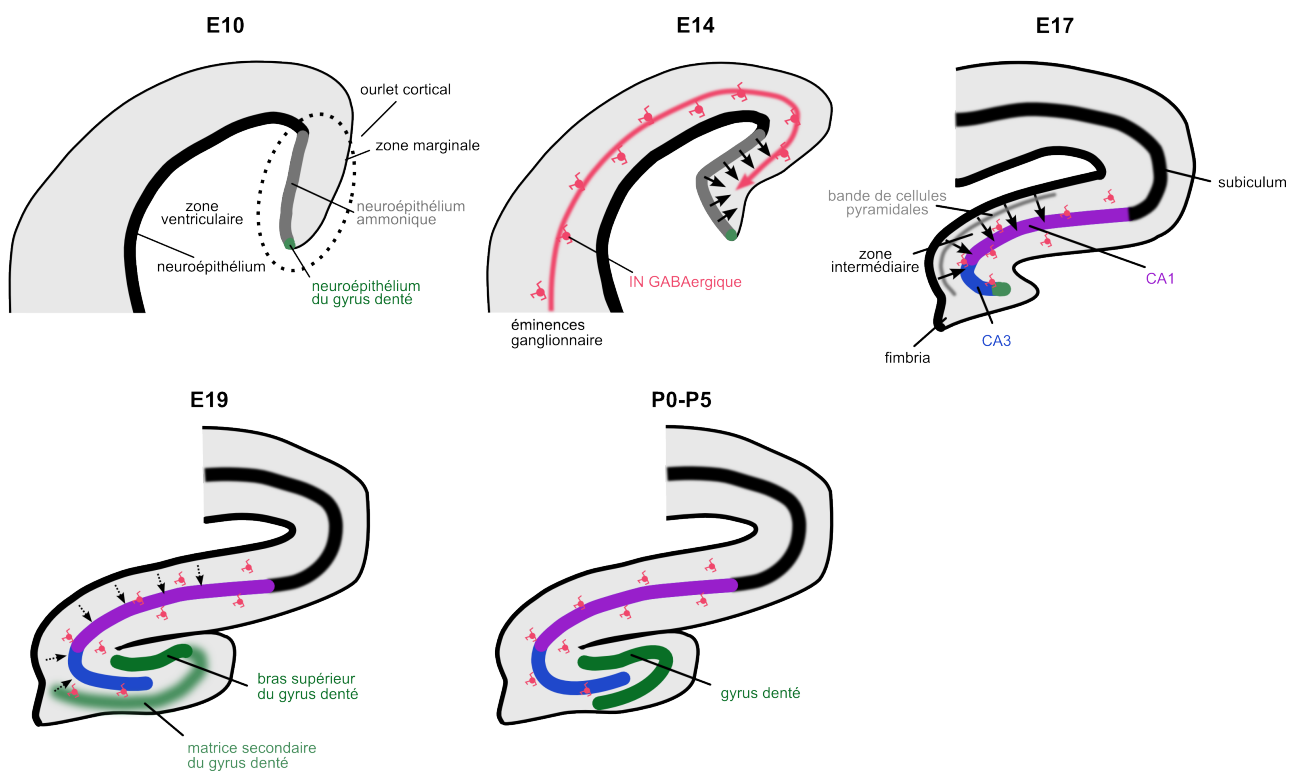


Figure 6 : développement de l'hippocampe. L'hippocampe se développe à partir de l'ourlet cortical où des cellules progénitrices du neuroépithélium formeront les neurones pyramidaux de la corne d'Ammon (neuroépithélium ammonique) et les cellules granulaires du gyrus denté (neuroépithélium du gyrus denté). Les interneurones de l'hippocampe migrent quant à partir des éminences ganglionnaires.

Un certain nombre de molécules intracellulaires et extracellulaires influencent cette migration. La migration des neurones pyramidaux et des interneurones GABAergiques pourrait subir des régulations réciproques : la libération de glutamate par les cellules de Cajal-Retzius faciliterait la migration des interneurones tandis que la libération de GABA par les interneurones faciliterait la migration des neurones glutamatergiques (Manent et al., 2005, 2006). Des mutations de gènes associés à la migration neuronale peuvent

entraîner des défauts de lamination de la couche de cellules pyramidales de CA3 (Belvindrah et al., 2014). Ainsi, la mutation de gènes codant pour certaines protéines tubulines ou pour des protéines associées aux microtubules peut provoquer l'apparition d'une seconde couche de cellules pyramidales de CA3 (protéine doublecortine, spinophiline, Usp9x) (Francis et al., 1999 ; Gleeson et al., 1999 ; Friocourt et al., 2005 ; Bielas et al., 2007 ; Stegeman et al., 2013).

Le processus de migration neuronale suit une séquence temporelle étroitement liée à la connectivité cellulaire (Deguchi et al., 2011). Les différentes connexions s'établissent plus tardivement et ne deviennent matures qu'après la naissance, une fois mises en place dans un réseau fonctionnel. Au cours de la migration des neurones pyramidaux de CA3, ceux-ci vont s'immobiliser transitoirement dans la zone intermédiaire avant de finir leur migration dans la région de CA3. Il a été avancé que ce ralentissement de la migration permettrait de synchroniser les cellules de CA3 avec le développement des fibres moussues des cellules granulaires du gyrus denté (celui-ci commençant à E17-E18). En effet, la majeure partie des cellules granulaires ne naît qu'après les cellules pyramidales de CA3, et les deux bras du gyrus denté ne sont totalement établis qu'à un stade post-natal précoce (Danglot et al., 2006). Néanmoins, certaines cellules granulaires naissent à des stades plus précoces de développement embryonnaire (E12) et une connectivité spécifique est mise en place entre les cellules de CA3 et ces cellules granulaires, ainsi qu'entre les cellules de CA3 et les cellules de CA1 nées à ce stade (Deguchi et al., 2011). Il existe ainsi une synchronisation de la production des différents types cellulaires avec la formation de microcircuits à des stades précoces de développement. Certains mutants présentent tout de même des défauts de développement du gyrus denté sans conséquence majeure sur le développement de la couche CA3, comme les souris *Cxcr4* et *Disc1* chez lesquelles les cellules granulaires ne sont pas bien guidées vers la région du gyrus denté mais où la lamination de CA3 reste intacte (Lu et al., 2002 ; Kvaajo et al., 2011 ; Meyer et Morris, 2009). Ceci suggère que d'autres mécanismes interviennent dans ce processus de lamination.

2) Guidage axonal et organisation laminaire des fibres moussues

Un certain nombre de molécules présentent une localisation subcellulaire très spécifique au cours du développement et participe à la mise en place de l'organisation laminaire des différentes afférences le long de l'arborisation dendritique des neurones de CA3. Ces molécules comprennent des protéines membranaires ou sécrétées dans la

matrice extracellulaire qui constituent des signaux répulsifs ou attractifs au cours de la croissance axonale. Le profil d'expression hautement régulé de ces protéines permet ainsi la ségrégation des différentes afférences sur les cellules pyramidales de CA3.

Certains modèles de souris mutantes ne présentent pas de défaut majeur de lamination de la couche de cellules pyramidales de CA3 ou du gyrus denté mais présentent des perturbations plus subtiles du guidage des fibres moussues dans la région de CA3. Ces défauts sont associés à différentes molécules de guidage axonal ou d'adhérence. En effet, l'organisation laminaire des afférences associatives et commissurales, de la voie perforante et des fibres moussues sur les cellules pyramidales de CA3 s'explique notamment par la présence de signaux moléculaires locaux et de protéines d'adhérence interagissant avec des protéines axonales spécifiques à chaque type d'afférences ou avec des protéines présentes dans la matrice extracellulaire.

a) Serum response factor (SRF)

La protéine SRF est un facteur de transcription connu pour intervenir dans les processus de croissance des neurites, le guidage axonale et l'adressage synaptique. Cette protéine induit l'activation de gènes de réponse précoce comme *c-Fos* en coopérant avec des cofacteurs comme des protéines de la famille de la myocardine (Norman et al., 1988 ; Cen et al., 2004). L'activation de la protéine SRF est étroitement liée à la dynamique du cytosquelette d'actine. En effet, la polymérisation de l'actine-G en actine-F permet la translocation dans le noyau des cofacteurs de la protéine SRF qui peuvent alors se dimériser avec la protéine SRF et activer la transcription de gènes d'activation précoce (Cen et al., 2004). La répression de l'expression de la protéine SRF est responsable de l'altération de l'organisation laminaire des fibres moussues dans le *stratum lucidum* (Knöll et al., 2006). Celles-ci se localisent alors de façon ectopique dans la couche de cellules pyramidales et forment des synapses aberrantes sur le soma de ces cellules. Ce défaut de guidage axonal est associé à une diminution de la croissance des neurites et à une réduction du mécanisme de répulsion axonale mettant en jeu les protéines ephrine-A et sémaphorine.

b) Les N-CAM

La protéine N-CAM-180 est fortement exprimée par les cellules granulaires du gyrus denté au cours du développement et perdure chez l'adulte. Les protéines N-CAM sont des protéines d'adhérence se liant à l'héparane sulfate, à des protéoglycanes de la

matrice extracellulaire ou à d'autres N-CAM par une liaison homophilique. La N-CAM-180 est une isoforme fortement glycosylée par des chaînes poly-sialates, des glucides acides chargés négativement. La déglycosylation de la N-CAM altère l'organisation laminaire des fibres moussues dans le *stratum lucidum* et engendre l'apparition de fibres moussues ectopiques dans la couche de cellules pyramidales de CA3 (Seki et Rutishauser et al., 1998).

c) Sémaphorines, neuropilines, plexines et élagage axonal

Dans le circuit neuronal en développement, les axones en croissance forment initialement de multiples projections collatérales pour assurer l'innervation de toutes leurs cibles potentielles. Lors de ce processus, des connexions non pertinentes sont également établies et nécessitent par la suite d'être raffinées et éliminées par un processus d'élagage axonal (O'Leary et al., 1990).

Au cours du développement de l'hippocampe, les fibres moussues sont organisées en deux faisceaux : un faisceau supra-pyramidal contactant la partie proximale des dendrites apicales des cellules pyramidales de CA3 dans le *stratum lucidum* et un faisceau infra-pyramidal dans le *stratum oriens* contactant les dendrites basales. A P5, ce dernier faisceau s'étend jusqu'à la courbure de la région CA3 puis se rétracte partiellement chez l'adulte jusqu'à la région CA3c (Claiborne et al., 1986) (**Figure 7**). Cette rétraction fait intervenir la protéine sécrétée sémaphorine 3F (Sema3F) qui se lie aux récepteurs neuropiline2 et plexine-A3 (Bagri et al., 2003).

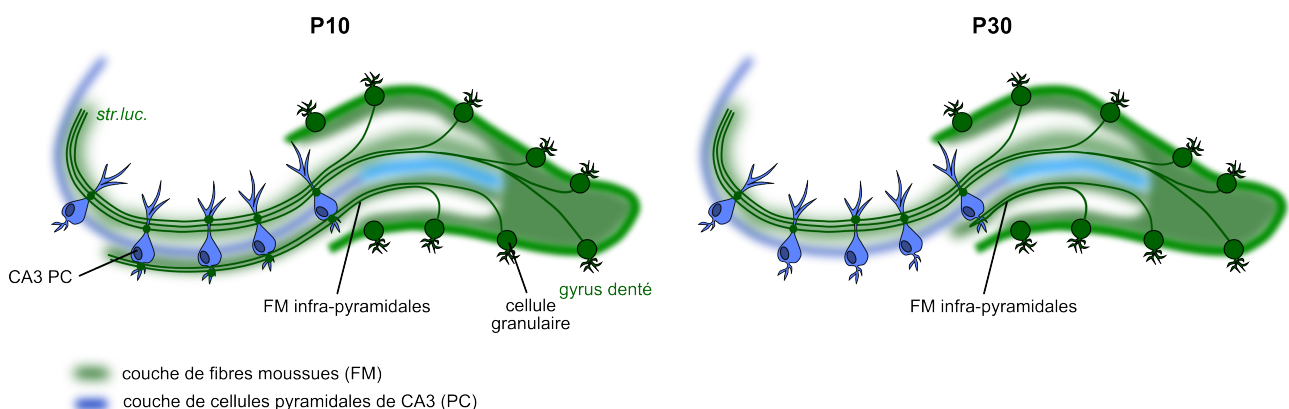


Figure 7 : Elagage axonal des fibres moussues infra-pyramidales dans CA3. Au cours du premier mois post-natal la couche de fibres moussues (FM) infra-pyramidale, située sous la couche de cellules pyramidales de CA3, se rétracte jusqu'à la région CA3c.

La famille des sémaphorines constitue un ensemble de molécules de guidage importantes au cours de la croissance axonale. Celles-ci peuvent être soit sécrétées dans la matrice extracellulaire soit liées à la membrane plasmique (Negishi et Katoh, 2005). Les

molécules de guidage axonale peuvent être divisées en deux groupes : les molécules attractives facilitant la croissance de l'axone et les molécules répulsives entraînant sa rétraction. Les sémaphorines appartiennent à la catégorie des molécules répulsives, au même titre que d'autres classes de protéines comme les éphrines. Les sémaphorines agissent comme des ligands se liant à leurs récepteurs membranaires : les plexines et les neuropilines. Ces dernières sont des protéines transmembranaires à un domaine membranaire qui une fois activées par la liaison à la sémaphorine, sont responsables du déclenchement de cascades de signalisations intracellulaires conduisant à la rétractation de l'axone. Les plexines et les neuropilines s'associent entre elles et forment un complexe protéique dans lequel la neuropiline constitue le domaine de liaison à la sémaphorine, la plexine participant à la transduction du signal intracellulaire. Certaines cascades de signalisation entraînant la rétraction de l'axone ont été identifiées et font intervenir l'activation d'enzymes GTPases de la famille des protéines Rho provoquant une réorganisation des filaments d'actine et l'endocytose de la membrane plasmique au niveau du cône de croissance de l'axone (Jurney et al., 2002). Ces cascades font également intervenir l'activité de protéines tyrosines kinase dans ce processus (Negishi et al., 2005).

Dans la région CA3 de l'hippocampe, la protéine Sema3F est fortement exprimée par des cellules positives pour le neuropeptide Y de la région infra-pyramidale et l'expression de la plexine-A3 est limitée aux cellules granulaires de la couche interne du gyrus denté d'où les cellules granulaires envoient une importante partie de leurs axones vers la couche infra-pyramidale (Bagri et al., 2003). Ainsi, au cours des premiers jours post-natals, la Sema3F se lie au complexe plexine-A3-neuropiline2 spécifiquement sur les axones des fibres moussues de la couche infra-pyramidale provoquant alors la rétraction de l'axone et la réduction de la couche de fibres moussues infra-pyramidales (Bagri et al., 2003 ; Liu et al., 2005).

D'autres protéines de la famille des plexines et des sémaphorines, participent également à l'organisation laminaire des fibres moussues dans le *stratum lucidum* : les plexine-A2 et A4 et la sémaphorine 6A (Sema6A) (Suto et al., 2007). L'expression de la plexine-A4 dans les fibres moussues prévient la localisation ectopique de fibres moussues en dehors du *stratum lucidum* de part l'expression dans toute la région CA3 de son ligand transmembranaire, la Sema6A. Mais la localisation des fibres moussues dans le *stratum lucidum* est tout de même permise par l'atténuation de l'activité répulsive de la Sema6A

qui se lie à la plexine-A2 exprimée par les cellules pyramidales de CA3 spécifiquement dans la partie proximale de leurs dendrites apicales. La suppression de la plexine-A2 entraîne un changement de la localisation des fibres moussues supra-pyramidales vers une localisation intra et infra-pyramidale. La suppression de la plexine A4 entraîne quant à elle une extension inappropriée des fibres moussues en dehors du *stratum lucidum*.

La protéine transmembranaire, Semaphorine 6B (Sema6B), un autre ligand des plexines-A2 et A4, participe également à la ségrégation des fibres moussues dans le *stratum lucidum* de CA3 (Tawarayama et al., 2010).

d) Eph, éphrines et élagage axonal

Il existe un mécanisme de signalisation supplémentaire participant à ce processus de répulsion des fibres moussues au cours de la croissance axonale : le système éphrine, Eph. La voie de signalisation classique des protéines Eph et éphrine fait normalement intervenir une protéine éphrine transmembranaire ou liée à la membrane par une molécule glycosylphosphatidylinositol comme le ligand de son récepteur tyrosine kinase : une protéine Eph transmembranaire. Les voies de signalisation mettant en jeu l'activation des récepteurs Eph sont impliquées dans le développement embryonnaire, le guidage axonal, l'adhérence et la migration cellulaire (Kullander et Klein, 2002).

Au cours du développement prénatal, la protéine éphrine-B3 se comporte comme un récepteur à la base de la voie de signalisation de la répulsion axonale des fibres moussues (Xu et Henkemeyer, 2009). La protéine EphB sert alors de ligand à la protéine éphrine-B2 pour activer une cascade de signalisation rétrograde. Cette voie de signalisation fait intervenir un mécanisme dépendant du couplage à la protéine adaptatrice Grb4, protéine à domaine SH2/SH3, impliquée dans la réorganisation du cytosquelette. Le domaine SH3 de Grb4 permet l'interaction de l'éphrine-B3 avec la protéine Dock180 et l'activation de l'effecteur PAK permettant la rétraction axonale (Xu et Henkemeyer, 2009).

Une autre protéine Eph, la protéine EphA4 présente un profil d'expression très précis dans les cellules granulaires le long du gyrus denté chez l'individu juvénile (Xu et Henkemeyer, 2009 ; Galimberti et al., 2010). Cette protéine participe à différents mécanismes de spécification des terminaisons axonales des fibres moussues à des périodes postnatales précoces critiques à travers la formation de complexes synaptiques présentant une carte tomographique précise (Galimberti et al., 2010).

e) Les nectines

Les protéines nectine-1 et nectine-3 sont également enrichies aux synapses FM-CA3 (Mizoguchi et al., 2002). La famille des nectines constitue une famille de protéines d'adhérence indépendantes du Ca^{2+} appartenant à la superfamille des immunoglobulines, coopérant étroitement avec les cadhérines. A la synapse FM-CA3, la protéine nectine-2 est localisée sur la membrane pré-synaptique et forme un complexe d'adhérence asymétrique en s'associant à la protéine nectine-3 sur la membrane post-synaptique au niveau des *puncta adherentia* (Mizoguchi et al., 2002). Ce complexe trans-synaptique d'adhérence est nécessaire à la formation des *puncta adherentia* à la synapse FM-CA3 critiques au maintien de la synapse (Honda et al., 2006). Chez les souris knockout pour ces protéines, la trajectoire prise par les fibres moussues est altérée au cours de la croissance axonale et les fibres moussues ne sont plus strictement ségréguées dans le *stratum lucidum* (Honda et al., 2006).

f) Les cadhérines

La formation des synapses FM-CA3 nécessite une protéine d'adhérence trans-synaptique, la protéine cadhérine-9, une cadhérine de type II spécifiquement exprimée par les cellules pyramidales de CA3 et les cellules granulaires du gyrus denté (Williams et al., 2011). Les cadhérines sont des protéines d'adhérence à un domaine transmembranaire. Le domaine extracellulaire N-terminal des cadhérines classiques de type I et de type II présente cinq domaines *extracellular cadherin* (EC) très conservés et trois sites de liaison pour le Ca^{2+} . Les domaines EC interviennent dans les liaisons entre deux cadhérines. Les cadhérines peuvent se lier entre elles en *cis* et en *trans* par des liaisons homophiliques dépendantes du Ca^{2+} extracellulaire. Une fois liées au Ca^{2+} , les domaines extracellulaires se dimérisent, se rigidifient et se stabilisent. Elles sont également étroitement liées au cytosquelette d'actine de par leurs interactions intracellulaires avec différentes isoformes de protéines caténines (Tepass et al., 2000). Les caténines sont des protéines cytosoliques pouvant être divisées en trois groupes : les protéines de la famille des β -caténines (β -caténine et plakoglobine), les α -caténines, et les protéines de la famille des caténines p120. La partie distale du domaine intracellulaire des cadhérines comprend un site de liaison aux β -caténines, tandis que la partie proximale contient un site de liaison aux protéines de la famille des caténines p120. Les α -caténines se lient quant à elles aux cadhérines de façon indirecte, par l'intermédiaire de la β -caténines. A la synapse, les cadhérines de type I, telles que la N-cadhérine, et de type II telles que les cadhérines 8 et

9, forment des complexes trans-synaptiques d'adhérence entre les éléments pré- et post-synaptiques. Dans le système nerveux central, les cadhérines présentent souvent une organisation laminaire régionale stricte (Redies et al., 1993 ; Yamagata et al., 1995 ; Suzuki et al., 1997 ; Huntley et Benson, 1999). L'expression et la distribution subcellulaire des cadhérines varient pendant l'état de développement des synapses (Salinas et Price, 2005).

A la synapse FM-CA3, les cadhérines-9 exprimées en pré- et en post-synaptique forment un complexe trans-synaptique d'adhésion permettant une reconnaissance bidirectionnelle des éléments pré- et post-synaptiques. In vivo, le knockdown de cette protéine entraîne de sévères altérations de la morphologie des synapses FM-CA3 suggérant que cette protéine joue un rôle dans la spécification synaptique de cette synapse au cours du développement (Williams et al., 2011). Aucune étude des propriétés de transmission synaptique n'a été menée à ce jour sur ce modèle.

D'autres types de cadhérines sont également exprimées à la synapse FM-CA3, comme la N-cadhérine et la cadhérine-8 (Mizoguchi et al 2002; Uchida et al., 1996 ; Bekirov et al., 2008). La cadhérine-8 est nécessaire au guidage axonal, à l'organisation laminaire des fibres moussues et à leur différenciation tandis que la N-cadhérine n'est pas nécessaire à la croissance axonale mais participe à l'organisation laminaire des fibres moussues et à l'arborisation dendritique des cellules de CA3 (Bekirov et al ; 2008).

En plus de leur participation à l'adhérence à proprement parler, les cadhérines interagissent avec de nombreuses molécules synaptiques et offrent un lien moléculaire entre l'adhérence cellulaire et la signalisation synaptique. Le complexe protéique composé des cadhérines et de leurs caténines associées est en lien avec le cytosquelette et permet de moduler la stabilité des synapses et de synchroniser les changements de structure entre les éléments pré- et post-synaptiques. La localisation et la fonction de la β -caténine sont dynamiquement régulées par l'activité synaptique (Murase et al., 2002).

D. Protéines d'adhérences et spécification synaptique

Les synapses chimiques sont classées en fonction du type de neurotransmetteur engagé dans la transmission synaptique (par exemple l'adrénaline, l'acétylcholine, le GABA ou le glutamate). Aujourd'hui, nous savons que la diversité moléculaire et chimique des synapses dans le système nerveux des mammifères s'avère être beaucoup plus complexe que cette classification traditionnelle basée sur le type de neurotransmetteur

impliqué. Au sein même de chaque catégorie de synapse, il existe une importante diversité de protéines exprimées et de niveaux d'expression de chacune de ces protéines. Ces protéines comprennent des sous-unités de récepteurs, des protéines de transport vésiculaire, des protéines d'échafaudage et d'adhérence, ainsi que des protéines critiques au cours du développement et des molécules de signalisation.

La diversité des récepteurs exprimés est permise entre autre par la multiplicité de combinaisons de sous-unités pouvant composer ces récepteurs. Les rAMPA présentent une composition en sous-unités pouvant être très différente d'une région du système nerveux central à une autre (Isaac et al., 2007). La majeure partie des synapses excitatrices matures expriment des rAMPA comprenant la sous-unité GluA2, tandis qu'un grand nombre d'interneurones GABAergiques hippocampiques ou corticaux expriment des rAMPA dépourvus de cette sous-unité (Lu et al., 2009 ; Savtchouk et Liu, 2011). Une douzaine de sous-unités des rNMDA ont été identifiées à différentes synapses mais 80 combinaisons de ces sous-unités et des différents variants d'épissage des sous-unités GluN1 et GluN2 sont théoriquement possibles (Cull-Candy et al., 2004 ; Granger et al., 2011). Les récepteurs GABAergiques de type A, principaux récepteurs ionotropiques pour la transmission inhibitrice rapide, sont codés par 19 gènes distincts pouvant produire 26 sous-types de récepteurs présentant des propriétés fonctionnelles différentes (Luscher et al., 2011 ; Rudolph et al., 2001).

Enfin, dans l'hippocampe, les rKA sont reparti de manière très stricte dans les différents types de neurones et dans les différentes synapses formées sur un même neurone, en particulier dans les cellules pyramidales de CA3 (voir chapitre III-B-6). Dans les neurones pyramidaux de la couche V du néocortex, il n'existe pas une d'organisation et de ségrégation des rKA le long de l'arborisation somatodendritique (Eder et al., 2003). En effet, d'après cette étude, les rKA semblent être préférentiellement extrasynaptiques, à la fois sur le soma et tout le long de l'arborisation dendritique. Les propriétés biophysiques de ces rKA sont très différentes de celles des rKA exprimés dans les cellules pyramidales de CA3 (cinétique de décroissance rapide comparables aux courants médiés par les rAMPA), ce qui pourrait indiquer une composition en sous-unités différente. Par ailleurs ces propriétés biophysiques pourraient suggérer que ces rKA ne sont pas associés de la même manière avec des protéines auxiliaires telles que NETO. **Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la répartition subcellulaire des rKA**

dans les différents types neuronaux et en particulier dans les cellules pyramidales de CA3 de l'hippocampe sont méconnus.

Les protéines d'adhérence servent à la fois de marqueurs moléculaires nécessaires à la mise en place des circuits neuronaux au cours du développement et participent également aux connexions synaptiques établies. Un grand nombre de ces protéines sont exprimées lors du développement du système nerveux et participent à la régulation de la formation des connexions neuronales spécifiques. Nombre d'entre elles sont ensuite ségrégées dans les synapses du système nerveux mature et permettent de recruter et de stabiliser des protéines aux synapses où elle sont exprimées (Arikath et al., 2008 ; Dalva et al., 2007). Elles pourraient ainsi participer à la ségrégation synaptique de certaines protéines telles que des récepteurs des neurotransmetteurs.

Par exemple, dans le cervelet, les cellules en corbeille forment de grosses synapses sur le segment initial de l'axone des cellules de Purkinje (Ango et al., 2004). La protéine neurofascine 186, un membre de la famille de protéines d'adhérence L1, permet de guider ces processus vers le segment initial à travers une interaction avec la protéine ankyrineG⁸⁶. Dans les synapses matures, l'ankyrineG est maintenue et sert de marqueur pour ces grosses synapses (synapse pinceau).

a) Les cadhérines et récepteurs AMPA

Les complexes cadhérine/caténines participent également au recrutement et à la stabilisation de différents partenaires protéiques. Dans le système nerveux central, certains de ces partenaires sont des protéines de la zone active et de la densité post-synaptique des synapses excitatrices. Dans la zone active des boutons, les β -caténines régulent la localisation des vésicules de libération de neurotransmetteur (Bamji et al., 2003). En effet, en absence de β -caténine, le nombre de vésicules du stock vésiculaire de réserve est diminué. Dans la densité post-synaptique, certains récepteurs du glutamate interagissent avec la N-cadhérine. Parmi eux la sous-unité GluA2 de rAMPA interagit directement avec la N-cadhérine par son domaine N-terminal (Saglietti et al., 2007). Les rAMPA interagissent également indirectement avec la N-cadhérine via de multiples interactions protéiques (Nuriya et al., 2006 ; Silverman et al., 2007) (**Figure 8**). Ces interactions indirectes font notamment intervenir la protéine δ -caténine qui se lie aux protéines ABP et GRIP (AMPA-binding protein) par les domaines de liaison PDZ (Silverman et al., 2007). Ce complexe protéique permettrait de faciliter le transport vésiculaire et de stabiliser les rAMPA à la membrane (Silverman et al., 2007 ; Dunah et

al., 2005 ; Heisler et al., 2014). Une fois à la synapse, l'interaction entre la N-cadhérine et les rAMPA participerait à la stabilisation des rAMPA à la synapse (Saglietti et al., 2007). Dans l'hippocampe, la N-cadhérine est nécessaire à l'induction de la PLT (Bozdagi et al., 2000).

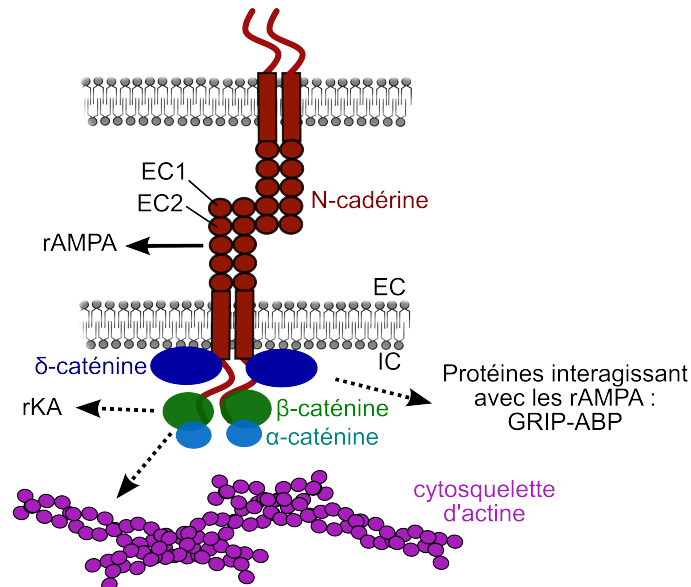


Figure 8 : N-cadhérine et interactions protéiques.

Le complexe d'adhésion N-cadhérine/β-caténine interagit également avec les rKA. Cette interaction est indirecte et fait intervenir les quatorze derniers acides aminés du domaine C-terminal de la sous-unité GluK2a des rKA (Coussen et al., 2002). Cette interaction est responsable du recrutement et de l'agrégation de rKA au niveau des zones d'adhérence impliquant les complexes N-cadhérine/β-caténine dans des systèmes hétérologues (Coussen et al., 2002). Mais aucune étude n'a cherché à déterminer les conséquences de cette interaction *in situ*, en particulier à la synapse FM-CA3 de l'hippocampe où les rKA sont strictement compartimentés. Dans cette étude, nous avons donc cherché à déterminer si le complexe N-cadhérine/β-caténine était impliqué dans cette ségrégation et dans la stabilisation des rKA à cette synapse.

Le niveau d'expression des cadhérines à la membrane, leur stabilisation et leur recyclage sont dépendants de l'activité neuronale. En effet, l'activation des rNMDA réduit l'endocytose des N-cadhérines (Tai et al., 2007). Ceci est permis par une diminution de la phosphorylation de la tyrosine 654 de la β-caténine qui favorise alors la liaison entre la N-cadhérine et la β-caténine. Il en résulte une stabilisation de la N-cadhérine à la membrane.

La stabilisation constitutive de l'association entre la N-cadhérine et la β -caténine par une mutation phosphomimétique de la tyrosine 654 en phénylalanine permet de prévenir la LTP dépendante des rNMDA en culture dissociée de neurones (Tai et al., 2007). L'endocytose des N-cadhérines contrôle ainsi l'efficacité synaptique.

b) Eph/Ephrines et récepteurs NMDA

Le système Eph/Ephrine est impliqué dans la signalisation intracellulaire au cours de la croissance axonale et de la synaptogenèse. Le récepteur tyrosine kinase EphA7 est exprimé dans la densité post-synaptique des synapses de l'hippocampe (Buchert et al., 1999). Les protéines éphrines-B peuvent être localisées dans les compartiments pré- et post-synaptiques en fonction de l'isoforme et de la région du système nerveux (Henkemeyer et al., 2003 ; Rodenas-Ruano et al., 2006). En plus d'agir comme ligand pré-synaptique des récepteurs Eph, les protéines éphrines-B peuvent ainsi moduler directement l'organisation et la fonction post-synaptique. La liaison de l'éphrine-B à la protéine EphB2 entraîne une interaction directe entre les domaines extracellulaires des rNMDA et de l'EphB2 (Dalva et al., 2000). Cette interaction permet l'agrégation de rNMDA à la synapse. Les souris knockout pour la protéine EphB2 présentent une réduction de 40% du nombre de rNMDA synaptiques (Henderson et al., 2001). Le récepteur EphB2 interagit également de manière indirecte avec les rAMPA, à travers son domaine de liaison PDZ et module leur localisation (Contractor et al., 2002 ; Kayser et al., 2006). L'activité kinase du récepteur EphB peut aussi affecter le trafic des rAMPA à la membrane en agissant sur l'endocytose (Irie et al., 2005). Ces protéines sont également impliquées dans des formes de plasticité dépendantes des rNMDA. Les souris knockout pour la protéine EphB2 présentent une réduction de la PLT dépendante des rNMDA à la synapse collatérale de Schaffer-CA1 (Grunwald et al., 2001 ; Henderson et al., 2001).

c) Neurexines/neuroligines et récepteurs NMDA

Les protéines neurexines et neuroligines sont des protéines d'adhérence trans-synaptiques dépendante du Ca^{2+} notamment impliquées dans la synaptogenèse. La neurexine est exprimée dans le bouton pré-synaptique tandis que la neuroligine est localisée dans le compartiment post-synaptique (Nguyen et al., 1997 ; Song et al., 1999). Ces protéines ont été particulièrement étudiées pour leurs fonctions dans la formation de synapses excitatrices et inhibitrices. La neuroligine 1 est préférentiellement exprimée dans les synapses excitatrices et participe à la spécification de ces synapses tandis que la protéine neuroligine 2 est localisée dans les synapses inhibitrices et participe à la mise en

place de ces contacts (Graf et al., 2004 ; Chih et al., 2005). Les neurexines et les neuroligines présentent un domaine de liaison PDZ dans leur région intracellulaire (Irie et al., 1997 ; Biederer et Sudhof, 2000). Les neuroligines peuvent ainsi se lier à des molécules de la densité post-synaptique comme la protéine PSD-95, une protéine importante dans le recrutement d'autres protéines synaptiques (Irie et al., 1997 ; Gerrow et al., 2006). La neuroligine 1 est également impliquée dans le recrutement et la stabilisation des rNMDA à la synapse (Chih et al., 2005 ; Khosravani et al., 2005 ; Budreck et al., 2013 ; Jung et al., 2010). Elle interagit directement avec les rNMDA par l'intermédiaire d'une séquence de son domaine N-terminal et permet de stabiliser les rNMDA dans la densité post-synaptique (Budreck et al., 2013). Cette interaction est également impliquée dans des phénomènes de PLT dans l'amygdale et l'hippocampe (Budreck et al., 2013 ; Jung et al., 2010).

III. Les récepteurs du glutamate de type kaïnate

Les rKA appartiennent à la famille des récepteurs du glutamate. Cette famille de récepteurs peut être divisée en deux catégories : les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) et les récepteurs ionotropiques du glutamate (récepteurs AMPA, récepteurs NMDA et récepteurs kaïnate).

A. Généralité : les récepteurs du glutamate

1) Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ces récepteurs présentent un domaine N-terminal extracellulaire, sept hélices α transmembranaires et un domaine C-terminal intracellulaire. Ces récepteurs sont classés en 3 groupes selon leurs homologies de séquence protéique, leur pharmacologie et le type de protéine G auxquels ils sont couplés (**Figure 9**). Le groupe 1 regroupe les récepteurs mGluR1 et mGluR5, couplés à la phospholipase C (PLC) via une protéine G de Gq. Le groupe 2 comprend les récepteurs mGluR2 et mGluR3 et le groupe 3, de mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Les groupes 2 et 3 sont couplés négativement à l'adénylate cyclase (AC) via les protéines G de type Gi/o.

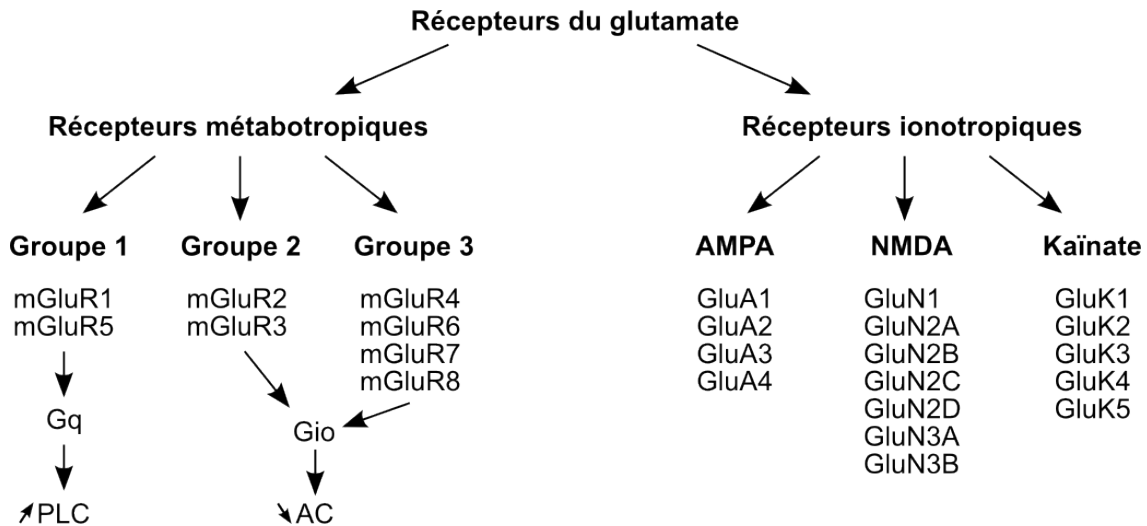


Figure 9 : Nomenclature des récepteurs du glutamate.

2) Les récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques du glutamate aussi appelés récepteurs canaux, sont regroupés en 3 familles : les rAMPA, les rNMDA et les rKA (Dingledine et al., 1999).

Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont des récepteurs canaux perméables aux cations (Na^+ , Ca^{2+} , K^+), et la perméabilité d'un ion par rapport à l'autre dépend du type de récepteurs et des modifications post-traductionnelles qu'ils peuvent subir.

Ces trois récepteurs présentent une structure commune : il s'agit de récepteurs tétramériques composés par l'assemblage de quatre sous-unités. Chaque sous-unité possède une structure primaire commune, elles comprennent quatre domaines membranaires (DM), dont trois domaines transmembranaires et une boucle réentrante (p-loop), un domaine N-terminal extracellulaire (DNT) et un domaine C-terminal intracellulaire (DCT). Le domaine de liaison au glutamate (LBD : ligand binding domain) est constitué par une partie du domaine N-terminal du récepteur (domaine S1), ainsi que par la boucle extracellulaire située entre les domaines membranaires 3 et 4 (domaine S2) (**Figure 10**).

a) Les récepteurs de type AMPA

Les rAMPA sont responsables de la transmission synaptique rapide. Ils peuvent être composés par l'assemblage de 4 sous-unités : GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4 (**Figure 9**). La composition en sous-unités des rAMPA détermine leur perméabilité calcique. Les récepteurs dépourvus de la sous-unité GluA2 sont imperméables au Ca^{2+} et présentent une importante rectification entrante de la relation courant/potentiel. Cette rectification est voltage-dépendante et est due au blocage intracellulaire du récepteur par des polyamines

(Bowie and Mayer, 1995). En présence de la sous-unité GluA2, la rectification des courants est linéaire ou sortante et le récepteur est imperméable au Ca^{2+} . Cette propriété s'explique par la présence d'une arginine à la place d'une glutamine dans le domaine membranaire 2 (Hume et al., 1991). Les quatre sous-unités peuvent exister sous deux isoformes « flip » et « flop » après épissage alternatif d'un domaine situé avant le dernier segment transmembranaire. La forme « flip » désensibilise plus lentement que la forme « flop » (Sommer et al., 1990). Les sous-unités GluA2 et GluA4 font l'objet d'un épissage alternatif dans la partie C-terminale, donnant lieu à des versions longues ou courtes des sous-unités (Dingledine et al., 1999).

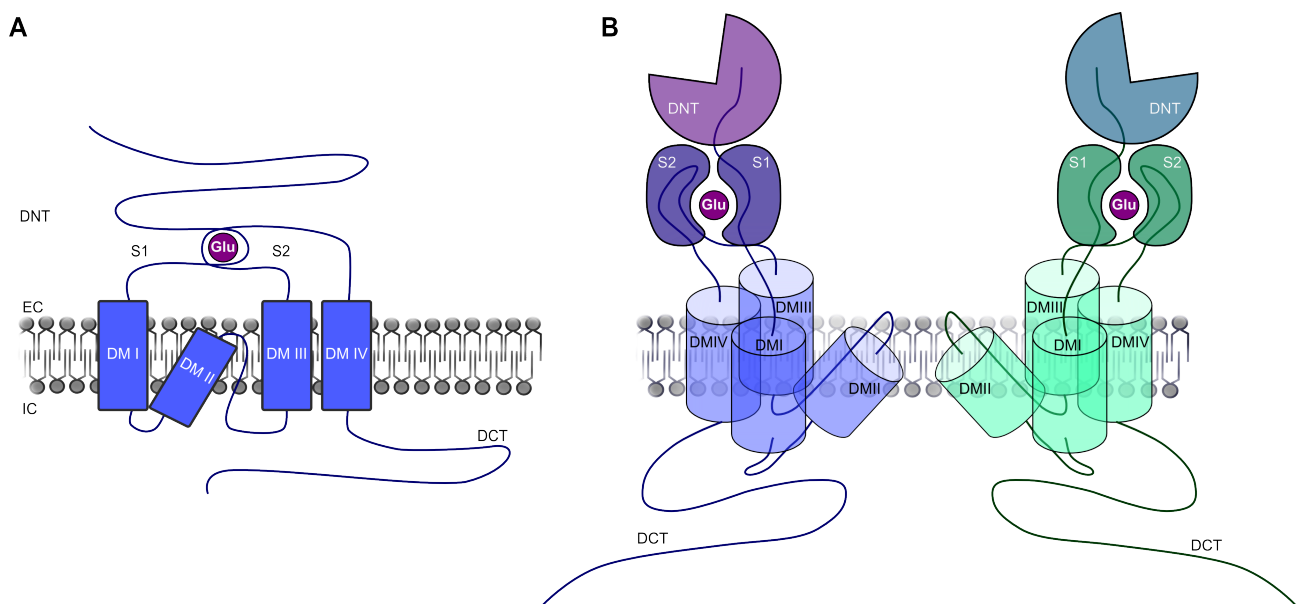


Figure 10 : Structure des récepteurs ionotropiques du glutamate. (A) Structure primaire d'une sous-unité ; **(B)** représentation de deux sous-unités et des différents domaines : DM : domaine membranaire ; DNT : domaine N-terminal ; DCT : domaine C-terminal.

b) Les récepteurs de type NMDA

La famille des récepteurs NMDA est composée de sept sous-unités : GluN1, GluN2A à D et GluN3A et B (Dingledine et al., 1999) (**Figure 9**). La sous-unité GluN2A est une sous-unité obligatoire pour l'assemblage de rNMDA fonctionnels (McIlhinney et al., 1996). Il existe trois sites indépendants d'épissage alternatif pour la sous-unité GluN1 (Zukin and Bennett, 1995) générant ainsi huit sous-unités GluN1. L'activation des rNMDA nécessite la liaison simultanée du glutamate et d'un co-agoniste (glycine, D-sérine) (Kleckner and Dingledine, 1988). De plus, contrairement aux rAMPA et kaïnate, le pore des rNMDA est bloqué par le Mg^{2+} extracellulaire pour des potentiels de membrane de repos. Ces récepteurs sont également plus fortement perméables au Ca^{2+} que les rAMPA et kaïnate (Ascher and Nowak, 1988).

B. Les récepteurs de type kaïnate

1) Clonage et structure

a) Clonage et structure primaire des sous-unités

Les sous-unités des rKA ont été clonées au début des années 1990 en utilisant des sondes d'hybridation de faible affinité pour les sous-unités des rAMPA (Bettler et al., 1990 ; Egebjerg et al., 1991 ; Lomeli et al., 1992 ; Sommer et al., 1992). La famille de gènes codant pour les rKA comprend cinq sous-unités : GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 et GluK5 (anciennement nommés GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2 respectivement) codées par 5 gènes *Grik1* à *Grik5* (Hollmann et Heinemann, 1994).

Les différentes sous-unités de rKA peuvent être classées en 2 catégories : les récepteurs « à faible affinité pour le kaïnate » (affinité située entre 50 et 100 nM) composés des sous-unités GluK1, GluK2 et GluK3, et les récepteurs « à haute affinité pour le kaïnate » (affinité située entre 5 et 15 nM) composés des sous-unités GluK4 et GluK5 (Schiffer et al., 1997 ; Werner et al., 1991 ; Herb et al., 1992). Les séquences des sous-unités GluK1, GluK2 et GluK3 partagent 75 à 80% d'homologie tandis que les séquences des sous-unités GluK4 et GluK5 en partagent 68%. Ces 2 sous-classes de sous-unités ne partagent entre elles que 45% d'homologie (Pinheiro et Mulle, 2006).

Chaque sous-unité des rKA présente une structure protéique primaire similaire à celle des rAMPA (**Figure 10**). Il s'agit d'une protéine transmembranaire composée de 4 domaines membranaires (DM) dont 3 domaines transmembranaires et une boucle réentrante, « p-loop », constituant la paroi du pore. Chaque sous-unité présente un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal cytosolique. Le domaine de liaison au ligand : LBD (Ligand Binding Domain) comprend une partie du domaine N-terminal du récepteur (domaine S1) et la boucle extracellulaire située entre les domaines transmembranaires III et IV (domaine S2). L'extrémité du domaine N-terminal participe à l'assemblage des sous-unités en dimères puis en tétramères et le domaine C-terminal (DCT) joue un rôle dans le trafic des récepteurs par de multiples interactions protéiques et modifications post-traductionnelles.

b) Variants d'épissage

Tout comme dans le cas des rAMPA, l'ARN messager (ARNm) codant pour certaines sous-unités des rKA fait l'objet d'un épissage alternatif. Cet épissage concerne surtout le DCT des sous-unités GluK1, GluK2 et GluK3 (**Figure 11**) :

La sous-unité GluK1 présente quatre variants d'épissage du DCT : GluK1a, GluK1b et GluK1c et GluK1d. Les trois sous-unités, GluK1, GluK2 et GluK3, présentent toutes une séquence conservée de 16 acides aminés au début de DCT entre le dernier segment transmembranaire et la cassette d'épissage. Le variant d'épissage le plus court de la sous-unité GluK1, le variant GluK1b, résulte de l'introduction d'un codon stop deux acides aminés après la cassette d'épissage, tandis que le variant GluK1c est généré par l'insertion de 29 acides aminés dans le cadre de lecture de la séquence de GluK1b (Sommer et al., 1992). Les sous-unités GluK1b et GluK1c possèdent toutes deux un domaine de liaison PDZ à la fin de leur DCT, mais ce domaine est absent du variant GluK1a. La sous-unité GluK1b présente un motif de rétention dans le réticulum endoplasmique (Ren et al., 2003). Ce motif contient un résidu arginine, en position 896 dans la partie distale du DCT, critique pour la rétention de la sous-unité dans le réticulum endoplasmique. Ce motif de rétention peut être régulé par la phosphorylation de la thréonine 898 se trouvant à proximité de ce motif (Ren et al., 2003). Le variant d'épissage GluK1d n'a quant à lui uniquement été identifié que chez l'humain (Gregor et al., 1993 ; Barbon et al., 2001). L'épissage alternatif de la sous-unité GluK1 concerne également la région N-terminale du récepteur. Cet épissage permet la synthèse de deux différentes isoformes GluK1-1 et GluK1-2. L'isoforme GluK1-1 présente une insertion de 15 acides aminés supplémentaires par rapport à l'isoforme GluK1-2 (Bettler et al., 1990).

L'épissage alternatif de la sous-unité GluK2 donne lieu à trois variants d'épissage : GluK2a, GluK2b et GluK2c (Gregor et al., 1993 ; Barbon et al., 2001 ; Jamain et al., 2002). Les sous-unités GluK2a et GluK2b sont exprimées dans les mêmes régions du système nerveux central et sont coassemblées dans les rKA natifs. Ces deux sous-unités présentent des propriétés de trafic membranaire très différentes. L'assemblage de ces deux sous-unités ensemble permet une régulation croisée entre les deux DCT à travers l'interaction avec des interacteurs protéiques différents (Coussen et al., 2005). Comme dans le cas de la sous-unité GluK1, la sous-unité GluK2 présente un variant d'épissage uniquement retrouvé chez l'humain. Il s'agit de l'isoforme GluK2c, qui comprend l'insertion d'un exon supplémentaire dans la région C-terminale (Barbon et al., 2001 ; Jamain et al., 2002).

La sous-unité GluK3 possède deux variants d'épissage générant les isoformes GluK3a et GluK3b pour lesquelles les séquences d'acides aminés présentent très peu

d'homologie (Schiffer et al., 1997). Les ARNm codant pour les sous-unités GluK4 et GluK5 ne subissent quant à eux aucun épissage alternatif.

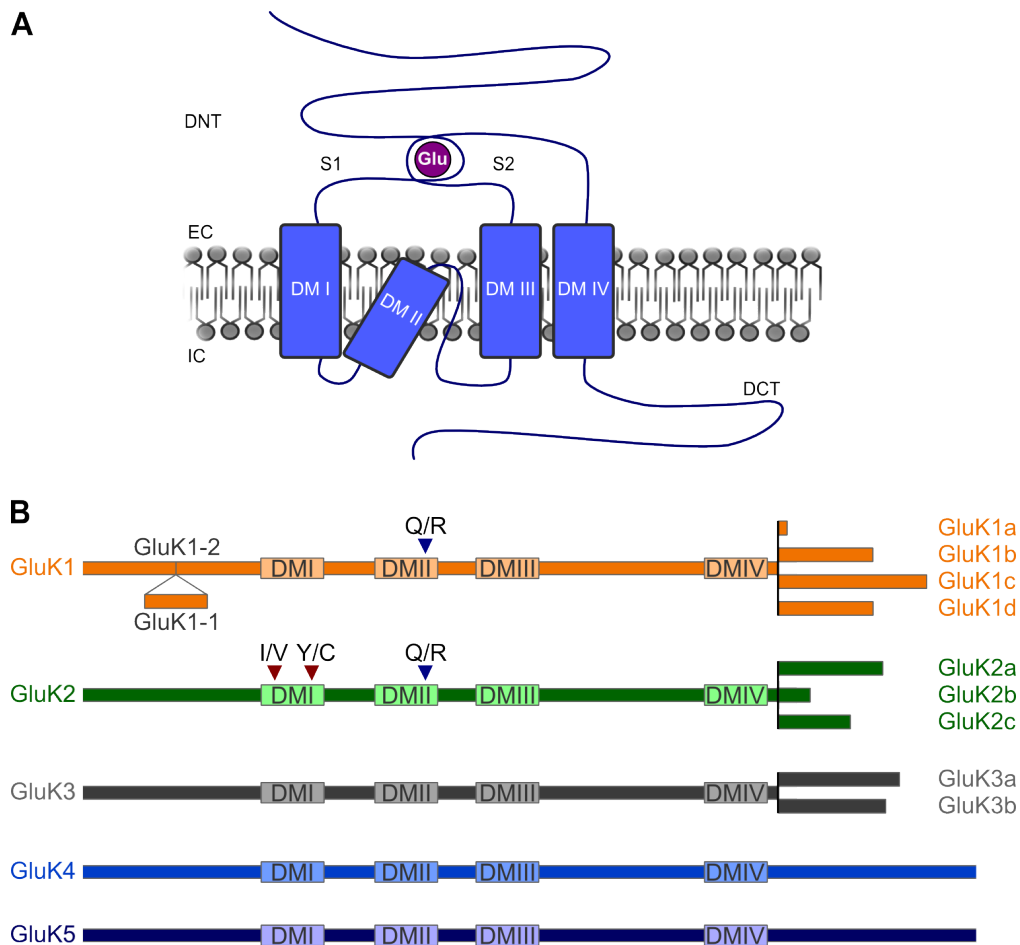


Figure 11 : Diversité de structure des rKA. (A) Structure primaire des différentes sous-unités des rKA. **(B)** Représentation linéaire de la structure primaire des différentes sous-unités et des variants d'épissage et sites d'édition. DM : domaine membranaire. Les flèches bleues et rouges indiquent les sites d'édition des différentes sous-unités.

Si l'épissage alternatif du DCT des différentes sous-unités n'affecte pas les propriétés biophysiques des rKA (Schiffer et al., 1997 ; Jaskolski et al., 2004 ; Coussen et al., 2005), il joue, en revanche, un rôle majeur dans le trafic à la membrane des différentes sous-unités et dans leur régulation par des interacteurs protéiques.

Le DCT de la sous-unité GluK5 présente un motif de rétention dans le réticulum endoplasmique qui l'empêche d'être exportée à la membrane en absence d'une autre sous-unité des rKA (Ren et al., 2003). Ce motif de rétention dans le réticulum endoplasmique est composé d'un motif riche en arginine, similaire à ceux caractérisés dans d'autres sous-unités de récepteurs ionotropiques du glutamate comme GluK1c et GluN1 (Jaskolski et al., 2004 ; Scott et al., 2001) ou le récepteur GABAb (Margeta-Mitrovic

et al., 2000). Lors de l'hétéromérisation du récepteur, ce motif de rétention est masqué permettant le trafic à la membrane de récepteurs hétéromériques comprenant la sous-unité GluK5.

c) Variants d'édition

A l'instar des rAMPA, les sous-unités GluK1 et GluK2 des rKA peuvent être éditées au niveau d'un site Q/R (glutamine/arginine) situé dans la boucle membranaire rééminente (**Figure 11**). L'édition est une modification post-traductionnelle d'une ou plusieurs bases de l'ARN pré-messager, modifiant ainsi l'acide aminé codé par le codon de départ. Ce phénomène d'édition résulte en un changement de la perméabilité calcique et de la sensibilité aux polyamines intracellulaires des rKA. Les récepteurs édités présentant un résidu arginine (R) sont peu perméables au Ca^{2+} , tandis que les récepteurs non-édités présentant un résidu glutamine (Q) sont plus fortement perméables au Ca^{2+} et sont bloqués par les polyamines intracellulaires pour des potentiels de membrane positifs (Sommer et al., ; 1992 Burnashev et al., 1995 ; Swanson et al., 1996). Le blocage du pore par les polyamines se traduit par une rectification entrante des courants dans la relation courant/potentiel des récepteurs non-édités, tandis que les récepteurs édités présentent une relation courant/potentiel linéaire (Bowie et Mayer 1995 ; Bähring et al., 1997).

La sous-unité GluK2 possède deux sites d'édition supplémentaires influençant également la perméabilité calcique du récepteur. Ces deux résidus se situent dans le premier domaine transmembranaire (**Figure 11**). Il s'agit des sites I/V (isoleucine/valine) et Y/C (tyrosine/cystéine) (Köhler et al., 1993).

L'état d'édition des rKA peut varier au cours du développement ou au cours de certains états pathologiques comme l'épilepsie ou certaines douleurs chroniques (Bernard et al., 1999 ; Vissel et al., 2001). Dans le cerveau au cours du développement embryonnaire, le niveau d'édition du site Q/R des sous-unités GluK1 et GluK2 est très faible, puis ce niveau augmente respectivement à 40% et 80% des ARNm au cours des premiers jours postnataux dans la plus part des régions du SNC (Belcher et Howe, 1997 ; Paschen et al., 1997 ; Bernard et al., 1999 ; lee et al., 2001). Dans la moelle épinière, à la fin du développement embryonnaire et chez les rats nouveau-nés, un changement d'édition des rKA entraîne une modification de l'expression de récepteurs majoritairement perméables au Ca^{2+} vers des rKA imperméables au Ca^{2+} à la fin de la première semaine postnatale (Bernard et al., 1999).

L'édition de l'ARNm codant pour la sous-unité GluA2 des rAMPA influence l'assemblage des récepteurs dans le réticulum endoplasmique (Greger et al., 2003). En effet, la présence d'un résidu positivement chargé au site Q/R de la sous-unité GluA2 joue fortement sur les interactions entre sous-unités au cours de la tétramérisation du récepteur. Cette charge positive pourrait également empêcher l'interaction du récepteur avec des protéines chaperonnes chargées positivement et ainsi agir comme motif de rétention dans le réticulum endoplasmique (Greger et al., 2002, 2003 ; Cull-Candy et al., 2006). Dans le cas des rKA, les conséquences de l'état d'édition des sous-unités GluK1 et GluK2 sur l'assemblage et le trafic des rKA restent encore débattues (Ma-Högemeier et al., 2010 ; Ball et al., 2010).

2) Assemblage

La composition des rKA, eu égard à leur assemblage en tétramères et à la diversité des sous-unités et des variants d'épissage de chacune des sous-unités, offre de larges possibilités de combinaisons. Les rKA à faible affinité, composés des sous-unités GluK1, GluK2 et GluK3, peuvent s'assembler entre eux et former des homomères fonctionnels dans des systèmes d'expression hétérologue. Les sous-unités GluK4 et GluK5 sont incapables de former des récepteurs homomériques fonctionnels et doivent s'assembler avec l'une des trois autres sous-unités pour former des récepteurs hétéromériques fonctionnels, présentant des propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes des récepteurs homomériques (Barberis et al., 2008).

3) Trafic membranaire des récepteurs kaïnate : régulation par les interactions protéiques et les modifications post-traductionnelles

Les études menées sur des récepteurs recombinants dans des systèmes hétérologues ont aidé à la compréhension des différents mécanismes mis en jeu dans le trafic des rKA vers la membrane plasmique. Ces études ont permis de montrer que le niveau d'expression à la membrane des rKA est dépendant du type de sous-unités impliquées et de l'épissage alternatif du DCT de certaines de ces sous-unités. En effet, le DCT des différentes sous-unités des rKA peut comprendre des motifs de rétention dans le réticulum endoplasmique ainsi que des motifs d'export vers la membrane plasmique. Le DCT des rKA est alors la cible de multiples interacteurs protéiques et peut faire l'objet de modifications post-traductionnelles pouvant moduler le trafic, l'endocytose, le recyclage et la dégradation des récepteurs. L'épissage alternatif du DCT des sous-unités augmente d'autant plus la diversité de protéines interagissant avec les rKA. Ces modulations

peuvent être dépendantes de l'activité et participent à des mécanismes de plasticité des rKA.

a) Trafic des récepteurs kaïnate et interactions protéiques

Chaque sous-unité et variant d'épissage est la cible d'interactions protéiques dépendantes de la séquence d'acides aminés du DCT du récepteur. Plusieurs catégories de protéines interagissent étroitement avec les rKA et modulent leur trafic membranaire. Ces protéines comprennent tout d'abord des protéines cargos impliquées dans le transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique ; des protéines d'échafaudage et de la densité post-synaptique étroitement liées au cytosquelette ; et enfin des protéines d'adhésion trans-synaptiques. Certaines de ces interactions sont également décrites pour les rAMPA et NMDA. Si les conséquences physiologiques de certaines de ces interactions ont été largement étudiées, le rôle d'un grand nombre d'entre elles reste toutefois mal connu.

✓ Protéines de liaison à domaine PDZ

Les rKA interagissent avec des protéines de la famille SAP90/PSD-95 (postsynaptic density protein-95) (Garcia et al., 1998 ; Mehta et al., 2001). Ces protéines participent à l'organisation de la densité post-synaptique à travers leurs multiples domaines de liaison PDZ (postsynaptic density protein (PSD-95), Drosophila disk large tumor suppressor (DLG1), zonula occludens-1 protein (zo-1)), un domaine GK (domaine enzymatique inactif guanylate kinase) et un domaine SH3. L'interaction de la PSD-95 avec des rKA composés des sous-unités GluK2 et GluK5 recombinantes est responsable de l'agrégation des rKA et d'un ralentissement de la cinétique de désensibilisation du récepteur. Cette interaction fait intervenir le domaine PDZ terminal de la sous-unité GluK2a (séquence ETMA) et 2 domaines riches en proline du DCT de GluK5 (**Figure 12**).

Les protéines PICK1 (protein interacting with C-kinase-1), et GRIP (GluR-interacting protein), syntenin et PSD-95 sont également des protéines de liaison à domaine PDZ interagissant avec les sous-unités GluK1b, GluK1c et GluK2 des rKA. La protéine PICK1 favorise la phosphorylation du DCT de GluK1 par la PKC sur les résidus sérine 880 et sérine 886 ce qui favorise la liaison de GRIP au DCT de GluK1 et augmente ainsi son encrage à la synapse (Hirbec et al., 2003). La protéine PICK1 est elle aussi phosphorylée par la PKC favorisant la stabilisation entre GRIP et les sous-unités GluK1 et GluK2. A l'inverse sur les rAMPA, la phosphorylation du DCT de GluA2 diminue

l'interaction de la sous-unité avec GRIP et empêche ainsi sa stabilisation à la membrane (Chung et al., 2000).

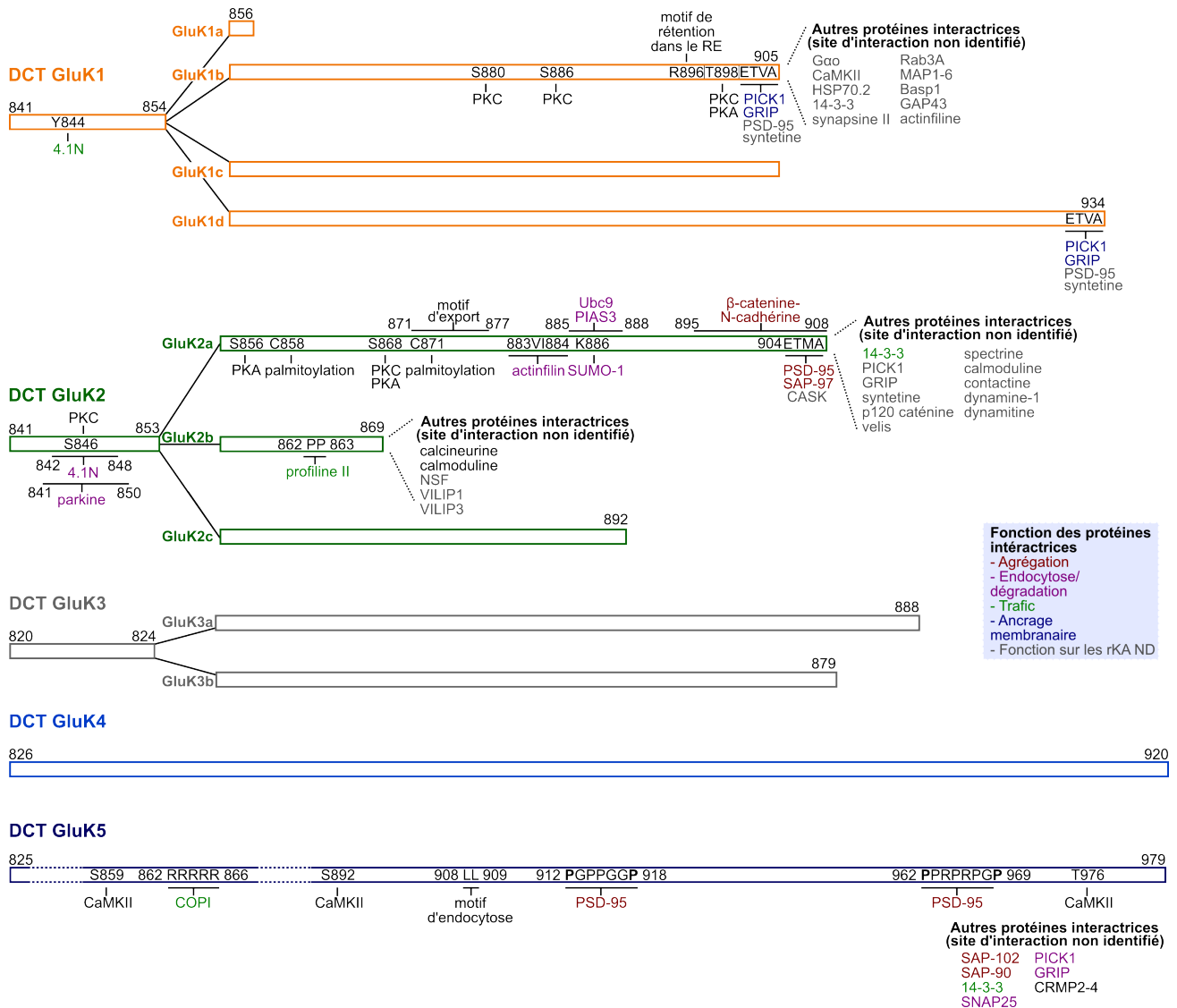


Figure 12 : Interactions protéiques avec les domaines C-terminaux des différentes sous-unités des rKA.

La sous-unité GluK5 interagit également avec les protéines PICK1, GRIP et SNAP-25. La protéine SNAP-25 appartient au complexe SNARE impliquée dans la libération vésiculaire de neurotransmetteurs. L'interaction avec cette protéine à la synapse FM-CA3 entraîne l'internalisation des rKA dans un processus de DLT des rKA à la synapse (Selak et al., 2009). Cette DLT des rKA implique également les protéines PICK1 et GRIP qui forment un complexe avec la sous-unité GluK5 et cette interaction est régulée par la phosphorylation par la PKC : la protéine PICK1 faciliterait la phosphorylation du DCT de la sous-unité GluK5 par la PKC et cette phosphorylation engendrerait un changement de

conformation facilitant l'interaction de GluK5 avec la protéine SNAP-25, diminuant simultanément l'affinité de la liaison à la protéine GRIP (Selak et al., 2009).

✓ Protéines cargos et protéines de transport vésiculaire

Certaines protéines cargos impliquées dans le transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, interagissent avec certaines sous-unités des rKA.

La sous-unité GluK5 interagit avec le complexe protéique COPI (coatamer protein complex I) (Vivithanaporn., 2006), un complexe protéique impliqué dans le transport rétrograde de vésicules du trans-golgi vers le cis-golgi et le réticulum endoplasmique (Lee et al., 2000). La liaison de COPI au DCT de GluK5 participe à la rétention de la sous-unité dans le réticulum endoplasmique. Cette interaction fait intervenir en particulier un domaine riche en arginine dans la région proximale du DCT de GluK5 (R862-R866) (**Figure 12**). Cette interaction est levée par l'assemblage de la sous-unité GluK5 avec la sous-unité GluK2a.

La sous-unité GluK2 est la sous-unité des rKA pour laquelle le plus grand nombre d'interacteurs protéiques ont été identifiés. La sous-unité GluK2a interagit notamment avec la famille de protéines 14-3-3, protéines chaperonnes impliquées dans le transport vésiculaire antérograde du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (Coussen et al., 2005). L'interaction de ces protéines 14-3-3 avec la sous-unité GluK2a favorise le trafic vers la membrane de cette sous-unité et l'assemblage entre GluK2a et les autres sous-unités des rKA au cours de la biosynthèse de récepteurs hétéromériques. Elle favorise également le trafic vers la membranes de sous-unités n'interagissant pas avec cette famille de protéines 14-3-3, comme le variant d'épissage GluK2b (Coussen et al., 2005). Notons par ailleurs que la sous-unité GluK1b interagit également avec cette famille de protéines 14-3-3, mais le rôle de cette interaction dans le trafic de cette sous-unité n'a pas encore été établi (Rutkowka-Wlodarczyk et al., 2015).

Le site d'interaction de la famille de protéine 14-3-3 n'a pas été identifié mais la sous-unité GluK2a présente un domaine d'export vers la membrane plasmique dans son DCT qui permet aux récepteurs homomériques GluK2a d'avoir un fort niveau d'expression membranaire (Yan et al., 2004). Ce domaine comprend sept résidus composés de manière prédominante d'acides aminés basiques situés dans la portion médiane du DCT

de la sous-unité (**Figure 12**). De tels motifs d'export se retrouvent dans d'autres récepteurs comme les rAMPA (Shen et al., 2000 ; Coleman et al., 2003).

La protéine Dynamine-1 interagit avec le DCT de GluK2a (Coussen et al., 2005). Les protéines de la famille des dynamines jouent un rôle important de l'endocytose de certains récepteurs comme les rAMPA et rNMDA (Wang et Linden, 2000 ; Nong et al., 2003) mais le rôle de la dynamine-1 dans l'endocytose de rKA n'est pas établie.

La sous-unité GluK2b interagit avec la protéine NFS (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) impliquée dans la fusion membranaire et dans la stabilisation des rAMPA (Coussen et al., 2005 ; Braithwaite et al., 2002).

✓ Protéines associées au cytosquelette

Le variant d'épissage GluK2b est fortement retenu dans le réticulum endoplasmique lorsqu'il est assemblé en homomère, et cette rétention implique l'interaction du DCT de GluK2b avec la protéine profiline IIa (Mondin et al., 2010). Cette protéine de liaison à l'actine, impliquée dans la régulation du transport membranaire et dans la dynamique du cytosquelette (Birbach, 2008), interagit spécifiquement avec la sous-unité GluK2b par l'intermédiaire de deux résidus proline 862 et 863 du DCT (**Figure 12**). L'interaction directe de la sous-unité GluK2b avec la profiline IIa inhibe l'exocytose du récepteur (Mondin et al., 2010). Les sous-unités GluK2a et GluK2b interagissent également avec des protéines étroitement liées au cytosquelette comme la protéine spectrine qui pourrait faire le lien entre les rKA et le cytosquelette d'actine (Coussen et al., 2009).

Les sous-unités GluK1 et GluK2 interagissent avec la protéine 4.1N sur la partie proximale du DCT des deux sous-unités (Shanks et al., 2012 ; Rutkowka-Wlodarczyk et al., 2015). La famille des protéines 4.1 constitue une famille de protéines adaptatrices avec le cytosquelette en raison de la présence d'un domaine de liaison à la spectrine et à l'actine. Cette interaction joue un rôle important dans le trafic à la membrane de la sous-unité GluK2a et dans la régulation de l'endocytose du récepteur (Copits et Swanson, 2013). Cette interaction est régulée par la phosphorylation et par la palmitoylation du DCT de GluK2a.

Le DCT de GluK1b interagit avec les protéines Basp1 et GAP43, étroitement associées au cytosquelette au cours du développement (Frey et al., 2000), mais les

conséquences physiologiques de l'interaction de ces protéines avec les rKA n'ont pas encore été établies.

✓ Protéines dépendantes du Ca^{2+}

La sous-unité GluK2b interagit avec des protéines connues pour être impliquées dans la régulation de la fonction de récepteurs par le Ca^{2+} comme la calcineurine, la calmoduline, VILIP-1 et VILIP-3 (visinin-like protein 1-3). La liaison des ces protéines avec la sous-unité GluK2b est dépendante du Ca^{2+} (Coussen et al., 2005). L'activation de la phosphatase calcineurine par l'entrée de Ca^{2+} suite à l'activation de rNMDA entraîne une inhibition de courants médiés par les rKA en réponse à une probable déphosphorylation des rKA et cette inhibition dépend de la présence des sous-unités GluK2a et GluK2b et de l'interaction de la calcineurine avec la sous-unité GluK2b (Ghetti et Heinemann., 2000 ; Coussen et al., 2005). Cette régulation de la fonction des rKA par l'état de phosphorylation ou de déphosphorylation des rKA faisant intervenir le DCT de GluK2b et la calcineurine est impliquée dans une forme de dépression à court terme des rKA dépendante de l'activité et de l'influx de Ca^{2+} généré par l'activation de rKA à la synapse FM-CA3 (Rebola et al., 2007).

✓ Complexes protéiques trans-synaptiques d'adhésion : N-cadhérine et β -caténines

Les cadhérines sont des protéines à un domaine transmembranaire présentant 5 répétitions d'ectodomaines extracellulaires (domaines EC1-EC5) séparées par des sites de liaison au Ca^{2+} . Elles possèdent également un court domaine intracellulaire très conservé dans les différentes familles de cadhérines. Le domaine N-terminal participe à l'adhésion homophilique des cadhérines entre elles. Le DCT intracellulaire se lie aux α et β -caténines et permet de créer un complexe protéique d'ancrage avec le cytosquelette d'actine.

La N-cadhérine, cadhérine majoritaire dans le système nerveux central, joue un rôle prépondérant dans l'adhérence entre les compartiments pré- et post-synaptiques en intervenant au cours de la synaptogenèse, de la croissance et l'arborisation des neurites et au cours de la guidance axonale (Benson and Tanaka, 1998; Nakai and Kamiguchi, 2002; Yu and Malenka, 2003). A des stades plus tardifs du développement, la N-cadhérine est plus enrichie dans les synapses où elle participe à la régulation de l'adhérence synaptique (Beesley et al., 1995; Uchida et al., 1996), et à la plasticité

synaptique (Bozdagi et al., 2000; Murase et al., 2002; Okamura et al., 2004; Tanaka et al., 2000; Togashi et al., 2002).

La sous-unité GluK2a des rKA interagit avec les complexes N-cadhérine/ β -caténine (Coussen et al., 2002) ainsi qu'avec d'autres complexes protéiques étroitement reliés à ce complexe d'adhésion. Ceci inclus des membres des protéines MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase) comme la protéine CASK qui interagit avec le domaine PDZ du DCT de la sous-unité GluK2a correspondant aux quatre derniers acides aminés du DCT (**Figure 11**). La protéine CASK appartient à un plus large complexe protéique composé des protéines Mint/LIN-10 et Velis/LIN-7 qui peuvent s'associer à des molécules d'adhérence dont notamment le complexe N-cadhérine/ β -caténine (Perego et al., 2000). **L'interaction entre la sous-unité GluK2a et le complexe N-cadhérine/ β -caténine est une interaction indirecte qui fait intervenir les quatorze derniers acides aminés du DCT du récepteur (Coussen et al., 2002) (Figure 12). Cette interaction est responsable du recrutement et de l'agrégation de rKA au niveau des zones d'adhérences impliquant les complexes N-cadhérine/ β -caténine dans des systèmes hétérologues (Coussen et al., 2002). Mais aucune étude n'a cherché à déterminer les conséquences de cette interaction dans un système neuronale *in situ*, en particulier à la synapse FM-CA3 de l'hippocampe où les rKA sont strictement compartimentés. Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si le complexe N-cadhérine/ β -caténine était impliqué dans cette ségrégation et dans la stabilisation des rKA à cette synapse.**

b) Modifications post-traductionnelles des récepteurs kaïnate

✓ Phosphorylation des récepteurs kaïnate

Les rKA sont sujets à des modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, pouvant entraîner leur internalisation voir leur dégradation. Les rKA sont la cible de différentes protéines kinases : la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) et la Calmodulin-dépendant kinase II (CaMKII). La phosphorylation des rKA joue un rôle fondamental les processus de plasticité à court et à long terme des rKA.

Les conséquences physiologiques de la phosphorylation des rKA varient en fonction des sous-unités impliquées, du type de protéines kinases mises en jeu et des voies de signalisations activées (**Figure 13**). Dans les neurones d'hippocampe en culture, les rKA peuvent être internalisés et entrer dans les voies de dégradation ou de recyclage

vers la membrane en fonction des cascades de signalisation activées (Martin et al., 2004). En effet, l'activation des rKA contenant la sous-unité GluK2 peut causer une forme de DLT des rKA entraînant leur internalisation de manière dépendante de l'activation de la PKC (**Figure13-A**). Une fois internalisés les rKA sont adressés vers les lysosomes pour être dégradés. L'activation des rNMDA, quant à elle, cause une internalisation des rKA dépendante de l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire et de l'activation de la PKA et de la PKC conduisant à l'internalisation des rKA vers les endosomes précoces puis vers un recyclage à la membrane plasmique (**Figure13-B**). Ainsi les rKA sont sujets à une endocytose dépendante de l'activité.

Dans le ganglion dorsal de la moelle épinière, la stimulation des rKA entraîne également une internalisation des rKA composés de la sous-unité GluK1 par un mécanisme dépendant de l'activation de la PKC (Rivera et al., 2007) (**Figure13-C**). Cette internalisation passe par la phosphorylation du DCT de la sous-unité GluK1b sur les serines 880 and 886 (**Figure 12**).

La PKC participe aussi au trafic des rKA dans les couches II et III du cortex perirhinal où elle est impliquée dans une forme de DLT des rKA indépendante des rNMDA et des canaux calciques dépendants du voltage (Park et al., 2006). Cette DLT implique également la protéine PICK1 qui joue un rôle d'adaptateur et facilite l'interaction entre la sous-unité GluK1 et la PKC (**Figure13-D**). Cette DLT des rKA est déclenchée par l'activation de rKA non-édités, perméables au Ca^{2+} . L'entrée de Ca^{2+} permet l'activation d'un mécanisme de Ca^{2+} *induced- Ca^{2+} release* pour libérer le Ca^{2+} des stocks intracellulaires. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire interfère avec la phosphorylation constitutive des rKA. Cette phosphorylation est normalement permise par l'activité constitutive des récepteurs métabotropiques mGluR5 permettant la stabilisation des rKA par l'interaction de PICK1 et PKC à la sous-unité GluK1b (Cho et al., 2003 ; Hirbec et al 2003). Ainsi dans la moelle épinière la phosphorylation de GluK1b entraîne une internalisation des rKA tandis que dans le cortex perirhinal, cette phosphorylation permet la stabilisation des rKA via l'interaction avec la protéine PICK1.

La phosphorylation de la sous-unité GluK1b peut également moduler la rétention dans le réticulum endoplasmique du récepteur. En effet, cette sous-unité présente un motif de rétention dans le réticulum endoplasmique pouvant être régulé par la phosphorylation de la thréonine 898 se trouvant à proximité de ce motif (Ren et al., 2003).

La phosphorylation de ce résidu modifierait alors la conformation de ce motif de rétention permettant une augmentation du trafic à la membrane de la sous-unité GluK1b.

Dans l'hippocampe, une autre protéine kinase est impliquée dans l'internalisation et la DLT des rKA. En effet, des stimulations répétées de la synapse FM-CA3 entraîne une DLT des rKA dépendante de la Calmodulin-dépendant kinase II (CaMKII) (Carta et al., 2012). Cette dépression des rKA dépend d'une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire qui va activer la CaMKII. Cette dernière phosphoryle trois acides aminés du DCT de la sous-unité GluK5 : les résidus S858, S892 et T976 (**Figure 12**). La phosphorylation de la sous-unité GluK5 augmente la mobilité latérale des rKA à la membrane et déstabilise ainsi les rKA à la synapse. Cet effet est probablement dû à un affaiblissement de l'interaction entre la sous-unité GluK5 avec la protéine PSD-95. Ainsi la déstabilisation des rKA à la synapse entraîne une dépression des réponses synaptiques médiées par les rKA.

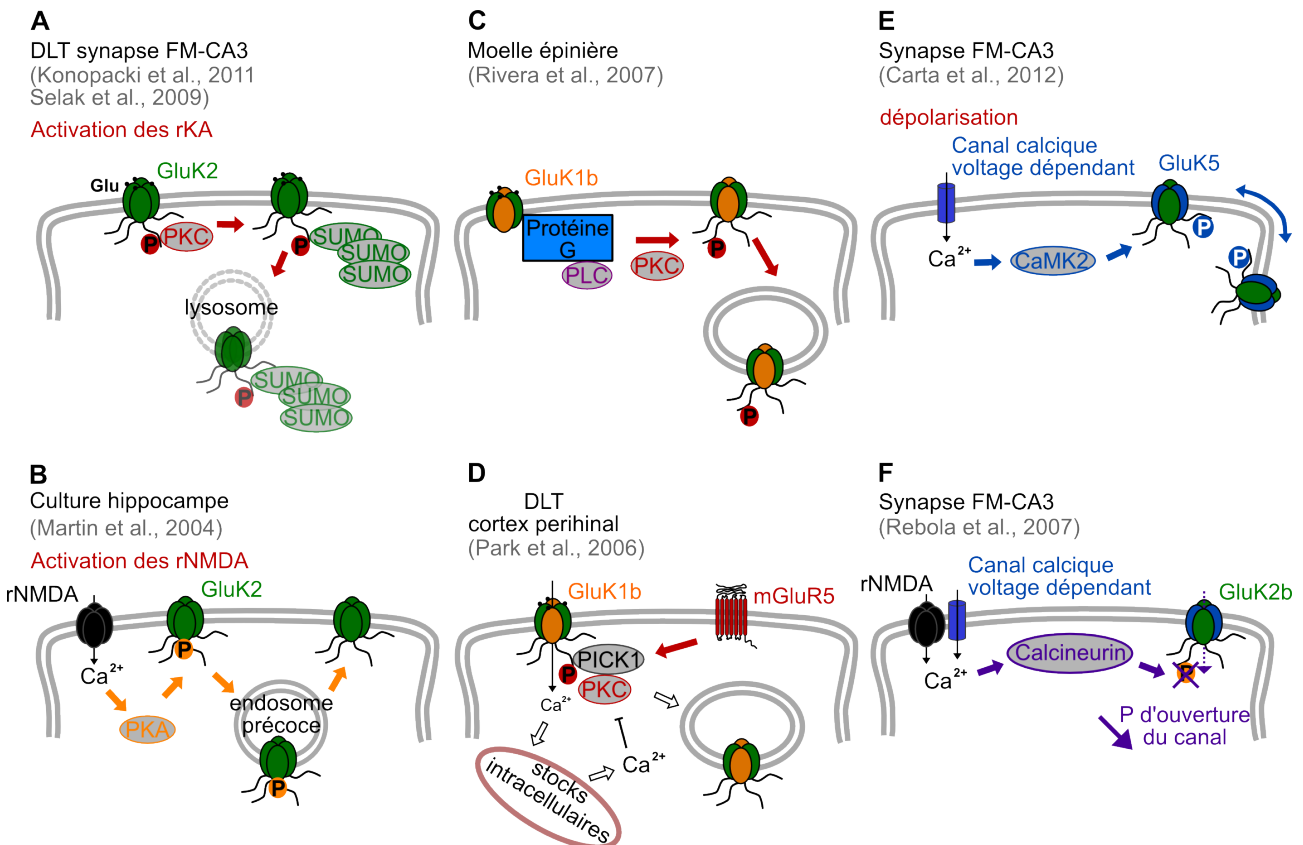


Figure 13 : Phosphorylation des rKA dans le SNC : internalisation, dégradation et DLT des rKA. Le domaine C-terminal des rKA peut être phosphorylé par différentes protéines kinases (PKC, PKA et CaMK2). La phosphorylation des rKA est modulée de façon dynamique en fonction de l'activité, et peut être activée par différentes cascades de signalisations en fonction des structures impliquées et du pool de protéines exprimées à la synapse. Cette phosphorylation peut affecter de façon différente le trafic des rKA selon la sous-unité phosphorylée.

A l'inverse, la CaMKII est connue pour être impliquée dans la PLT des rAMPA notamment à la synapse collatérale de Schaffer-CA1. Lors de cette PLT la CaMKII est

activée par l'entrée de Ca^{2+} après activation des rNMDA (Lisman et al., 2002). Une fois activée, elle phosphoryle la sous-unité GluA1 et sa protéine auxiliaire stargazine et augmente ainsi la fonction du canal (Kristensen et al., 2011), le trafic des rAMPA à la membrane et leur immobilisation à la synapse (Makino & Malinow, 2009 ; Opazo et al., 2010).

Le DCT de la sous-unité GluK1b interagit également avec la CaMKII (Rutkowka-Wlodarczyk et al., 2015) mais les conséquences fonctionnelles de la phosphorylation du DCT de la sous-unité GluK1 par cette kinase n'ont pas encore été étudiées.

Dans l'hippocampe, l'état de phosphorylation des rKA peut aussi être impliqué dans des phénomènes de plasticité à court terme entraînant des changements d'activité du canal (**Figure13-F**). En effet, l'activation des rNMDA entraîne une dépression transitoire des réponses médiées par les rKA (Ghetti & Heinemann, 2000 ; Rebola et al., 2007). Cette dépression est dépendante de l'activation de la phosphatase dépendante du Ca^{2+} et de la calmoduline, la calcineurine, qui interagit avec la sous-unité GluK2b des rKA (Coussen et al., 2005). La récupération des courants médiés par les rKA est dépendante de l'activité de la CaMKII. Des études précédentes ont montré que la sous-unité GluK2 pouvait être phosphorylée (par la PKA sur la sérine 684) provoquant une augmentation des réponses glutamatergiques due à une élévation de la probabilité d'ouverture du récepteur, tandis que la calcineurine diminue la probabilité d'ouverture des rKA (Raymond et al., 1993 ; Wang et al., 1993 ; Traynelis et al., 1997 ; Kornreich et al., 2007). Ainsi le recyclage et la dégradation des rKA peuvent être modulés par l'activité neuronale à travers l'état de phosphorylation du récepteur. Les conséquences fonctionnelles de la phosphorylation des rKA dépendent des sous-unités impliquées, du type de kinases et des cascades de signalisation mises en jeu.

✓ Palmitoylation des récepteurs kaïnate

Le DCT de la sous-unité GluK2a des rKA peut être palmitoylée sur 2 résidus cystéine (C858 et C871) (**Figure 12**). La palmitoylation de la sous-unité GluK2 influence la phosphorylation du récepteur par la PKC. En effet, l'état de palmitoylation du récepteur déterminerait l'accessibilité de la PKC sur ces deux sites de phosphorylation situés à proximité de sites de palmitoylation (Picking et al., 1995) (Figure X). Par ailleurs, l'état de palmitoylation et de phosphorylation de la sous-unité GluK2 régule l'interaction de cette dernière avec la protéine 4.1N. Ainsi la palmitoylation du récepteur favorise l'interaction de

la sous-unité GluK2a avec la protéine 4.1N et favorise donc l'endocytose du récepteur, tandis que la phosphorylation du récepteur par la PKC diminue cette interaction (Copits et Swanson, 2013).

✓ SUMOylation des récepteurs kaïnate

La phosphorylation par la PKC du DCT de la sous-unité GluK2a peut favoriser la SUMOylation du récepteur permettant ainsi son internalisation et son entrée dans des voies de dégradation par les lysosomes (Nasu-Nishimura et al., 2010 ; Konopacki et al., 2011 ; Chamberlain et al., 2012) (**Figure13-A**). La SUMOylation consiste en la liaison d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier) par une liaison covalente à un résidu lysine de la protéine SUMOylée par une voie enzymatique semblable à la voie de l'ubiquitination (Wilkinson et al., 2010). L'activation de la PKC peut être induite par l'activation des rKA. Deux sites de phosphorylation de la PKC ont été identifiés dans le DCT de GluK2 : la sérine 846 (S846) et la sérine 868 (S868) (Nasu-Nishimura et al., 2010). L'activation des rKA permet ainsi la phosphorylation des 2 sites S846 et S868, mais seule la phosphorylation du site S868 favorise la SUMOylation de GluK2 du fait de son étroite proximité avec le résidu lysine K886 cible de la SUMOylation de GluK2 (**Figure 12**). Cette SUMOylation dépendante de la phosphorylation de la S868 est impliquée dans le phénomène de DLT des rKA à la synapse FM-CA3 de l'hippocampe (Chamberlain et al., 2012).

✓ Ubiquitination des récepteurs kaïnate

Les rKA composés de la sous-unité GluK2 peuvent également être ubiquitinylés pour être dégradés. Cette ubiquitinylation fait intervenir la liaison avec la protéine actifiline qui se lie au DCT de GluK2 (**Figure 12**) et intervient comme une protéine adaptatrice faisant le lien avec l'ubiquitine ligase Cul3 (Salinas et al., 2006). La sélection du substrat pour l'ubiquitinylation fait intervenir une ligase E3 constituant un complexe de protéines à laquelle Cul3 appartient et permettant le transfert de l'ubiquitine sur des résidus lysines spécifiques de son substrat sur. Il en résulte une polyubiquitination de la protéine qui permet de l'envoyer vers le protéasome pour sa dégradation (Petroski et Deshaies ; 2005). La sous-unité GluK2 des rKA interagit également avec une autre protéine de la famille des ligases E3, la protéine parkine, dans la partie proximale du DCT (Maraschi et al., 2014) (**Figure 12**), où elle participe également à l'ubiquitinylation de la sous-unité GluK2 et régule ainsi sa dégradation.

4) Sous-unités auxiliaires des récepteurs kaïnate : les protéines Neto

Une sous-unités auxiliaire peut être définie comme étant une protéine ne participant pas à la formation du pore du canal, mais interagissant de manière directe et stable avec les sous-unités constituant le pore dès l'assemblage du canal. Cette protéine doit pouvoir moduler de manière directe les propriétés du canal et/ou son trafic (Yan et Tomita ; 2012).

Les premières sous-unités auxiliaires identifiées furent des sous-unités auxiliaires de canaux voltage-dépendant au sodium, au Ca^{2+} et au potassium dans les années 1990 (Isom et al., 1994 ; Adelman et al., 1995 ; Gurnett et Cambell, 1996 ; Trimmer, 1998). Les premières sous-unités auxiliaires de récepteur canaux ne furent identifiées qu'à partir des années 2000 pour les rAMPA (Nicoll et al., 2006 ; Osten et Stern-Bach 2006 ; Milstein et Nicoll ; 2008). La protéine stargazine fut la première sous-unité auxiliaire décrite pour les rAMPA (Vandenberghe et al., 2005). Cette protéine à quatre domaines transmembranaires appartient à la famille des TARP (transmembrane AMPA receptor regulatory protein).

Les protéines Neto1 et 2 (neuropilin and tolloid-like 1-2), sous-unités auxiliaires des rKA furent identifiées par la suite. Il s'agit de protéines à un domaine membranaire interagissant avec les rKA et pouvant moduler les propriétés biophysiques, le trafic à la membrane et la stabilisation synaptique des rKA (Zhang et al., 2009 ; Copits et al., 2011 ; Fisher et Mott, 2012).

La protéine Neto2 est une protéine à un domaine transmembranaire de 56 kDa présentant deux domaines CUB extracellulaires (domaines retrouvés dans la famille de CUB-domain proteins chez c-elegans identifiés comme étant des modulateurs des récepteurs à l'acétylcholine et des rAMPA) et un domaine LDL dans la région extracellulaire, nécessaire à l'interaction avec la sous-unité GluK2 (**Figure 14**) (Zhang et al., 2009). La protéine Neto2 interagit spécifiquement avec les sous-unités des rKA et n'interagit pas avec les sous-unités des rAMPA. Elle a d'abord été décrite comme une sous-unité auxiliaire modulant les propriétés biophysiques des rKA composés de la sous-unité GluK2 (Zhang et al., 2009). La protéine Neto2 augmente l'amplitude des courants médiés par l'activation de rKA et ralentit les cinétiques de désensibilisation et de désensibilisation du récepteur (Zhang et al., 2009; Straub et al., 2011). La modulation de ces propriétés biophysiques passe par une augmentation de la probabilité d'ouverture du récepteur et non par un changement de conductance du canal.

A l'instars des TARPS pour les rAMPA, les protéines Neto inhibent également le blocage du pore dépendant du voltage par les polyamines, (Soto et al., 2007 ; Fisher et Mott, 2012). Ainsi, les rKA composés de sous-unités GluK2(Q) non éditées, coexprimés avec les protéine Neto, présentent une diminution de la rectification entrante des courants à des voltages positifs quand ils sont coexprimés avec les sous-unités auxiliaires Neto. Ceci serait permis par la présence de 3 résidus positivement chargés situés dans le domaine transmembranaire des protéines Neto. La présence de ces résidus agirait comme un écran de charges positives réduisant l'accessibilité aux polyamines positivement chargées vers le pore du canal.

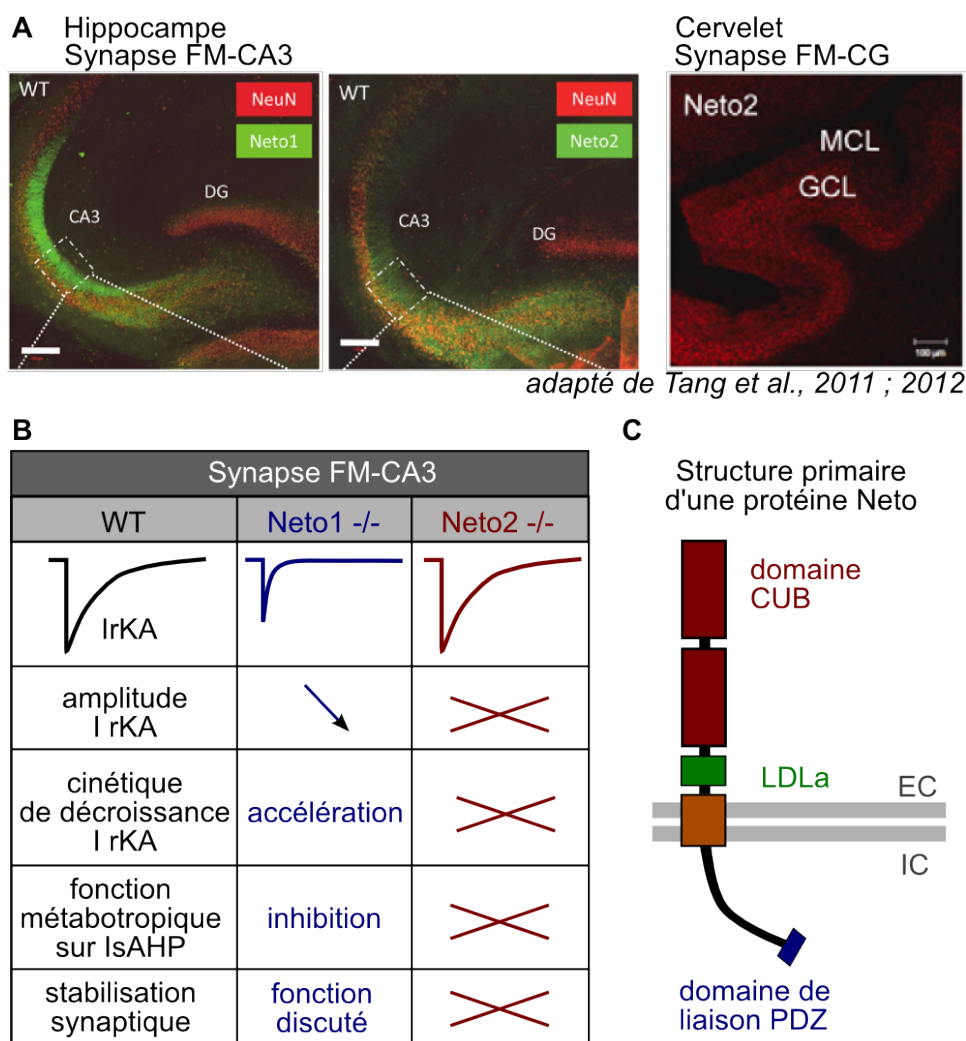


Figure 14 : rKA et sous-unité auxiliaire Neto. (A) Les protéines Neto1 et 2 sont toutes deux exprimées dans l'hippocampe et en particulier dans le stratum lucidum. (B) A la synapse FM-CA3, la protéine Neto1 module les propriétés biophysiques et la fonction métabotrope des rKA postsynaptiques, cependant le rôle de cette protéine sur le trafic à la membrane et la stabilisation synaptique à cette synapse reste encore discuté. Bien que la protéine Neto2 soit également exprimée dans cette région de l'hippocampe, elle ne semble pas moduler les propriétés des rKA à la synapse FM-CA3. (C) Structure primaire d'une protéine Neto.

Les protéines Neto peuvent également augmenter le trafic à la membrane de certains rKA, comme les hétéromères GluK1/GluK2b, des rKA présentant un faible trafic membranaire dans des conditions basales (Copits et al., 2011). La surexpression de la protéine Neto2 entraîne une accumulation de rKA composés par les sous-unités GluK1 et GluK2b dans la densité post-synaptique en culture primaire d'hippocampe.

Un homologue de la protéine Neto2, la protéine Neto1, interagit également avec les rKA (Zhang et al., 2009 ; Tang et al., 2011). Celle-ci est particulièrement enrichie dans le *stratum lucidum* de l'hippocampe où les fibres moussues du gyrus denté forment des synapses avec les cellules pyramidales de CA3 (**Figure 14**). A cette synapse, chez les souris Neto1^{-/-}, les courants médiés par les rKA ont une amplitude diminuée et une cinétique de décroissance plus rapide. La perte de Neto1 chez ces souris est également responsable d'une diminution du nombre de rKA dans la fraction de PSD de l'hippocampe (Tang et al., 2011). Néanmoins, chez les souris Neto1^{-/-}, le marquage immunohistochimique pour les sous-unités GluK2/3 ne montre aucune modification par rapport au contrôle dans le *stratum lucidum* (Straub et al., 2011). Ainsi le rôle de la protéine Neto1 dans le trafic et dans la stabilisation synaptique des rKA à la synapse FM-CA3 reste encore débattu. La protéine Neto1 permettrait également de moduler la fonction métabotrope des rKA dans CA3 (Wyeth et al., 2014). En effet, chez les souris Neto1^{-/-}, une perte de l'inhibition des courants sAHP après application en bain de kaïnate a été observé.

Notons également que la protéine Neto2 est également exprimée dans le *stratum lucidum* mais, chez les souris Neto2^{-/-} ni les courants médiés par les rKA, ni la fonction métabotrope des rKA sur les courants sAHP ne sont altérés par la perte de la protéine Neto2 à la synapse FM-CA3 (Tang et al., 2011 ; Wyeth et al., 2014). Ceci suggérerait que les rKA hétéromériques composés des sous-unités GluK2/GluK4 et GluK5 seraient préférentiellement modulés par la protéine Neto1 à cette synapse.

La protéine Neto2 jouerait préférentiellement un rôle dans le cervelet où elle est colocalisée avec la sous-unité GluK2 des rKA dans la couche de cellules granulaires du cervelet à la synapse formée entre les fibres moussues et les cellules granulaires (Tang et al., 2012) (**Figure 14**). Dans le cervelet, une diminution du nombre de rKA a été observée chez les souris Neto2^{-/-}. La modulation du nombre de rKA à la synapse dans le cervelet pourrait faire intervenir la protéine GRIP qui interagit avec le DCT de la protéine Neto2. La protéine Neto2 pourrait ainsi former un complexe avec la protéine GRIP et la sous-unité

GluK2. Cette interaction de Neto2 avec GRIP permettrait la stabilisation la liaison de GluK2 avec GRIP et ainsi que celle des rKA à la synapse.

Les propriétés des rKA peuvent être modulées de manières différentes par les protéines Neto1 et Neto2. Par exemple, la protéine Neto1 accélère la cinétique de désensibilisation des rKA composés de la sous-unité GluK1 tandis que la protéine Neto2 la ralentirait (Copits et al., 2011). Les protéines Neto peuvent également moduler de manière distincte certaines propriétés des rKA en fonction des sous-unités qui les composent. Ainsi, la protéine Neto1 augmente la sensibilité au glutamate des rKA recombinant homomériques composés de la sous-unité GluK2 (Fisher et Mott., 2013) tandis qu'elle ne semble pas modifier la sensibilité au glutamate des rKA hétéromériques composés des sous-unités GluK2 et GluK5.

Par ailleurs, la protéine Neto1 ralentit, voir inhibe la désensibilisation des rKA hétéromériques composés des sous-unités GluK2-GluK5 et GluK2-GluK4 de manière dépendante de la concentration de glutamate (Fisher et Mott., 2013). En effet, plus la concentration de glutamate est faible plus les effets sur la désensibilisation sont importants. Neto1 entraîne également une accélération de la récupération après désensibilisation ce qui permettrait aux neurones de CA3 de répondre à des stimulations à haute fréquence par les cellules granulaires, à la synapse FM-CA3.

Certaines études ont montré que la protéine Neto1 pouvait interagir avec les rNMDA (Cousins et al., 2013 ; Wyeth et al., 2014). Le lien entre les protéines Neto et les rNMDA est encore sujet à controverse. Une diminution de la transmission synaptique médiée par les rNMDA a été rapportée par une étude chez les souris Neto1^{-/-} aux synapses associatives et commissurales de CA3 (Tang et al., 2011), mais une autre étude menée la même année n'a pas confirmé cette observation (Straub et al. 2011). Par ailleurs, aucune des études menées sur la protéine Neto1 n'a permis d'observer de déficit de la transmission impliquant les rNMDA à la synapse FM-CA3 (Straub et al., 2011 ; Tang et al., 2011). Une étude, conduite par microscopie électronique, a révélé que le nombre de synapses FM-CA3 exprimant la sous-unité GluN2B était augmenté chez les souris Neto1-2^{-/-} (Wyeth et al., 2014). Mais aucun changement n'a été observé pour la sous-unité GluN2A. De plus les courants médiés par les rNMDA à la synapse FM-CA3 sont plus sensibles à l'ifenprodil, un antagoniste spécifique des rNMDA composés de la sous-unité GluN2B, chez les souris Neto1-2^{-/-}.

5) Pharmacologie des récepteurs kaïnate

Les sous-unités des rKA ayant une structure similaire à celle des autres récepteurs ionotropiques du glutamate (Bennett and Dingledine, 1995), peu de molécules sélectives pour ces récepteurs existent. Les rAMPA et rKA ont une affinité similaire pour le glutamate ($EC_{50} \sim 300 \mu M$) (Paternain et al., 1996). Les rKA natifs et recombinants peuvent également être activés par des agonistes exogènes tels que l'AMPA, le kaïnate et le domoate, qui activent également les rAMPA (Bleakman and Lodge, 1998). La synthèse et la caractérisation de nouveaux composés ont conduit à l'identification de différents agonistes et antagonistes spécifiques (Tableau 1). Les antagonistes compétitifs classiques des rAMPA comme le CNQX s'avèrent être peu sélectifs et antagonisent également les rKA. L'antagoniste NBQX, bien qu'affectant également les rKA est néanmoins plus de 100 fois plus sélectif pour les rAMPA que pour les rKA (Mayer et al., 2006), il peut ainsi être utilisé comme antagoniste des rAMPA dans l'étude de rKA natif (Mulle et al., 2000). Par la suite l'étude des rKA natifs a été possible par le développement d'une série de 2,3 benzodiazepines, comme le GYKI 53655, qui agit comme un antagoniste non-compétitif sélectif des rAMPA (Paternain et al., 1995 ; Wilding et Huettner, 1996). Malgré tout, ces antagonistes n'ont pas été testés sur toutes les combinaisons de récepteurs hétéromériques. La potentielle hétérogénéité dans la composition des rKA, de part le nombre de possibilités d'assemblage entre les différentes sous-unités existantes, complique d'autant plus leur caractérisation pharmacologique. Il existe tout de même un certain nombre de composés développés pour les rKA.

a) Agonistes

L'acide 5-tert-butyl-4-isoxazolepropionique (ATPA) et la (S)-5-iodowillardiine sont des agonistes puissants et sélectifs de GluK1, avec une faible affinité pour les rAMPA et les rKA contenant les sous-unités GluK2 et GluK3 (Clarke et al., 1997; Swanson and Heinemann, 1998; Alt et al., 2004; Clarke and Collingridge, 2004). Les récepteurs contenant la sous-unité GluK1 peuvent également être activé par l'AMPA et les récepteurs hétéromériques contenant les sous-unités GluK2 et GluK5 par l'ATPA et l'AMPA (Paternain et al., 2000). L'acide (2S,4R)-4-méthyl glutamique (SYM2081) et l'acide (2S,4R,6E)-2-amino-4-carboxy-7-(2-naphtyl)hept-6-énoïque (LY339434) sont plus sélectifs pour les rKA que pour les récepteurs AMPA. Le premier affiche une sélectivité pour les rKA contenant les sous-unités GluK1 et GluK2 et le second semble être plus sélectif pour la sous-unité GluK1 que pour les sous-unités GluK2 et GluK3 (Small et al., 1998; Pedregal

et al., 2000; Alt et al., 2004). Le SYM2081 quant à lui, est un agoniste qui agit comme un antagoniste en faisant entrer le récepteur dans un état de désensibilisation très rapidement (Zhou et al., 1997). La toxine marine nommée dysihaïne, agit comme un agoniste des rKA (Swanson et al., 2002). Grâce à cette substance, il a été mis en évidence que l'activation de la sous-unité GluK1 était suffisante pour permettre l'ouverture du canal dans des récepteurs hétéromériques composés des sous-unités GluK1/GluK5 (Swanson et al., 2002).

b) Antagonistes

Peu de composés ont à ce jour été décrits comme étant des antagonistes sélectifs des rKA. La plupart d'entre eux s'avèrent être sélectifs pour la sous-unité GluK1. Les composés de la famille des quinoxalinediones, parmi lesquelles le 6-cyano-7-nitroquinoxaline (CNQX) et le 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo(F)quinoxaline (NBQX), agissent comme des antagonistes compétitifs des rKA natifs et recombinants. Le NBQX est plus de 100 fois plus sélectif pour les rAMPA que pour les rKA pour de faibles concentrations (Mayer, 2006) et peut ainsi être utilisé comme antagoniste sélectif des récepteurs AMPA pour l'étude des rKA natifs dans le système nerveux central (Bureau et al., 1999). Des dérivés du pyrrolil-quinoxalinedione, comme le LU97175, possèdent une plus forte affinité pour les rKA que pour les rAMPA, en particulier pour les sous-unités GluK1, GluK2 et GluK3 des rKA (Loscher et al., 1999). De nouveaux composés présentant une meilleure sélectivité pour les rKA ont été développés par la suite. Ils agissent comme des antagonistes plus spécifiques de certaines sous-unités. Parmi ceux ci, nous pouvons citer le (3S,4aR,6S,8aR)-6-(4-carboxyphényl)méthyl-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-décahydroxyisoquinoline-3-carboxilate (LY382884), un composé dérivé de l'antagoniste non compétitif des rAMPA et le (3S,4aR,6R,8aR)-6-(2-(tétrazol-5-yl)éthyl)décahydroxyisoquinoline-3-carboxilate (LY293558), qui présente une sélectivité pour la sous-unité GluK1 (Bortolotto et al., 1999; Smolders et al., 2002; Alt, 2004) mais aussi le LY377770 (O'Neill et al., 1998). De même, l'UBP296 et 302, des dérivés de la willardiine, sont des antagonistes sélectifs des rKA contenant la sous-unité GluK1 (More, 2004). L'UBP310 a été montré comme étant un antagoniste sélectif de ces mêmes récepteurs dans des systèmes recombinants (Dolman et al., 2005). L'UBP302, 310 et 316 bloquent les récepteurs recombinants homomériques GluK3, mais sont peu efficaces sur les récepteurs homomériques GluK2 ou hétéromériques GluK2/GluK3 (Perrais et al., 2009 ; Pinheiro et al., 2013). Le GYKI53655, antagoniste non-compétitif spécifique des

récepteurs AMPA, bloque à forte concentration (50 μ M) les récepteurs contenant la sous-unité GluK3 (Perrais et al., 2009). L'UBP 310 est également un antagoniste spécifique des récepteurs homomériques GluK2/GluK5 à la synapse FM-CA3 de l'hippocampe et dans un système hétérologue (Pinheiro et al., 2013). Le NS3763 et l'ACET sont aussi spécifiques pour la sous-unité GluK1 (Christensen, 2004; Dargan et al., 2009). Le MSVIII-19, un analogue synthétique de la dysiherbaïne, est également un antagoniste des récepteurs homomériques GluK1 (Sanders et al., 2005). Les rKA peuvent également être bloqués par les lanthanides, en particulier par le lanthanum et le gadolinium (Huettnner et al., 1998) avec une meilleure efficacité par rapport aux récepteurs AMPA. Le zinc est aussi capable d'inhiber ou de potentialiser certains rKA natifs et recombinants (Mott et al.; Huettnner et al., 1998; Fukushima et al., 2003 ; Véran et al., 2012).

c) Modulateurs allostériques

Outre les agonistes et les antagonistes, la fonction des rKA peut être modulée par différents modulateurs allostériques. Des études fonctionnelles ont notamment mises en évidence que l'activation des rKA nécessite la présence de certains ions dans le milieu extracellulaire (Bowie, 2002; Paternain et al., 2003). En effet, les rKA composés de la sous-unité GluK2 sont sensibles aux cations et anions monovalents comme les ions Na^+ et le Cl^- (Bowie, 2002). Cette sous-unité possède des sites de liaison aux anions et aux cations, indépendants l'un de l'autre, que le Cl^- et le Na^+ lient respectivement (Plested and Mayer, 2007; Plested et al., 2008). La plupart des rKA natifs et recombinants, à l'exception des hétéromères GluK2/GluK4, sont inhibés par les protons de manière dépendante du voltage (Mott et al., 2003).

D'autres molécules comme celles de la famille des lectines issues des plantes, parmi lesquelles la concanavaline A, l'agglutinine du soja et l'agglutinine des germes de blé constituent des bloqueurs de la désensibilisation des rKA, en particulier sur les rKA homomériques (Partin et al., 1993; Wong and Mayer, 1993; Yue et al., 1995). Le blocage de la désensibilisation par la concanavaline A diffère entre agoniste complet et partiel (Fay and Bowie, 2006). Ces composés agissent en se liant à la chaîne carbohydrate latérale des rKA. La modulation de l'activité du canal par ces molécules nécessite la N-glycosylation du récepteurs (Everts et al., 1997). Certains acides gras cis-insaturés, tels que l'acide arachidonique et l'acide docosahexanoïque, constituants majeurs des phospholipides membranaires dans le cerveau, peuvent agir comme bloqueurs des rKA natifs (Wilding et al., 1998). Les acides gras membranaires bloquent la sous-unité

GluK2(R) et les hétéromères GluK2(R)/GluK1(R) mais induisent une plus faible inhibition des homomères GluK1 et des rKA non-édités (Wilding, 2005).

Tableau 1 : Pharmacologie des rKA

Composé	Activité	Sélectivité	Structure	Référence
ATPA	Agoniste	GluK1 et agoniste partiel de GluK2/GluK5		(Clarke et al., 1997)
(S)-5-iodowillardiine	Agoniste	GluK1 et agoniste partiel de GluK2/GluK5		(Swanson et al., 1998)
LY339434	Agoniste	GluK1		(Small et al., 1998)
Dysiherbaine	Agoniste	GluK1 (active aussi mGluR5)		(Swanson et al., 2002)
LU97175	Antagoniste compétitif	GluK3>GluK1>GluK2		(Loscher et al., 1999)
LY377770	Antagoniste compétitif	GluK1		(O'Neill et al., 1998)
LY382884	Antagoniste compétitif	GluK1		(O'Neill et al., 1998)
UBP296	Antagoniste compétitif	GluK1, GluK1/GluK2, GluK1/GluK5		(More, 2004)
NS3763	Antagoniste non compétitif	GluK1		(Christensen, 2004)
SYM2081	Antagoniste	GluK1, GluK2 (bloque aussi EEAT2 à forte concentration)		(Zhou et al., 1997)
MSVII-19	Antagoniste	GluK1		(Sanders et al., 2005)
UBP 310	Antagoniste	GluK1, GluK2/GluK5>GluK2		(Pinheiro et al., 2013 Dolman et al., 2005)

6) Distribution et fonctions des récepteurs kaïnate

a) Distribution des récepteurs kaïnate dans le système nerveux central

Les rKA sont largement exprimés dans l'ensemble du système nerveux des vertébrés et forment une mosaïque complexe d'expression dans l'ensemble du système

nerveux (Wisden et Seeburg, 1993 ; Bahn et al., 1994). Les premières études sur la distribution des rKA dans le SNC ont porté sur l'identification de sites de forte affinité pour le kaïnate par autoradiographie de tranches de cerveau en présence de [^3H]-kaïnate (Foster et al., 1981 ; Monaghan et al., 1982). L'affinité du kaïnate pour les différentes structures qui composent le système nerveux central est variable d'une région à l'autre, et au sein d'une même structure, d'une couche de neurone à l'autre. En effet, le kaïnate présente une importante affinité pour des régions comme le télencéphale, ou le cervelet. L'autoradiographie de l'hippocampe révèle en particulier une distribution du [^3H]-kaïnate limitée au *stratum lucidum* et au gyrus denté (Monaghan et al., 1982). Cette méthodologie présente l'inconvénient de ne pas être très sensible et de ne pas permettre de distinguer le profil d'expression d'une sous-unité par rapport à l'autre.

Le clonage des rKA a permis par la suite de déterminer avec plus de précision le profil d'expression de chaque sous-unité par hybridation *in situ* (Egebjerg et al., 1991 ; Wisden et Seeburg, 1993 ; Bureau et al., 1999). Ces études démontrent que les sous-unités des rKA sont exprimées dans de nombreuses structures du SNC comme le cortex (les sous-unités GluK3 et GluK5 dans du néocortex ; la sous-unité GluK1 dans les cortex cingulaire et piriforme et dans le subiculum), le thalamus (sous-unités GluK1 et GluK3), dans le cervelet (sous-unités GluK1, GluK2, GluK3 et GluK5). L'expression des rKA apparaît également dans des noyaux du septum, l'hypothalamus, le caudé-putamen et dans la moelle épinière.

b) Distribution subcellulaire des récepteurs kaïnate dans l'hippocampe

L'hippocampe représente un bon exemple de la complexité de l'expression des rKA dans les différents types neuronaux. En effet, l'hippocampe regroupe la totalité des 5 sous-unités des rKA, et au sein même de cette structure le profil d'expression de ces sous-unités est très hétérogène. Dans l'hippocampe, L'ARN messager codant pour la sous-unité GluK2 est exprimé à la fois par les cellules pyramidales et les interneurons de CA1, CA3, et dans le gyrus denté (Bureau et al., 1999). Néanmoins le niveau d'expression de GluK2 dans CA3 est tout de même deux fois plus important que dans les cellules pyramidales de CA1. La sous-unité GluK1 est quant à elle préférentiellement exprimée dans les interneurons GABAergiques où elle s'assemble avec la sous-unité GluK2 (Bureau et al., 1999 ; Paternain et al., 2000). L'ARNm codant pour la sous-unité GluK3 est essentiellement exprimée dans les cellules granulaires du gyrus denté (Bureau et al., 1999). La sous-unité GluK4 est fortement exprimée dans la couche de cellules

pyramidales de CA3, beaucoup plus faiblement dans le gyrus denté et est absente des autres régions de l'hippocampe (Werner et al., 1991 ; Kask et al., 2000). Comme la sous-unité GluK2, la sous-unité GluK5 est exprimée par les cellules pyramidales de CA3, de CA1 et dans le gyrus denté mais avec un niveau d'expression plus important dans les cellules pyramidales de CA3 (Bureau et al., 1999).

L'étude fonctionnelle des rKA révèle que ces récepteurs peuvent être localisés de manière hétérogène dans les différents compartiments subcellulaires des neurones où ils sont exprimés. Ainsi, les rKA peuvent être compartimentés de manière très stricte dans certaines régions subcellulaires. Les neurones pyramidaux de CA3 constituent un bon exemple de cette compartimentation. En effet, dans ces neurones, les ARNm codant pour les sous-unités GluK2, GluK4 et GluK5 sont fortement exprimés, mais les études fonctionnelles indiquent que les rKA post-synaptiques sont strictement ségrégués à la synapse formée entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3 et sont totalement absents des autres types d'afférences sur ces mêmes neurones (voies associatives et commissurales, voies perforantes) (Vignes et Collingridge ; Bureau et al., 1999 ; Castillo et al., 1997 ; Mulle et al., 1998 ; Ruiz et al., 2005 ; Darstein et al., 2003). En effet, des courants synaptiques médiés par les rKA peuvent être activés par stimulation électrique des fibres moussues (Mulle et al., 1998 ; Bureau et al., 1999), ou par application de glutamate « en puff » dans le *stratum lucidum* où les fibres moussues du gyrus denté font synapses avec les cellules pyramidales de CA3 (Castillo et al., 1997). En revanche ces courants sont absents après application de glutamate « en puff » dans le *stratum radiatum* où les axones constituant les voies associatives et commissurales provenant d'autres cellules de CA3 et les voies perforantes du cortex entorhinal contactant les cellules pyramidales de CA3. Ces observations fonctionnelles corroborent les marquages autoradiographiques au [³H]-kaïnate (Foster et al., 1981 ; Monaghan et al., 1982) qui montre une forte affinité du [³H]-kaïnate dans le *stratum lucidum*. De même, les marquages immunohistochimiques dirigés contre les sous-unités GluK2 et GluK5 révèlent une présence très importante dans le *stratum lucidum* (Darstein et al., 2003 ; Ruiz et al., 2005) (**Figure 15**).

Les mécanismes qui sous-tendent cette ségrégation restent inconnus. La question de la ségrégation des récepteurs à la synapse peut être étroitement liée à celle des mécanismes mis en jeu dans la stabilisation synaptique des rKA à travers d'éventuelles interactions protéiques. Dans cette optique, nous avons cherché tout

d'abord à caractériser cette ségrégation subcellulaire dans CA3 puis à déterminer les mécanismes moléculaires sous-tendant la stabilisation synaptique des rKA à la synapse formée entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3.

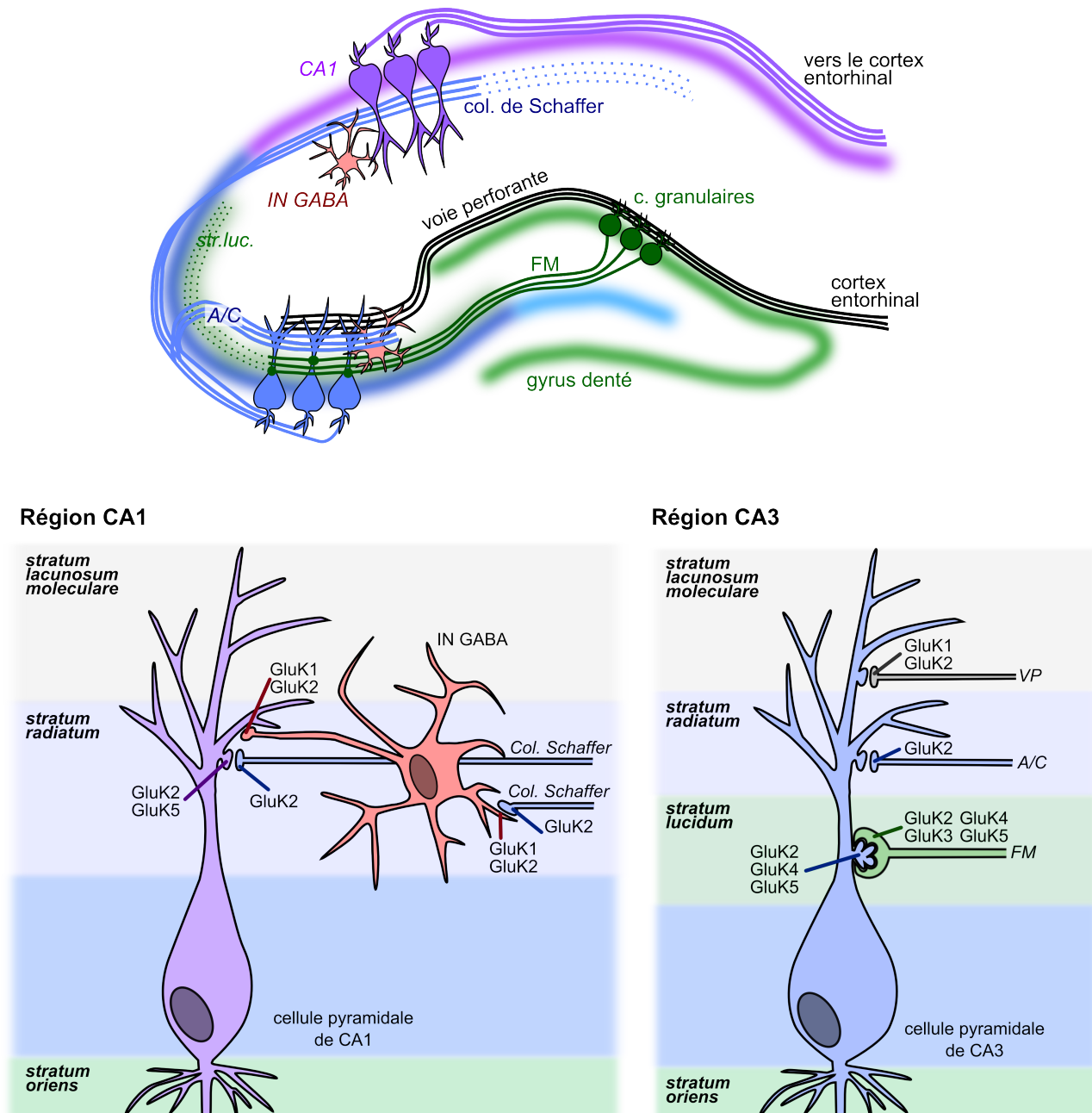


Figure 15 : Distribution subcellulaire des rKA dans l'hippocampe.

c) Fonction des récepteurs kainate dans l'hippocampe

Les souris knockout pour la sous-unité GluK2 présentent une altération de la mémoire de peur conditionnée (Ko et al., 2005), mais ne présentent pas de déficit majeur de comportement lors de batterie classique incluant le labyrinthe aquatique de Morris (Mulle et al., 1998).

✓ Les récepteurs kaïnate dans les cellules pyramidales de CA3

Les rKA peuvent être localisés dans les compartiments pré- et post-synaptiques des synapses formées sur les cellules pyramidales de CA3. Dans ces neurones, les rKA post-synaptiques sont exclusivement localisés à la synapse formée entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3 (Vignes et Collingridge, 1997 ; Castillo et al., 1997 ; Mulle et al., 1998). A cette synapse, il est possible d'isoler pharmacologiquement des courants médiés par les rKA après stimulation électrique de fibres moussues en utilisant un antagoniste spécifique des rAMPA n'affectant pas les rKA comme le GYKI 53655. Ces courants médiés par les rKA sont de faible amplitude en comparaison des courants médiés par les rAMPA, et présentent une cinétique de décroissance lente. Ces courants sont totalement absents chez les souris knockout pour la sous-unité GluK2 (Mulle et al., 1998). En l'absence de la sous-unité GluK2, les sous-unités GluK4 et GluK5 ne peuvent pas s'assembler pour former des rKA fonctionnels. Néanmoins les sous-unités GluK4 et GluK5 jouent elles aussi un rôle déterminant dans la fonctionnalité des rKA à cette synapse. En effet, en absence de la sous-unité GluK5, les courants médiés par les rKA présentent une cinétique de décroissance plus rapide que chez les souris contrôle (Contractor et al., 2003). Chez les souris knockout pour la sous-unité GluK4, les courants médiés par les rKA sont également altérés et présentent une amplitude plus faible et une cinétique de décroissance plus lente (Fernandes et al., 2009). Finalement, chez les souris double-knockout pour les sous-unités GluK4 et GluK5, les courants médiés par les rKA sont totalement abolis (Fernandes et al., 2009). Il est toutefois intéressant de noter qu'en l'absence des sous-unités GluK4 et GluK5, bien que les courants médiés par les rKA soient abolis, la sous-unité GluK2 est toujours exprimée à la membrane (Fernandes et al., 2009). Néanmoins, le nombre de rKA à la synapse est altéré dans les compartiments pré- et post-synaptiques. Ces résultats suggèrent que les sous-unités GluK4 et GluK5 sont nécessaires à la localisation synaptique des rKA à la synapse FM-CA3.

La lente cinétique de décroissance des courants médiés par les rKA à la synapse FM-CA3 favorise la sommation temporelle des signaux synaptiques (Sachidhanandam et al., 2009). Cependant, la fonction ionotrope des rKA post-synaptiques ne participe que de façon minime à la dynamique de transfert de l'information à la synapse FM-CA3, et ce, en raison des fortes propriétés de facilitation de la transmission synaptique à court-terme à cette synapse (Pinheiro et al., 2013).

Les rKA post-synaptiques possèdent également une fonction métabotrope à cette synapse. En effet, l'activation des rKA post-synaptiques à la synapse FM-CA3 entraîne une inhibition des courants sAHP et mAHP (Fisahn et al., 2004 ; Chamberlain et al., 2013 ; Ruiz et al., 2005). Cette fonction métabotrope implique des canaux potassiques importants dans la phase de post-hyperpolarisation (afterhyperpolarization : AHP) des potentiels d'action (PA). Les courants sAHP (slow AHP) suivent de brèves bouffées de potentiels d'action et sont générés par des courants potassiques dépendants du Ca^{2+} . Ces courants peuvent se maintenir plusieurs secondes et leur activation est dépendante de la fréquence et du nombre de PA de la bouffée. Ils agissent ainsi comme un mécanisme de feed-back négatif pour limiter la genèse répétée de bouffées de PA durant une hyperexcitabilité de la cellule (Traub et al., 1993). Ces courants peuvent être inhibés par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) après la libération de neurotransmetteurs comme la noradrénaline, l'acétylcholine ou le glutamate (Nicoll, 1988). Cette fonction métabotrope est indépendante de la fonction ionotrope des rKA puisque l'utilisation d'un antagoniste spécifique pour les rKA hétéromériques post-synaptiques, l'UBP 310, n'altère pas cette fonction (Pinheiro et al., 2013).

Cette inhibition des courants AHP est dépendante des rKA contenant la sous-unité GluK2 (Fisahn et al., 2005 ; Ruiz et al., 2005 ; Fernandes et al., 2009). Mais la participation des sous-unités GluK4 et GluK5 reste encore discutée (Ruiz et al., 2005 ; Fernandez et al., 2009). Cette inhibition des courants sAHP est altérée chez les souris KO pour la protéine NETO1, sous-unité auxiliaire des rKA à la synapse FM-CA3 (Wyeth et al., 2014). De plus, la DLT des rKA, entraîne une diminution de l'inhibition des courants sAHP par les rKA (Chamberlain et al., 2013). Ce mécanisme de plasticité synaptique a alors pour conséquence fonctionnelle la régulation de l'excitabilité cellulaire dans CA3. Ainsi de courts trains de stimulations de cellules granulaires entraînent, d'une part, une dépolarisation de la membrane post-synaptique, et d'autre part une augmentation de l'excitabilité neuronale pendant plusieurs secondes.

La fonction métabotrope des rKA intervient également dans la modulation de l'excitabilité des interneurons de l'hippocampe lors des 2 premières semaines de vie postnatale. En effet, durant cette période, les rKA exprimés dans les interneurons de CA3 sont activés de manière tonique par le glutamate ambiant, conduisant à une inhibition tonique des courants AHP, et à une augmentation de l'excitabilité de ces interneurons

(Segerstrale et al., 2010). Cette modulation fait intervenir des rKA composés de la sous-unité GluK1.

Aux synapses formées sur les cellules pyramidales de CA3, les rKA sont également présents dans les boutons pré-synaptiques où ils modulent la libération de glutamate en agissant comme des autorécepteurs. Les rKA peuvent être activés par un événement unique de libération de glutamate entraînant une facilitation de la transmission synaptique en moins de 10 ms (Contractor et al., 2001 ; Lauri et al., 2001 ; Schmitz al., 2001 ; Pinheiro et al., 2007).

A la synapse FM-CA3, les sous-unités GluK2, GluK3, GluK4 et GluK5 sont des sous-unités des rKA critiques pour la modulation de l'excitabilité axonale et des plasticités pré-synaptiques à court-terme (Contractor et al., 2000, 2001, 2003 ; Pinheiro et al., 2007 ; Fernandes et al., 2009). En effet, les souris knockout pour la sous-unité GluK2 présentent un déficit de la facilitation à court-terme à cette synapse, incluant la facilitation en fréquence et la facilitation en paire (Contractor et al., 2001). De même, des déficits similaires des plasticités pré-synaptiques à court-terme ont pu être observés à la synapse FM-CA3 chez les souris knockout pour la sous-unité GluK3 (Pinheiro et al., 2007).

Chez les souris double knockout pour les sous-unités GluK4 et GluK5, la facilitation en paire est également altérée tandis que la facilitation en fréquence reste intacte (Fernandes et al., 2009). La délétion génétique des sous-unités GluK4 et GluK5 déstabilise la localisation pré-synaptique des rKA à proximité des sites de libération du glutamate, les délocalisant ainsi à distance de ces sites où ils restent capables de répondre à des long trains de stimuli entraînant une libération de glutamate soutenue.

En participant à ces phénomènes de plasticité synaptique à court-terme à la synapse FM-CA3, les rKA agissent comme des amplificateurs de la transmission synaptique entre les cellules granulaires et les cellules pyramidales de CA3. Ils permettent de réduire le délai entre le début d'une décharge d'activité du gyrus denté et l'activation du neurone de CA3 cible, réduisant ainsi le seuil nécessaire pour le transfert de l'information du gyrus denté vers les cellules pyramidales de CA3 (Sachidhanandam et al., 2009). En contrôlant ainsi cette dynamique d'activité à court-terme, les rKA permettent à la synapse FM-CA3 d'agir comme un détonateur conditionnel. Ils participeraient à la dynamique de l'intégration synaptique de l'information dans CA3 (Pinheiro et Mulle ; 2006).

En plus de moduler les phénomènes de plasticité à court-terme à la synapse FM-CA3, les rKA participent à la PLT pré-synaptique à cette synapse (Contractor et al., 2001). En effet, chez les souris KO pour la sous-unité GluK2, la PLT pré-synaptique est diminuée (la PLT résiduelle étant dépendante de l'activation de récepteurs métabotropiques mGluR1). L'activation de rKA pré-synaptiques est responsable d'une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire dans le bouton, après libération des stocks intracellulaires (Scott et al., 2008 ; Nistico et al., 2011).

Le blocage de l'activité des rKA entraîne une augmentation du seuil d'induction de la PLT pré-synaptique à la synapse FM-CA3 (Schmitz et al., 2003). Cette diminution du seuil d'induction de la PLT par l'activation des rKA serait nécessaire à la coopérativité entre différentes afférences sur CA3. En effet, l'application d'un bref tétanus incapable à lui seul d'induire une PLT en association à un tétanus plus fort aux synapses A/C ou à une fibre moussue voisine, permet l'induction d'une PLT. Cette coopération est dépendante de l'activation de rKA pré-synaptiques. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le rôle des rKA dans cette PLT sont mal connus. Mais il a été suggéré que la facilitation synaptique induite par l'activation de rKA pré-synaptiques serait la conséquence d'une dépolarisation pré-synaptique qui engendrerait un élargissement du potentiel d'action par l'inactivation de canaux potassiques permettant une augmentation de l'entrée de Ca^{2+} dans la terminaison synaptique (Geiger et Jonas, 2000 ; Schmitz et al., 2003).

La fonction pré-synaptique des rKA joue un rôle important lors du développement post-natal précoce des réseaux de neurones de l'hippocampe (Lauri et al., 2005). Les rKA pré-synaptiques participent alors au contrôle de la l'activité spontanée des réseaux de neurones de l'hippocampe. Lors de la première semaine postnatale, les rKA pré-synaptiques sont activés de façon tonique par le glutamate ambiant. Ils permettent alors d'inhiber la libération vésiculaire du glutamate aux synapses formées sur les cellules pyramidales de CA3 (Lauri et al., 2005). Durant cette même période postnatale, ces rKA pré-synaptiques sont également présents dans les interneurons du *stratum lucidum* de CA3, où leur activation par le glutamate ambiant à cette fois ci pour conséquence de faciliter la libération vésiculaire du glutamate. Ainsi, lors des premières semaines postnatales, les rKA participent au contrôle des patrons d'activité des réseaux de neurones en développement en régulant la balance entre transmission GABAergique et glutamatergique (Lauri et al., 2005) en faveur d'une inhibition de l'activité du réseau. Cette régulation est dépendante de la sous-unité GluK1.

Une meilleure compréhension du rôle des rKA dans l'activité du circuit de CA3 nécessite de prendre en considération l'expression des rKA par les interneurons GABAergiques de CA3, ces derniers jouant un rôle majeur dans l'établissement de l'activité oscillatoire du réseau. Il n'a pas encore été bien établi si des rKA fonctionnels peuvent être activés dans des conditions physiologiques dans différentes classes d'interneurones de CA3, comme dans CA1, en particulier ceux contactés par les fibres moussues.

✓ Les récepteurs kaïnate dans les cellules pyramidales de CA1

Dans CA1, bien que la sous-unité GluK2 soit exprimée dans les cellules pyramidales (Egebjerg et al., 1991 ; Bureau et al., 1999), il est impossible de mesurer des courants synaptiques médiés par les rKA dans ces cellules (Frerking et al., 1998). La fonction des rKA dans les cellules pyramidales de CA1 est principalement une fonction métabotrope indépendante de la fonction de canal du récepteur.

L'activation des rKA des cellules pyramidales de CA1 après application de kaïnate en bain, ou après stimulation synaptique tétranique, entraîne, comme dans les cellules pyramidales de CA3, une inhibition des courants sAHP dans les neurones pyramidaux de CA1 (Melyan et al., 2002 ; 2004). Cette inhibition passe par l'activation de protéine G et est dépendante de la PKC.

Chez l'adulte, l'activation pharmacologique des rKA peut entraîner une inhibition de la transmission glutamatergique à la synapse collatérale de Schaffer-cellules pyramidales de CA1 (Frerking et al., 2001). Cette inhibition ne serait pas liée à l'activation de rKA exprimés par les interneurons de CA1 augmentant ainsi la transmission GABAergique, mais à l'activation de rKA pré-synaptiques directement à la synapse collatérale de Schaffer-CA1 qui inhiberaient la probabilité de libération de glutamate de manière dépendante de l'activation de protéine G sensible à la toxine pertussique.

Lors de la première semaine postnatale, des rKA pré-synaptiques sont exprimés dans certaines populations de synapses situées entre les collatérales de Schaffer et les cellules pyramidales de CA1. Durant cette période, les rKA sont physiologiquement activés par le glutamate ambiant et participent à l'inhibition tonique de la libération de glutamate pour maintenir une faible probabilité de libération de glutamate à la synapse et cet effet est dépendant de l'activation de protéine G sensible à la toxine pertussique. Ainsi ces synapses produisent une forte facilitation en fréquence permettant aux neurones de

CA1 immatures de répondre de façon préférentielle à des stimuli à haute fréquence (Lauri et al., 2006). L'induction d'une PLT exprimée pré-synaptiquement pendant la première semaine postnatale à ces synapses réprime l'inhibition de la libération de glutamate altérant ainsi les propriétés dynamiques de transmission synaptique à cette synapse. Durant ce stade précoce de développement, les rKA ne sont pas exprimés à toutes les synapses entre collatérales de Schaffer et CA1 et les synapses n'exprimant pas de rKA pré-synaptiques présentent une probabilité de libération de glutamate plus importante et une absence de la facilitation en fréquence de la transmission synaptique. Ces synapses présentent ainsi des propriétés de transmission synaptiques semblables à celles de synapses matures, suggérant ainsi que la perte de stimulation tonique des rKA pendant la première semaine postnatale permettrait une maturation fonctionnelle de ces synapses.

✓ Les récepteurs kaïnate dans les interneurons de CA1

Contrairement aux interneurons de CA3, la fonction des rKA dans les interneurons de CA1 a été très largement décrite. Certains interneurons GABAergiques situés dans le *stratum radiatum* et le *stratum lacunosum* de CA1 expriment des rKA post-synaptiques au niveau de l'arborisation somato-dendritique (Wondolowski et Frerking, 2009 ; Frerking et al., 1998) ainsi que dans les neurones positifs à la somatostatine dans le *stratum oriens* (Goldin et al., 2007 ; Yang et al., 2007). Dans ces interneurons, ces récepteurs sont essentiellement composés des sous-unités GluK1 et GluK2. Contrairement aux neurones de CA1 où des rKA post-synaptiques sont exprimés mais où aucun courant médié par ces récepteurs ne peut être mesuré, l'activation des rKA post-synaptiques dans les interneurons de CA1 permet d'activer des courants présentant une cinétique de décroissance lente, comme dans les cellules pyramidales de CA3. Les courants médiés par l'activation de ces rKA augmente l'excitabilité de ces interneurons (Frerking et al., 1998 ; Wondolowski et Frerking, 2009). En effet, l'activation des rKA post-synaptiques dans les interneurons de CA1 entraîne une dépolarisation et une augmentation de leur fréquence de décharge (Frerking et al., 1998 ; Cossart et al., 1998). Cette augmentation de l'excitabilité a pour conséquence de favoriser l'inhibition des cellules pyramidales de CA1 qu'ils innervent. En modifiant l'excitabilité de ces neurones, les rKA participent ainsi à la modulation de l'activité de réseau et de l'activité rythmique dans l'hippocampe (Goldin et al., 2007 ; Yang et al., 2007 ; Huxter et al., 2007). Ainsi l'inhibition des rKA contenant la sous-unité GluK1 par l'UBP 310 et l'UBP 316 *in vivo* sur le rat éveillé entraîne un ralentissement des oscillations theta dans toutes les couches de

l'hippocampe sans affecter l'amplitude des oscillations (Huxter et al., 2007). En raison de l'expression sélective de la sous-unité GluK1 dans les interneurons de l'hippocampe, cela suggère un rôle de l'activation endogène des rKA exprimés par les interneurons dans la régulation du rythme theta. Néanmoins, il faut tout de même noter que les antagonistes des rKA contenant la sous-unité GluK1 peuvent également inhiber les rKA hétéromériques GluK2/GluK5 exprimés à la synapse FM/CA3 de l'hippocampe (Pinheiro et al., 2013). Ainsi l'utilisation de ces antagonistes dans cette étude a pu affecter l'activité des cellules pyramidales de CA3.

Certains interneurons de CA1 expriment également des rKA pré-synaptiques. Si les rKA post-synaptiques participent à la dépolarisation des interneurons par une action dépendante des propriétés de canal du récepteur, de nombreuses études ont au contraire montré que des rKA pré-synaptiques peuvent être responsables d'une inhibition de la libération vésiculaire de GABA (Rodriguez-Morino et al., 1997 ; Cunha et al., 1997 ; Rodriguez-Morino et al., 2000). *In vivo*, cette levée de l'inhibition (ou désinhibition) est responsable d'une augmentation de l'excitabilité des neurones pyramidaux dans CA1 qui adoptent alors un profil de décharge semblable à celui observé lors d'activités épileptiques induites par l'exposition à des drogues convulsivantes responsables d'un blocage de l'inhibition par le GABA. L'activation de rKA présents dans les terminaisons GABAergiques serait due à une diffusion du glutamate (spillover) provenant de synapses glutamatergiques adjacentes jusqu'à la synapse GABAergique (Min et al., 1999) (**Figure 16**). Ainsi, dans la région de CA1, une forte stimulation des collatérales de Schaffer, par exemple dans un contexte d'épilepsie, entrainerait une désinhibition des neurones pyramidaux de CA1 dépendante de l'activation de rKA pré-synaptiques très sensibles au glutamate et composés de la sous-unité GluK1, par diffusion du glutamate vers la synapse inhibitrice entre interneurone GABAergique et cellule pyramidale de CA1 (Rodriguez-Morino et al., 2000).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la désinhibition de la transmission GABAergique mettant en jeu les rKA, font intervenir le système endocannabinoïde (Lourenço et al., 2010) (**Figure 16-B**). La libération de glutamate lors d'une bouffée de potentiel d'action à la synapse collatérale de Schaffer-CA1 entraîne une activation de récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR1 et mGluR5) post-synaptiques. L'activation de ces récepteurs déclenche une cascade de signalisation entraînant une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et l'activation de la diacylglycerol lipase (DAGL)

permettant la synthèse de l'endocannabinoïde 2-arachidinoïlglycerol (2-AG). Une fois synthétisé, le 2-AG agit sur des récepteurs aux endocannabinoïdes CB1 pré-synaptiques situés sur la terminaison GABAergiques. En parallèle, le glutamate libéré active également les rKA pré-synaptiques de la synapses GABAergique induisant une dépolarisation modérée de la terminaison synaptique. Cette dépolarisation facilite la signalisation médiée par l'activation des récepteurs CB1 qui est responsable de l'inhibition de la libération vésiculaire de GABA.

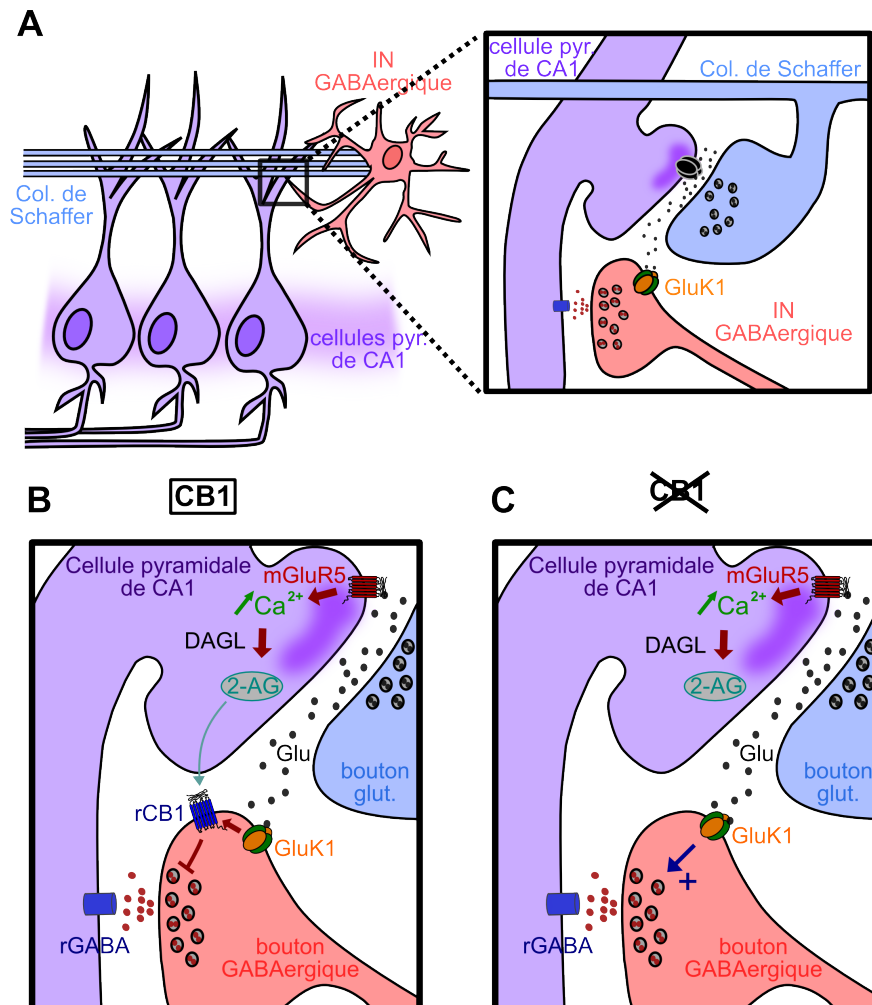


Figure 16 : Role des rKA pré-synaptiques dans la desinhibition par les interneurons GABAergiques de CA1. Dans le stratum lucidum, les synapses excitatrices et inhibitrices sont étroitement liées (A). Lors de l'arrivée d'un train de potentiels d'action à la terminaison synaptique de la collatérale de Schaffer, la glutamate libéré active des récepteurs mGluR qui permet la synthèse et la libération de 2-AG. (B) Du fait de la proximité de la synapse excitatrice et inhibitrice, le 2-AG active les rCB1 de la terminaison GABAergique et en parallèle le glutamate diffuse et active des rKA pré-synaptiques à la terminaison GABAergique qui vont faciliter la signalisation médiée par l'activation des rCB1 permettant l'inhibition de la libération de GABA. (C) En absence de rCB1 à la terminaison GABAergique, la stimulation des rKA pré-synaptiques potentialise la libération vésiculaire de GABA.

Il existe également une population de terminaisons GABAergiques où les récepteurs CB1 sont absents (Figure 16-C). A ces synapses, l'activation des rKA par le

spillover de glutamate potentialise la libération de GABA dans la fente synaptique (Jiang et al., 2001 ; Lourenço et al., 2010). Les rKA pré-synaptiques peuvent également favoriser ou inhiber la libération de GABA à des synapses entre un interneurone et un autre interneurone GABAergique en fonction de la présence ou de l'absence de récepteurs CB1 à la terminaison synaptique (Cossart et al., 2001 ; Lourenço et al., 2010).

Les rKA peuvent également être exprimés à certaines synapses formées entre les collatérales de Schaffer et interneurons de CA1 dans le *stratum radiatum*. A certaines de ces synapses, les rKA sont présents au niveau pré-synaptique et agissent comme autorécepteurs en facilitant la libération de glutamate (Sun et Dobrunz, 2006). Ces synapses excitatrices entre collatérales de Schaffer et interneurons GABAergiques présentent des propriétés de transmission synaptique différentes en fonction de la catégorie à laquelle appartient l'interneurone. En effet, les synapses impliquant des interneurons positifs à la somatostatine présentent une importante facilitation à court-terme tandis que les interneurons non positifs à la somatostatine ne présentent qu'une faible facilitation voir une dépression de la transmission à court-terme (Sun et Dobrunz, 2006). L'activation des rKA exprimés par les interneurons positifs à la somatostatine permet d'augmenter transitoirement la probabilité de libération de glutamate de manière similaire à ce qui est observé à la synapse FM-CA3. Ces rKA sont composés des sous-unités GluK1 et GluK2 et seraient perméables au Ca^{2+} (Sun et al., 2008). Les synapses excitatrices situées sur les interneurons positifs à la somatostatine dans le *stratum oriens lacunosum* moléculaire (O-LM) présentent également des propriétés de facilitation importantes, celle-ci est atténuée en présence de NS102, un antagoniste spécifique de la sous-unité GluK2 (Sylwestrak et Ghosh, 2012). Notons par ailleurs que la protéine Elf1 (extracellular leucine-rich repeat fibronectin-containing 1) est spécifiquement exprimée dans cette dernière catégorie d'interneurons et régule la formation de ces synapses présentant une forte facilitation ((Sylwestrak et Ghosh, 2012). De ce fait, il pourrait être intéressant de chercher à déterminer si ce mécanisme trans-synaptique participerait au recrutement et à la stabilisation des rKA à cette synapse.

✓ Les récepteurs kaïnate dans le gyrus denté, implications dans l'épilepsie

Des les cellules granulaires du gyrus denté, les ARNm codant pour les sous-unités GluK2, GluK3, GluK4 et GluK5 sont exprimés (Wisden et Seeburg, 1993). Ces quatre sous-unités sont exprimées dans les boutons pré-synaptiques des fibres moussues aux synapses FM-CA3. Si la fonction de ces rKA pré-synaptiques a été largement

caractérisée, le profil d'expression et la fonction de rKA dans les compartiments somato-dendritiques des cellules granulaires du gyrus denté dans des conditions physiologiques sont beaucoup moins bien établis. En effet, aucun courant médié par les rKA ne peut être évoqué par des stimulations des afférences glutamatergiques dans la couche moléculaire du gyrus denté dans des conditions physiologiques, de plus, tout les courants excitateurs miniatures sont médiés par les rAMPA (Epsztein et al., 2005).

Le kaïnate est une neurotoxine connue pour provoquer des convulsions aiguës. Néanmoins, il reste encore à déterminer si les rKA jouent un rôle dans la physiopathologie de l'épilepsie du lobe temporal (Vincent et Mulle., 2009). Dans un contexte d'épilepsie temporale chronique, chez des modèles animaux et chez les patients, des connexions anormales sont établies entre des fibres moussues récurrentes et les cellules granulaires (Patrylo et Dudek, 1998 ; Nadler, 2003). Cette reconnexion ectopique, appelée bourgeonnement des fibres moussues, constitue un mécanisme de compensation de la mort cellulaire des cellules moussues situées dans l'hilus du gyrus denté qui a pour conséquence une perte d'afférences au niveau de la couche moléculaire du gyrus denté. Chez des patients souffrant d'épilepsie du lobe temporal, que le niveau d'expression des ARNm codant pour la sous-unité GluK5 est augmenté dans le gyrus denté (Mathern et al., 1998). Chez ces patients, le marquage au kaïnate radioactif peut être corrélé au bourgeonnement des fibres moussues dans le gyrus denté (Represa et al., 1987).

L'implication des rKA dans la genèse d'activités épileptiques chroniques chez le rongeur a été établie. En effet, la formation de fibres moussues aberrantes sur les cellules granulaires du gyrus denté dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal déclenche l'expression de rKA post-synaptiques fonctionnels à ces synapses ectopiques (Epsztein et al., 2005, 2010 ; Artinian et al., 2011). Des courants médiés par les rKA peuvent alors être évoqués par stimulation de ces fibres moussues récurrentes, et ils peuvent également être enregistrés au cours de l'activité spontanée du neurone. Ces courants médiés par les rKA présentent une cinétique de décroissance lente, comparable à celle observée lors de l'activation des rKA à la synapse FM-CA3. Cette lente cinétique de décroissance est responsable de l'apparition de courants sodiques persistants élargissant la fenêtre temporelle pour l'intégration synaptique des signaux arrivant sur les cellules granulaires (Epsztein et al., 2010 ; Artinian et al., 2011). Ceci entraîne une modification du profil de décharge des cellules granulaires, qui passe de décharges espacées à un rythme de décharge anormalement soutenu. Le blocage des rKA permet de diminuer de manière

significative l'activité de réseau impliquant les fibres moussues récurrentes (Epsztein et al., 2005 ; Epsztein et al., 2010 ; Peret et al., 2014). A ces synapses récurrentes, la composante médiée par les rKA représente la moitié de la transmission glutamatergique. De manière intéressante, dans ces synapses, les rKA et les rAMPA ne semblent pas être colocalisés à la même synapse mais forme plutôt deux populations de synapses bien distinctes (Epsztein et al., 2005 ; Peret et al., 2014). En conclusion, les rKA ectopiques jouent un rôle dans l'activité épileptique chronique dans l'hippocampe dans un contexte d'épilepsie du lobe temporal.

d) Autres fonctions des récepteurs kainate dans le système nerveux central

✓ Le cortex somato-sensoriel

Au cours du développement, les rKA peuvent être exprimés à la pré et la post-synapse aux synapses thalamo-corticales du cortex somatosensoriel (Kidd et al., 1999 ; Kidd et al., 2002). A ces synapses, les rAMPA et les rKA ne semblent pas être colocalisés aux mêmes synapses (Kidd et al., 1999). Il existe ainsi des synapses présentant des CPSE purement médiés par les rKA et d'autres purement médiés par les rAMPA.

Les rKA pré-synaptiques sont exprimés au cours du développement aux synapses thalamo-corticales du cortex somato-sensoriel où ils régulent la transmission synaptique durant la première semaine de vie postnatale (Kidd et al., 2002). En effet, à ces synapses, l'activation des rKA pré-synaptiques est responsable d'une dépression de la transmission synaptique lors de stimuli à hautes fréquences (100 Hz), correspondant à l'activité évoquée lors d'une stimulation sensorielle. En prenant en compte les fréquences de stimulation mises en jeu dans ce mécanisme, la fonction des rKA devrait être imputable à la fonction ionotrope du récepteur et non métabotrope. L'activation de ces rKA pourrait par exemple entraîner une dépolarisation du bouton suffisante pour inactiver des canaux calciques dépendants du voltage ou pour diminuer le gradient électrochimique pour le Ca^{2+} . Cette régulation de la transmission synaptique disparaît à la fin de la première semaine de vie postnatale. La perte de ce mécanisme régulateur permettrait de transférer les informations sensorielles à hautes fréquences du thalamus vers le cortex et représenterait ainsi une étape importante dans la maturation des processus d'intégration somato-sensoriel.

Toujours à ces synapses, les rKA peuvent moduler l'efficacité de la transmission synaptique de façon bidirectionnelle (Jouhaneau et al., 2011). L'application de faible concentration de kaïnate en bain (3 μM) entraîne une potentialisation de la transmission synaptique tandis que l'application d'une plus forte concentration de kaïnate (10 μM) est responsable d'une dépression de la transmission synaptique à cette même synapse. Cette facilitation de la transmission synaptique par les rKA pré-synaptiques est également présente chez l'adulte et dépendante de l'activation d'une voie de signalisation cellulaire impliquant l'adenylate cyclase, l'AMP cyclique et la PKA (Andrade-Talavera et al., 2013). L'activation de ces rKA entraînerait une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire par des rKA perméables au Ca^{2+} , qui activerait un mécanisme *Ca^{2+} induce- Ca^{2+} release* entraînant l'activation d'une adénylate cyclase dépendante du Ca^{2+} par un complexe Ca^{2+} -calmoduline.

Les synapses thalamo-corticales sont sujettes à une régulation du développement à long-terme dépendante de l'activité. La PLT de ces synapses implique une rapide diminution du nombre de rKA synaptiques en faveur d'une transmission synaptique médiée par les rAMPA. Ceci suggère que les rKA sont régulés en réponse à des phénomènes de plasticité synaptique durant le développement (Kidd et Issac, 1999).

✓ Le cervelet

Comme dans l'hippocampe, les rKA sont exprimés de manière spécifique dans différents types de neurones du cervelet. Les ARNm codant pour les sous-unités GluK2 et GluK5 sont exprimés dans les cellules granulaires. Les ARNm codant pour les sous-unités GluK1 et GluK4 sont exprimés dans les cellules de Purkinje et l'ARNm codant pour la sous-unité GluK3 est exprimé par des interneurones de la couche moléculaire (Wisden et Seeburg, 1993). Ils peuvent être localisés dans les compartiments pré- et post-synaptiques.

Dans les cellules de Golgi, une population d'interneurones GABAergiques située dans la couche de cellules granulaires du cervelet, des rKA post-synaptiques composés de la sous-unité GluK2 ont été observés (Bureau et al., 2000). Ces rKA sont localisés à la synapse formée entre les fibres parallèles des cellules de Purkinje et les cellules de Golgi. Les courants médiés par l'activation de ces rKA présentent une cinétique de décroissance plus lente que les courants médiés par l'activation des rAMPA.

Dans les cellules de Purkinje, la présence de rKA fonctionnels a pu être détectée (Renard et al., 1995). Aux synapses formées entre les fibres parallèles des cellules granulaires et les cellules de Purkinje ou les cellules étoilées, les rKA pré-synaptiques sont responsables de phénomènes de dépression ou de facilitation de la transmission synaptique (Delaney et Jahr, 2002). Comme aux synapses thalamo-corticales dans le cortex somato-sensoriel, l'application de faibles concentrations d'agoniste des rKA entraîne une potentialisation de la transmission synaptique, tandis que l'application de fortes concentrations provoque une dépression de cette transmission modulant ainsi la force de la transmission glutamatergique. La stimulation à faible fréquence des fibres parallèles entraîne une facilitation des deux synapses tandis que des stimulations à haute fréquence entraîne une dépression des synapses formées entre fibres parallèles et cellules étoilées et une facilitation des synapses formées entre fibres parallèles et cellules de Purkinje. Ces différences de plasticité pourraient s'expliquer par une plus grande densité de rKA ou par une plus grande sensibilité au glutamate des rKA exprimés aux synapses formées entre fibres parallèles et cellules étoilées.

IV- Approches méthodologiques

Nous avons cherché à déterminer quels sont les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la compartimentation des rKA à la synapse FM-CA3.

L'étude de la localisation subcellulaire des rKA en tranche fait face à de plusieurs difficultés techniques. D'abord, les techniques d'immunohistochimie sur tranches d'hippocampe couplées à l'imagerie confocale ne permettent pas d'avoir la résolution suffisante pour distinguer les rKA natifs localisés dans les compartiments pré-synaptiques de ceux localisés dans les compartiments post-synaptiques. De plus il existe peu d'anticorps dirigés contre les différentes sous-unités des rKA disponibles sur le marché et ceux-ci ne sont pas toujours spécifiques pour une sous-unité uniquement.

Nous avons choisi d'étudier la localisation des rKA par une cartographie fonctionnelle subcellulaire des rKA dans CA3. Pour ce faire, nous avons opté pour la technique de décageage focalisé de glutamate afin d'étudier la localisation subcellulaire des rKA le long de l'arborisation dendritique des cellules de CA3.

A. Cartographie fonctionnelle des récepteurs du glutamate : décadeage de glutamate

Le concept à la base de la technologie de décadeage repose sur la création d'une molécule d'intérêt rendue biologiquement inerte par l'ajout d'un groupement chimique protecteur photolysable. L'irradiation de ce composé cagé par la lumière induit une libération de molécules piégées, leur permettant alors de devenir biologiquement actives et d'agir sur leurs cibles. Ainsi, le faisceau lumineux servant à décadeer localement une molécule, se transforme en outil puissant pour stimuler des cibles biologiques de manière précise dans le temps et l'espace. La technologie du décadeage de molécules cagées peut être utilisée en association avec d'autres technologies comme la technique de patch-clamp pour mesurer en parallèle l'activité électrique de la cellule d'intérêt, ou des techniques d'imagerie pour observer des changements morphologiques des cellules.

En principe, tout type de molécules de signalisations, de seconds messagers ou de neurotransmetteurs peut être cagé (Mayer et Heckel., 2006). Il existe déjà une grande variété de ces molécules, comme des neurotransmetteurs, le Ca^{2+} , des inositols, des nucléotides, des peptides, des enzymes et des molécules d'ADN ou d'ARN (Ellis-Davies et al., 1994 ; Milburn et al., 1989 ; Wieboldt et al., 1994 ; Matsuzaki et al., 2001 ; Matsuzaki et al., 2010). La majeure partie de ces molécules sont cagées à l'aide d'une liaison covalente à un chromophore photosensible. La technologie de photolyse de ces composés cagés peut être utilisée en culture de cellules en monocouche, en tranche de tissu et même *in vivo*.

Une illumination uniforme de la préparation permet de libérer le composé cagé dans un grand volume, mais le décadeage peut également être beaucoup plus focalisé et restreint en modulant la taille du faisceau lumineux et/ou le mode d'illumination. En effet, l'utilisation de lasers, permet de contenir la photolyse sur un petit volume de la préparation. Ainsi, le décadeage de neurotransmetteur dans l'espace extracellulaire d'une tranche de cerveau ou dans une préparation de neurones en culture permet de stimuler un grand nombre de neurones simultanément par une illumination globale de la préparation, ou permet de stimuler quelques synapses par une illumination plus précise de l'arborisation dendritique d'un neurone.

Les propriétés photochimiques des composés cagés sont déterminées par leurs propriétés d'absorption de la lumière. Ces composés peuvent être décadés dans un système utilisant comme source d'illumination un laser ayant une longueur d'onde

d'excitation proche de l'ultraviolet (320-360 nm). Certains composés cagés peuvent également être décagés par une excitation 2-photons. L'excitation 2-photons nécessite l'emploi d'un laser à une longueur d'onde proche de l'infrarouge, faiblement énergétique (>720 nm). Le principe de l'excitation 2-photons consiste à exciter l'échantillon d'intérêt de manière pulsée à une longueur d'onde élevée. Lors d'une excitation classique à une longueur d'onde fortement énergétique, l'état d'excitation atteint par l'absorption d'un photon unique par le chromophore se produit dans une échelle de temps de l'ordre de 10^{15} s⁻¹. Si deux photons d'énergie deux fois plus faibles entrent en collision avec le chromophore à un intervalle de temps de l'ordre de 10^{-18} s, alors l'absorption « virtuellement simultanée » des deux photons est permise. La microscopie 2-photons consiste donc à illuminer l'échantillon avec un laser infrarouge pulsé à très haute fréquence afin de permettre cette coïncidence d'absorption. Dans ces conditions, la probabilité que deux photons soit localisés aux mêmes coordonnées de l'espace et au même instant est très faible et cet événement ne peut avoir lieu que dans le flux dense de photons situés au plan focal du faisceau du laser. L'excitation est ainsi extrêmement focalisée en z, les photons dispersés en z n'étant alors pas capables de photolyser les composés cagés en dehors du plan focal (Oheim et al., 2001) (**Figure 17**). Ce type d'excitation offre la possibilité de décager plus en profondeur dans les tissus du fait de leurs relatives transparences à ces hautes longueurs d'onde et permet un meilleur confinement axial du décageage. Cette méthode présente tout de même certaines limites. A de faibles puissances de laser non toxiques pour les cellules, la conversion des composés cagés dans la zone restreinte de décageage représente moins de 10% de la concentration initiale de composés (Brown et al., 1999 ; Matsuzaki et al., 2001 ; Kiskin et al., 2002). Pour cette raison, le décageage en microscopie 2-photons est réalisé en utilisant des puissances de laser proches de la limite de phototoxicité, et des concentrations de composés cagés très importantes (plusieurs millimolaires pour du glutamate cagé) (Kiskin et al., 2002 ; Koester et al., 1999 ; Hopt et Neher, 2001 ; Ji et al., 2008). En effet, les composés cagés les plus communément utilisés ont été mis au point pour être photolysés dans des longueurs d'onde proche de l'ultraviolet.

Aux longueurs d'onde du pic d'absorption des composés cagés communément utilisés dans l'ultraviolet (320-360 nm), l'absorption de la lumière dans la solution cagée entre l'objectif et la préparation est si importante pour de fortes concentrations de composés cagés, que peu de lumière peut atteindre la préparation. Afin de remédier à ce

problème, une excitation à une longueur d'onde un peu plus élevée peut être réalisée (405 nm) pour réduire l'absorption de la lumière par le composé entre l'objectif et l'échantillon (Trigo et al., 2009). La réduction de l'efficacité de la photolyse peut être compensée par l'augmentation de la puissance du laser tout en restant dans une gamme d'intensité non toxique pour les cellules. Contrairement au décageage 2-photons, où le décageage est confiné en x, y et en z, le décageage en microscopie 1-photon entraîne une photolyse peu précise en z du fait de la dispersion des photons dans la profondeur de l'échantillon venant décager des composés cagés en dehors du plan focal.

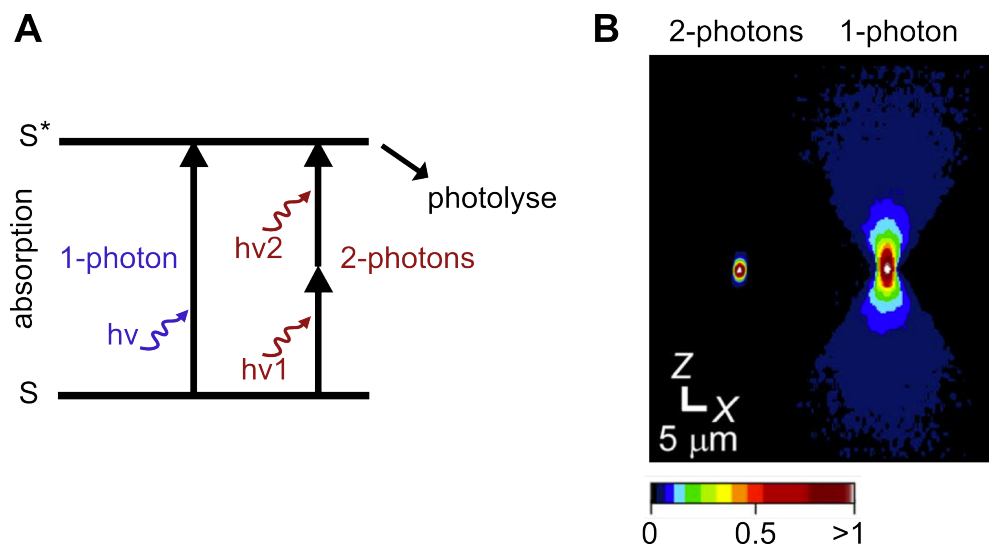


Figure 17 : Résolution spatiale des techniques de microscopie 1-photon et 2-photons. (A) Diagramme de Jablonski simplifié : l'excitation non linéaire en microscopie 2-photons est basée sur l'absorption simultanée de 2 photons ($h\nu$) de faible énergie et de longueur d'onde élevée émis par un laser pulsé pour atteindre l'état d'excitation d'un fluorophore (S^*), ou dans le cas du décageage, la photolyse du chromophore. **(B)** Image dans les plans x et z de billes fluorescentes de 3 μm de diamètre en microscopie 1-photon (excitation à 488 nm) et 2-photons (excitation à 720 nm). (Adapté de Matsuzaki et al., 2008).

Le glutamate cagé est un des neurotransmetteurs cagés les plus largement utilisés dans la littérature. De nombreuses molécules de glutamate cagé synthétisées à partir de différents chromophores et de différentes stratégies de cageage ont été développées, mais peu d'entre elles ont satisfait tous les critères d'exigence des neurobiologistes pour photolyser ces molécules dans des tissus complexes tels que des tranches de cerveau ou dans le cerveau *in vivo*. Le groupe α -carboxy-ortho-nitrobenzyl (CNB), de la famille des cages dérivées des nitrobenzyls, fut le premier groupe de protection utilisé pour cager des neurotransmetteurs avec succès (Wiebolt et al., 1994). Le glutamate est libéré de sa cage CNB rapidement et avec une importante efficacité lors de la photolyse (demi vie, 25 μs) et permet ainsi d'activer des rAMPA avec une cinétique d'activation rapide. La principale limite d'utilisation du composé cagé CNB-glutamate, est sa faible sensibilité aux

longueurs d'onde élevées proches de l'infrarouge et donc sa faible efficacité pour du décaageage en microscopie 2-photons.

Une autre forme de glutamate cagé disponible dans le commerce, le 4-methoxy-7-nitroindoliny-glutamate (MNI-glu) (**Figure 18**), de la famille des cages dérivées des nitroindoniles, peut quant à elle être utilisée à la fois à des longueurs d'onde proches de l'ultraviolet et de l'infrarouge, lui permettant ainsi d'être employée en microscopie 2-photons. Le MNI-glu constitue de ce fait le glutamate cagé le plus utilisé dans la littérature (Losonczy et al., 2006 ; Nikolenko et al., 2007 ; Matsuzaki et al., 2008).

L'utilisation du glutamate cagé a joué un rôle important dans l'étude de la physiologie synaptique. La possibilité de modifier les concentrations de neurotransmetteurs de manière rapide et précise dans l'espace présente un grand intérêt dans l'étude de la fonction des récepteurs à une échelle subcellulaire (Callaway et Yuste, 2002). Le glutamate cagé a notamment été employé dans l'étude des propriétés biophysiques des récepteurs du glutamate dans différents types neuronaux. Le décaageage de glutamate peut être utilisé pour mimer des réponses synaptiques et pour obtenir une cartographie fonctionnelle des récepteurs ionotropiques du glutamate le long de l'arborisation dendritique des neurones en cultures primaires, en tranches de cerveau ou *in vivo* (Matsuzaki et al., 2001 ; Shoham et al., 2005 ; Chen et al., 2011). Ces cartographies fonctionnelles des récepteurs ont principalement été utilisées dans l'étude des rAMPA, alors qu'une seule étude a employé cette technique dans l'étude de la localisation subcellulaire des rKA (Eder et al., 2003).

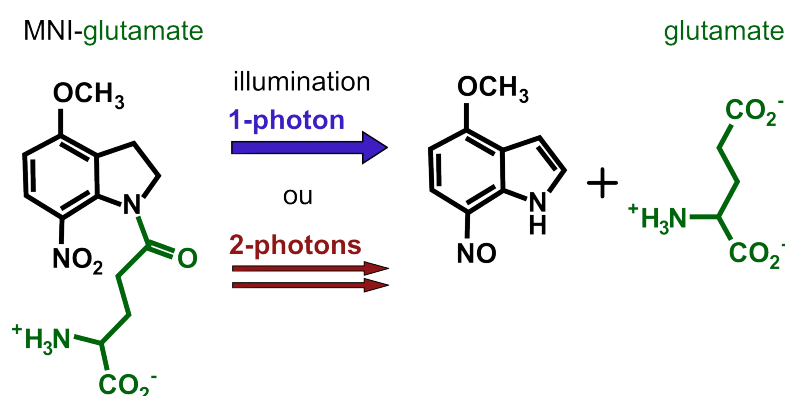


Figure 18 : Structure chimique et photolyse du MNI-glutamate.

Afin d'étudier la localisation subcellulaire des rKA le long de l'arborisation dendritique des cellules pyramidales de CA3 et les mécanismes moléculaires

impliqués dans leur stabilisation synaptique à la synapse FM-CA3, nous avons choisi d'utiliser la technique de décageage focalisé de glutamate à 405nm.

Le décageage de glutamate peut être effectué sur un poste d'électrophysiologie classique. Il nécessite simplement l'installation d'un système de LED et un laser à 405 nm (Trigo et al., 2009). Cette installation est ainsi beaucoup moins onéreuse qu'une installation 2-photons. Bien calibré, avec un laser aligné de sorte à obtenir un point de diffraction limité de diamètre minimum, le spot de décageage situé au plan focal mesure environ 2 microns de diamètre pour notre objectif 60X.

Les cellules sont systématiquement transfectées avec une protéine fluorescente cytosolique (EGFP ou tomato) afin d'avoir un marqueur morphologique du neurone et de pouvoir identifier les différents domaines subcellulaires comme les excroissances épineuses. Le déplacement du spot de décageage d'une région d'intérêt à l'autre est permis en déplaçant directement le microscope sur la préparation.

B. Mécanismes de transfert de gènes en neurosciences

Dans le but d'étudier les déterminants moléculaires nécessaires à la stabilisation et à la ségrégation synaptique des rKA le long de l'arborisation dendritique des cellules pyramidales de CA3, nous avons réexprimé des sous-unités mutantes des rKA dans ces cellules afin d'interférer avec certaines interactions protéiques.

Il existe une grande variété de techniques permettant d'introduire un ADN d'intérêt dans des neurones et de le faire exprimer par ces cellules. Chaque technique possède un certain nombre d'avantages et de limites expérimentales. Ces méthodes présentent différentes caractéristiques comme : l'efficacité de transfection, du niveau d'expression protéique, de la toxicité, la reproductibilité, le coût, la pertinence pour une expérience donnée. Certaines techniques sont plus appropriées pour la transfection de progéniteurs neuronaux et d'autres pour des neurones post-mitotiques. Il est donc important de prendre tous ces critères en considération lors du choix de la technique de transfection pour un modèle expérimental précis.

Une des limitations majeures rencontrées lors du travail sur des neurones de mammifères est leur fragilité et leur sensibilité aux stress physiques et aux changements

de température, de pH ou d'osmolarité. Il est donc primordial de les manipuler avec la plus grande précaution lors de la procédure de transfection.

1) Transfection basée sur l'utilisation de virus recombinants

L'utilisation de virus recombinants comme vecteur, a représenté une avancée majeure dans la transfection d'ADN dans des neurones post-mitotiques (Geller et Breakefield, 1988). Cette méthode de transfection est aujourd'hui largement employée notamment pour la transfection d'ADN *in vivo* où son efficacité est très importante en comparaison d'autres techniques de transfection non virale. La transfection basée sur l'infection virale repose sur la capacité intrinsèque du virus à infecter son hôte en insérant son matériel génétique, ARN ou ADN, dans la cellule pour le faire exprimer. Cette prédisposition pour l'infection rend l'utilisation des virus relativement aisée que se soit dans le tissu jeune ou adulte et dans différents modèles comme les cultures primaires de neurones, les tranches organotypiques ou directement *in vivo*.

Les vecteurs viraux recombinants utilisés pour des expériences de transfection de gènes sont incapables de se répliquer et leur utilisation reste relativement sûre. Les vecteurs viraux recombinants peuvent être appliqués localement en culture ou injectés précisément *in vivo* dans un groupe de neurones d'une structure d'intérêt par stéréotaxie afin de permettre une expression très localisée du gène d'intérêt.

L'utilisation de vecteurs viraux présente tout de même un certain nombre de limitations (Slack et Miller, 1996 ; Simonato et al., 2000 ; Ehrenguber et al, 2001 ; Janson et al., 2001) : l'usage de virus peut présenter une certaine toxicité pour les neurones, la construction du vecteur viral nécessite plus d'étapes que d'autres types de vecteurs, la taille des inserts pouvant être transfectés est limitée et varie d'un vecteur viral à l'autre. L'utilisation de vecteurs viraux nécessite la mise en place de procédures de sécurités non négligeable pour les expérimentateurs.

Il existe une grande variété de vecteurs viraux pouvant être utilisés pour transfecter des neurones. Ces vecteurs viraux diffèrent par leur efficacité d'infection, le niveau d'expression protéique qu'ils permettent, leur toxicité cellulaire et la taille de l'insert qu'ils peuvent contenir (Washbourne et McAllister, 2002) (**Tableau 2**).

a) Amplicon dérivé de l'Herpes simplex virus (HSV)

Le virus de l'herpes ou Herpes simplex virus (HSV) est le premier virus à avoir été utilisé comme vecteur viral pour la transfection de gènes dans des neurones (Geller et

Breakefield, 1988). Les neurones représentent des cellules hôtes naturelles pour ce virus. Le vecteur viral amplicon de l'HSV est un vecteur viral recombinant dérivé du HSV natif qui a été rendu incapable de se répliquer (De Silva et Bowers, 2009 ; Epstein, 2009). Ce vecteur présente la particularité de pouvoir contenir des transgènes de grandes tailles (supérieur à 150 kilo-bases (kb)) ce qui représente un grand intérêt pour la transfection de nombreuses protéines synaptiques telles que des sous-unités de récepteurs aux neurotransmetteurs codés par de longues séquences, ou de protéines sous le contrôle de séquences régulatrices de grande taille. Néanmoins ce vecteur présente l'inconvénient majeur d'être difficile à produire en routine pour des titres forts.

b) Adénovirus

Les adénovirus peuvent infecter de manière efficace des neurones post-mitotiques, mais infectent de manière préférentielle les cellules gliales, d'où la nécessité d'employer des promoteurs neuronaux spécifiques pour ce type de virus (Karra et Dahm, 2010). De plus, à l'instar de l'amplicon dérivé de l'HSV, l'insert ne s'intègre pas dans le génome de la cellule hôte et n'est donc pas stable pour des cellules en division. Son utilisation est préférentiellement limitée aux neurones post-mitotiques. Contrairement à l'amplicon dérivé de l'HSV, les adénovirus ne permettent pas de transférer d'importantes séquences d'ADN (maximum 15 kb).

c) Adeno-associated virus (AAV)

Les adeno-associated virus (AAV) présentent un grand intérêt pour le transfert de gènes en neurosciences. Contrairement aux HSV et aux adénovirus, les AAV permettent l'intégration stable de l'insert dans le génome de la cellule hôte. Chaque sérotype d'AAV exprime différents récepteurs de surface pour l'entrée dans la cellule hôte, leur conférant ainsi la possibilité d'infecter de manière spécifique différents types de neurones (Büning et al., 2008). Néanmoins, comme les adénovirus, la taille du transgène qui peut être inséré dans les AAV est très limitée (< 5 kb). De plus, l'expression du transgène après l'infection prend plus de temps que pour les autres virus (environ 2 semaines).

d) Lentivirus

Les lentivirus sont des rétrovirus ayant la capacité d'infecter des cellules post-mitotiques. Ils s'insèrent également de manière stable dans le génome de l'hôte et présentent une importante efficacité d'infection et une faible toxicité cellulaire (Karra et

Dahm, 2010). Ce vecteur viral est très utilisé en neurosciences, il est facile à produire mais comme les AAV, la taille du transgène qu'il peut intégrer est limitée (6kb).

Tableau 2 : Vecteurs viraux utilisés en neurosciences

	Amplicon de l'herpes simplex virus (HSV)	Adénovirus	Adeno-associated virus (AAV)	Lentivirus	Sindbis
Efficacité de la transfection neuronale	élevée	modérée	élevée	élevée	très élevée
Niveau d'expression	élevé	modéré	élevé	élevé	élevé
Onset d'expression	quelques heures, expression se réduisant au cours des premières semaines	quelques jours, expression pouvant durer plusieurs semaines	≈ 2 semaines	≈ 2 semaines	quelques heures
Ratio d'expression neurone/glie	élevé	Faible (pallier par l'emploi de promoteurs spécifiques)	variable en fonction du sérotype	variable	élevé
Expression ciblée	oui	oui	oui	oui	oui
Expression sur cellule unique	non	non	non	non	non
Intégration dans le génome de l'hôte	non	non	oui	oui	non
Taille de l'insert maximale	> 150 kb	≈ 15 kb	≈ 5 kb	≈ 6 kb	≈ 10 kb
Toxicité cellulaire	faible	élevée avec des titres importants	faible	faible	très élevée
Application en culture neuronale dissociées	oui	oui	oui	oui	oui
Application en culture organotypiques	oui	oui	oui	oui	Oui
Application <i>in vivo</i>	oui	oui	oui	oui	oui
Précautions pour la sécurité de l'utilisateur	oui	oui	oui	oui	oui

e) Virus Sindbis

Les virus Sindbis sont des virus à ARN permettant une expression très rapide (en quelques heures) et très efficace des transgènes qu'ils transportent (Washbourne et McAllister, 2002). L'efficacité de l'infection par les virus Sindbis est très importante mais ils sont également responsables de l'inhibition de la synthèse protéique des cellules hôtes en seulement quelques heures les rendant ainsi très toxiques pour les cellules infectées.

2) Transfection chimique

Les techniques de transfections chimiques permettent de transfecter des neurones grâce à des protocoles expérimentaux relativement simples, néanmoins, ces méthodes sont principalement destinées aux cultures de neurones dissociés.

a) Co-précipitation Ca^{2+} -phosphate/ADN

La méthode de transfection par co-précipitation de phosphate de Ca^{2+} et d'ADN est l'une des méthodes de transfection chimique les plus anciennes et des plus couramment utilisées pour transfecter des cultures primaires de neurones (Dahm et al., 2008). Cette méthode est facile à mettre en place et ne nécessite pas d'équipement spécifique. Le principe physique de cette méthode est de former des cristaux d'ADN avec des ions Ca^{2+} dans un tampon phosphate, l'ADN peut ainsi pénétrer dans la cellule sous cette forme. Dans les cellules post-mitotiques telles que les neurones, l'ADN ne peut pas pénétrer dans le noyau et l'efficacité de la transfection est alors plus faible que dans les cellules pouvant entrer en mitose et faire pénétrer l'ADN dans le noyau. Dans les neurones l'efficacité de la transfection est de l'ordre de 1% à 5% et peut atteindre 30% dans les systèmes les plus optimisés (Goetze et al., 2004). Cette méthode de transfection est donc peu efficace mais présente l'avantage de ne pas être toxique pour les neurones. Néanmoins, son usage reste limité aux cultures primaires de neurones dissociés.

b) Lipofection

La lipofection est une seconde méthode de transfection chimique très utilisée en cultures primaires de neurones dissociés. Cette technique a également été employée *in vivo* par injection chez le xenope (Alsina et al., 2001). Elle est basée sur la formation de micelles lipidiques hydrophiles permettant de lier l'ADN et de lui faire passer la double couche lipidique de la membrane plasmique. Ces micelles de 100 à 500 nm de diamètre sont constituées de lipides chargés positivement et sont appelés liposomes (Pedroso de Lima et al., 2001). Les lipides cationiques de ces liposomes interagissent avec les acides nucléiques chargés négativement et facilitent la fusion à la membrane plasmique du complexe lipidique associé aux acides nucléiques. Des agents lipidiques non liposomaux pouvant se lier aux acides nucléiques ont également été développés. Les complexes formés par ces lipides permettraient de faire pénétrer l'ADN dans la cellule par endocytose et présenterait une meilleure efficacité de transfection que la première méthode en culture primaire de neurones (Butcher et al., 2009).

Comme la méthode de co-précipitation au phosphate de Ca^{2+} , cette méthode de transfection ne nécessite pas d'équipement particulier et est peu toxique pour les cellules. Elle possède également une efficacité de transfection relativement faible en cultures primaires de neurones dissociés, située entre 5 et 10% et pouvant atteindre 30% dans le meilleur des cas (Dalby et al., 2004).

3) Transfection physique

En plus de l'utilisation de vecteurs viraux et de méthodes chimiques pour faire pénétrer le matériel génétique dans la cellule cible, il existe également 2 méthodes de transfusions physiques de l'ADN dans les neurones : la micro-injection et la transfection biolistique.

a) Micro-injection

La micro-injection consiste à introduire le matériel génétique directement dans le cytoplasme en utilisant une fine pipette de verre. Cette méthode permet de cibler les cellules à transférer très précisément et permet, si nécessaire, de transférer une cellule unique dans une préparation. Néanmoins, la micro-injection inflige un stress physique à la cellule en rompant la membrane plasmique (Zhang et Yu, 2008). Cette méthode a préférentiellement été utilisée dans des neurones d'invertébrés, plus grands et plus résistants que les neurones de vertébrés, mais a déjà été employée dans des neurones chez le murin, avec néanmoins une plus faible efficacité et un plus fort taux de mort neuronale après transfection (Kohara et al., 2001).

b) Transfection biolistique

La transfection biolistique a initialement été employée pour le transfert de matériel génétique dans les cellules végétales puisque cette méthode permet de passer la membrane squelettique de ces cellules (Klein et al., 1987 ; Christou et al., 1988). Cette technique de transfection consiste à recouvrir des billes de métal (en or ou en tungstène) de quelques micromètres de diamètre, de plasmides contenant une séquence d'ADN d'intérêt. Ces billes sont ensuite placées dans des cartouches puis dans un pistolet à gaz comprimé appelé Gene Gun. Grâce à ce pistolet, les billes recouvertes d'ADN sont propulsées à grande vitesse sur la préparation et peuvent ainsi pénétrer dans certaines cellules. Cette technique de transfection est beaucoup utilisée dans le domaine des neurosciences pour transférer des neurones en cultures organotypiques (O'Brien et Lummis, 2006). La transfection biolistique présente ainsi l'avantage de pouvoir être

utilisée dans un système neuronal où les connections sont préservées mais elle présente aussi un certain nombre d'inconvénients. Cette méthode peut endommager de manière importante les tissus transfectés. La transfection biolistique ne permet pas de cibler un type neuronal en particulier et entraîne la transfection de beaucoup de cellules gliales. L'efficacité de la transfection est faible irrégulier d'une préparation à l'autre.

4) Transfection par électroporation

Le principe de l'électroporation est de rendre une cellule compétente pour la réception d'un ADN d'intérêt en perméabilisant transitoirement la membrane plasmique par la délivrance d'une stimulation électrique. Ainsi au cours de la stimulation électrique, l'ADN peut pénétrer dans le cytoplasme des cellules d'intérêt. L'électroporation est longtemps restée une technique de transfection limitée aux cultures de neurones dissociées et aux progéniteurs neuronaux *in vivo*. Ces dernières années, cette technique s'est développée et permet aujourd'hui la transfection de neurones post-mitotiques en cultures organotypiques et *in vivo*. La méthode de délivrance du champ électrique varie en fonction du stade de développement et du type de système étudié.

a) Electroporation de cultures primaires dissociées

La nucléofection est une forme d'électroporation utilisant une série d'impulsions électriques à fort voltage permettant aux plasmides de pénétrer directement dans le noyau, donnant lieu ainsi à une bonne efficacité de transfection (60% à 80%) (Zeitelhofer et al., 2007 ; Zeitelhofer et al., 2009). Cette technique de transfection peut être utilisée à la fois sur des progéniteurs neuronaux et sur des neurones post-mitotiques (Knöll et al., 2006), mais reste tout de même plus efficace si la transfection est effectuée à un stade précoce de différenciation.

b) Electroporation *in-utero*

L'électroporation peut être employée *in vivo* chez l'embryon par la technique d'électroporation *in utero*. Cette technique consiste à électroporer des progéniteurs neuronaux chez l'embryon de rongeur *in utero* à un stade précoce de développement par l'injection d'un ADN d'intérêt dans les ventricules cérébraux et par l'utilisation d'électrodes à la surface de l'embryon pour délivrer le champs électrique nécessaire à la pénétration de l'ADN dans les cellules (Shimogori et Ogawa, 2008). L'électroporation *in utero* a beaucoup été utilisée dans l'étude de structures cérébrales comme le cortex, la rétine, le thalamus ou le cervelet (Dixit et al., 2011 ; Petros et al., 2009 ; Matsui et al., 2011).

c) Electroporation focale *in vivo*

L'électroporation peut également être effectuée après la naissance *in vivo* sur des neurones post-mitotiques. Pour cela une pipette contenant la solution à électroporer est placée dans la région cérébrale d'intérêt, l'ADN est en suite injecté localement puis une stimulation électrique permet l'électroporation d'une population de neurones à proximité de l'électrode. Souvent, cette technique ne permet pas de transfecter un grand nombre de neurones (Mizuno et al., 2010 ; Ohmura et al., 2014).

Récemment une nouvelle technique de transfection électrochimique a été développée : la iontoporation (De la Rossa et Jabaudon, 2015). Cette technique permet de transfecter localement un grand nombre de neurones post-mitotiques (de 10 à plus de 500). La iontoporation combine l'application d'un champ électrique par le biais de deux électrodes situées à la surface du crâne avec l'injection dans la structure d'intérêt d'une solution contenant un plasmide et une molécule amphipathique, le trans-cyclohexane-1,2-diol (TCHD). Le TCHD permet d'inhiber la sélectivité du complexe de pore nucléaire, autorisant ainsi la diffusion passive de macromolécules, comme l'ADN plasmidique, dans le noyau (Liashkovich et al., 2010 ; Vanderbroucke et al., 2007).

d) Electroporation sur cellule unique

L'électroporation sur cellule unique, aussi appelée *single cell electroporation* (SCE), permet de transfecter cellule par cellule, un faible nombre de neurones d'intérêt dans une préparation. L'électroporation sur cellule unique est de plus en plus employée en tranches organotypiques et *in vivo* dans des couches de cortex superficielles (Zhang et al., 2012 ; Judkewitz et al., 2009).

Cette méthode de transfection nécessite l'acquisition de compétences techniques plus longues à acquérir que d'autres méthodes précédemment citées. Elle nécessite notamment d'être à l'aise avec la micromanipulation de pipettes de patch clamp sous microscope (Rathenberg et al., 2003). La SCE nécessite de remplir une pipette de patch clamp avec une solution intracellulaire contenant le ou les plasmides d'intérêt. Sous microscope, la pipette est positionnée au contact d'une cellule à transfectée. Un train de stimulations électriques est alors appliqué à la cellule à travers l'électrode en contact avec la solution d'électroporation de la pipette. Cette stimulation électrique permet de perméabiliser transitoirement la membrane plasmique du neurone et de diffuser l'ADN dans la cellule pour qu'il soit ensuite exprimé. Une fois la cellule transfectée, la pipette est lentement rétractée et une autre cellule peut alors être transfectée avec cette même

pipette. En tranches organotypiques, il est ainsi possible de transfecter plus d'une dizaine de neurones par tranche avec une bonne efficacité de transfection.

Nous avons utilisé la SCE dans notre modèle de cultures organotypiques d'hippocampe. Cette méthode nous est apparue comme étant beaucoup plus efficace que la transfection biolistique et est tout à fait adaptée pour la transfection de constructions de grandes tailles comme des sous-unités des rKA. Pour chaque neurone de CA3 transfecté, nous avons utilisé un train de 50 stimulations à 100 Hz d'une amplitude -11,5 V. La durée de chaque stimulation est de 600 μ s (Figure 19). Les électroporations ont été effectuées sous un poste de patch-clamp, sous un microscope droit au 60X. Le poste doit être nettoyé méticuleusement avant chaque session d'électroporation pour éviter toute contamination microbienne. Cette technique de transfection permet de contrôler aisément la quantité d'ADN transfectée et est très adaptée à la co-transfection de plusieurs plasmides distincts.

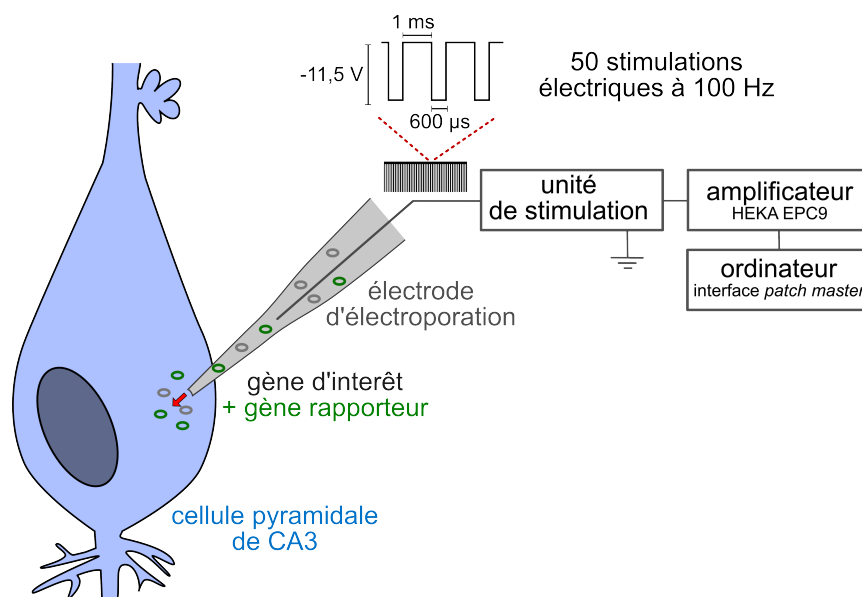


Figure 19 : Electroporation sur cellule unique. Le protocole employé dans cette étude pour effectuer des électroporations sur cellules uniques de cellules pyramidales de CA3 consiste à approcher le soma d'une cellule d'intérêt avec une pipette de patch-clamp remplie d'une solution intracellulaire contenant les plasmides codant pour les gènes d'intérêt. Une fois en contact avec la cellule, un train de stimulations électriques est délivré pour perméabiliser transitoirement la membrane de la cellule et pour permettre à l'ADN de diffuser dans la cellule. Une fois l'électroporation effectuée, la pipette est délicatement rétractée et peut être réutilisée pour électroporer plusieurs cellules dans la même tranche.

Résultats

-

Discussion

Résultats-Discussion

Article : “Molecular determinants for the strictly compartmentalized expression of kainate receptors in CA3 pyramidal cells”

Sabine Fièvre*, Mario Carta*, Virginie Labrousse, and Christophe Mulle.

Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

* equal first authors

Soumis

A. Problématique

Dans les cellules pyramidales de CA3 de l'hippocampe, les rKA post-synaptiques sont spécifiquement ségrégués à la synapse formée entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de CA3 où ils participent à la réponse synaptique. Ils sont par contre totalement absents des autres afférences glutamatergiques sur ces neurones. Nous avons voulu déterminer quels mécanismes moléculaires pouvaient être mis en jeu dans la stabilisation et la compartimentation des rKA à la synapse FM-CA3. A cette synapse, les rKA sont composés des sous-unités GluK2, GluK4 et GluK5, la sous-unité GluK2a étant une sous-unité obligatoire pour la formation de rKA fonctionnels. Dans cette étude, nous nous sommes tout particulièrement intéressé au DCT de la sous-unité GluK2a des rKA car ce domaine est connu pour être la cible de nombreux interacteurs protéiques et de nombreuses modifications post-traductionnelles.

B. Résultats

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la ségrégation des rKA post-synaptiques à la synapse FM-CA3 des cellules pyramidales de CA3, nous avons utilisé principalement des cultures organotypiques d'hippocampe. Ce système *in vitro* permet de conserver l'organisation des connexions de l'hippocampe tout en pouvant réaliser des manipulations génétiques de manière aisée en utilisant la technique d'électroporation sur cellule unique.

Ce modèle a d'abord été validé en comparant la composante médiée par les rKA des CPSE à la synapse FM-CA3 dans des tranches aigües et dans des cultures organotypiques chez les souris contrôle (wt). La composante médiée par les rKA après

stimulation électrique minimale d'une fibre moussue a été isolée pharmacologiquement en utilisant un antagoniste spécifique des rAMPA, le LY303070 à 25 μ M. Nous avons pu montrer que le rapport rAMPA/rKA est similaire en tranches aigües et dans des cultures organotypiques d'hippocampe.

Aucune composante de courants médiés par les rKA ne peut être mesurée par une stimulation électrique des voies associatives et commissurales.

Pour évaluer plus précisément la localisation des rKA nous avons utilisé la technique de décaage de glutamate pour effectuer une cartographie fonctionnelle des rKA le long de l'arborisation dendritique dans des cultures organotypiques provenant de souris wt. Ce décaage a été effectué en utilisant un laser à 405 nm pour décaer le MNI-glutamate présent dans la solution extracellulaire à une concentration de 500 μ M (Trigo et al., 2009). Trois jours avant l'expérimentation, les tranches ont été transfectées avec un plasmide codant pour la GFP afin de révéler la morphologie dendritique des neurones de CA3 qui seront patchés. Lors de l'expérience de décaage, le spot laser est positionné sur différents compartiments du neurone patché. Nous avons ainsi cartographié les rAMPA et les rKA dans différents compartiments des cellules pyramidales de CA3 : le soma, les excroissances épineuses, le tronc dendritique des dendrites proximales et les dendrites distales. Par cette technique, nous avons montré que les courants médiés par les rKA étaient détectables uniquement lors du décaage de glutamate sur les excroissances épineuses. Ces courants sont en effet absents des compartiments somatiques des dendrites distales. Dans ces conditions, quelque soit le compartiment cellulaire, aucun courant médié par les rKA n'est enregistré chez les souris GluK2^{-/-}. Chez les souris wt, les courants médiés par les rAMPA peuvent quant à eux être enregistrés dans tous les compartiments où le décaage de glutamate a été effectué. Ces résultats confirment la compartimentation subcellulaire des rKA dans les cellules pyramidales de CA3.

Nous nous sommes alors intéressé aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans la stabilisation synaptique et la compartimentation des rKA à la synapse FM-CA3. Notre attention s'est tout particulièrement portée sur le DCT de la sous-unité GluK2a, cible de nombreux interacteurs protéiques. Pour cela nous avons utilisé une stratégie de remplacement moléculaire afin de pouvoir manipuler aisément le DCT de la sous-unité GluK2a. Nous avons d'abord transfecté des tranches de souris GluK2^{-/-} avec un plasmide exprimant la sous-unité GluK2a wt. La technique d'électroporation sur cellule unique nous

a permis de transfecter des cellules pyramidales de CA3 avec différentes concentrations d'ADN dans la pipette d'électroporation (de 3 à 80 ng/μL) afin de déterminer les conditions optimales pour réexprimer les rKA dans CA3 de manière comparable au wt. Nous avons pu observer que l'amplitude des courants mesurés était dépendante de la concentration d'ADN transfectée dans les cellules. Après l'électroporation de fortes concentrations d'ADN codant pour la sous-unité GluK2a, l'amplitude des courants médiés par les rKA mesurés après décaage de glutamate sur les excroissances épineuses est supérieure à celle observée chez le wt. Par ailleurs, dans ces conditions, des courants ectopiques médiés par les rKA peuvent être mesurés lors du décaage de glutamate sur le soma ou sur les dendrites distales des cellules pyramidales de CA3. Il faut également noter que les courants induits par le décaage de glutamate sur les excroissances épineuses après la réexpression d'une forte concentration d'ADN présente également une cinétique de décroissance bien plus rapide que chez les souris wt. Ceci peut s'expliquer par la formation préférentielle d'homomère GluK2 dans ces conditions.

La réexpression de la sous-unité GluK2a à une plus faible concentration (3 ng/μL) nous a permis de récupérer des courants médiés par les rKA comparables au wt en terme d'amplitude et de cinétique de décroissance après le décaage de glutamate sur les excroissances épineuses. De plus, comme chez le wt, aucun courant n'est enregistré lors du décaage de glutamate sur le soma ou sur les dendrites plus distales. Il est donc important de contrôler finement les paramètres de transfection pour pouvoir être en mesure de conserver des courants médiés par les rKA comparables au wt et pour reproduire la compartimentation des rKA observée chez les souris wt.

Nous avons également mesuré les CPSE médiés par les rKA après stimulation des fibres moussues ou de la voie associative et commissurale dans ces différentes conditions afin de mesurer la composante purement synaptique des rKA. De manière intéressante, lors de la stimulation des fibres moussues, quelque soit la concentration d'ADN testée, le rapport rKA/rAMPA est le même et est comparable au wt, de plus aucun CPSE médié par les rKA ne peut être mesuré lors de stimulation des voies associatives et commissurales. Ce résultat suggère qu'il existerait un nombre limité d'emplacements où les rKA peuvent être stabilisés à la synapse FM-CA3 lors de la réexpression ou de la surexpression des rKA dans les cellules pyramidales de CA3. Il y aurait ainsi une mécanisme moléculaire permettant réguler de manière spécifique la quantité de rKA pouvant être présent à la synapse.

Après avoir déterminé les conditions de transfection optimales pour réexprimer dans des cultures organotypiques de souris GluK2^{-/-} un niveau de rKA comparable au wt, nous avons réexprimé des sous-unités GluK2a présentant différents niveaux de troncation du DCT. Nous avons alors observé une diminution des CPSE médiés par les rKA à la synapse FM-CA3 après réexpression d'une sous-unité GluK2a dont les 14 derniers acides aminés ont été délétés GluK2Δ14. Nous avons également observé une diminution de l'amplitude des courants après le décaageage de glutamate sur les excroissances épineuses des cellules pyramidales de CA3 après la réexpression de cette sous-unité GluK2Δ14. Les 14 derniers acides aminés de la sous-unité GluK2a sont impliqués dans la liaison de la sous-unité GluK2 au complexe N-cadhérine/β-caténine (Coussen et al., 2002). Ce résultat suggère donc que l'interaction de la sous-unité GluK2a avec ce complexe trans-synaptique d'adhérence serait nécessaire pour une bonne stabilisation des rKA à la synapse FM-CA3.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons altéré la fonction du complexe N-cadhérine/β-caténine en utilisant deux approches. Dans un premier temps nous avons surexprimé une protéine N-cadhérine dont le domaine extracellulaire d'adhérence homophile a été délété (NcadΔ390) dans des cellules pyramidales de CA3 de cultures organotypiques wt. Cette N-cadhérine est alors incapable d'effectuer une liaison trans-synaptique avec d'autres N-cadhérines et agit comme un dominant négatif en séquestrant les α et β-caténines. Dans ces conditions, nous avons observé une diminution de la composante médiée par les rKA des CPSE à la synapse FM-CA3 par rapport au contrôle sans modification de la composante médiée par les rAMPA.

Le dominant négatif NcadΔ390 peut potentiellement affecter la signalisation mettant en jeu d'autres types de cadhérines. Pour cette raison, nous avons également spécifiquement délété la N-cadhérine en exprimant la protéine Cre recombinase dans des cellules pyramidales de CA3 de souris N-cadhérine floxées. Dans ces conditions, nous avons également observé une diminution de la composante médiée par les rKA des CPSE à la synapse FM-CA3 par rapport au contrôle sans modification de la composante médiée par les rAMPA.

TITLE: Molecular determinants for the strictly compartmentalized expression of kainate receptors in CA3 pyramidal cells

Sabine Fièvre*, Mario Carta*, Virginie Labrousse, and Christophe Mulle.

Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

* equal first authors

SUMMARY

Distinct subtypes of ionotropic glutamate receptors can segregate to specific synaptic inputs in a given neuron. In CA3 pyramidal cells (PCs), kainate receptors (KARs) are present at mossy fiber (mf) synapses and absent from other glutamatergic inputs. Using functional mapping of glutamate receptors by focal glutamate uncaging we show that KARs display a strictly confined expression on thorny excrescences, the postsynaptic elements of mf-CA3 synapses, being excluded from extrasynaptic somatodendritic compartments, at variance with AMPA receptors. We combined quantitative molecular replacement with electrophysiology and focal glutamate uncaging to show that the faithful reinstatement of KAR segregation in CA3 PCs critically depends on the amount of GluK2a protein. We have identified a sequence in the GluK2a C-terminal domain necessary for restricted expression of KARs which is responsible for GluK2a interaction with N-Cadherin. Targeted deletion of N-Cadherin or overexpression of a dominant negative N-Cadherin in CA3 PCs greatly reduces KAR-EPSCs at mf-CA3 synapses. Our findings suggest that multiple mechanisms combine to control the compartmentalization of KARs at mf-CA3 synapses, including a stringent control of the amount of GluK2 subunit in CA3 PCs, a limited number of slots for KARs, and the recruitment/stabilization of KARs by N-Cadherins.

Key words: Synapse specification/subcellular segregation/kainate receptors/CA3/N-Cadherin

INTRODUCTION

The function of the brain critically depends on highly specific connectivity between neuronal populations. There is an extreme anatomical and functional diversity of types of synapses that form between different populations of neurons. At the level of a single neuron, different excitatory and inhibitory synaptic inputs generally follow precise subcellular targeting. The segregation of different excitatory connections onto a single neuron is particularly striking in laminated structures such as the hippocampus (Williams et al., 2010). As an example, CA3 pyramidal cells (PCs) receive three main types of glutamatergic afferents which are precisely positioned along the apical and basal dendrites, from the entorhinal cortex (perforant path), from recurrent CA3 collaterals (associational/commissural, A/C fibers) and from the dentate gyrus (DG) through mossy fibers (mf). In addition to their subcellular topography, glutamatergic synapses from these different inputs greatly vary in their structural and functional properties. Mf inputs make synaptic contacts on proximal dendrites of CA3 PCs (in the stratum lucidum) via “giant” mf boutons with multiple glutamate release sites facing large postsynaptic structures called thorny excrescences (TE) (Henze et al., 2000). In contrast A/C and perforant path synapses are of the single site/single spine type. Mf-CA3 synapses display a wide dynamic range of short-term plasticity and express NMDAR independent presynaptic forms of LTD and LTP (Nicoll and Schmitz, 2005).

Parameters specifying synaptic properties include equipment in ionotropic glutamate receptors (iGluRs), with distinct subtypes of iGluRs being segregated to particular glutamatergic synaptic inputs in a given neuron. The different families of iGluRs, AMPARs, NMDARs and KARs exist as multiple subtypes endowed with distinctive properties (Bettler and Mulle, 1995; Paoletti et al., 2013). The subcellular segregation of KARs in CA3 PCs provides a striking example of synaptic specification within a single neuronal population. KARs are tetrameric iGluRs composed of the combinations of five subunits GluK1–GluK5. KARs regulate the activity of synaptic circuits at presynaptic and postsynaptic sites, through either ionotropic or metabotropic actions (Contractor et al., 2011). KARs are expressed and functional in many cell types in the hippocampus, in both principal neurons of CA1, DG and CA3 as well as in interneurons (Carta et al., 2014). However, activation of postsynaptic KARs by synaptic release of glutamate has only been encountered in CA1 GABAergic interneurons and in CA3 PCs. In CA3 PCs, stimulation of mf inputs but not of A/C inputs, evokes EPSCs mediated by KARs (KAR-EPSCs) which contain the GluK2 subunit (Castillo et al., 1997; Mulle et al., 1998). In addition, in CA3 PCs, puff application

of glutamate above the stratum lucidum, but not the stratum radiatum, activates KAR-mediated inward currents (Castillo et al., 1997), further indicating that KARs are spatially segregated in these cells. This segregation of KARs in the stratum lucidum is further supported by KA binding studies and by immunocytochemical labeling, although this does not discriminate between pre- and postsynaptic KARs (Darstein et al., 2003; Ruiz et al., 2005).

The molecular mechanisms underlying subcellular trafficking of KARs have been explored in heterologous systems and in dissociated neuronal cultures (Contractor et al., 2011; Lerma and Marques, 2013), in conditions which do not reproduce the strict subcellular segregation observed for native KARs in an *in vivo* situation. The subcellular trafficking and localization of neurotransmitter receptors in neurons are tightly regulated by association with interacting proteins. KAR subunits interact through their cytoplasmic C-terminal domain with a large array of proteins involved in the regulation of trafficking to the plasma membrane (Copits and Swanson, 2013; Coussen et al., 2002; 2005; Garcia et al., 1998). In addition to these interacting proteins, NETO1 and NETO2 (NEuropilin TOLloid-like 1 and 2) have been identified as auxiliary proteins assembling with KARs to control their gating and pharmacology (Copits et al., 2011; Copits and Swanson, 2012; Fisher and Mott, 2012; Straub et al., 2011; Tang et al., 2011; Zhang et al., 2009). NETO1 contributes to postsynaptic KARs at mf-CA3 synapses (Straub et al., 2011; Tang et al., 2011), however the effect of NETO proteins on KAR targeting is less clear (Copits et al., 2011; Palacios-Filardo et al., 2014). NETO proteins do not appear to be responsible for the segregation of KARs to mf-CA3 synapses (Copits and Swanson, 2012).

The mechanisms underlying the stringent segregation of KARs in specific subcellular compartments, in particular in CA3 PCs, are currently unknown. Cell autonomous mechanisms as well as extrinsic signals from the afferent mfs through transsynaptic signaling may be at play. Here we have characterized the compartmentalized expression of KARs in organotypic slices and used a quantitative gene replacement strategy combined with focal glutamate uncaging and electrophysiology to identify molecular determinants for the subcellular segregation of KARs in CA3 PCs.

RESULTS

Functional mapping of KARs in CA3 PCs

To explore molecular mechanisms underlying the compartmentalized expression of KARs in CA3 PCs, we used hippocampal organotypic slice cultures as an *in vitro* system easily amenable to genetic manipulation of molecules in single identified neurons (Carta et al., 2013). To validate the model, we first compared KAR expression in acute slices and in organotypic slice cultures. Minimal stimulation of mfs evoked EPSCs in CA3 PCs which are substantially blocked by LY303070 (25 μ M), a selective antagonist of AMPARs. In both acute and cultured slices, the remaining synaptic current represented KAR-EPSCs which can be blocked by the AMPAR/KAR antagonist NBQX (not shown) and are abolished in GluK2^{-/-} mice (Figure 1A-C). In both acute and organotypic slices, KAR-EPSCs can be evoked by stimulation of mfs, but not of A/C fibers (Figure 1B-C). The KAR/AMPA ratio is comparable between the two conditions (mf KAR/AMPA ratio, acute GluK2^{+/+}: 13.2 $\pm$ 1.1%; organotypic GluK2^{+/+}: 12.4 $\pm$ 2.4%; acute GluK2^{-/-}: 2.3 $\pm$ 0.2%; organotypic GluK2^{-/-}: 1.7 $\pm$ 0.1%; A/C KAR/AMPA ratio: acute GluK2^{+/+}: 2.0 $\pm$ 0.5%; organotypic GluK2^{+/+}: 0.1 $\pm$ 0.0% n=6-8) (Figure 1C).

KARs are strictly segregated at mf-CA3 PCs synapse and absent from A/C inputs in organotypic slices, hence validating the model to study the mechanisms underlying synapse specific expression of KARs in CA3 PCs, however it is not known whether KARs are also present in extrasynaptic compartments. To get a more precise evaluation of the subcellular segregation of KARs, we mapped functional KARs in single CA3 PCs using focal laser photolysis of caged glutamate at 405 nm (Trigo et al., 2009). Three days before recording, CA3 PCs were transfected by single cell electroporation (see methods) with a cDNA expressing GFP to reveal dendritic morphology of CA3 PCs. The laser spot used for uncaging could be positioned in 3D in reference to the distinct compartments of CA3 PCs. We first evaluated the precision of the method by moving the laser spot at different distances away from a dendrite in the stratum radiatum while recording AMPAR mediated currents evoked by glutamate uncaging (Sup Fig 1A-B). This provided an evaluation for the spatial precision of glutamate uncaging of roughly 5-10 μ m in diameter.

We then mapped AMPARs and KARs in distinct compartments of CA3 PCs in organotypic slices (Figure 1D). In CA3 PCs recorded in the voltage-clamp mode, glutamate uncaging (MNI glutamate 500 μ M, 2 ms) evoked AMPAR-mediated currents in all compartments, namely on the soma, thorny excrescences, and proximal shaft and distal dendrites (Figure 1E-F). In striking contrast, KAR-evoked currents (recorded in the presence of LY303070

and D-AP5) could only be evoked when the uncaging spot was localized above visually identified thorny excrescences (average amplitude 59.4 ± 13.2 pA, $n=10$) (Figure 1G-H). No KAR-current could be evoked when the laser spot was either positioned on the soma, on the shaft of proximal dendrites or on distal dendrites. No KAR-current was evoked in GluK2^{-/-} organotypic slices (Figure 1I-J), or in any compartment of CA1 PCs (Sup Figure 1D-E). In acute slices, functional mapping of KARs revealed a similar restricted pattern of expression (Sup Figure 1F-G). Functional mapping of AMPARs and KARs highlights a clear distinction between iGluR subtypes. AMPARs are readily expressed at synaptic as well as at extrasynaptic sites, i.e on the soma and on dendritic shafts. In contrast, KARs appear excluded from the soma and from dendritic shafts, and are only activated when the laser is focused on thorny excrescences. With the current resolution of laser uncaging it is not possible to exclude the presence of KARs at perisynaptic sites within the thorny excrescence, given the spacing between the different PSDs (300-400 nm) (Rollenhagen et al., 2007; Wilke et al., 2014).

Quantitative replacement of GluK2 in GluK2^{-/-} mice

In order to gain insight into the mechanism by which KARs are targeted to mf-CA3 synapses and excluded from extrasynaptic sites, we used a molecular substitution approach in combination with slice electrophysiology and glutamate uncaging (Figure 2). As expected, in CA3 PCs transfected with GFP and prepared from GluK2^{-/-} mice, glutamate uncaging on thorny excrescences did not result in any detectable current. We then rescued functional KARs in slices from GluK2^{-/-} mice using single cell electroporation of CA3-PCs. A main advantage of single cell electroporation is the possibility to control the amount of cDNA transfected, in addition to being able to precisely target CA3 PCs. We transfected various concentrations (3, 10, 20, 40 and 80 ng/μl) of cDNA encoding the GluK2a subunit together with cDNA encoding soluble GFP (Figure 2; Sup Figure 2). Two to three days after transfection, GFP-expressing CA3 PCs were recorded in the whole-cell mode. KAR-currents evoked by focal glutamate uncaging onto thorny excrescences could be successfully recorded with electroporation of cDNA at a concentration as low as 3 ng/μl. The amplitude of KAR-currents depended on the amount of cDNA transfected (mean amplitude: 80 ng/μl: 275.2 ± 64.4 pA; 40 ng/μl: 126.1 ± 41.3 pA; 20 ng/μl: 85.3 ± 22.1 pA; 10 ng/μl: 97.3 ± 9.5 pA; 3 ng/μl: 68.7 ± 12.3 pA; $n= 10-22$) (Figure 2A-C). Interestingly, the average amplitude of native KAR-currents in wild-type slices corresponded best to the low (3 ng/μl) concentration of GluK2a cDNA. Importantly, with GluK2a cDNA concentrations of 10 ng/μl and above, aberrant KAR-currents were also

evoked with focal glutamate uncaging onto the soma (Figure 2B-D), and distal dendrites (Sup Figure 2) in stark contrast with the native situation (soma, mean amplitude: 80 ng/μl: 93.2 ± 29.7 pA; 40 ng/μl: 22.8 ± 4.1 pA; 20 ng/μl: 24.9 ± 9.6 pA; 10 ng/μl: 23.3 ± 4.2 pA).

In slices from WT mice, KAR-currents displayed slow decay kinetics (mean tau weighted WT: 126 ± 17 ms, $n = 7$). This slow decay kinetics can be explained by the heteromeric composition of native KARs and by the interaction of KARs with auxiliary subunits like NETOs (Barberis et al., 2008; Contractor et al., 2003; Fernandes et al., 2009; Straub et al., 2011; Zhang et al., 2009). In CA3 PCs of GluK2^{-/-} mice transfected with GluK2a cDNA, the decay kinetics of KAR-currents evoked by focal glutamate uncaging onto thorny excrescences was much faster than in native conditions for concentrations GluK2a cDNA of 10 ng/μl and above (mean tau weighted GluK2a 80 ng/μl: 18.1 ± 5.5 ms; 40 ng/μl: 46.6 ± 8.6 ms; GluK2a 20 ng/μl: 68.6 ± 9.4 ms; GluK2a 10 ng/μl: 71.9 ± 5.1 ms; $n = 7-13$) (Figure 2E,F). The electroporation of 3 ng/μl GluK2a cDNA restored decay kinetics to values not significantly different from WT (mean tau weighted GluK2a 3 ng/μl: 103.4 ± 12.0 ms). In addition, KAR-currents evoked in the soma for concentrations of GluK2a cDNA of 10 ng/μl and above also displayed fast decay kinetics (mean tau weighted, GluK2a 80 ng/μl: 16.2 ± 2.1 ms; $n=7$). From a methodological standpoint, these quantitative reexpression experiments clearly show that the amount of cDNA transfected, and consequently of GluK2a protein is critical for a faithful rescue of KAR subcellular segregation similar to native conditions. The use of a low amount of GluK2a cDNA (3 ng/μl) restored the restricted expression of KARs in thorny excrescences, while transfection of a higher amount of cDNA lead to the expression of KARs with ectopic localization and aberrant kinetics.

To further illustrate the importance of controlling the amount of electroporated GluK2a cDNA in order to faithfully rescue the restricted expression of KARs in CA3 PCs, we reexpressed tagged GluK2a and performed immunocytochemical detection with confocal microscopy. We have transfected a SEP-tagged GluK2a at concentrations of 3 ng/μl and 80 ng/μl in GluK2^{-/-} CA3 PCs. We initially planned to visualize SEP fluorescence on the membrane of CA3 PCs in live conditions. Because the fluorescence level was too low to be reliably detected, we turned to immunodetection of the GFP (SEP) tag. Whereas strong GFP immuno-fluorescence was detected in all compartments of CA3 PCs following transfection of 80 ng/μl of GluK2a cDNA, we observed considerably weaker fluorescence following transfection of 3ng/μl of GluK2a cDNA, with spots of SEP-GluK2 mainly detected on thorny excrescences (Figure 2G-H).

Recombinant homomeric GluK2 KARs display notably faster deactivation kinetics than heteromeric GluK2/GluK5 when expressed in HEK293 cells and activated by a short (1ms) pulse of glutamate (Barberis et al., 2008). We reasoned that fast glutamate uncaging may be able to reveal a difference between homomeric and heteromeric KAR composition in CA3 PCs and that fast decay kinetics of ectopic KAR-currents observed in conditions of overexpression of GluK2 may be due to a prevalence of homomeric GluK2. To test this hypothesis, we used UBP310 as an antagonist of recombinant GluK2/GluK5 KARs and synaptic KARs, which spares homomeric GluK2 KARs (Pinheiro et al., 2013). We observed that in WT slices, KAR-currents evoked by glutamate uncaging on thorny excrescences was strongly inhibited with 3 μ M UBP310 (mean % of inhibition: 86.5 ± 2.0 %; n=6) (Figure 3) confirming that native KARs in CA3 PCs are likely to be heteromeric KARs. In CA3 PCs from GluK2^{-/-} mice, following transfection of low concentrations of GluK2 cDNA (3 ng/ μ l), KARs were also largely inhibited by UBP310 3 μ M (mean % of inhibition: 81.6 ± 7.4 %; n=7) (Figure 3). In contrast, following transfection of a higher amount of cDNA (80 ng/ μ l), inhibition of KAR-currents evoked by glutamate uncaging on thorny excrescences was largely attenuated (mean % of inhibition: 29.0 ± 12.3 %; n=12), and this inhibition spared the fast decaying component of the response (Figure 3). These results strongly suggest that following transfection of a high concentration of GluK2a cDNA, ectopic KARs with fast decay kinetics represent a pool of homomeric GluK2 KARs. These experiments also bring strong support to the notion that native KARs are heteromeric KARs. KAR-currents can be successfully rescued in CA3-PCs but faithful replacement of KARs in CA3 PCs requires precise quantitative transfection of GluK2a cDNA.

Synaptic rescue of KARs at Mf-CA3 synapses in GluK2^{-/-} mice.

We then tested the conditions for the selective rescue of synaptic KARs at mf-CA3 synapses in slices from GluK2^{-/-} mice. AMPAR and KAR-mediated EPSCs were evoked by local electrical stimulation of mf and A/C inputs to CA3 PCs (Figure 4A-C). To normalize the intrinsic variability at mf-CA3 synapses, the relative amplitude of KAR-EPSCs was measured with respect to the amplitude of AMPAR-EPSCs for each transfected cell recorded, as previously described (Carta et al., 2013). KAR-EPSCs could be rescued at mf-CA3 synapses with concentrations of GluK2a cDNA of 3 ng/ μ l and above. Interestingly the KAR/AMPA ratio was comparable to WT for all the different concentrations of cDNA electroporated (KAR/AMPA ratio, WT: 10.8 ± 2.1 %; GluK2^{-/-} not transfected: 0.8 ± 0.1 %; 80 ng/ μ l: 11.2 ± 1.2 %; 20 ng/ μ l: 9.9 ± 1.0 %; 10 ng/ μ l: 8.5 ± 1.2 %; 3 ng/ μ l: 9.5 ± 0.8 %;

n=6-9; one way ANOVA; $P>0.05$) (Figure 4C). Stimulation of A/C inputs did not elicit any KAR-EPSCs neither in CA3 PCs from WT mice nor in CA3 PCs from GluK2^{-/-} mice transfected with the different concentrations of GluK2a cDNA (A/C KAR/AMPA ratio, WT: $0.1 \pm 0.0\%$; GluK2 80ng/ μ l: $0.1 \pm 0.1\%$, n=6-9; Student's t-test; $P>0.05$). Analysis of the decay kinetics of KAR-EPSCs revealed no statistically significant differences between WT and conditions with various amount of GluK2a cDNA electroporated (mean tau weighted, WT: 49.9 ± 7.0 ms; GluK2 80ng/ μ l: 32.4 ± 8.6 ms; 20 ng/ μ l: 31.5 ± 2.6 ms; 10 ng/ μ l: 42.6 ± 8.9 ms; 3 ng/ μ l: 41.0 ± 7.8 ms; n = 6-9, one way ANOVA; $P>0.05$) (Figure 4D-E). Thus, these results indicate that synaptically evoked KARs can be reliably rescued at mf-CA3 synapses and are absent from other inputs mimicking the normal distribution of endogenous KARs. In addition, whereas the use of high cDNA concentration lead to the expression of ectopic extrasynaptic KAR-currents of large amplitude, the relative amplitude of KAR-EPSCs did not differ between the different concentrations of cDNA. While the amount/content of synaptic KARs is precisely controlled independently of the copy number of GluK2a cDNA expressed, the amount of extrasynaptic KARs depends on concentration of cDNA electroporated. These observations imply that at synaptic contacts an active and specific molecular mechanism/machinery precisely regulates the amount of KARs, possibly due to limited number of slots to accommodate synaptic KARs at mf-CA3 synapses.

GluK2a C-terminal sequence necessary for stabilization of KARs at mf-CA3 synapses

The C-terminal domain (CTD) of GluK2 is the target of multiple proteins that modulate the trafficking of KARs to the plasma membrane (Contractor et al., 2011). Alternative splicing in the CTD of GluK2 increases the diversity of possible interactions (Coussen et al., 2005; Hirbec et al., 2003; Jaskolski et al., 2004). We studied the role of the CTD domain of GluK2a in the stabilization of KARs at mf-CA3 synapses by using the molecular replacement strategy described above to reexpress different truncated forms of GluK2a subunits in CA3 PCs (Figure 5). In hippocampal slice cultures from GluK2^{-/-} mice, cDNAs (3 ng/ μ l) coding for different GluK2a subunits truncated in the C-terminal domain (GluK2 Δ 4; GluK2 Δ 14; GluK2 Δ 29 and GluK2 Δ 39) were electroporated in CA3 PCs (Figure 5A). AMPAR- and KAR-EPSCs were evoked by mf electrical stimulation (Figure 5B-C). Reexpression of GluK2 Δ 4, a GluK2a subunit lacking the PDZ binding domain necessary for the interaction with PSD95 rescued KAR-EPSCs with a relative amplitude comparable to WT (KAR/AMPA ratio WT: $10.0 \pm 1.3 \%$; GluK2 Δ 4: $9.7 \pm 1.4 \%$). Interestingly, reexpression of GluK2a mutants with a deletion of the 14 or 29 last amino acids lead to strongly reduced KAR-EPSCs (KAR/AMPA ratio, GluK2 Δ 14: $4.8 \pm 0.8 \%$; $P<0.01$; n=7; GluK2 Δ 29: $3.4 \pm 0.7 \%$; $P<0.001$; n=12), albeit trafficking of these mutated GluK2a

(GluK2 Δ 14 and GluK2 Δ 29) to the plasma membrane is not impaired in dissociated cultured neurons (Jaskolski et al., 2004). Hence, decreased amplitude of KAR-EPSCs may be explained by a default in the recruitment or stabilization of KARs at mf-CA3 synapses. The corresponding 14 last amino acids of the GluK2a CTD are essential for the interaction of GluK2a with N-Cadherin/ β -catenin complexes (Coussen et al., 2002). Further truncation of the last 39 amino-acids (GluK2 Δ 39) is known to decrease surface trafficking of GluK2a due to the loss of an essential protein sequence (amino acids 871 to 882) responsible for forward trafficking of KARs (Jaskolski et al., 2004; Yan et al., 2004). Accordingly, expression of GluK2 Δ 39 (3 ng/ μ l) in GluK2 $^{-/-}$ mice lead to KARs-EPSCs with largely reduced relative amplitude with respect to WT (KAR/AMPA ratio, WT: 10.0 ± 1.3 ; GluK2 Δ 39: 2.0 ± 0.5 ; $P < 0.001$; $n = 5-8$).

We performed glutamate uncaging in CA3 PCs of GluK2 $^{-/-}$ mice electroporated with cDNA for GluK2a truncated in the C-terminal domain, (Figure 5D-E). KAR-currents evoked by glutamate uncaging on thorny excrescences following reexpression of GluK2 Δ 14 (3 ng/ μ l) and GluK2 Δ 29 displayed largely decreased mean amplitudes as compared to WT (mean amplitude, WT: 59.7 ± 12.0 pA; GluK2 Δ 14: 15.9 ± 1.8 pA; GluK2 Δ 29: 19.3 ± 2.6 pA; $P < 0.001$; $n = 11-15$). These results confirm that the 14 last aminoacids of GluK2a CTD are important for the stabilization of KARs at mf-CA3 synapses. No detectable extrasynaptic KAR-currents were however observed in the soma following reexpression of GluK2 Δ 14 or GluK2 Δ 29 in GluK2 $^{-/-}$ mice (mean amplitude, GluK2 Δ 14: 4.5 ± 0.9 pA; GluK2 Δ 29: 6.7 ± 1.7 pA; GluK2 $^{-/-}$, not transfected: 1.0 ± 0.1 pA; $n = 10-7$) (Sup Figure 3).

N-Cadherin is involved in synaptic stabilization KARs

GluK2a interacts with N-Cadherin/ β -catenin complexes through its CTD domain; this interaction involves the 14 last amino acids of the CTD and is necessary for N-Cadherin mediated recruitment and aggregation of membrane KARs in heterologous cells (Coussen et al., 2002). Because truncation of this 14 amino-acid sequence strongly decreased KAR-EPSC amplitude, we tested the role of N-Cadherin/ β -catenin in the stabilization of KARs at mf-CA3 synapses. For this, we first used a dominant-negative approach in organotypic cultures by overexpressing an N-Cadherin protein lacking the extracellular domain necessary for homophilic adhesions and transsynaptic adhesion (Ncad- Δ E) in CA3 cells. This mutant acts as a dominant negative construct by sequestering α - and β -catenins (1996), thereby interfering with the binding of GluK2a to endogenous N-Cadherin. Under these conditions, we observed a strong reduction in the amplitude of KAR-EPSCs, as quantified by the KAR/AMPA ratio (mean KAR/AMPA ratio, GFP: $17.3 \pm 3.9\%$; Ncad- Δ E: $5.8 \pm 1.1\%$; $P < 0.05$; $n = 6-6$) (Figure 6A-B). The net amplitude of AMPAR-EPSCs

current was not affected by the overexpression of Ncad-ΔE (mean net amplitude, GFP: 114.1 ± 11.5 pA; Ncad-ΔE: 109.8 ± 15.2 pA; n=6-6) (Figure 6C).

The dominant negative construct Ncad-ΔE may potentially affect signaling through different types of cadherins. For this reason, we specifically deleted N-Cadherin by expression of the Cre recombinase in CA3 PCs from N-Cadherin floxed mice (N-Cadherin^{f/f}) (Li et al., 2005) with a plasmid coding for GFP-cre or for nuclear GFP as a control (Figure 6 C-D). We also observed a marked reduction of KAR-EPSCs in CA3 PCs with knockdown of N-Cadherins as quantified by the KAR/AMPA ratio (mean KAR/AMPA ratio, nuclear GFP: 10.9 ± 1.6 %; GFP-cre: 3.1 ± 0.6 %; $P < 0.0001$, n=7-6). The net amplitude of AMPAR-EPSCs was not affected by down regulation of N-Cadherins (mean net amplitude, nuclear GFP: 155.2 ± 43.7 pA; GFP-cre: 132.5 ± 13.8 pA; n=7-6). We obtained similar results when knockdown of N-Cadherins was performed *in vivo* by stereotaxic infection of N-Cadherin^{f/f} mice with a virus (AAV 2.9) coding for GFP-Cre under the control of a synapsin promoter in the CA3 area of the hippocampus. Acute brain slices were prepared and patch clamp recordings of CA3 PCs were performed 3-4 weeks after infection (Sup Figure 4). Altogether, these results indicate that N-Cadherin/β-catenin complex is involved in the recruitment and/or stabilization of KARs at mf-CA3 synapses.

DISCUSSION

Here we show that organotypic slice cultures faithfully reproduce the strict compartmentalization of KARs at mf-CA3 synapses in CA3 PCs. This provides a much improved model over dissociated cultured neurons, which express functional native KARs however not synaptically. Like in acute slices, focal glutamate uncaging in CA3 PCs from wild-type organotypic slices reveals a highly segregated subcellular distribution of functional KARs. KAR-currents can be only be activated when the uncaging spot is focalized on thorny excrescences, but not on the soma, on the shaft of proximal dendrites or on distal dendrites and spines. The spatial resolution of our technique, together with the spacing between PSDs of mf-CA3 synapses (circa 500 nm) (Rollenhagen et al., 2007; Wilke et al., 2013), does not allow to exclude the presence of KARs at perisynaptic sites between the various PSDs on thorny excrescences. Nonetheless, the first lesson drawn from the uncaging experiment is the striking difference between the two related iGluR families AMPARs and KARs. Whereas AMPARs appear present at both synaptic and extrasynaptic sites in acute and organotypic slices, KARs appear to be exclusively distributed at a particular synaptic input and absent from extrasynaptic sites. Extrasynaptic AMPARs appear to serve as a pool of receptors ready to be used for LTP of AMPAR-

EPSCs (Choquet and Triller, 2013). The lack of a pool of extrasynaptic KARs may explain the lack of LTP of KAR-EPSCs (Carta et al., 2014), except in artificial conditions where AMPARs are absent (Granger et al., 2013). The segregation of synaptic KARs at mf-CA3, but not at A/C fiber synapses (Castillo et al., 1997), is readily preserved in organotypic slices.

With this model system in hand, we sought to identify molecular determinants borne by the major KAR subunit GluK2 required for the strict subcellular segregation observed. We transfected CA3 PCs from GluK2^{-/-} slices to reexpress the GluK2a subunit and mutants thereof, based on the fact that GluK2 is an essential component of KARs in CA3 PCs (Mulle et al., 1998). From a methodological standpoint, we found that transfection of a precise amount of GluK2a cDNA, by using single-cell electroporation, was necessary for a faithful restoration of the strict subcellular segregation of KARs. With concentrations of cDNA above 10 ng/μl, reexpression of GluK2a lead to the abnormal expression of KARs throughout the somatodendritic compartment of CA3 PCs. Beside the strong methodological warning about the importance of using a quantitative replacement strategy, these results also suggest that the stringent subcellular segregation of native KARs - the exclusion from extrasynaptic sites - depends at least in part on the amount of the GluK2 subunit. Hence in physiological conditions, one can speculate that the amount of GluK2-containing KARs is strongly controlled, either at the transcriptional level or at the posttranscriptional level. Not much is known about transcriptional regulation of KARs. At the posttranscriptional level, SUMOylation of GluK2a leads to the removal of KARs from the postsynaptic membrane, leading to a decrease in KAR-mediated synaptic transmission (Martin et al., 2007). In addition, the presence of GluK2 in the plasma membrane can be controlled by its interaction with Parkin which interacts and ubiquitinates GluK2, and as a consequence regulates GluK2 levels and KAR-currents in cultured neurons (Maraschi et al., 2014). It would thus be interesting to map KARs in CA3 PCs in the absence of Parkin, or in conditions of reduced SUMOylation of GluK2. The large ectopic KAR-currents evoked by short UV uncaging flashes observed in CA3 PCs transfected with high concentrations of cDNA displayed fast decay kinetics, which are reminiscent of recombinant homomeric GluK2 KARs (Barberis et al., 2008) and are very different from native KARs recorded on thorny excrescences. The block of ectopic KAR-currents by UBP310, an antagonist of heteromeric GluK2/GluK5 receptors but not of homomeric GluK2 (Pinheiro et al., 2013), indicates that ectopic KARs are likely homomers. This suggests that the availability of GluK4 or GluK5 to form heteromers are in controlled and limited amounts in CA3 PCs. Hence, non controlled overexpression of GluK2 leads to the loss of the strict

compartmentalization of KARs in CA3 PCs giving rise to abnormal homomeric GluK2 at extrasynaptic sites.

Reexpression of GluK2a in CA3 PCs of GluK2^{-/-} mice restores expression of KARs at mf-CA3 synapses. Interestingly, the amplitude and kinetics of KAR-EPSCs appear independent of the amount of cDNA transfected, a finding compatible with a synaptic slot hypothesis (Choquet and Triller, 2013). Whatever the cDNA concentration however, KAR-EPSCs cannot be recorded at A/C synapses. We thus propose that only a limited amount of slots selective for KARs are available at mf-CA3 synapses. Once these slots are occupied, overexpressed KARs are targeted to extrasynaptic sites. The limited slots for KARs correlates with the observation that in physiological conditions, KAR-EPSCs can undergo LTD (Carta et al., 2013; Chamberlain et al., 2012; Selak et al., 2009), but not LTP. GluK4 and GluK5 are certainly essential elements in controlling the synaptic amount of KARs. GluK5 is essential for long term plasticity of KARs (Carta et al., 2013; Selak et al., 2009), and removing both GluK4 and GluK5 abolishes KAR-EPSCs (Fernandes et al., 2009).

What constitutes a KAR synaptic slot remains an open question. Possibilities include PDZ-domain proteins such as PSD95, PICK or GRIP (Coussen et al., 2005; Garcia et al., 1998; Hirbec et al., 2003), and this was explored with our molecular replacement approach. Reexpression of a mutated GluK2a subunit lacking the 4 last amino-acids responsible for the interaction with PDZ domain proteins did not affect KAR-EPSCs. However removal of the last 14 amino acids of GluK2a has a strong impact on the amplitude of KAR-EPSCs which were not further decreased by extending the C-terminal truncation. Interestingly, these last 14 amino acids are essential for the interaction of GluK2-containing KARs with N-Cadherin/ β -catenin complexes, albeit this interaction is likely indirect (Coussen et al., 2002). N-Cadherins are synaptic adhesion proteins implicated in synapse formation and maturation (Basu et al., 2015). Activation of N-Cadherins by ligand-covered latex beads recruits GluK2a to N-Cadherin/ β -catenin complexes in heterologous cells in a manner which strictly depends on the last 14 aa of GluK2a (Coussen et al., 2005). Here we demonstrate that overexpression of a dominant negative N-Cadherin or knocking down N-Cadherin in slice cultures or *in vivo* strongly reduces KAR-EPSCs at mf-CA3 synapses without impacting on basal synaptic properties. Although N-Cadherin binds AMPARs through an interaction with the N-terminal extracellular domain of GluA2 (Saglietti et al., 2007), AMPAR-EPSCs were not affected by the removal of N-Cadherin. Hence our data indicate that N-Cadherins specifically recruit and stabilize KARs at mf-CA3 synapses.

Synaptic specificity is likely mediated by a network of synaptic molecules. N-Cadherins appear to be one of the partner molecules responsible for the synaptic stabilization of KARs at mf-CA3 synapses. Accordingly, it is interesting to note that N-Cadherin labeling is particularly intense in the dendritic shaft of CA3 PCs in the stratum lucidum (Fannon and Colman, 1996). Other partners are likely to play a role in the subcellular segregation of KARs at these particular synaptic sites. Synaptic specificity in the brain involves differential expression of type II cadherin genes (Basu et al., 2015), such as Cadherin-9 which is expressed in both the DG and CA3 PCs, and appears essential for the specific formation of mf-CA3 synapses during development (Williams et al., 2011). Cadherin-9 may also play a role in specifying the functional properties of mature mf-CA3 synapses, although this has yet to be explored. An association between N-Cadherin and Cadherin-9, possibly assembled as heterodimers, could be essential for the maintenance of specific synaptic features. One can speculate that the loss of Cadherin-9 could similarly impact KAR-EPSCs.

Understanding the molecular mechanisms underlying the synaptic recruitment of KARs at mf-CA3 synapses could shed light on the pathological process through which aberrant KARs are recruited at recurrent mf onto DG cells in temporal lobe epilepsy (Epsztein et al., 2005). Neutralization of these aberrant KARs markedly attenuates epileptic seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy (Peret et al., 2014). The molecular mechanisms underlying synaptic segregation of KARs likely bear similarities at both mf-CA3 synapses and recurrent mf synapses onto DG cells. Hence this KAR targeting mechanism represents a promising target for the treatment of epileptic conditions refractory to pharmacological treatment.

In conclusion, our findings suggest that multiple mechanisms combine to control the specific subcellular localization of KARs at mf-CA3 synapses, including a stringent control of the amount of GluK2 subunit in CA3 PCs, a limited number of slots for KARs, and the recruitment/stabilization of KARs by transsynaptic mechanisms which involve N-Cadherins.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

DNA constructs

GluK2a WT and GluK2a C-terminal mutant cDNAs used in the present study were described previously (Coussen et al., 2005; Jaskolski et al., 2004). NCad-ΔE cDNA (Bard et al., 2008) and SEP GluK2a cDNA (Martin et al., 2008) were described previously.

Slice culture preparation and transfection

Organotypic hippocampal slice (300 μm thickness) cultures were prepared from P5-P7 GluK2^{-/-} and wild type FVB mice as described previously (Carta et al., 2013) according to the guidelines of the University of Bordeaux/CNRS Animal Care and Use Committee. Three to four days after plating, the medium was replaced and then changed every 2-3 days. After 7 days in vitro (DIV), visually identified CA3 PCs were transfected by single cell electroporation. For this, slices were placed in the microscope chamber in the presence of a small volume of a sterile pre-warmed (37°C) HEPES based ACSF composed of 145 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES and 10 mM glucose, adjusted to 310 mOsm/L and pH 7.4 with NaOH at room temperature. Electroporation pipettes (8-10 mΩ) were filled with a solution containing the following: 140 mM CH₃KSO₃, 2 mM MgCl₂, 4 mM NaCl, 5 mM P-creatine, 3 mM Na₂ATP, 0.33 mM GTP, 0.2 mM EGTA and 10 mM HEPES adjust to 300 mOsm/L and pH 7.2 with KOH. DNA plasmids were dissolved at various concentrations in the electroporation solution: GluK2 WT and GluK2 C-terminal mutant cDNAs at concentration between 3 and 80 ng/μl; GFP at 30 ng/μl. The electroporation pipette was approached to the cell body in loose cell-attached configuration. A train of stimulation to the cell body (50 square pulses, 600 μs duration, at 100 Hz with an amplitude of -11.5 V). The pulses were delivered by a stimulating unit controlled by an EPC9 amplifier (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany) and the pipette was slowly retracted and positioned on an other cell body.

In vivo virus injection and acute slices preparation

Stereotaxic viral injections were performed on 3 weeks old male C57bl6 N-Cadherin^{fl/fl} mice. The mice were injected with 300nl (55 nl/min) of an AAV2/9 encoding for GFP-Cre under a synapsin promotor (AAV2/9.hsynapsin.hghintron.GFP.cre.wpre.sv40; titer 1.33¹¹) in the CA3 area of the right hippocampus with the following coordinates: +1.90 mm ML, -1.90 mm AP and -1.9 mm DV. For acute slices recordings, transverse hippocampal slices (320 μm thick) were obtained from 17 to 19 days old FVB GluK2^{-/-} and GluK2^{+/+} mice and

from 2 month old N-Cadherin^{fl/fl} mice anesthetized with ketamine (75mg/kg) and xylazine (10mg/kg) mix and killed by decapitation.

Electrophysiology

Whole-cell patch clamp experiments were performed at 33°C from CA3 PCs expressing or not GFP 3-4 days after transfection. Whole-cell voltage-clamp recordings were performed with 3-4 M Ω electrodes filled with a solution containing 140 mM CsCH₃SO₃, 2 mM MgCl₂, 4 mM NaCl, 5 mM P-creatine, 3 mM Na₂ATP, 0.33 mM GTP, 0.2 mM EGTA and 10 mM HEPES adjust to 300 mOsm/l and pH 7.2 with CsOH. In experiments in which mf or A/C inputs were electrically stimulated by an extracellular electrode, slices were perfused with an extracellular solution (aCSF) composed of: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 2.3 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂ and 25 mM glucose saturated with 95% O₂ / 5% CO₂. Mf synaptic responses were evoked by minimal stimulation (Marchal and Mulle, 2004) by placing a patch pipette filled with aCSF in the hilus of the DG. A/C excitatory stimulations were evoked by placing the pipette in the *stratum radiatum* above the CA3 PC layer. The distinct nature of the stimulated inputs was confirmed by recording short-term plasticity properties. These experiments were performed at 30–32°C in the presence of pharmacological drugs in the aCSF: NBQX 150 nM, DAP-5 50 μ M, bicuculline 10 μ M. KAR-currents were pharmacologically isolated by the addition of LY 303070 25 μ M, a selective AMPA receptors antagonist. For glutamate uncaging experiments, slices were bathed with a small volume of HEPES based ACSF composed of 140 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 6 mM HEPES, 4 mM Na-HEPES, 2.3 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂, 10 mM glucose and 1 mM sodium pyruvate. Glutamate receptors were activated by glutamate uncaging in the presence of MNI-glutamate 500 μ M. Glutamate uncaging was performed on a Nikon FN1 microscope equipped with a 60X lens (numerical aperture 1.00) and a 405 nm Obis laser (Coherent, Germany; 50 mW CW) controlled by a Digitimer DS2A (Digitimer, Welwyn, UK)

The access resistance was <20 M Ω , and cells were discarded if it changed by >20%. No series resistance compensation was used. Recordings were made using EPC 9 or EPC10 amplifiers (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany), were filtered at 0.5-1kHz, digitalized at 5 kHz, and stored on a personal computer for further analysis (IGOR PRO 6.2; WaveMetrics, Lake Oswego, OR). Values are presented as mean $\pm$ s.e.m. Electrophysiological analysis was performed with the IGOR PRO software through NeuroMatic v2.6 plugin. The decaying phase of the currents was fitted with a function of the following form: $y(t) = \sum A_i \exp(-t / \tau_i)$, where A_i is the fraction of respective components (

$\sum A_i=1$) and τ_i is the time constant τ_ω calculated using the formula $\tau_\omega = \sum A_i \tau_i$. A maximum of two exponential components was used. It has been shown that in organotypic slice cultures A/C fast synaptic transmission, unlike mf-CA3, can be in part mediated by P2X receptors activated by ATP (Mori et al., 2001). We have observed similar residual currents in our preparation both in the presence of NBQX 25 μ M and in GluK2^{-/-} animals (data not shown). For this reason, to quantify KAR-mediated EPSCs at A/C input we have subtracted the residual current after application of LY 303070, with the residual current after the further application of NBQX (to block AMPARs and KARs).

Immunohistochemistry

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared from P5-P7 GluK2^{-/-} and after DIV7, CA3 PCs were transfected by single cell electroporation with cDNA constructs coding for tomato (30 ng/ μ l) and for SEP-GluK2a subunit either at 3 ng/ μ l or at 80 ng/ μ l. 3 days after transfection, the slices were fixed with paraformaldehyde 4%, 30% sucrose for 15 minutes at room temperature. After blocking within PBS, 10% SVF for 1 hour, the slices were incubated with a mouse monoclonal primary antibody anti-GFP (Roche) in PBS containing 5% SVF (dilution 1:200, over night at 4°C). After 3 washing in PBS, the slices were incubating with fluorophore-coupled secondary antibody anti-mouse (Lifetechnologies) in PBS containing 5% SVF (dilution 1:1000, for 2 hours at room temperature). Finally the slices were washed 3 times at room temperature with PBS, and coverlipped in Vectashield medium (Vector).

In Figure 1, the confocal images were obtained after fixation of organotypic slices following glutamate uncaging on organotypic slices from WT FVB mice electroporated with a cDNA construct coding for GFP-N1. After fixation and blocking as previously described, we immunodetected GFP by incubating the slices with a mouse monoclonal antibody anti-GFP (Roche) (dilution 1/200, overnight at 4°C) in PBS containing 0.2%, Triton and 5% SVF. After 3 washing in PBS, the slices were incubated with a fluorophore-coupled secondary antibody anti-mouse (Lifetechnologies) in PBS containing 5% SVF and 0.2% Triton (dilution 1:1000, for 2 hours at room temperature). Finally the slices were washed 3 times at room temperature with PBS, and coverlipped in Vectashield medium (Vector).

Confocal laser-scanning fluorescence microscopy and image analysis

Confocal image stacks of PFA-fixed organotypic slices were acquired with a Leica DM6000 TCQS SP8 X white laser-scanning microscope using the objective Leica HCX PL Apo CS 100X oil NA 1.4 and the 647nm (alexa 647) and 550nm (Tomato) diode lasers.

Stacks from GFP GluK2 (3 ng/μl and 80 ng/μl) were acquired randomly (n=7). Camera aperture, magnification, light power, and exposure time were fixed for all images. Images were processed with ImageJ 1.49d software (Wayne Rasband, National institutes of Health, USA). Illustrations correspond to 2D maximal projections of 3D acquired confocal stacks smoothened by the median filter.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SF performed and analysed slice electrophysiology experiments in combination with pharmacological and molecular replacement approaches with the help of MC. MC initiated the project and developed single cell electroporation of KAR cDNAs in hippocampal slices. VL helped SF to design the immunohistochemistry experiments, and performed image acquisition and analysis. CM supervised the project and wrote the manuscript together with SF and MC.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Conseil Régional d'Aquitaine, the European Commission (EIF Fellowship awarded to MC), the Agence Nationale de la Recherche (contract MossyGlu), the labex BRAIN and the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20140931189 to SF). We would like to acknowledge Françoise Coussen for the fruitful initial discussions, and for her help with the GluK2a plasmids. We thank Séverine Deforges for producing the plasmid DNAs, Elisabeth Normand, Audrey Lacquemant and Amandine Gautier for taking care of the mice, Olivier Thoumine for Ncad-ΔE construct and discussion and Adam Gorlewicz for his help with immunocytochemistry and for all discussions on Cadherins. Confocal microscopy was performed at the Bordeaux Imaging Center.

REFERENCES

- Barberis, A., Sachidhanandam, S., and Mulle, C. (2008). GluR6/KA2 kainate receptors mediate slow-deactivating currents. *Journal of Neuroscience* 28, 6402–6406.
- Bard, L., Boscher, C., Lambert, M., Mege, R.M., Choquet, D., and Thoumine, O. (2008). A Molecular Clutch between the Actin Flow and N-Cadherin Adhesions Drives Growth Cone Migration. *Journal of Neuroscience* 28, 5879–5890.
- Basu, R., Taylor, M.R., and Williams, M.E. (2015). The classic cadherins in synaptic specificity. *Cell Adh Migr* 9, 193–201.
- Bettler, B., and Mulle, C. (1995). Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34, 123–139.
- Carta, M., Fièvre, S., Gorlewicz, A., and Mulle, C. (2014). Kainate receptors in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience* n/a–n/a.
- Carta, M., Opazo, P., Veran, J., Athané, A., Choquet, D., Coussen, F., and Mulle, C. (2013). CaMKII-dependent phosphorylation of GluK5 mediates plasticity of kainate receptors. *The EMBO Journal* 32, 496–510.
- Castillo, P.E., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388, 182–186.
- Chamberlain, S.E.L., González-González, I.M., Wilkinson, K.A., Konopacki, F.A., Kantamneni, S., Henley, J.M., and Mellor, J.R. (2012). SUMOylation and phosphorylation of GluK2 regulate kainate receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 15, 845–852.
- Choquet, D., and Triller, A. (2013). Perspective. *Neuron* 80, 691–703.
- Contractor, A., Mulle, C., and Swanson, G.T. (2011). Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. *Trends Neurosci* 34, 154–163.
- Contractor, A., Sailer, A.W., Darstein, M., Maron, C., Xu, J., Swanson, G.T., and Heinemann, S.F. (2003). Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation of mossy-fiber synapses in KA2-/- mice. *J Neurosci* 23, 422–429.
- Copits, B.A., and Swanson, G.T. (2013). Kainate Receptor Post-translational Modifications Differentially Regulate Association with 4.1N to Control Activity-dependent Receptor Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 288, 8952–8965.
- Copits, B.A., Robbins, J.S., Frausto, S., and Swanson, G.T. (2011). Synaptic Targeting and Functional Modulation of GluK1 Kainate Receptors by the Auxiliary Neuropilin and Tolloid-Like (NETO) Proteins. *Journal of Neuroscience* 31, 7334–7340.
- Copits, B.A., and Swanson, G.T. (2012). Dancing partners at the synapse: auxiliary subunits that shape kainate receptor function. *Nat Rev Neurosci* 13, 675–686.
- Coussen, F., Normand, E., Marchal, C., Costet, P., Choquet, D., Lambert, M., Mège, R.-M., and Mulle, C. (2002). Recruitment of the kainate receptor subunit glutamate receptor 6 by cadherin/catenin complexes. *J Neurosci* 22, 6426–6436.

- Coussen, F., Perrais, D., Jaskolski, F., Sachidhanandam, S., Normand, E., Bockaert, J., Marin, P., and Mulle, C. (2005). Co-assembly of two GluR6 kainate receptor splice variants within a functional protein complex. *Neuron* 47, 555–566.
- Darstein, M., Petralia, R.S., Swanson, G.T., Wenthold, R.J., and Heinemann, S.F. (2003). Distribution of kainate receptor subunits at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 23, 8013–8019.
- Epsztein, J., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., and Crépel, V. (2005). Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. *Journal of Neuroscience* 25, 8229–8239.
- Fannon, A.M., and Colman, D.R. (1996). A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron* 17, 423–434.
- Fernandes, H.B., Catches, J.S., Petralia, R.S., Copits, B.A., Xu, J., Russell, T.A., Swanson, G.T., and Contractor, A. (2009). High-Affinity Kainate Receptor Subunits Are Necessary for Ionotropic but Not Metabotropic Signaling. *Neuron* 63, 818–829.
- Fisher, J.L., and Mott, D.D. (2012). The Auxiliary Subunits Neto1 and Neto2 Reduce Voltage-Dependent Inhibition of Recombinant Kainate Receptors. *Journal of Neuroscience* 32, 12928–12933.
- Garcia, E.P., Mehta, S., Blair, L.A., Wells, D.G., Shang, J., Fukushima, T., Fallon, J.R., Garner, C.C., and Marshall, J. (1998). SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. *Neuron* 21, 727–739.
- Granger, A.J., Shi, Y., Lu, W., Cerpas, M., and Nicoll, R.A. (2013). LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type. *Nature* 493, 495–500.
- Henze, D.A., Urban, N.N., and Barrionuevo, G. (2000). The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Nsc* 98, 407–427.
- Hirbec, H., Francis, J.C., Lauri, S.E., Braithwaite, S.P., Coussen, F., Mulle, C., Dev, K.K., Coutinho, V., Meyer, G., Isaac, J.T.R., et al. (2003). Rapid and differential regulation of AMPA and kainate receptors at hippocampal mossy fibre synapses by PICK1 and GRIP. *Neuron* 37, 625–638.
- Jaskolski, F., Coussen, F., Nagarajan, N., Normand, E., Rosenmund, C., and Mulle, C. (2004). Subunit composition and alternative splicing regulate membrane delivery of kainate receptors. *Journal of Neuroscience* 24, 2506–2515.
- Lerma, J., and Marques, J.M. (2013). Kainate Receptors in Health and Disease. *Neuron* 80, 292–311.
- Li, J., Patel, V.V., Kostetskii, I., Xiong, Y., Chu, A.F., Jacobson, J.T., Yu, C., Morley, G.E., Molkentin, J.D., and Radice, G.L. (2005). Cardiac-specific loss of N-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. *Circulation Research* 97, 474–481.
- Maraschi, A., Ciammola, A., Folci, A., Sassone, F., Ronzitti, G., Cappelletti, G., Silani, V., Sato, S., Hattori, N., Mazzanti, M., et al. (2014). Parkin regulates kainate receptors by interacting with the GluK2 subunit. *Nature Communications* 5, 5182.

- Marchal, C., and Mulle, C. (2004). Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors. *J Physiol (Lond)* 561, 27–37.
- Martin, S., Bouschet, T., Jenkins, E.L., Nishimune, A., and Henley, J.M. (2008). Bidirectional regulation of kainate receptor surface expression in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 283, 36435–36440.
- Martin, S., Nishimune, A., Mellor, J.R., and Henley, J.M. (2007). SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* 447, 321–325.
- Mori, M., Heuss, C., Gähwiler, B.H., and Gerber, U. (2001). Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol (Lond)* 535, 115–123.
- Mulle, C., Sailer, A., Pérez-Otaño, I., Dickinson-Anson, H., Castillo, P.E., Bureau, I., Maron, C., Gage, F.H., Mann, J.R., Bettler, B., et al. (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 392, 601–605.
- Nicoll, R.A., and Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 6, 863–876.
- Palacios-Filardo, J., Aller, M.I., and Lerma, J. (2014). Synaptic Targeting of Kainate Receptors. *Cerebral Cortex*.
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14, 383–400.
- Peret, A., Christie, L.A., Ouedraogo, D.W., Gorlewicz, A., Epsztein, J., Mulle, C., and Crépel, V. (2014). Contribution of Aberrant GluK2-Containing Kainate Receptors to Chronic Seizures in Temporal Lobe Epilepsy. *CellReports* 8, 347–354.
- Pinheiro, P.S., Lanore, F., Veran, J., Artinian, J., Blanchet, C., Crépel, V., Perrais, D., and Mulle, C. (2013). Selective Block of Postsynaptic Kainate Receptors Reveals Their Function at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Cerebral Cortex* 23, 323–331.
- Rollenhagen, A., Satzler, K., Rodriguez, E.P., Jonas, P., Frotscher, M., and Lubke, J.H.R. (2007). Structural Determinants of Transmission at Large Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Journal of Neuroscience* 27, 10434–10444.
- Ruiz, A., Sachidhanandam, S., Utvik, J.K., Coussen, F., and Mulle, C. (2005). Distinct subunits in heteromeric kainate receptors mediate ionotropic and metabotropic function at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 25, 11710–11718.
- Saglietti, L., Dequidt, C., Kamieniarz, K., Rousset, M.-C., Valnegri, P., Thoumine, O., Beretta, F., Fagni, L., Choquet, D., Sala, C., et al. (2007). Extracellular Interactions between GluR2 and N-Cadherin in Spine Regulation. *Neuron* 54, 461–477.
- Selak, S., Paternain, A.V., Aller, I.M., Pico, E., Rivera, R., and Lerma, J. (2009). A Role for SNAP25 in Internalization of Kainate Receptors and Synaptic Plasticity. *Neuron* 63, 357–371.
- Straub, C., Hunt, D.L., Yamasaki, M., Kim, K.S., Watanabe, M., Castillo, P.E., and Tomita,

- S. (2011). Distinct functions of kainate receptors in the brain are determined by the auxiliary subunit Neto1. *Nat Neurosci* 14, 866–873.
- Tang, M., Pelkey, K.A., Ng, D., Ivakine, E., McBain, C.J., Salter, M.W., and McInnes, R.R. (2011). Neto1 Is an Auxiliary Subunit of Native Synaptic Kainate Receptors. *Journal of Neuroscience* 31, 10009–10018.
- Trigo, F.F., Corrie, J.E.T., and Ogden, D. (2009). Laser photolysis of caged compounds at 405nm: Photochemical advantages, localisation, phototoxicity and methods for calibration. *J. Neurosci. Methods* 180, 9–21.
- Wilke, S.A., Antonios, J.K., Bushong, E.A., Badkoobehi, A., Malek, E., Hwang, M., Terada, M., Ellisman, M.H., and Ghosh, A. (2013). Deconstructing Complexity: Serial Block-Face Electron Microscopic Analysis of the Hippocampal Mossy Fiber Synapse. *Journal of Neuroscience* 33, 507–522.
- Wilke, S.A., Raam, T., Antonios, J.K., Bushong, E.A., Koo, E.H., Ellisman, M.H., and Ghosh, A. (2014). Specific Disruption of Hippocampal Mossy Fiber Synapses in a Mouse Model of Familial Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 9, e84349.
- Williams, M.E., de Wit, J., and Ghosh, A. (2010). Molecular mechanisms of synaptic specificity in developing neural circuits. *Neuron* 68, 9–18.
- Williams, M.E., Wilke, S.A., Daggett, A., Davis, E., Otto, S., Ravi, D., Ripley, B., Bushong, E.A., Ellisman, M.H., Klein, G., et al. (2011). Cadherin-9 Regulates Synapse-Specific Differentiation in the Developing Hippocampus. *Neuron* 71, 640–655.
- Yan, S., Sanders, J.M., Xu, J., Zhu, Y., Contractor, A., and Swanson, G.T. (2004). A C-terminal determinant of GluR6 kainate receptor trafficking. *J Neurosci* 24, 679–691.
- Zhang, W., St-Gelais, F., Grabner, C.P., Trinidad, J.C., Sumioka, A., Morimoto-Tomita, M., Kim, K.S., Straub, C., Burlingame, A.L., Howe, J.R., et al. (2009). A Transmembrane Accessory Subunit that Modulates Kainate-Type Glutamate Receptors. *Neuron* 61, 385–396.
- (1996). Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *17*, 837–848.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Compartmentalized expression of KARs in CA3 PCs

- A)** Illustrative scheme of the hippocampus with recording and stimulating electrodes.
- B)** Voltage-clamp recordings were performed on CA3 PCs at -70 mV from acute and organotypic slices prepared from GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} mice, in the presence of bicuculline (10 μ M), D-AP5 (50 μ M) and a low concentration of NBQX (150 nM) to limit polysynaptic activity. In all, 30 responses evoked at 3 Hz were averaged in the absence and in the presence of 25 μ M LY303070, to isolate the AMPAR and the KAR component of mf-CA3

synaptic responses, respectively. In the insert are showed enlargements, by the same proportion, of isolated KAR-EPSCs.

C) Summary graphs for the relative amplitude of KAR-EPSCs versus AMPAR-EPSCs obtained in acute and organotypic slices prepared from GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} mice.

D) Confocal image of a CA3 PC (GluK2^{+/+}) transfected with GFP illustrating the locations where glutamate uncaging (MNI-glutamate, 500 μ M) was performed and the corresponding evoked KAR-mediated current. Purple arrow-heads represent the time at which uncaging was done (405 nm, 2 ms). In all, 5 responses evoked at 0.1 Hz were averaged at each uncaging site.

E, F) Sample traces illustrating AMPAR-KAR-mediated currents evoked by glutamate uncaging (bicuculline 10 μ M, D-AP5 50 μ M and NBQX 150 nM) in organotypic slices prepared from GluK2^{+/+} mice. Uncaging was performed in different districts of the CA3 PC, soma (S), thorny excrescence (TE), proximal dendrites (PD), and distal dendrites (DD). Summary bar graph illustrates the average of the net amplitude of the evoked currents.

G, H) Sample traces illustrating KAR-mediated currents evoked by glutamate uncaging (addition of 25 μ M LY303070) in organotypic slices prepared from GluK2^{+/+}. Uncaging was performed in different compartments of the CA3 PC (S, TE, PD, DD). Bar graph summarizing the average net amplitude of evoked KAR-currents.

I, J) Sample traces illustrating the lack of KAR-mediated current (addition of 25 μ M LY303070) evoked by glutamate uncaging in organotypic slices prepared from GluK2^{-/-} mice. Uncaging was performed in different compartments of the CA3 PC (S, TE, PD, DD). Bar graph summarizing the average net amplitude of the evoked currents. In all panels, values are presented as mean $\pm$ SEM of n experiments.

Figure 2: Quantitative replacement of KARs

A, B) Sample traces illustrating KAR-currents evoked by glutamate uncaging on thorny excrescences (A) and soma (B) of CA3 PCs in organotypic slice cultures prepared from GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} mice not transfected (NT) or transfected with different amounts of GluK2a cDNA (80, 20, 3 ng/ μ l).

C, D) Bar graphs summarizing the average amplitude of KAR-currents evoked by glutamate uncaging on thorny excrescences (C) or on the soma (D) in the different conditions.

E, F) Sample traces of KAR-currents evoked by glutamate uncaging showed in A, and scaled at the peak illustrating differences in the decay kinetics for various conditions. F, Quantification of the decay rate (tau weighted) of KAR-currents evoked by glutamate uncaging for the different conditions.

G, H) Confocal image of the dendritic tree of a CA3 PC (GluK2^{-/-}) transfected with tomato and SEP-GluK2 at 80 ng/μl (G) or at 3 ng/μl (H) after alexa 647 immunohistochemistry against GFP. Right corner, close up view of thorny excrescences in the proximal dendrites of CA3 PCs.

In all panels, values are presented as mean ± SEM of n experiments. Data were compared using one way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (**p<0.01 ***p<0.001)

Figure 3: Block of KAR-currents by the GluK2/GluK5 antagonist UBP310.

A) Sample traces illustrating KAR-currents evoked by glutamate uncaging on thorny excrescences of CA3 PCs in organotypic slice cultures prepared from GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} not transfected (NT) or transfected with 3 ng/μl of GluK2a cDNA or 80 ng/μl in the absence or presence of UBP 310 (3 μM).

B) Bar graph summarizing the percentage of inhibition of UBP 310 (3 μM) on the KAR-currents evoked by glutamate uncaging. In all panels, values are presented as mean ± SEM of n experiments. Data were compared using one way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (**p<0.01)

Figure 4: Rescue of synaptic KARs at mf-CA3 synapses

A, B) Sample traces illustrating synaptic currents evoked by mf stimulation (A) and A/C stimulation (B) in organotypic slices prepared from GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} mice, not transfected (NT) or transfected with different amounts of GluK2a cDNA (80, 20, 3 ng/μl). Experiments were performed in the presence of bicuculline (10 μM), D-AP5 (50 μM) and NBQX (150 nM). Traces represent the average of synaptic currents evoked at 3 Hz in the absence and in the presence of 25 μM LY303070, to isolate the AMPAR and the KAR component, respectively. In the insert are showed enlargements, by the same proportion, of isolated KAR-EPSCs.

C) Bar graph summarizing the KAR/AMPA ratio obtained from the experiments presented in (A) and (B).

D, E) Sample traces of mf-CA3 KAR-EPSCs showed in A, and scaled at the peak illustrating the lack of difference in the decay kinetics for various conditions. (E) Quantification of the decay rate (tau weighted) of KAR-EPSCs from cells transfected with different amount of cDNA encoding for GluK2a.

In all panels, values are presented as mean $\pm$ SEM of n experiments. Data were compared using one way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (**p<0.01, ***p<0.001)

Figure 5: GluK2a C-terminal sequence necessary for stabilization of synaptic KARs

A) Schematic representation of the GluK2a subunit, illustrating the sites at which the C-terminal domain was truncated.

B, C) Sample traces illustrating synaptic currents evoked by mf stimulation in organotypic slices prepared from GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} mice, not transfected (NT) or transfected with 3 ng/ μ l of wt or mutated GluK2a cDNA (Δ 4, Δ 14, Δ 29 and Δ 39). Experiments were performed in the presence of bicuculline (10 μ M), D-AP5 (50 μ M) and NBQX (150 nM). Traces represent the average of synaptic currents evoked at 3 Hz in the absence and in the presence of 25 μ M LY303070, to isolate the AMPAR and the KAR component, respectively. In the insert are showed enlargements, by the same proportion, of isolated KAR-EPSCs. (C) Bar graphs summarizing KAR/AMPA ratios obtained from the experiments presented in B, C.

D, E) Sample traces illustrating KAR-currents evoked by glutamate uncaging on thorny excrescences of CA3 PCs in organotypic slice cultures prepared from GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} mice, not transfected (NT) or transfected with 3 ng/ μ l of wt or mutated GluK2a cDNA (Δ 14 and Δ 29). E, Bar graphs summarizing KAR/AMPA ratios obtained from the experiments presented in (D).

In all panels, values are presented as mean $\pm$ SEM of n experiments. Data were compared using one way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (**p<0.01, ***p<0.001).

Figure 6: N-Cadherin is necessary for stabilization of synaptic KARs

A) Sample traces illustrating synaptic currents evoked by mf stimulation in organotypic slices prepared from wt mice transfected with GFP or with NCad- Δ E (30 ng/ μ l). Experiments were performed in the presence of bicuculline (10 μ M), D-AP5 (50 μ M) and NBQX (150 nM). Traces represent the average of synaptic currents evoked at 3 Hz in the absence and in the presence of 25 μ M LY303070, to isolate the AMPAR and the KAR component, respectively. In the insert are showed enlargements, by the same proportion,

of isolated KAR-EPSCs. **(B)** Bar graphs summarizing KAR/AMPA ratios and the net amplitude of the AMPA-EPSCs obtained from the experiments presented in A.

(C) Sample traces illustrating synaptic currents evoked by mf stimulation in organotypic slices prepared from NCad^{flox/flox} mice transfected with nuclear GFP or GFP-Cre (30 ng/ μ l??). Experiments were performed in the presence of bicuculline (10 μ M), D-AP5 (50 μ M) and NBQX (150 nM). Traces represent the average of synaptic currents evoked at 3 Hz in the absence and in the presence of 25 μ M LY303070, to isolate the AMPA and the KAR component, respectively. In the insert are showed enlargements, by the same proportion, of isolated KAR-EPSCs. **(D)** Bar graphs summarizing KAR/AMPA ratios and the net amplitude of the AMPA-EPSCs obtained from the experiments presented in C.

In all panels, values are presented as mean $\pm$ SEM of n experiments. Data were compared using one way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Figure 1

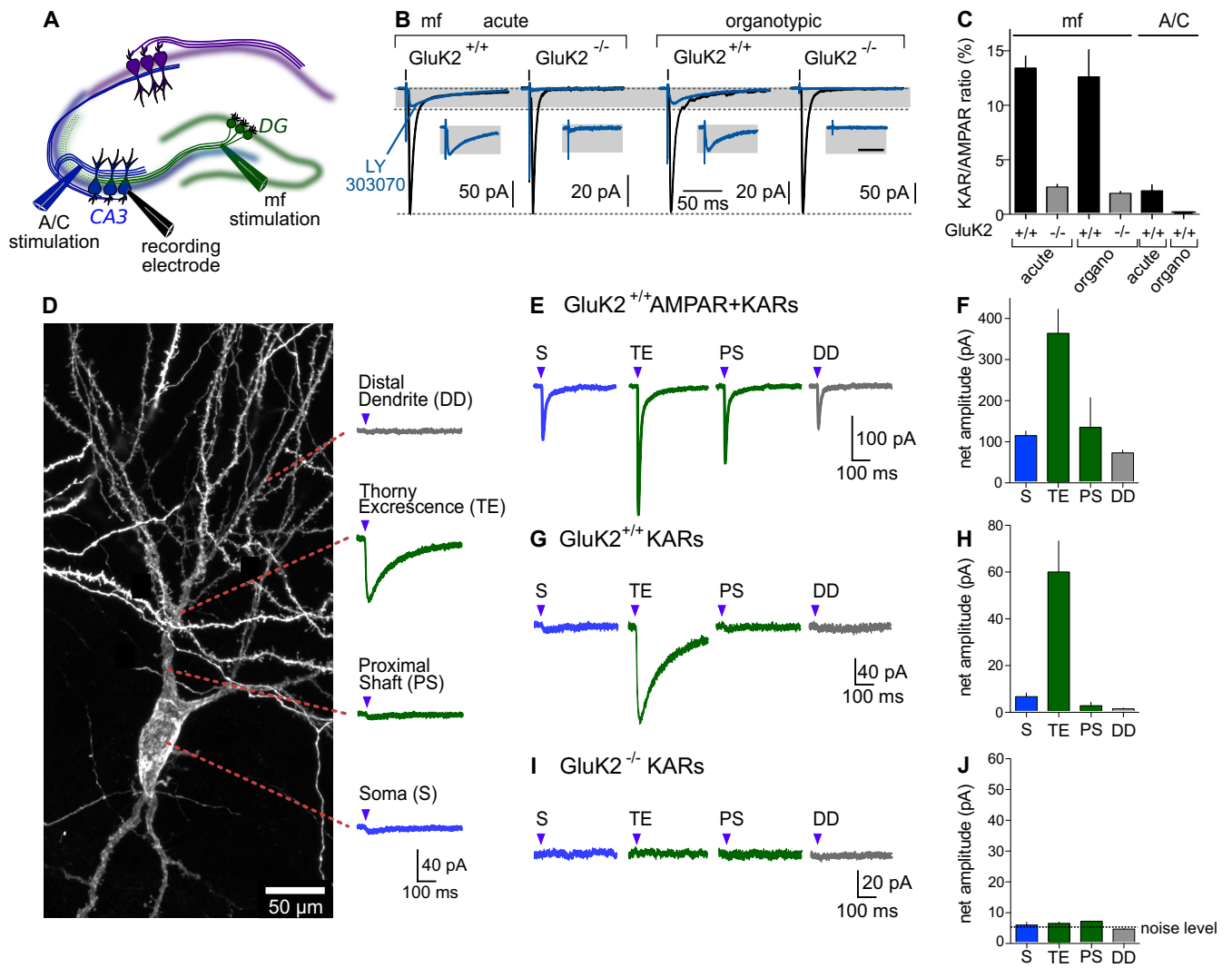
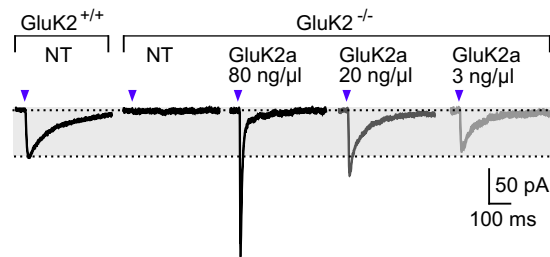
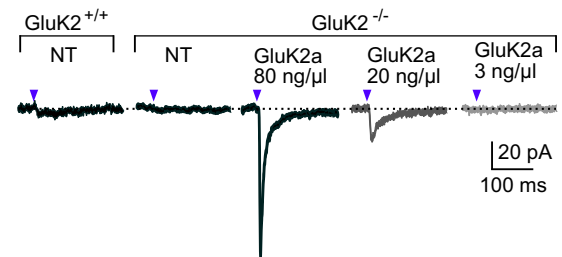


Figure 2

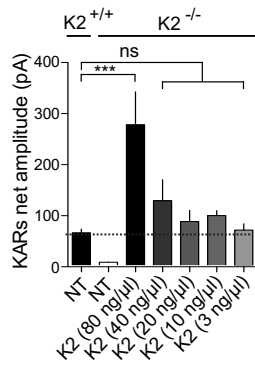
A thorny excrescences



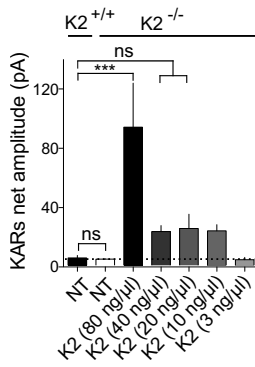
B soma



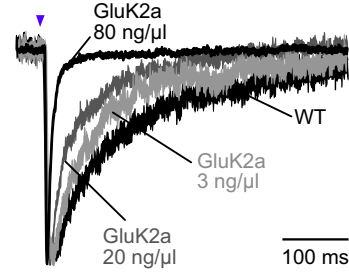
C TE



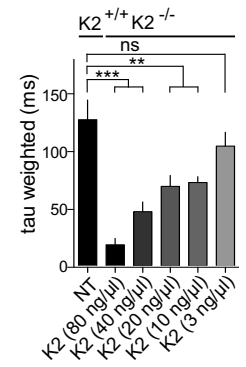
D soma



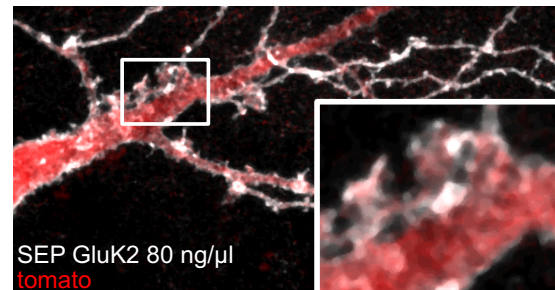
E normalized traces



F TE



G



H

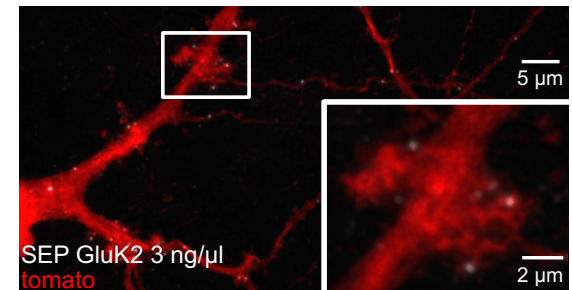
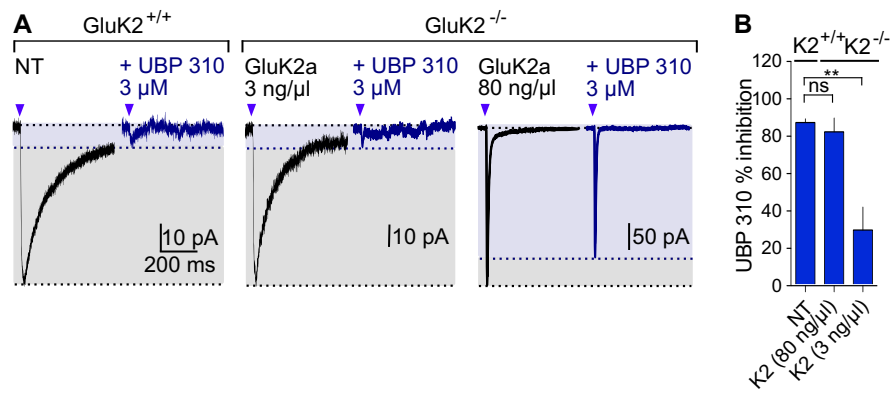


Figure 3



5 μ m

Figure 4

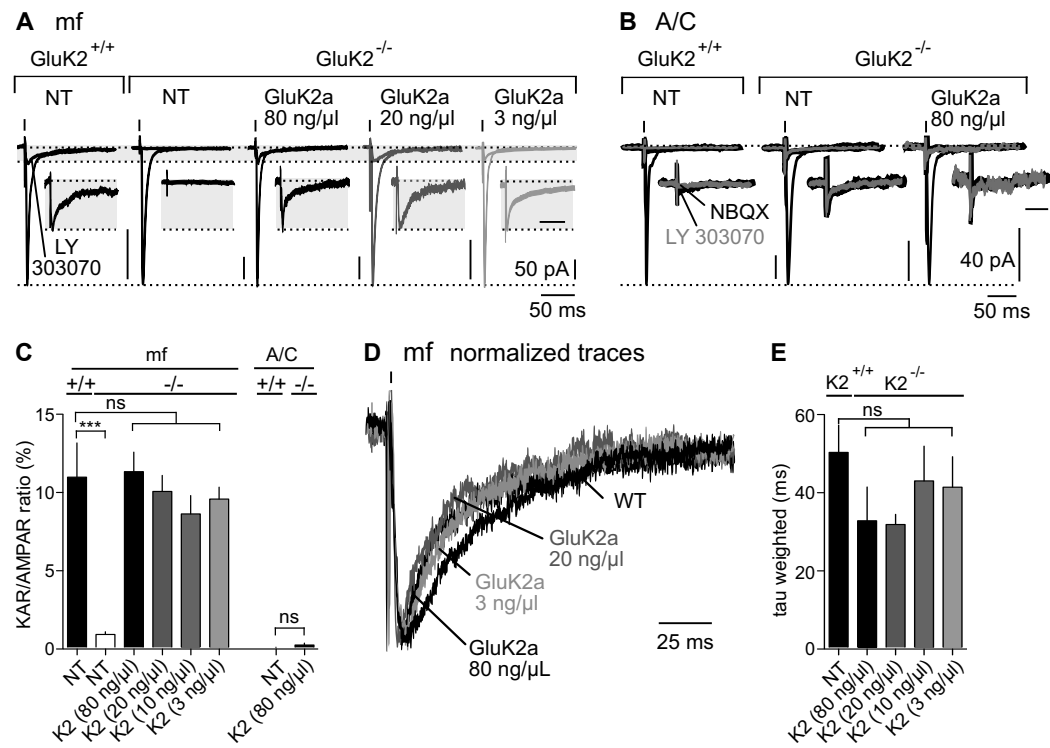


Figure 5

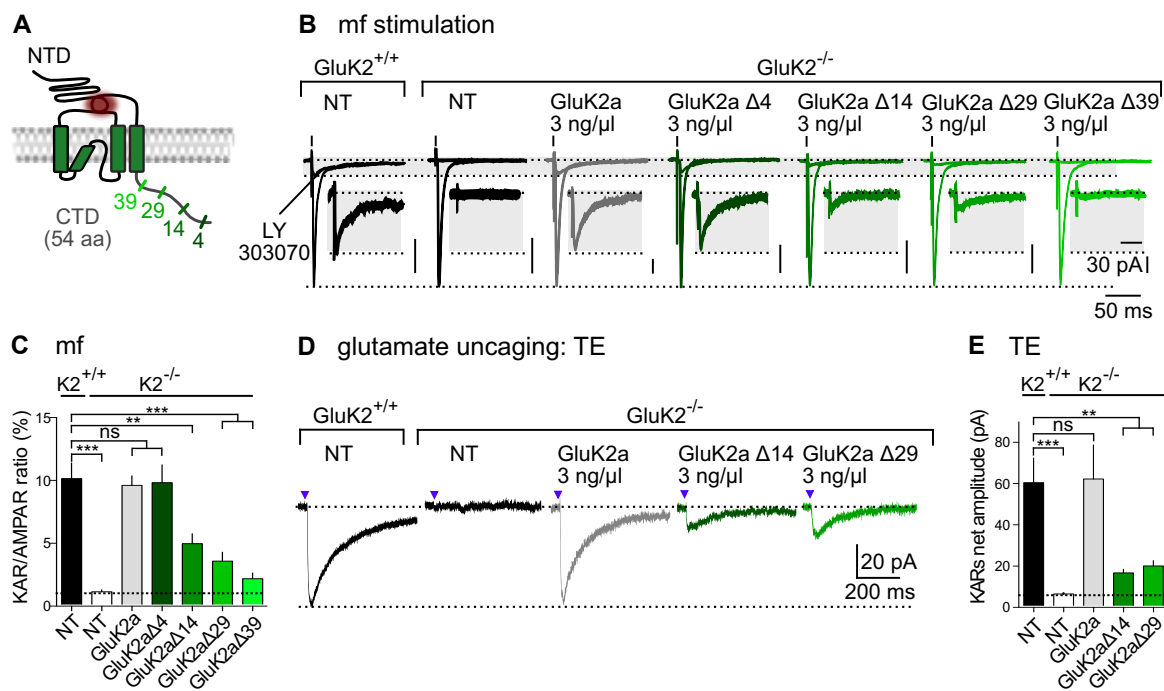
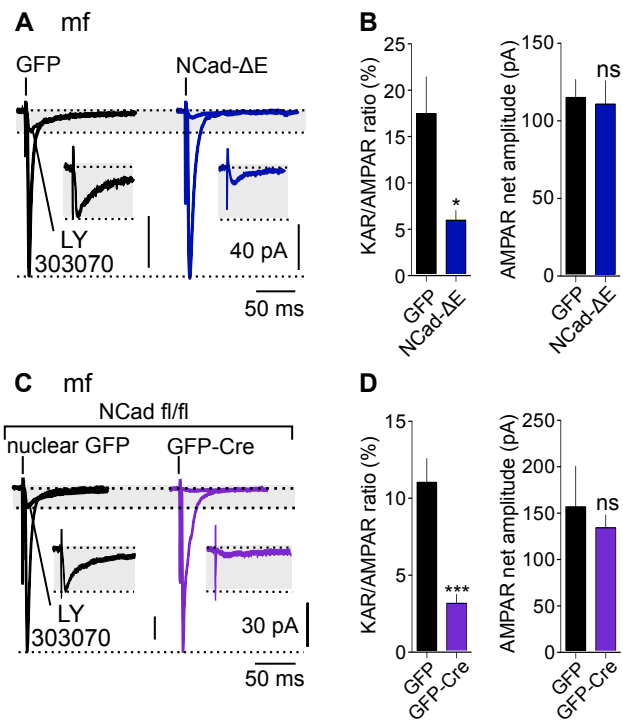


Figure 6



Supplementary figures legend.

Supplementary figure S1: Spatial precision of monophoton glutamate uncaging in organotypic slice cultures.

A) To have access to the spatial precision of the glutamate uncaging system, AMPARs mediated-currents have been recorded following glutamate uncaging from different distance of a dendrite.

B) Graph representation of the percentage of current amplitude after uncaging on the dendrite to the current amplitude after uncaging at different distance from the dendrite itself.

C) Epifluorescence images and corresponding confocal images of a CA3 PC (GluK2^{+/+}) illustrating the location of where glutamate uncaging (MNI-glutamate 500 μ M) was performed and the correspondent evoked KAR-mediated current. Purple arrow head represent the time at which uncaging was done (405 nm, 2 ms). Glutamate uncaging was performed on the soma (S), thorny excrescences (TE), proximal shaft (PS) and distal dendrite (DD). The confocal images were acquired after glutamate uncaging, fixation and mounting of the slice.

D, E) Sample traces illustrating the glutamate uncaging evoked KAR-mediated current (in the presence of 25 μ M LY303070) in organotypic slices prepared from GluK2^{+/+}. Uncaging was performed in different districts of the CA1 PC (soma, proximal dendrite and distal dendrite). Summary bar graph illustrates the average the net amplitude of the evoked currents (net amplitude soma: 4.5 ± 0.3 pA; proximal dendrite: 4.7 ± 0.2 pA; distal dendrite: 4.4 ± 0.6 pA; n=5)

F, G) Bar graph summarizing the average net amplitude of the evoked currents after glutamate uncaging in different compartments of CA3 PC (S, TE, PD, DD) from acute (GluK2^{+/+}) slices in absence of LY303070 (F) in order to record both AMPARs and KARs component (net amplitude: S: $73.5 \text{ pA} \pm 49.1 \text{ pA}$; TE: $286.7 \pm 37.1 \text{ pA}$; PS: $121.2 \pm 32.6 \text{ pA}$; DD: $65.7 \pm 15.6 \text{ pA}$; n=4) or in presence of LY 303070 (G) in order to record KARs component (net amplitude: S: $4.4 \pm 2.7 \text{ pA}$; TE: $81.23 \pm 8.3 \text{ pA}$; PS: $5.5 \pm 0.0 \text{ pA}$; $1.0 \pm 0.7 \text{ pA}$ n=4). In all panels, values are presented as mean $\pm$ SEM of n experiments.

Supplementary figure S2: Quantitative replacement of KARs.

A) Sample traces illustrating the KAR-currents evoked by glutamate uncaging on the distal dendrites CA3 PCs in organotypic slice cultures prepared from GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} not

transfected (NT) or transfected with different amount of GluK2a cDNA (80, 40, 20, 10, 3 ng/μl).

B) Summary bar graphs illustrating the average amplitude of the KARs evoked currents at the distal dendrites (Average net current amplitude: WT: 5.4 ± 0.3 pA; GluK2a 80 ng/μl: 19.2 ± 5.2 pA; GluK2a 40 ng/μl: 21.5 ± 4.2 pA; GluK2a 20 ng/μl: 16.0 ± 5.4 pA; GluK2a 10 ng/μl: 9.4 ± 2.6 pA; GluK2a 3 ng/μl: 2.6 ± 1.0 pA).

In all panels, values are presented as mean $\pm$ SEM of n experiments. Data were compared using one way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (*p<0.05).

Supplementary figure S3: Glutamate uncaging on the soma after reexpression of CTD truncated GluK2 subunits.

A) Sample traces illustrating the KAR-currents evoked by glutamate uncaging on soma of CA3 PCs in organotypic slice cultures prepared from GluK2^{+/+} and GluK2^{-/-} not transfected (NT) or transfected with 3 ng/μl of wt or mutated GluK2a cDNA ($\Delta 14$ and $\Delta 29$).

B) Summary bar graphs illustrating the average amplitude of the KARs evoked currents presented in (A) (Average net current amplitude: WT: 5.0 ± 1.6 pA; GluK2a: 3.8 ± 1.6 pA; GluK2a $\Delta 14$: 4.5 ± 0.9 pA; GluK2a $\Delta 29$: 6.7 ± 1.7 pA; n=7-8)..

Values are presented as mean $\pm$ SEM of n experiments. Data were compared using one way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.

Supplementary figure S4: *in vivo* knockout of N-Cadherin in CA3 PC decreases the amount of KARs at mf-CA3 synapse.

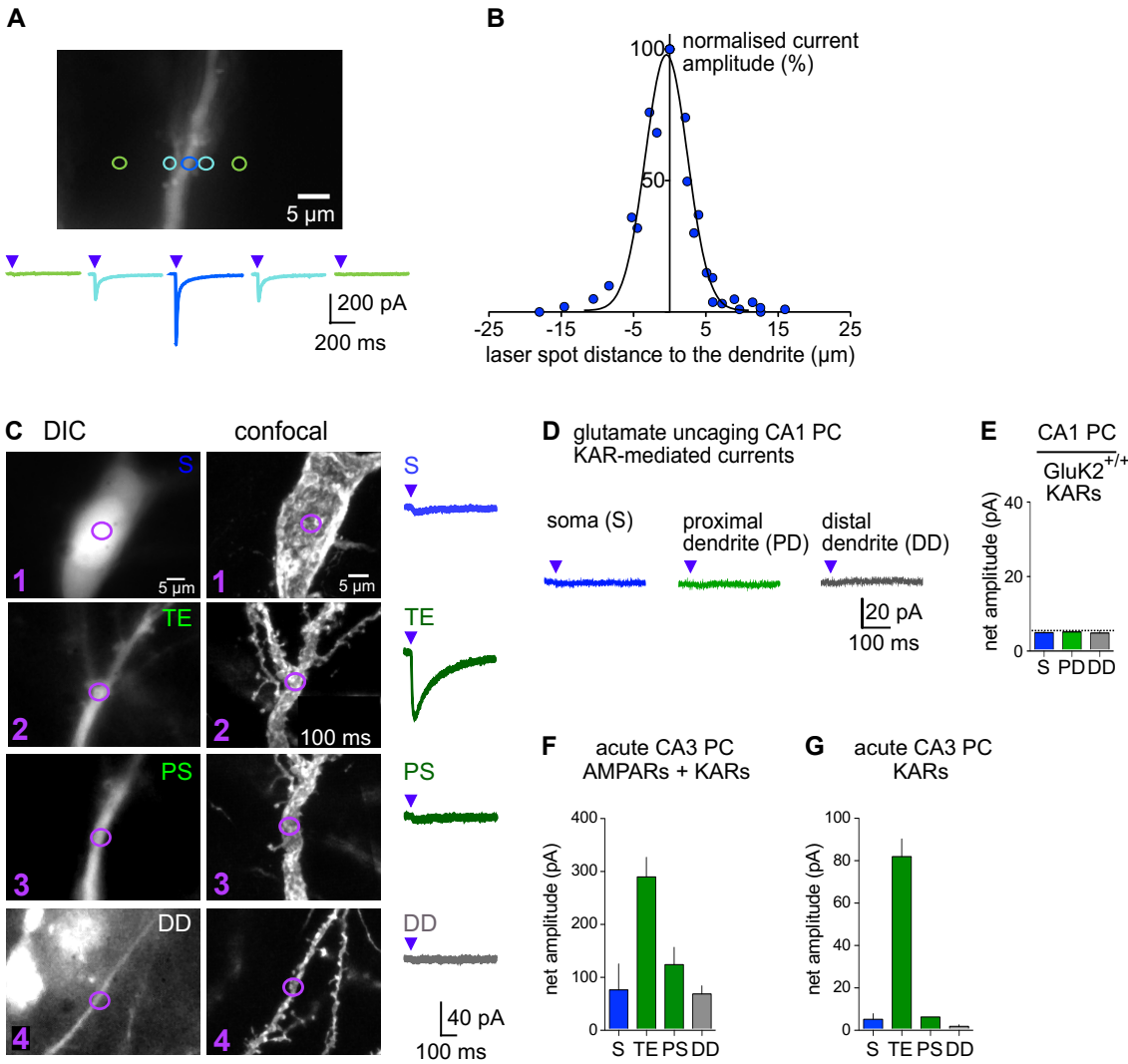
A) Representative hippocampal acute slice from a N-Cadherin^{fl/fl} mouse infected in the CA3 region with an AAV2.9 encoding GFP-cre. Slices were prepared 3-4 weeks after infection.

B) Sample traces illustrating the synaptic currents evoked by mossy fiber stimulation in CA3 PCs from acute slices prepared from N-Cadherin^{fl/fl} mice not transfected (NT) or infected with GFP-Cre (for clarity stimulus artifacts were removed). Experiments were carried in the presence of bicuculline (10 μM), D-AP5 (50 μM) and NBQX (150 nM). Traces represent the average of synaptic currents evoked at 3 Hz in the absence and in the presence of 25 μM LY303070, to isolate the AMPAR and the KAR component, respectively. In the insert are showed enlargements, by the same proportion, of isolated KAR-EPSCs.

C) Summary bar graphs illustrating the KAR/AMPA and the amplitude of the AMPAR mediated current obtained from the experiments presented in B. (mean KAR/AMPA ratio: not transfected: 10.3 ± 1.0 %; GFP-cre: 4.7 ± 0.5 %; n=13; mean amplitude: not transfected: 234.6 ± 42.4 pA; GFP-cre: 241.0 ± 28.9 pA; n=13).

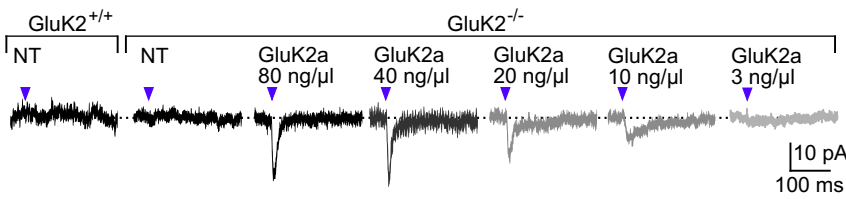
In all panels, values are presented as mean $\pm$ SEM of n experiments. Data were compared using one way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test (**p<0.001).

Supplementary figure S1

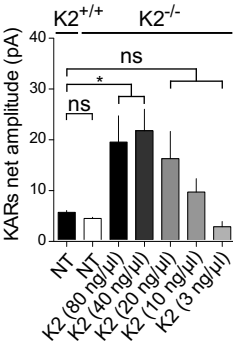


Supplementary figure S2

A Glutamate uncaging: distal dendrites

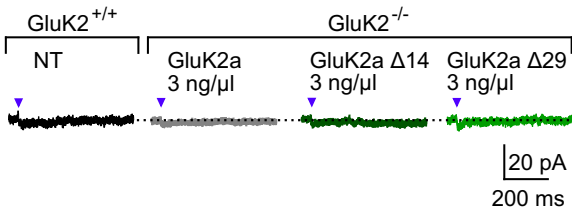


B Distal dendrites

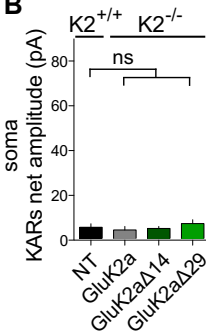


Supplementary figure S3

A Glutamate uncaging: soma



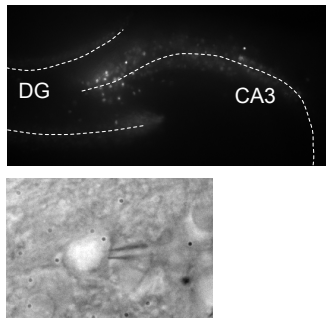
B



Supplementary figure S4

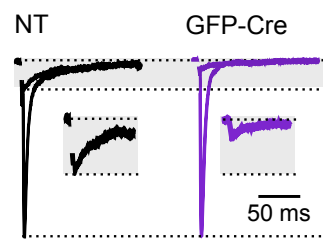
A

N-cadherin fl/fl mice
Infection AAV-synapsin
GFP-Cre in CA3 PC

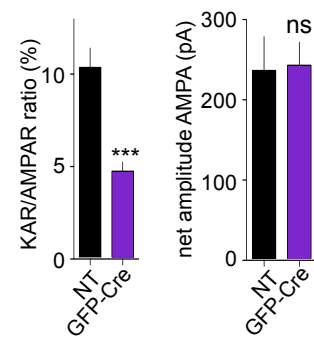


B

mf EPSCs
C57bl6 N-cadherin fl/fl



C



C. Discussion

Dans ce travail, nous avons pu montrer que les cultures organotypiques d'hippocampe permettaient de reproduire fidèlement la stricte compartimentation des rKA aux synapses FM-CA3 des cellules pyramidales de CA3. Comme dans les tranches aigües, le décageage focalisé de glutamate en cultures organotypiques révèle que les rKA sont strictement ségrégués dans les excroissances épineuses situées sur les dendrites proximales des cellules pyramidales de CA3 où les fibres moussues du gyrus denté contactent les cellules pyramidales de CA3. Néanmoins, il faut prendre en compte que la précision de notre système de décageage de glutamate (plusieurs μm) ainsi que la distance entre les différentes densités post-synaptiques des synapses FM-CA3 (environ 500 nm) (Rollenhagen et al., 2007 ; Wilke et al., 2013) ne nous permet pas d'exclure la possibilité que des rKA soient présent dans des sites peri-synaptiques dans le voisinage des excroissances épineuses des cellules pyramidales de CA3. Nous avons toutefois mis en évidence que les rKA et les rAMPA présentent une localisation subcellulaire très distincte dans les cellules pyramidales de CA3. En effet, les rAMPA sont localisés tout le long de l'arborisation dendritique ainsi que sur le soma.

Ensuite, nous avons cherché des conditions expérimentales permettant de réexprimer la sous-unité GluK2a des rKA dans des neurones de CA3 de souris GluK2^{-/-}. Nous avons pu observer qu'il est important de contrôler finement les paramètres de transfection pour être en mesure de conserver des courants médiés par les rKA comparables au wt et pour reproduire la compartimentation des rKA observée chez les souris wt. Les résultats obtenus ont également permis d'observer que quelque soit la quantité de récepteurs réexprimée, il existe un mécanisme permettant de limiter le nombre de rKA localisé dans la densité post-synaptique de la synapse FM-CA3. L'observation selon laquelle il existe un nombre limité d'emplacements où les rKA peuvent être incérés à la synapse est en adéquation avec les observations que les rKA peuvent subir une dépression à long terme (Carta et al., 2013 ; Chamberlain et al., 2012 ; Selak et al., 2009) mais pas de potentialisation à long terme. Le nombre limité d'emplacements où les rKA peuvent s'incérer et être stabilisés à la membrane FM-CA3 peut être expliqué par le nombre limité d'autres interacteurs protéiques nécessaires à la stabilisation synaptiques de rKA à cette synapse. Ainsi, la surexpression de la sous-unité GluK2 entrainerait la saturation de certaines protéines synaptiques nécessaires à la stabilisation des rKA dans ces conditions. Les autres rKA non associés à ces protéines ne pourraient alors pas être

stabilisés dans la densité post-synaptique et se retrouverait ainsi dans les compartiments extra et peri-synaptiques. La nature des protéines synaptiques composants ces « slots » est encore indéterminée. Il pourrait s'agir notamment de protéines à domaine PDZ comme PSD95, PICK ou GRIP (Coussen et al., 2005 ; Garcia et al., 1998 ; Hirbec et al., 2003).

Il faut également noter que les rKA ectopiques localisés dans les compartiments extra- ou peri-synaptiques lors de la surexpression d'une forte concentration d'ADN codant pour la sous-unité GluK2a présentent des propriétés biophysiques très différentes des courants médiés par les rKA synaptiques induits par la stimulation électrique des fibres moussues. En effet, les premiers présentent une cinétique de décroissance très rapide tandis que les courants purement synaptiques présentent une cinétique de décroissance plus lente, comparable au wt. Ces différences s'expliquent par la différence de composition de ces récepteurs en fonction de leur localisation synaptique ou extra-synaptique. Chez les souris wt, les rKA exprimés à la synapse FM-CA3 sont des hétéromères composés des sous-unités GluK2, GluK4 et GluK5. Lors de la surexpression d'une forte concentration d'ADN codant pour la sous-unité GluK2, nous avons observé que les rKA formés étaient principalement composés d'homomères GluK2. Ainsi dans ces conditions, nous pouvons supposer que les autres sous-unités GluK4 et GluK5 sont présentes à des quantités saturantes et ne peuvent s'associer qu'à une faible portion des sous-unités GluK2 surexprimées. Nous pouvons supposer que les sous-unités GluK4 et GluK5 participent au contrôle du nombre de rKA présents à la synapse.

Nous avons ensuite cherché à déterminer par quels mécanismes moléculaires les rKA pouvaient être stabilisés à la synapse FM-CA3. Nous avons donc réexprimé différentes sous-unités GluK2a présentant des délétions du DCT. La réexpression d'une sous-unité délétée des quatre derniers acides aminés du DCT, responsables d'interactions avec des protéines à domaine PDZ, n'affecte pas les CPSE médiées par les rKA. Par contre, la délétion des 14 derniers acides aminés du DCT entraîne une réduction significative des courants médiés par les rKA à la synapse FM-CA3. Or ces 14 derniers acides aminés sont impliqués dans l'interaction de la sous-unité GluK2a avec le complexe N-cadhérine/ β -caténine, cette interaction étant probablement indirecte (Coussen et al., 2005). Dans un système hétérologue, l'activation des N-cadhérines par des billes recouvertes du fragment extracellulaire de la N-cadhérine entraîne le recrutement de la sous-unité GluK2a de manière dépendante des 14 derniers acides aminés du DCT (Coussen et al., 2005). La séquence exacte d'acides aminés parmi les quatorze derniers

acides aminés mis en jeu dans l'interaction entre le complexe N-cadhérine/ β -caténine et la sous-unité GluK2a reste encore à déterminer. Pour cela, des mutations plus ciblées du DCT de la sous-unité GluK2a couplées à des expériences de biochimie, comme la co-immunoprécipitation de la protéine N-cadhérine et de la sous-unité GluK2a, nous permettrait de déterminer avec plus de précision le site d'interaction de la sous-unité GluK2a avec la cadhérine. De même, le mode d'interaction mis en jeu n'est pas connu. Il serait intéressant de connaître la nature de la possible protéine intermédiaire mise en jeu dans cette interaction.

Ici, nous avons montré qu'altérer la fonction de la N-cadhérine dans les cellules pyramidales de CA3, soit en surexprimant un dominant négatif de la N-cadhérine, soit en effectuant une suppression ciblée de la N-cadhérine post-synaptique, entraîne une réduction de l'amplitude des CPSE médiés par les rKA à la synapse FM-CA3 sans affecter la composante médiée par les rAMPA. Ces résultats suggèrent que la N-cadhérine participe au recrutement et à la stabilisation spécifiquement des rKA à la synapse FM-CA3. Ainsi la N-cadhérine pourrait appartenir à une famille d'interacteurs protéiques responsable de la stabilisation synaptique des rKA à la synapse FM-CA3 spécifiquement. Notons que la N-cadhérine semble être particulièrement abondante dans le *stratum lucidum* où les fibres moussues contactent les cellules pyramidales de CA3 (Fannon et Colman., 1996). De plus, une autre cadhérine, la cadhérine 9, est spécifiquement exprimée par les cellules granulaires et les cellules pyramidales de CA3 dans l'hippocampe (Williams et al., 2011). Cette cadhérine pourrait également être impliquée dans la spécificité synaptique à la synapse FM-CA3. Nous pouvons supposer que cette cadhérine pourrait s'assembler avec la N-cadhérine en hétérodimères.

Nous avons été toutefois surpris d'observer que la composante de courants médiés par les rAMPA n'était pas modifiée lors de l'altération de la fonction des cadhérines, que ce soit par la surexpression d'un dominant négatif ou par invalidation conditionnelle de la N-cadhérine. Des études antérieures ont mis en évidence que les rAMPA interagissent de façon étroite avec le complexe trans-synaptique d'adhésion mettant en jeu la N-cadhérine (Silverman et al., 2007 ; Saglietti et al., 2007). Contrairement aux rKA qui interagissent avec le complexe N-cadhérine/ β -caténine à travers le DCT de la sous-unité GluK2a, les rAMPA interagissent de manière directe avec la N-cadhérine via son domaine extracellulaire (Saglietti et al., 2007). Les rAMPA peuvent ainsi interagir en trans avec des protéines N-cadhérines pré-synaptiques.

De plus, sachant que les N-cadhérines sont impliquées dans la formation et la maturation des synapses (Basu et al., 2015), il serait probablement nécessaire de déterminer si l'altération de la fonction de la N-cadhérine dans les cellules pyramidales de CA3 a des conséquences sur la morphologie des synapses FM-CA3. Nous avons mené des expériences préliminaires sur des tranches d'hippocampe en cultures provenant de souris N-cadhérine flox transfectées avec la protéine de fusion GFP-Cre. Dans ces conditions, nous avons observé que les cellules de CA3 transfectées avec la GFP-Cre semblent présenter une arborisation dendritique moins développée que les cellules transfectées avec une GFP nucléaire seule. Cette expérience reste encore à répliquer et à valider. Mais de manière intéressante, lors des expériences d'électrophysiologie réalisées sur les neurones transfectés avec la protéine GFP-Cre, nous n'avons pas rencontré de difficulté particulière pour trouver des cellules granulaires synaptiquement connectées aux cellules pyramidales de CA3 patchées. De plus les propriétés de facilitation à court-terme, particulièrement remarquable à cette synapse, ne sont pas altérées lors de la manipulation de l'expression de la N-cadhérine. Ces observations ne sont toutefois pas suffisantes pour affirmer que la transmission synaptique ou le nombre de synapses ne sont pas modifié par la manipulation génétique de cette protéine. Il sera nécessaire de mesurer par exemple l'activité synaptique miniature en présence de tétradotoxine dans ces cellules pyramidales de CA3. L'analyse de l'activité miniature nous donnerait des indications quant à une éventuelle altération de la transmission synaptique basale, et quant au nombre de synapses fonctionnelles sur ces neurones. Néanmoins, si l'analyse de l'activité miniature révèle un quelconque changement par rapport au contrôle, elle ne nous permettra pas de déterminer si une éventuelle altération de la transmission synaptique observée touche la synapse FM-CA3 ou une autre synapse sur les cellules pyramidales de CA3.

Conclusion - Perspectives

Conclusion – Perspectives

Les synapses représentent des compartiments cellulaires hautement spécialisés et diversifiés. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la spécification des synapses constitue un axe d'étude majeure dans le domaine des neurosciences. Les travaux menés au cours de cette étude suggèrent que de multiples mécanismes moléculaires sont combinés pour contrôler la compartimentation spécifique des rKA à la synapse FM-CA3. Ces mécanismes incluent un strict contrôle de la quantité de rKA dans les cellules, une quantité limitée de créneaux synaptiques possible à la synapse FM-CA3 et le recrutement et la stabilisation de ces récepteurs à la synapse par un mécanisme trans-synaptique impliquant les N-cadhérines.

La spécification synaptique est un mécanisme plastique pouvant être modulé par l'environnement. Dans le système nerveux central mature, la fonction et la composition protéique des synapses peuvent être modulées par l'activité neuronale. Les modifications à plus ou moins long-terme de l'efficacité synaptique définissent les mécanismes de plasticité synaptique. Ces mécanismes varient d'une synapse à l'autre et peuvent impliquer des molécules d'adhésions trans-synaptiques permettant l'activation de cascades de signalisation et le recrutement de protéines spécifiques permettant le remodelage des compartiments synaptiques et la modification de l'efficacité synaptique (Dalva et al., 2007). En culture de neurones dissociés, l'induction d'une PLT chimique est accompagnée d'une augmentation du marquage synaptique pour la N-cadhérine (Bozdagi et al., 2000). En culture de neurones dissociés ou en tranche aigüe dans les cellules pyramidales de CA1, le blocage des N-cadhérines prévient l'induction de la PLT (Bozdagi et al., 2000 ; Tang et al., 1998). Il serait intéressant d'étudier si le rôle de la N-cadhérine dans la stabilisation des rKA à la synapse FM-CA3 peut être régulé par l'activité synaptique.

Il est connu que dans un contexte d'épilepsie chronique, des rKA fonctionnels sont recrutés lors de l'établissement de fibres moussues récurrentes anormales sur les cellules granulaires du gyrus denté (Epsztein et al., 2005, 2010 ; Artinian et al., 2011). Il serait intéressant de déterminer si les complexes cadhérine/ β -caténine participent au recrutement des rKA dans le compartiment post-synaptique de ces connexions ectopiques. Dans un contexte d'épilepsie chronique chez la souris, induite par l'injection

de pilocarpine, la protéine cadhérine-9 est particulièrement enrichie dans le gyrus denté, où ces connections récurrentes sont formées (observation non publiée). Il serait également intéressant de déterminer si les complexes d'adhérence impliquant les protéines cadhérines participent à la mise en place de ces connexions récurrentes.

Bibliographie

Bibliographie

- Acsády, L., Kamondi, A., Sik, A., Freund, T., & Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), 3386–3403.
- Adelman, J. P. (1995). Proteins that interact with the pore-forming subunits of voltage-gated ion channels. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(3), 286–295.
- Alsina, B., Vu, T., & Cohen-Cory, S. (2001). Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1093–1101.
- Alt, A., Weiss, B., Ogden, A. M., Knauss, J. L., Oler, J., Ho, K., et al. (2004). Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro. *Neuropharmacology*, 46(6), 793–806.
- Amaral, D. G., Ishizuka, N., & Claiborne, B. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. *Progress in Brain Research*, 83, 1–11.
- Andrade-Talavera, Y., Duque-Feria, P., Sihra, T. S., & Rodríguez-Moreno, A. (2013). Pre-synaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves PKA and Ca²⁺-calmodulin at thalamocortical synapses. *Journal of Neurochemistry*, 126(5), 565–578.
- Ango, F., di Cristo, G., Higashiyama, H., Bennett, V., Wu, P., & Huang, Z. J. (2004). Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell*, 119(2), 257–272.
- Arikath, J., & Reichardt, L. F. (2008). Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 31(9), 487–494.
- Artinian, J., Peret, A., Marti, G., Epsztein, J., & Crépel, V. (2011). Synaptic kainate receptors in interplay with INaP shift the sparse firing of dentate granule cells to a sustained rhythmic mode in temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 31(30), 10811–10818.
- Ascher, P., & Nowak, L. (1988). The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *The Journal of Physiology*, 399, 247–266.
- Bagri, A., Cheng, H.-J., Yaron, A., Pleasure, S. J., & Tessier-Lavigne, M. (2003). Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell*, 113(3), 285–299.
- Bahn, S., Volk, B., & Wisden, W. (1994). Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(9), 5525–5547.
- Bähring, R., Bowie, D., Benveniste, M., & Mayer, M. L. (1997). Permeation and block of rat GluR6 glutamate receptor channels by internal and external polyamines. *The Journal of Physiology*, 502 (Pt 3), 575–589.
- Ball, S. M., Atlason, P. T., Shittu-Balogun, O. O., & Molnár, E. (2010). Assembly and intracellular distribution of kainate receptors is determined by RNA editing and subunit composition. *Journal of Neurochemistry*, 114(6), 1805–1818.
- Bamji, S. X., Shimazu, K., Kimes, N., Huelsken, J., Birchmeier, W., Lu, B., & Reichardt, L. F. (2003). Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly. *Neuron*, 40(4), 719–731.
- Barberis, A., Sachidhanandam, S., & Mulle, C. (2008). GluR6/KA2 Kainate Receptors Mediate Slow-Deactivating Currents. *Journal of Neuroscience*, 28(25), 6402–6406.
- Barbon, A., Vallini, I., & Barlati, S. (2001). Genomic organization of the human GRIK2 gene and evidence for multiple splicing variants. *Gene*, 274(1-2), 187–197.

- Basu, R., Taylor, M. R., & Williams, M. E. (2015). The classic cadherins in synaptic specificity. *Cell Adhesion & Migration*, 9(3), 193–201.
- Beesley, P. W., Mummery, R., Tibaldi, J., Chapman, A. P., Smith, S. J., & Rider, C. C. (1995). The post-synaptic density: putative involvement in synapse stabilization via cadherins and covalent modification by ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, 23(1), 59–64.
- Bekirov, I. H., Nagy, V., Svoronos, A., Huntley, G. W., & Benson, D. L. (2008). Cadherin-8 and N-cadherin differentially regulate pre- and postsynaptic development of the hippocampal mossy fiber pathway. *Hippocampus*, 18(4), 349–363.
- Belcher, S. M., & Howe, J. R. (1997). Characterization of RNA editing of the glutamate-receptor subunits GluR5 and GluR6 in granule cells during cerebellar development. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 52(1), 130–138.
- Belvindrah, R., Nosten-Bertrand, M., & Francis, F. (2014). Neuronal migration and its disorders affecting the CA3 region. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 63.
- Bennett, J. A., & Dingledine, R. (1995). Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron*, 14(2), 373–384.
- Benson, D. L., & Tanaka, H. (1998). N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(17), 6892–6904.
- Bernard, A., Ferhat, L., Dessi, F., Charton, G., Represa, A., Ben-Ari, Y., & Khrestchatisky, M. (1999). Q/R editing of the rat GluR5 and GluR6 kainate receptors in vivo and in vitro: evidence for independent developmental, pathological and cellular regulation. *The European Journal of Neuroscience*, 11(2), 604–616.
- Biederer, T., & Sudhof, T. C. (2000). Mints as adaptors. Direct binding to neurexins and recruitment of munc18. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 39803–39806.
- Bielas, S. L., Serneo, F. F., Chechlac, M., Deerinck, T. J., Perkins, G. A., Allen, P. B., et al. (2007). Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. *Cell*, 129(3), 579–591.
- Bischofberger, J., Engel, D., Frotscher, M., & Jonas, P. (2006). Timing and efficacy of transmitter release at mossy fiber synapses in the hippocampal network. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 453(3), 361–372.
- Birbach, A. (2008). Profilin, a multi-modal regulator of neuronal plasticity. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 30(10), 994–1002.
- Bleakman, D., & Lodge, D. (1998). Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, 37(10-11), 1187–1204.
- Bortolotto, Z. A., Clarke, V. R., Delany, C. M., Parry, M. C., Smolders, I., Vignes, M., et al. (1999). Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature*, 402(6759), 297–301.
- Bowie, D., & Mayer, M. L. (1995). Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron*, 15(2), 453–462.
- Bowie, D. (2002). External anions and cations distinguish between AMPA and kainate receptor gating mechanisms. (2002). External anions and cations distinguish between AMPA and kainate receptor gating mechanisms., 539(Pt 3), 725–733.
- Bozdagi, O., Shan, W., Tanaka, H., Benson, D. L., & Huntley, G. W. (2000). Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron*, 28(1), 245–259.
- Braithwaite, S. P., Xia, H., & Malenka, R. C. (2002). Differential roles for NSF and GRIP/ABP in AMPA receptor cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 7096–7101.
- Breustedt, J., Vogt, K. E., Miller, R. J., Nicoll, R. A., & Schmitz, D. (2003). Alpha1E-containing Ca²⁺ channels are involved in synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12450–12455.

- Brown, E. B., Shear, J. B., Adams, S. R., Tsien, R. Y., & Webb, W. W. (1999). Photolysis of caged Ca^{2+} in femtoliter volumes using two-photon excitation. *Biophysical Journal*, 76(1 Pt 1), 489–499.
- Buchert, M., Schneider, S., Meskenaite, V., Adams, M. T., Canaani, E., Baechli, T., et al. (1999). The junction-associated protein AF-6 interacts and clusters with specific Eph receptor tyrosine kinases at specialized sites of cell-cell contact in the brain. *The Journal of Cell Biology*, 144(2), 361–371.
- Budreck, E. C., Kwon, O.-B., Jung, J. H., Baudouin, S., Thommen, A., Kim, H.-S., et al. (2013). Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(2), 725–730.
- Büning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadts-Humme, S., & Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *The Journal of Gene Medicine*, 10(7), 717–733.
- Bureau, I., Bischoff, S., Heinemann, S. F., & Mulle, C. (1999). Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(2), 653–663.
- Bureau, I., Dieudonne, S., Coussen, F., & Mulle, C. (2000). Kainate receptor-mediated synaptic currents in cerebellar Golgi cells are not shaped by diffusion of glutamate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6838–6843.
- Burnashev, N., Zhou, Z., Neher, E., & Sakmann, B. (1995). Fractional Ca^{2+} currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *The Journal of Physiology*, 485 (Pt 2), 403–418.
- Butcher, A. J., Torrecilla, I., Young, K. W., Kong, K. C., Mistry, S. C., Bottrill, A. R., & Tobin, A. B. (2009). N-methyl-D-aspartate receptors mediate the phosphorylation and desensitization of muscarinic receptors in cerebellar granule neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 17147–17156.
- Callaway, E. M., & Yuste, R. (2002). Stimulating neurons with light. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(5), 587–592.
- Carta, M., Opazo, P., Veran, J., eacute, A. A., Choquet, D., Coussen, F. C. O., & Mulle, C. (2012). CaMKII-dependent phosphorylation of GluK5 mediates plasticity of kainate receptors. *The EMBO Journal*, 1–15.
- Carta, M., Lanore, F., Rebola, N., Szabo, Z., Da Silva, S. V., Lourenço, J., et al. (2014). Membrane Lipids Tune Synaptic Transmission by Direct Modulation of Presynaptic Potassium Channels. *Neuron*, 81(4), 787–799.
- Castillo, P. E., Weisskopf, M. G., & Nicoll, R. A. (1994). The role of Ca^{2+} channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation. *Neuron*, 12(2), 261–269.
- Castillo, P. E., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1997). Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature*, 388(6638), 182–186.
- Gen, B., Selvaraj, A., & Prywes, R. (2004). Myocardin/MKL family of SRF coactivators: key regulators of immediate early and muscle specific gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(1), 74–82.
- Chamberlain, S. E. L., Iez, I. M. G. A. L.-G. A., Wilkinson, K. A., Konopacki, F. A., Kantamneni, S., Henley, J. M., & Mellor, J. R. (2012). SUMOylation and phosphorylation of GluK2 regulate kainate receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nature Publishing Group*, 1–10.
- Chamberlain, S. E. L., Sadowski, J. H. L. P., Teles-Grilo Ruivo, L. M., Atherton, L. A., & Mellor, J. R. (2013). Long-Term Depression of Synaptic Kainate Receptors Reduces Excitability by Relieving Inhibition of the Slow Afterhyperpolarization. *Journal of Neuroscience*, 33(22), 9536–9545.
- Chen, H., Bagri, A., Zupicich, J. A., Zou, Y., Stoeckli, E., Pleasure, S. J., et al. (2000). Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron*, 25(1), 43–56.
- Chevalleyre, V., & Siegelbaum, S. A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron*, 66(4), 560–572.
- Chih, B., Engelman, H., & Scheiffele, P. (2005). Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*, 307(5713), 1324–1328.

- Cho, K., Francis, J. C., Hirbec, H., Dev, K., Brown, M. W., Henley, J. M., & Bashir, Z. I. (2003). Regulation of kainate receptors by protein kinase C and metabotropic glutamate receptors. *The Journal of Physiology*, 548(3), 723–730.
- Chung, H. J., Xia, J., Scannevin, R. H., Zhang, X., & Huganir, R. L. (2000). Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its interaction with PDZ domain-containing proteins. *Journal of Neuroscience*, 20(19), 7258–7267.
- Claiborne, B. J., Amaral, D. G., & Cowan, W. M. (1986). A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 246(4), 435–458.
- Clarke, V. R., Ballyk, B. A., Hoo, K. H., Mandelzys, A., Pellizzari, A., Bath, C. P., et al. (1997). A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature*, 389(6651), 599–603.
- Coleman, S. K., Cai, C., Mottershead, D. G., Haapalahti, J.-P., & Keinänen, K. (2003). Surface expression of GluR-D AMPA receptor is dependent on an interaction between its C-terminal domain and a 4.1 protein. *Journal of Neuroscience*, 23(3), 798–806.
- Contractor, A., Swanson, G. T., Sailer, A., O'Gorman, S., & Heinemann, S. F. (2000). Identification of the kainate receptor subunits underlying modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 region of the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 20(22), 8269–8278.
- Contractor, A., Swanson, G., & Heinemann, S. F. (2001). Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron*, 29(1), 209–216.
- Contractor, A., Rogers, C., Maron, C., Henkemeyer, M., Swanson, G. T., & Heinemann, S. F. (2002). Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science*, 296(5574), 1864–1869.
- Contractor, A., Sailer, A. W., Darstein, M., Maron, C., Xu, J., Swanson, G. T., & Heinemann, S. F. (2003). Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation of mossy-fiber synapses in KA2^{-/-} mice. *Journal of Neuroscience*, 23(2), 422–429.
- Copits, B. A., Robbins, J. S., Frausto, S., & Swanson, G. T. (2011). Synaptic Targeting and Functional Modulation of GluK1 Kainate Receptors by the Auxiliary Neuropilin and Tolloid-Like (NETO) Proteins. *Journal of Neuroscience*, 31(20), 7334–7340.
- Copits, B. A., & Swanson, G. T. (2013). Kainate receptor post-translational modifications differentially regulate association with 4.1N to control activity-dependent receptor endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 8952–8965.
- Cossart, R., Esclapez, M., Hirsch, J. C., Bernard, C., & Ben-Ari, Y. (1998). GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nature Neuroscience*, 1(6), 470–478.
- Cossart, R., Tyzio, R., Dinocourt, C., Esclapez, M., Hirsch, J. C., Ben-Ari, Y., & Bernard, C. (2001). Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. *Neuron*, 29(2), 497–508.
- Cousins, S. L., Innocent, N., & Stephenson, F. A. (2013). Neto1 associates with the NMDA receptor/amyloid precursor protein complex. *Journal of Neurochemistry*, 126(5), 554–564.
- Coussen, F., Normand, E., Marchal, C., Costet, P., Choquet, D., Lambert, M., et al. (2002). Recruitment of the kainate receptor subunit glutamate receptor 6 by cadherin/catenin complexes. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6426–6436.
- Coussen, F., Perrais, D., Jaskolski, F., Sachidhanandam, S., Normand, E., Bockaert, J., et al. (2005). Coassembly of Two GluR6 Kainate Receptor Splice Variants within a Functional Protein Complex. *Neuron*, 47(4), 555–566.
- Christensen, J. K. (2004). A Mosaic of Functional Kainate Receptors in Hippocampal Interneurons. *Journal of Neuroscience*, 24(41), 8986–8993.
- Savtchouk, I., & Liu, S. J. (2011). Remodeling of synaptic AMPA receptor subtype alters the probability and pattern of action potential firing. *Journal of Neuroscience*, 31(2), 501–511.
- Cull-Candy, S., Kelly, L., & Farrant, M. (2006). Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(3), 288–297.

- Cunha, R. A., Constantino, M. D., & Ribeiro, J. A. (1997). Inhibition of [3H] gamma-aminobutyric acid release by kainate receptor activation in rat hippocampal synaptosomes. *European Journal of Pharmacology*, 323(2-3), 167–172.
- Dahm, R., Zeitelhofer, M., Götze, B., Kiebler, M. A., & Macchi, P. (2008). Visualizing mRNA localization and local protein translation in neurons. *Methods in Cell Biology*, 85, 293–327.
- Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E. C., Tilkins, M. L., Price, P. J., & Ciccarone, V. C. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods (San Diego, Calif.)*, 33(2), 95–103.
- Dalva, M. B., Takasu, M. A., Lin, M. Z., Shamah, S. M., Hu, L., Gale, N. W., & Greenberg, M. E. (2000). EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell*, 103(6), 945–956.
- Dalva, M. B., McClelland, A. C., & Kayser, M. S. (2007). Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(3), 206–220.
- Danglot, L., Triller, A., & Marty, S. (2006). The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus*, 16(12), 1032–1060.
- Dargan, S. L., Clarke, V. R. J., Alushin, G. M., Sherwood, J. L., Nisticò, R., Bortolotto, Z. A., et al. (2009). Neuropharmacology. *Neuropharmacology*, 56(1), 121–130.
- Darstein, M., Petralia, R. S., Swanson, G. T., Wenthold, R. J., & Heinemann, S. F. (2003). Distribution of kainate receptor subunits at hippocampal mossy fiber synapses. *Journal of Neuroscience*, 23(22), 8013–8019.
- Day, N. C., Shaw, P. J., McCormack, A. L., Craig, P. J., Smith, W., Beattie, R., et al. (1996). Distribution of alpha 1A, alpha 1B and alpha 1E voltage-dependent Ca²⁺ channel subunits in the human hippocampus and parahippocampal gyrus. *Neuroscience*, 71(4), 1013–1024.
- Deguchi, Y., Donato, F., Galimberti, I., Cabuy, E., & Caroni, P. (2011). Temporally matched subpopulations of selectively interconnected principal neurons in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 14(4), 495–504.
- Delaney, A. J., & Jahr, C. E. (2002). Kainate receptors differentially regulate release at two parallel fiber synapses. *Neuron*, 36(3), 475–482.
- la Rossa, De, A., & Jabaudon, D. (2015). In vivo rapid gene delivery into postmitotic neocortical neurons using iontoporation. *Nature Protocols*, 10(1), 25–32.
- De Silva, S., & Bowers, W. J. (2009). Herpes Virus Amplicon Vectors. *Viruses*, 1(3), 594–629.
- Dietrich, D., Kirschstein, T., Kukley, M., Pereverzev, A., Brelie, von der, C., Schneider, T., & Beck, H. (2003). Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca²⁺ channels. *Neuron*, 39(3), 483–496.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 7–61.
- Dixit, R., Lu, F., Cantrup, R., Gruenig, N., Langevin, L. M., Kurrasch, D. M., & Schuurmans, C. (2011). Efficient gene delivery into multiple CNS territories using in utero electroporation. *Journal of Visualized Experiments*, (52).
- Dobrunz, L. E., & Stevens, C. F. (1999). Response of hippocampal synapses to natural stimulation patterns. *Neuron*, 22(1), 157–166.
- Dunah, A. W., Hueske, E., Wyszynski, M., Hoogenraad, C. C., Jaworski, J., Pak, D. T., et al. (2005). LAR receptor protein tyrosine phosphatases in the development and maintenance of excitatory synapses. *Nature Neuroscience*, 8(4), 458–467.
- Eder, M., Becker, K., Rammes, G., Schierloh, A., Azad, S. C., Zieglgänsberger, W., & Dodt, H.-U. (2003). Distribution and properties of functional postsynaptic kainate receptors on neocortical layer V pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(16), 6660–6670.
- Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I., & Heinemann, S. (1991). Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature*, 351(6329), 745–748.

- Ehrengruber, M. U., Hennou, S., Büeler, H., Naim, H. Y., Déglon, N., & Lundström, K. (2001). Gene transfer into neurons from hippocampal slices: comparison of recombinant Semliki Forest Virus, adenovirus, adeno-associated virus, lentivirus, and measles virus. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 17(5), 855–871.
- Ellis-Davies, G. C., & Kaplan, J. H. (1994). Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca^{2+} with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 187–191.
- Epstein, A. L. (2009). HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties--a review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(3), 399–410.
- Epsztein, J. (2005). Recurrent Mossy Fibers Establish Aberrant Kainate Receptor-Operated Synapses on Granule Cells from Epileptic Rats. *Journal of Neuroscience*, 25(36), 8229–8239.
- Epsztein, J., Sola, E., Represa, A., Ben-Ari, Y., & Crépel, V. (2010). A selective interplay between aberrant EPSPKA and INaP reduces spike timing precision in dentate granule cells of epileptic rats. *Cerebral Cortex*, 20(4), 898–911.
- Evstratova, A., & Tóth, K. (2014). Information processing and synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber terminals. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 28.
- Everts, I., Villmann, C., & Hollmann, M. (1997). N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Molecular Pharmacology*, 52(5), 861–873.
- Fannon, A. M., & Colman, D. R. (1996). A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron*, 17(3), 423–434.
- Fay, A.-M. L., & Bowie, D. (2006). Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. *The Journal of Physiology*, 572(Pt 1), 201–213.
- Frey, D., Laux, T., Xu, L., Schneider, C., & Caroni, P. (2000). Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *The Journal of Cell Biology*, 149(7), 1443–1454.
- Fernandes, H. B., Catches, J. S., Petralia, R. S., Copits, B. A., Xu, J., Russell, T. A., et al. (2009). High-Affinity Kainate Receptor Subunits Are Necessary for Ionotropic but Not Metabotropic Signaling. *Neuron*, 63(6), 818–829.
- Fisahn, A., Heinemann, S. F., & McBain, C. J. (2004). The kainate receptor subunit GluR6 mediates metabotropic regulation of the slow and medium AHP currents in mouse hippocampal neurones. *The Journal of Physiology*, 562(1), 199–203.
- Fisahn, A., Contractor, A., Traub, R. D., Buhl, E. H., Heinemann, S. F., & McBain, C. J. (2004). Distinct roles for the kainate receptor subunits GluR5 and GluR6 in kainate-induced hippocampal gamma oscillations. *Journal of Neuroscience*, 24(43), 9658–9668.
- Fisher, R. S., & Alger, B. E. (1984). Electrophysiological mechanisms of kainic acid-induced epileptiform activity in the rat hippocampal slice. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 4(5), 1312–1323.
- Fisher, J. L., & Mott, D. D. (2012). The Auxiliary Subunits Neto1 and Neto2 Reduce Voltage-Dependent Inhibition of Recombinant Kainate Receptors. *Journal of Neuroscience*, 32(37), 12928–12933.
- Fisher, J. L., & Mott, D. D. (2013). Modulation of homomeric and heteromeric kainate receptors by the auxiliary subunit Neto1. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 19), 4711–4724.
- Foster, A. C., Mena, E. E., Monaghan, D. T., & Cotman, C. W. (1981). Synaptic localization of kainic acid binding sites. *Nature*, 289(5793), 73–75.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., et al. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*, 23(2), 247–256.
- Franco, S. J., Martínez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S. R., & Müller, U. (2011). Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron*, 69(3), 482–497.

- Frerking, M., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1998). Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nature Neuroscience*, 1(6), 479–486.
- Frerking, M., Schmitz, D., Zhou, Q., Johansen, J., & Nicoll, R. A. (2001). Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3-->CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *Journal of Neuroscience*, 21(9), 2958–2966.
- Frerking, M., & Ohliger-Frerking, P. (2002). AMPA receptors and kainate receptors encode different features of afferent activity. *Journal of Neuroscience*, 22(17), 7434–7443.
- Friocourt, G., Kappeler, C., Saillour, Y., Fauchereau, F., Rodriguez, M. S., Bahi, N., et al. (2005). Doublecortin interacts with the ubiquitin protease DFFRX, which associates with microtubules in neuronal processes. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 28(1), 153–164.
- Garcia, E. P., Mehta, S., Blair, L. A., Wells, D. G., Shang, J., Fukushima, T., et al. (1998). SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. *Neuron*, 21(4), 727–739.
- Gaykema, R. P., van der Kuil, J., Hersh, L. B., & Luiten, P. G. (1991). Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-diagonal band complex: anterograde tracing with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin combined with immunohistochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience*, 43(2-3), 349–360.
- Geiger, J. R., & Jonas, P. (2000). Dynamic control of presynaptic Ca(2+) inflow by fast-inactivating K(+) channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron*, 28(3), 927–939.
- Geller, A. I., & Breakefield, X. O. (1988). A defective HSV-1 vector expresses Escherichia coli beta-galactosidase in cultured peripheral neurons. *Science*, 241(4873), 1667–1669.
- Gerrow, K., Romorini, S., Nabi, S. M., Colicos, M. A., Sala, C., & El-Husseini, A. (2006). A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron*, 49(4), 547–562.
- Giger, R. J., Cloutier, J. F., Sahay, A., Prinjha, R. K., Levengood, D. V., Moore, S. E., et al. (2000). Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron*, 25(1), 29–41.
- Gleeson, J. G., Minnerath, S. R., Fox, J. W., Allen, K. M., Luo, R. F., Hong, S. E., et al. (1999). Characterization of mutations in the gene doublecortin in patients with double cortex syndrome. *Annals of Neurology*, 45(2), 146–153.
- Granger, A. J., Gray, J. A., Lu, W., & Nicoll, R. A. (2011). Genetic analysis of neuronal ionotropic glutamate receptor subunits. *The Journal of Physiology*, 589(17), 4095–4101.
- Grunwald, I. C., Korte, M., Wolfer, D., Wilkinson, G. A., Unsicker, K., Lipp, H. P., et al. (2001). Kinase-independent requirement of EphB2 receptors in hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 32(6), 1027–1040.
- Gurnett, C. A., & Campbell, K. P. (1996). Transmembrane auxiliary subunits of voltage-dependent ion channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(45), 27975–27978.
- Ghetti, A., & Heinemann, S. F. (2000). NMDA-Dependent modulation of hippocampal kainate receptors by calcineurin and Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase. *Journal of Neuroscience*, 20(8), 2766–2773.
- Goetze, B., Grunewald, B., Baldassa, S., & Kiebler, M. (2004). Chemically controlled formation of a DNA/Ca²⁺ phosphate coprecipitate: application for transfection of mature hippocampal neurons. *Journal of Neurobiology*, 60(4), 517–525.
- Gold, A. E., & Kesner, R. P. (2005). The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. *Hippocampus*, 15(6), 808–814.
- Goldin, M., Epsztein, J., Jorquera, I., Represa, A., Ben-Ari, Y., Crépel, V., & Cossart, R. (2007). Synaptic kainate receptors tune oriens-lacunosum moleculare interneurons to operate at theta frequency. *Journal of Neuroscience*, 27(36), 9560–9572.
- Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S.-X., Linhoff, M. W., & Craig, A. M. (2004). Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell*, 119(7), 1013–1026.

- Greger, I. H., Khatri, L., & Ziff, E. B. (2002). RNA editing at arg607 controls AMPA receptor exit from the endoplasmic reticulum. *Neuron*, 34(5), 759–772.
- Greger, I. H., Khatri, L., Kong, X., & Ziff, E. B. (2003). AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron*, 40(4), 763–774.
- Gregor, P., O'Hara, B. F., Yang, X., & Uhl, G. R. (1993). Expression and novel subunit isoforms of glutamate receptor genes GluR5 and GluR6. *NeuroReport*, 4(12), 1343–1346.
- Gupta, A., Tsai, L.-H., & Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nature Reviews. Genetics*, 3(5), 342–355.
- Guzowski, J. F., Knierim, J. J., & Moser, E. I. (2004). Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. *Neuron*, 44(4), 581–584.
- Heisler, F. F., Lee, H. K., Gromova, K. V., Pechmann, Y., Schurek, B., Ruschkies, L., et al. (2014). GRIP1 interlinks N-cadherin and AMPA receptors at vesicles to promote combined cargo transport into dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(13), 5030–5035.
- Henderson, J. T., Georgiou, J., Jia, Z., Robertson, J., Elowe, S., Roder, J. C., & Pawson, T. (2001). The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron*, 32(6), 1041–1056.
- Henkemeyer, M., Itkis, O. S., Ngo, M., Hickmott, P. W., & Ethell, I. M. (2003). Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *The Journal of Cell Biology*, 163(6), 1313–1326.
- Henze, D. A., Urban, N. N., & Barrionuevo, G. (2000). The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience*, 98(3), 407–427.
- Henze, D. A., McMahon, D. B. T., Harris, K. M., & Barrionuevo, G. (2002). Giant miniature EPSCs at the hippocampal mossy fiber to CA3 pyramidal cell synapse are monoquantal. *Journal of Neurophysiology*, 87(1), 15–29.
- Herb, A., Burnashev, N., Werner, P., Sakmann, B., Wisden, W., & Seeburg, P. H. (1992). The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron*, 8(4), 775–785.
- Hirbec, H., Francis, J. C., Lauri, S. E., Braithwaite, S. P., Coussen, F., Mulle, C., et al. (2003). Rapid and differential regulation of AMPA and kainate receptors at hippocampal mossy fibre synapses by PICK1 and GRIP. *Neuron*, 37(4), 625–638.
- Hoch, R. V., Rubenstein, J. L. R., & Pleasure, S. (2009). Genes and signaling events that establish regional patterning of the mammalian forebrain. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(4), 378–386.
- Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 31–108.
- Honda, T., Sakisaka, T., Yamada, T., Kumazawa, N., Hoshino, T., Kajita, M., et al. (2006). Involvement of nectins in the formation of puncta adherentia junctions and the mossy fiber trajectory in the mouse hippocampus. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 31(2), 315–325.
- Hopt, A., & Neher, E. (2001). Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 80(4), 2029–2036.
- Huang, Y. Y., Li, X. C., & Kandel, E. R. (1994). cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell*, 79(1), 69–79.
- Hume, R. I., Dingledine, R., & Heinemann, S. F. (1991). Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls Ca²⁺ permeability. *Science*, 253(5023), 1028–1031.
- Huntley, G. W., & Benson, D. L. (1999). Neural (N)-cadherin at developing thalamocortical synapses provides an adhesion mechanism for the formation of somatopically organized connections. *The Journal of Comparative Neurology*, 407(4), 453–471.

- Huxter, J. R., Zinyuk, L. E., Roloff, E. V. L., Clarke, V. R. J., Dolman, N. P., More, J. C. A., et al. (2007). Inhibition of kainate receptors reduces the frequency of hippocampal theta oscillations. *Journal of Neuroscience*, 27(9), 2212–2223.
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., et al. (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. *Science*, 277(5331), 1511–1515.
- Irie, F., Okuno, M., Pasquale, E. B., & Yamaguchi, Y. (2005). EphrinB-EphB signalling regulates clathrin-mediated endocytosis through tyrosine phosphorylation of synaptojanin 1. *Nature Cell Biology*, 7(5), 501–509.
- Isaac, J. T. R., Ashby, M. C., & McBain, C. J. (2007). The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron*, 54(6), 859–871.
- Isom, L. L., De Jongh, K. S., & Catterall, W. A. (1994). Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron*, 12(6), 1183–1194.
- Jamain, S., Betancur, C., Quach, H., Philippe, A., Fellous, M., Giros, B., et al. (2002). Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Molecular Psychiatry*, 7(3), 302–310.
- Janson, C. G., McPhee, S. W., Leone, P., Freese, A., & During, M. J. (2001). Viral-based gene transfer to the mammalian CNS for functional genomic studies. *Trends in Neurosciences*, 24(12), 706–712.
- Jaskolski, F. (2004). Subunit Composition and Alternative Splicing Regulate Membrane Delivery of Kainate Receptors. *Journal of Neuroscience*, 24(10), 2506–2515.
- Ji, N., Magee, J. C., & Betzig, E. (2008). High-speed, low-photodamage nonlinear imaging using passive pulse splitters. *Nature Methods*, 5(2), 197–202.
- Jiang, L., Xu, J., Nedergaard, M., & Kang, J. (2001). A kainate receptor increases the efficacy of GABAergic synapses. *Neuron*, 30(2), 503–513.
- Jonas, P., Major, G., & Sakmann, B. (1993). Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 472, 615–663.
- Jones, M. W., & McHugh, T. J. (2011). Updating hippocampal representations: CA2 joins the circuit. *Trends in Neurosciences*, 34(10), 526–535.
- Judkewitz, B., Rizzi, M., Kitamura, K., & Häusser, M. (2009). Targeted single-cell electroporation of mammalian neurons in vivo. *Nature Protocols*, 4(6), 862–869.
- Jouhanneau, J.-S., Ball, S. M., Molnár, E., & Isaac, J. T. R. (2011). Mechanisms of bi-directional modulation of thalamocortical transmission in barrel cortex by presynaptic kainate receptors. *Neuropharmacology*, 60(6), 832–841.
- Jung, S.-Y., Kim, J., Kwon, O.-B., Jung, J. H., An, K., Jeong, A. Y., et al. (2010). Input-specific synaptic plasticity in the amygdala is regulated by neuroligin-1 via postsynaptic NMDA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4710–4715.
- Jurney, W. M., Gallo, G., Letourneau, P. C., & McLoon, S. C. (2002). Rac1-mediated endocytosis during ephrin-A2- and semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Journal of Neuroscience*, 22(14), 6019–6028.
- Kamiya, H., & Ozawa, S. (2000). Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. *The Journal of Physiology*, 523 Pt 3, 653–665.
- Karra, D., & Dahm, R. (2010). Transfection Techniques for Neuronal Cells. *Journal of Neuroscience*, 30(18), 6171–6177.
- Kask, K., Jerecic, J., Zamanillo, D., Wilbertz, J., Sprengel, R., & Seeburg, P. H. (2000). Developmental profile of kainate receptor subunit KA1 revealed by Cre expression in YAC transgenic mice. *Brain Research*, 876(1-2), 55–61.
- Kayser, M. S., McClelland, A. C., Hughes, E. G., & Dalva, M. B. (2006). Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors. *Journal of Neuroscience*, 26(47), 12152–12164.
- Kidd, F. L., & Isaac, J. T. (1999). Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses. *Nature*, 400(6744), 569–573.

- Kidd, F. L., Coumis, U., Collingridge, G. L., Crabtree, J. W., & Isaac, J. T. R. (2002). A presynaptic kainate receptor is involved in regulating the dynamic properties of thalamocortical synapses during development. *Neuron*, 34(4), 635–646.
- Kiskin, N. I., Chillingworth, R., McCray, J. A., Piston, D., & Ogden, D. (2002). The efficiency of two-photon photolysis of a “caged” fluorophore, o-1-(2-nitrophenyl)ethylpyranine, in relation to photodamage of synaptic terminals. *European Biophysics Journal : EBJ*, 30(8), 588–604.
- Kleckner, N. W., & Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, 241(4867), 835–837.
- Klein, R. M., Wolf, E. D., Wu, R., & Sanford, J. C. (1992). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology (Reading, Mass.)* (Vol. 24, pp. 384–386).
- Knöll, B., Kretz, O., Fiedler, C., Alberti, S., Schütz, G., Frotscher, M., & Nordheim, A. (2006). Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 9(2), 195–204.
- Ko, S., Zhao, M.-G., Toyoda, H., Qiu, C.-S., & Zhuo, M. (2005). Altered behavioral responses to noxious stimuli and fear in glutamate receptor 5 (GluR5)- or GluR6-deficient mice. *Journal of Neuroscience*, 25(4), 977–984.
- Kobayashi, K., Manabe, T., & Takahashi, T. (1996). Presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy fiber-CA3 synapse. *Science*, 273(5275), 648–650.
- Koester, H. J., Baur, D., Uhl, R., & Hell, S. W. (1999). Ca²⁺ fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage. *Biophysical Journal*, 77(4), 2226–2236.
- Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M., & Tsumoto, T. (2001). Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science*, 291(5512), 2419–2423.
- Köhler, M., Burnashev, N., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1993). Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron*, 10(3), 491–500.
- Konopacki, F. A., Jaafari, N., Rocca, D. L., Wilkinson, K. A., Chamberlain, S., Rubin, P., et al. (2011). Agonist-induced PKC phosphorylation regulates GluK2 SUMOylation and kainate receptor endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19772–19777.
- Kornreich, B. G., Niu, L., Roberson, M. S., & Oswald, R. E. (2007). Identification of C-terminal domain residues involved in protein kinase A-mediated potentiation of kainate receptor subtype 6. *Neuroscience*, 146(3), 1158–1168.
- Khosravani, H., Altier, C., Zamponi, G. W., & Colicos, M. A. (2005). The Arg473Cys-neuroigin-1 mutation modulates NMDA mediated synaptic transmission and receptor distribution in hippocampal neurons. *Febs Letters*, 579(29), 6587–6594.
- Kristensen, A. S., Jenkins, M. A., Banke, T. G., Schousboe, A., Makino, Y., Johnson, R. C., et al. (2011). Mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulation of AMPA receptor gating. *Nature Neuroscience*, 14(6), 727–735.
- Kullander, K., & Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(7), 475–486.
- Kvajo, M., McKellar, H., Drew, L. J., Lepagnol-Bestel, A.-M., Xiao, L., Levy, R. J., et al. (2011). Altered axonal targeting and short-term plasticity in the hippocampus of Disc1 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), E1349–58.
- Kwon, H.-B., & Castillo, P. E. (2008). Long-Term Potentiation Selectively Expressed by NMDA Receptors at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron*, 57(1), 108–120.
- Lauri, S. E. (2005). Endogenous Activation of Kainate Receptors Regulates Glutamate Release and Network Activity in the Developing Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 25(18), 4473–4484.
- Lauri, S. E., Vesikansa, A., Segerstråle, M., Collingridge, G. L., Isaac, J. T. R., & Taira, T. (2006). Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release. *Neuron*, 50(3), 415–429.

- Lawrence, J. J., Grinspan, Z. M., & McBain, C. J. (2004). Quantal transmission at mossy fibre targets in the CA3 region of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 554(Pt 1), 175–193.
- Lee, C. J., Kong, H., Manzini, M. C., Albuquerque, C., Chao, M. V., & MacDermott, A. B. (2001). Kainate receptors expressed by a subpopulation of developing nociceptors rapidly switch from high to low Ca^{2+} permeability. *Journal of Neuroscience*, 21(13), 4572–4581.
- Lee, C. J., Kong, H., Manzini, M. C., Albuquerque, C., Chao, M. V., & MacDermott, A. B. (2001). Kainate receptors expressed by a subpopulation of developing nociceptors rapidly switch from high to low Ca^{2+} permeability. *Journal of Neuroscience*, 21(13), 4572–4581.
- Lein, E. S., Zhao, X., & Gage, F. H. (2004). Defining a molecular atlas of the hippocampus using DNA microarrays and high-throughput in situ hybridization. *Journal of Neuroscience*, 24(15), 3879–3889.
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., et al. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, 445(7124), 168–176.
- Li, P., Wilding, T. J., Kim, S. J., Calejesan, A. A., Huettnner, J. E., & Zhuo, M. (1999). Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature*, 397(6715), 161–164.
- Liashkovich, I., Meyring, A., Kramer, A., & Shahin, V. (2011). Exceptional structural and mechanical flexibility of the nuclear pore complex. *Journal of Cellular Physiology*, 226(3), 675–682.
- Lisman, J., Schulman, H., & Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(3), 175–190.
- Liu, X.-B., Low, L. K., Jones, E. G., & Cheng, H.-J. (2005). Stereotyped axon pruning via plexin signaling is associated with synaptic complex elimination in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 25(40), 9124–9134.
- Lomeli, H., Wisden, W., Köhler, M., Keinänen, K., Sommer, B., & Seeburg, P. H. (1992). High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *Febs Letters*, 307(2), 139–143.
- Löscher, W., Lehmann, H., Behl, B., Seemann, D., Teschendorf, H. J., Hofmann, H. P., et al. (1999). A new pyrrolyl-quinoxalinedione series of non-NMDA glutamate receptor antagonists: pharmacological characterization and comparison with NBQX and valproate in the kindling model of epilepsy. *The European Journal of Neuroscience*, 11(1), 250–262.
- Losonczy, A., & Magee, J. C. (2006). Integrative properties of radial oblique dendrites in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, 50(2), 291–307.
- Lourenço, J., Cannich, A., Carta, M., Coussen, F., Mülle, C., & Marsicano, G. (2010). Synaptic activation of kainate receptors gates presynaptic CB(1) signaling at GABAergic synapses. *Nature Neuroscience*, 13(2), 197–204.
- Lu, M., Grove, E. A., & Miller, R. J. (2002). Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(10), 7090–7095.
- Lu, W., Shi, Y., Jackson, A. C., Bjorgan, K., During, M. J., Sprengel, R., et al. (2009). Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron*, 62(2), 254–268.
- Luscher, B., Fuchs, T., & Kilpatrick, C. L. (2011). GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron*, 70(3), 385–409.
- Ma-Högemeier, Z.-L., Körber, C., Werner, M., Racine, D., Muth-Köhne, E., Tapken, D., & Hollmann, M. (2010). Oligomerization in the endoplasmic reticulum and intracellular trafficking of kainate receptors are subunit-dependent but not editing-dependent. *Journal of Neurochemistry*, 113(6), 1403–1415.
- Makino, H., & Malinow, R. (2009). AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron*, 64(3), 381–390.
- Manent, J.-B., Demarque, M., Jorquera, I., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., & Represa, A. (2005). A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *Journal of Neuroscience*, 25(19), 4755–4765.

- Manent, J.-B., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., & Represa, A. (2006). Glutamate acting on AMPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons. *Journal of Neuroscience*, 26(22), 5901–5909.
- Maraschi, A., Ciammola, A., Folci, A., Sassone, F., Ronzitti, G., Cappelletti, G., et al. (2014). Parkin regulates kainate receptors by interacting with the GluK2 subunit. *Nature Communications*, 5, 5182.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron*, 27(1), 97–106.
- Marín, O., Valiente, M., Ge, X., & Tsai, L.-H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), a001834.
- Marques, J. M., Rodrigues, R. J., Valbuena, S., Rozas, J. L., Selak, S., Marin, P., et al. (2013). CRMP2 Tethers Kainate Receptor Activity to Cytoskeleton Dynamics during Neuronal Maturation. *Journal of Neuroscience*, 33(46), 18298–18310.
- Martin, S., & Henley, J. M. (2004). Activity-dependent endocytic sorting of kainate receptors to recycling or degradation pathways. *The EMBO Journal*, 23(24), 4749–4759.
- Mathern, G. W., Pretorius, J. K., Kornblum, H. I., Mendoza, D., Lozada, A., Leite, J. P., et al. (1998). Altered hippocampal kainate-receptor mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Neurobiology of Disease*, 5(3), 151–176.
- Matsui, A., Yoshida, A. C., Kubota, M., Ogawa, M., & Shimogori, T. (2011). Mouse in utero electroporation: controlled spatiotemporal gene transfection. *Journal of Visualized Experiments*, (54).
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1086–1092.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2008). Three-dimensional mapping of unitary synaptic connections by two-photon macro photolysis of caged glutamate. *Journal of Neurophysiology*, 99(3), 1535–1544.
- Matsuzaki, M., Hayama, T., Kasai, H., & Ellis-Davies, G. C. R. (2010). Two-photon uncaging of gamma-aminobutyric acid in intact brain tissue. *Nature Chemical Biology*, 6(4), 255–257.
- Mayer, M. L. (2006). Crystal Structures of the Kainate Receptor GluR5 Ligand Binding Core Dimer with Novel GluR5-Selective Antagonists. *Journal of Neuroscience*, 26(11), 2852–2861.
- Mayer, G., & Heckel, A. (2006). *Biologically active molecules with a "light switch". Angewandte Chemie (International ed. in English)* (Vol. 45, pp. 4900–4921).
- McIlhinney, R. A., Molnár, E., Atack, J. R., & Whiting, P. J. (1996). Cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1a requires the co-expression of the NR2A subunit in transfected cells. *Neuroscience*, 70(4), 989–997.
- Mehta, S., Wu, H., Garner, C. C., & Marshall, J. (2001). Molecular mechanisms regulating the differential association of kainate receptor subunits with SAP90/PSD-95 and SAP97. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16092–16099.
- Melyan, Z., Wheal, H. V., & Lancaster, B. (2002). Metabotropic-mediated kainate receptor regulation of IsAHP and excitability in pyramidal cells. *Neuron*, 34(1), 107–114.
- Melyan, Z., Lancaster, B., & Wheal, H. V. (2004). Metabotropic regulation of intrinsic excitability by synaptic activation of kainate receptors. *Journal of Neuroscience*, 24(19), 4530–4534.
- Meyer, K. D., & Morris, J. A. (2009). Disc1 regulates granule cell migration in the developing hippocampus. *Human Molecular Genetics*, 18(17), 3286–3297.
- Milburn, T., Matsubara, N., Billington, A. P., Udgaonkar, J. B., Walker, J. W., Carpenter, B. K., et al. (1989). Synthesis, photochemistry, and biological activity of a caged photolabile acetylcholine receptor ligand. *Biochemistry*, 28(1), 49–55.
- Milstein, A. D., & Nicoll, R. A. (2008). Regulation of AMPA receptor gating and pharmacology by TARP auxiliary subunits. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(7), 333–339.

- Min, M. Y., Melyan, Z., & Kullmann, D. M. (1999). Synaptically released glutamate reduces gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic inhibition in the hippocampus via kainate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), 9932–9937.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., & Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, 113(3), 329–342.
- Mizoguchi, A., Nakanishi, H., Kimura, K., Matsubara, K., Ozaki-Kuroda, K., Katata, T., et al. (2002). Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses. *The Journal of Cell Biology*, 156(3), 555–565.
- More, J. C. A., Nisticò, R., Dolman, N. P., Clarke, V. R. J., Alt, A. J., Ogden, A. M., et al. (2004). Characterisation of UBP296: a novel, potent and selective kainate receptor antagonist. *Neuropharmacology*, 47(1), 46–64.
- Mott, D. D., Washburn, M. S., Zhang, S., & Dingledine, R. J. (2003). Subunit-dependent modulation of kainate receptors by extracellular protons and polyamines. *Journal of Neuroscience*, 23(4), 1179–1188.
- Mulle, C., Sailer, A., Perez-Otano, I., Dickinson-Anson, H., Castillo, P. E., Bureau, I., et al. (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature*, 392(6676), 601–605.
- Mulle, C., Sailer, A., Swanson, G. T., Brana, C., O'Gorman, S., Bettler, B., & Heinemann, S. F. (2000). Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron*, 28(2), 475–484.
- Murase, S., Mosser, E., & Schuman, E. M. (2002). Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron*, 35(1), 91–105.
- Monaghan, D. T., & Cotman, C. W. (1982). The distribution of [3H]kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Research*, 252(1), 91–100.
- Mondin, M., Carta, M., Normand, E., Mulle, C., & Coussen, F. (2010). Profilin II Regulates the Exocytosis of Kainate Glutamate Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 40060–40071.
- Montag-Sallaz, M., Schachner, M., & Montag, D. (2002). Misguided axonal projections, neural cell adhesion molecule 180 mRNA upregulation, and altered behavior in mice deficient for the close homolog of L1. *Molecular and Cellular Biology*, 22(22), 7967–7981.
- Moore, K. A., Nicoll, R. A., & Schmitz, D. (2003). Adenosine gates synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14397–14402.
- Myers, C. E., & Scharfman, H. E. (2011). Pattern separation in the dentate gyrus: a role for the CA3 backprojection. *Hippocampus*, 21(11), 1190–1215. doi:10.1002/hipo.20828
- Nakai, Y., & Kamiguchi, H. (2002). Migration of nerve growth cones requires detergent-resistant membranes in a spatially defined and substrate-dependent manner. *The Journal of Cell Biology*, 159(6), 1097–1108.
- Nadler, J. V. (2003). The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochemical Research*, 28(11), 1649–1658.
- Nakazawa, K., Quirk, M. C., Chitwood, R. A., Watanabe, M., Yeckel, M. F., Sun, L. D., et al. (2002). Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science*, 297(5579), 211–218.
- Nasu-Nishimura, Y., Jaffe, H., Isaac, J. T. R., & Roche, K. W. (2010). Differential Regulation of Kainate Receptor Trafficking by Phosphorylation of Distinct Sites on GluR6. *Journal of Biological Chemistry*, 285(4), 2847–2856.
- Negishi, M., Oinuma, I., & Katoh, H. (2005). Plexins: axon guidance and signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(12), 1363–1371.
- Nguyen, T., & Sudhof, T. C. (1997). Binding properties of neuroligin 1 and neuroligin 1beta reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 26032–26039.
- Nicoll, R. A. (1988). The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. *Science*, 241(4865), 545–551.

- Nicoll, R. A., & Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), 863–876.
- Nicoll, R. A. (2006). Auxiliary Subunits Assist AMPA-Type Glutamate Receptors. *Science*, 311(5765), 1253–1256.
- Nikolenko, V., Poskanzer, K. E., & Yuste, R. (2007). Two-photon photostimulation and imaging of neural circuits. *Nature Methods*, 4(11), 943–950.
- Nisticò, R., Dargan, S. L., Amici, M., Collingridge, G. L., & Bortolotto, Z. A. (2011). Synergistic interactions between kainate and mGlu receptors regulate bouton Ca²⁺ signalling and mossy fibre LTP. *Scientific Reports*, 1.
- Nong, Y., Huang, Y.-Q., Ju, W., Kalia, L. V., Ahmadian, G., Wang, Y. T., & Salter, M. W. (2003). Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature*, 422(6929), 302–307.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., & Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell*, 55(6), 989–1003.
- Nuriya, M., & Haganir, R. L. (2006). Regulation of AMPA receptor trafficking by N-cadherin. *Journal of Neurochemistry*, 97(3), 652–661.
- O'Brien, J. A., & Lummis, S. C. R. (2006). Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held gene gun. *Nature Protocols*, 1(2), 977–981.
- Oheim, M., Beaupaire, E., Chaigneau, E., Mertz, J., & Charpak, S. (2001). Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *Journal of Neuroscience Methods*, 111(1), 29–37.
- Okamura, K., Tanaka, H., Yagita, Y., Saeki, Y., Taguchi, A., Hiraoka, Y., et al. (2004). Cadherin activity is required for activity-induced spine remodeling. *The Journal of Cell Biology*, 167(5), 961–972.
- O'Leary, D. D., Bicknese, A. R., De Carlos, J. A., Heffner, C. D., Koester, S. E., Kutka, L. J., & Terashima, T. (1990). Target selection by cortical axons: alternative mechanisms to establish axonal connections in the developing brain. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 55, 453–468.
- O'Neill, M. J., Bond, A., Ornstein, P. L., Ward, M. A., Hicks, C. A., Hoo, K., et al. (1998). Decahydroisoquinolines: novel competitive AMPA/kainate antagonists with neuroprotective effects in global cerebral ischaemia. *Neuropharmacology*, 37(10-11), 1211–1222.
- Opazo, P., Labrecque, S., Tigaret, C. M., Frouin, A., Wiseman, P. W., De Koninck, P., & Choquet, D. (2010). CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron*, 67(2), 239–252.
- Osten, P., & Stern-Bach, Y. (2006). Learning from stargazin: the mouse, the phenotype and the unexpected. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(3), 275–280.
- Park, Y., Jo, J., Isaac, J. T. R., & Cho, K. (2006). Long-term depression of kainate receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron*, 49(1), 95–106.
- Partin, K. M., Patneau, D. K., Winters, C. A., Mayer, M. L., & Buonanno, A. (1993). Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron*, 11(6), 1069–1082.
- Paschen, W., Schmitt, J., Gissel, C., & Dux, E. (1997). Developmental changes of RNA editing of glutamate receptor subunits GluR5 and GluR6: in vivo versus in vitro. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 98(2), 271–280.
- Paternain, A. V., Morales, M., & LERMA, J. (1995). Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron*, 14(1), 185–189.
- Paternain, A. V., Vicente, A., Nielsen, E. O., & LERMA, J. (1996). Comparative antagonism of kainate-activated kainate and AMPA receptors in hippocampal neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 8(10), 2129–2136.
- Paternain, A. V., Herrera, M. T., Nieto, M. A., & Lerma, J. (2000). GluR5 and GluR6 kainate receptor subunits coexist in hippocampal neurons and coassemble to form functional receptors. *Journal of Neuroscience*, 20(1), 196–205.

- Paternain, A. V., Cohen, A., Stern-Bach, Y., & Lerma, J. (2003). A role for extracellular Na⁺ in the channel gating of native and recombinant kainate receptors. *Journal of Neuroscience*, 23(25), 8641–8648.
- Patrylo, P. R., & Dudek, F. E. (1998). Physiological unmasking of new glutamatergic pathways in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-induced epileptic rats. *Journal of Neurophysiology*, 79(1), 418–429.
- Pedregal, C., Collado, I., Escribano, A., Ezquerra, J., Domínguez, C., Mateo, A. I., et al. (2000). 4-Alkyl- and 4-cinnamylglutamic acid analogues are potent GluR5 kainate receptor agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(10), 1958–1968.
- Pedroso de Lima, M. C., Simões, S., Pires, P., Faneca, H., & Düzgüneş, N. (2001). Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3), 277–294.
- Perego, C., Vanoni, C., Massari, S., Longhi, R., & Pietrini, G. (2000). Mammalian LIN-7 PDZ proteins associate with beta-catenin at the cell-cell junctions of epithelia and neurons. *The EMBO Journal*, 19(15), 3978–3989.
- Perkinton, M. S., & Sihra, T. S. (1999). A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience*, 90(4), 1281–1292.
- Perrais, D., Pinheiro, P. S., Jane, D. E., & Mulle, C. (2009). Neuropharmacology. *Neuropharmacology*, 56(1), 131–140.
- Petros, T. J., Rebsam, A., & Mason, C. A. (2009). In utero and ex vivo electroporation for gene expression in mouse retinal ganglion cells. *Journal of Visualized Experiments*, (31). doi:10.3791/1333
- Petroski, M. D., & Deshaies, R. J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(1), 9–20.
- Pickering, D. S., Taverna, F. A., Salter, M. W., & Hampson, D. R. (1995). Palmitoylation of the GluR6 kainate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), 12090–12094.
- Pinheiro, P., & Mulle, C. (2006). Kainate receptors. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 457–482.
- Pinheiro, P. S., Perrais, D., Coussen, F., Barhanin, J., Bettler, B., Mann, J. R., et al. (2007). GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29), 12181–12186.
- Pinheiro, P. S., Lanore, F., Veran, J., Artinian, J., Blanchet, C., Crepel, V., et al. (2013). Selective Block of Postsynaptic Kainate Receptors Reveals Their Function at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Cerebral Cortex*, 23(2), 323–331.
- Plested, A. J. R., & Mayer, M. L. (2007). Structure and mechanism of kainate receptor modulation by anions. *Neuron*, 53(6), 829–841.
- Plested, A. J. R., Vijayan, R., Biggin, P. C., & Mayer, M. L. (2008). Molecular basis of kainate receptor modulation by sodium. *Neuron*, 58(5), 720–735.
- Rathenberg, J., Nevian, T., & Witzemann, V. (2003). High-efficiency transfection of individual neurons using modified electrophysiology techniques. *Journal of Neuroscience Methods*, 126(1), 91–98.
- Raymond, L. A., Blackstone, C. D., & Huganir, R. L. (1993). Phosphorylation and modulation of recombinant GluR6 glutamate receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Nature*, 361(6413), 637–641.
- Rebola, N., Sachidhanandam, S., Perrais, D., Cunha, R. A., & Mulle, C. (2007). Short-Term Plasticity of Kainate Receptor-Mediated EPSCs Induced by NMDA Receptors at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Journal of Neuroscience*, 27(15), 3987–3993.
- Rebola, N., Luján, R., Cunha, R. A., & Mulle, C. (2008). Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron*, 57(1), 121–134.
- Rebola, N., Carta, M., Lanore, F., Blanchet, C., & Mulle, C. (2011). NMDA receptor-dependent metaplasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Nature Neuroscience*, 14(6), 691–693.

- Redies, C., Engelhart, K., & Takeichi, M. (1993). Differential expression of N- and R-cadherin in functional neuronal systems and other structures of the developing chicken brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 333(3), 398–416.
- Ren, Z., Riley, N. J., Garcia, E. P., Sanders, J. M., Swanson, G. T., & Marshall, J. (2003). Multiple trafficking signals regulate kainate receptor KA2 subunit surface expression. *Journal of Neuroscience*, 23(16), 6608–6616.
- Ren, Z., Riley, N. J., Needleman, L. A., Sanders, J. M., Swanson, G. T., & Marshall, J. (2003). Cell surface expression of GluR5 kainate receptors is regulated by an endoplasmic reticulum retention signal. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52700–52709.
- Renard, A., Crépel, F., & Audinat, E. (1995). Evidence for two types of non-NMDA receptors in rat cerebellar Purkinje cells maintained in slice cultures. *Neuropharmacology*, 34(3), 335–346.
- Represa, A., Tremblay, E., & Ben-Ari, Y. (1987). Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers: localization and plasticity. *Neuroscience*, 20(3), 739–748.
- Rivera, R., Rozas, J. L., & Lerma, J. (2007). PKC-dependent autoregulation of membrane kainate receptors. *The EMBO Journal*, 26(20), 4359–4367.
- Risold, P. Y., & Swanson, L. W. (1997). Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 24(2-3), 115–195.
- Rodenas-Ruano, A., Perez-Pinzon, M. A., Green, E. J., Henkemeyer, M., & Liebl, D. J. (2006). Distinct roles for ephrinB3 in the formation and function of hippocampal synapses. *Developmental Biology*, 292(1), 34–45.
- Rodríguez-Moreno, A., Herreras, O., & Lerma, J. (1997). Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron*, 19(4), 893–901.
- Rodríguez-Moreno, A., & Lerma, J. (1998). Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron*, 20(6), 1211–1218.
- Rodríguez-Moreno, A., López-García, J. C., & Lerma, J. (2000). Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), 1293–1298.
- Rollenhagen, A., Sätzler, K., Rodríguez, E. P., Jonas, P., Frotscher, M., & Lübke, J. H. R. (2007). Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses. *Journal of Neuroscience*, 27(39), 10434–10444.
- Rolls, E. T., & Kesner, R. P. (2006). A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Progress in Neurobiology*, 79(1), 1–48.
- Rudolph, U., Crestani, F., & Möhler, H. (2001). GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4), 188–194.
- Ruiz, A. (2005). Distinct Subunits in Heteromeric Kainate Receptors Mediate Ionotropic and Metabotropic Function at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Journal of Neuroscience*, 25(50), 11710–11718.
- Rutkowska-Włodarczyk, I., Aller, M. I., Valbuena, S., Bologna, J.-C., Prézeau, L., & Lerma, J. (2015). A proteomic analysis reveals the interaction of GluK1 ionotropic kainate receptor subunits with Go proteins. *Journal of Neuroscience*, 35(13), 5171–5179.
- Sachidhanandam, S., Blanchet, C., Jeantet, Y., Cho, Y. H., & Mulle, C. (2009). Kainate Receptors Act as Conditional Amplifiers of Spike Transmission at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Journal of Neuroscience*, 29(15), 5000–5008.
- Saglietti, L., Dequidt, C., Kamieniarz, K., Rousset, M.-C., Valnegri, P., Thoumine, O., et al. (2007). Extracellular Interactions between GluR2 and N-Cadherin in Spine Regulation. *Neuron*, 54(3), 461–477.
- Salin, P. A., Scanziani, M., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1996). Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 13304–13309.

- Salinas, P. C., & Price, S. R. (2005). Cadherins and catenins in synapse development. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(1), 73–80.
- Salinas, G. D., Blair, L. A. C., Needleman, L. A., Gonzales, J. D., Chen, Y., Li, M., et al. (2006). Actinfilin is a Cul3 substrate adaptor, linking GluR6 kainate receptor subunits to the ubiquitin-proteasome pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40164–40173.
- Sanders, J. M., Ito, K., Settimo, L., Pentikäinen, O. T., Shoji, M., Sasaki, M., et al. (2005). Divergent pharmacological activity of novel marine-derived excitatory amino acids on glutamate receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(3), 1068–1078.
- Savtchouk, I., & Liu, S. J. (2011). Remodeling of synaptic AMPA receptor subtype alters the probability and pattern of action potential firing. *Journal of Neuroscience*, 31(2), 501–511.
- Scanziani, M., Salin, P. A., Vogt, K. E., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1997). Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 385(6617), 630–634.
- Scharfman, H. E. (2007). The CA3 “backprojection” to the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*, 163, 627–637.
- Schiavo, G., Matteoli, M., & Montecucco, C. (2000). Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiological Reviews*, 80(2), 717–766.
- Schmitz, D., Frerking, M., & Nicoll, R. A. (2000). Synaptic activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, 27(2), 327–338.
- Schmitz, D., Mellor, J., & Nicoll, R. A. (2001). Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science*, 291(5510), 1972–1976.
- Schmitz, D., Mellor, J., Breustedt, J., & Nicoll, R. A. (2003). Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Nature Neuroscience*, 6(10), 1058–1063.
- Shimogori, T., & Ogawa, M. (2008). Gene application with in utero electroporation in mouse embryonic brain. *Development, Growth & Differentiation*, 50(6), 499–506.
- Scott, D. B., Blanpied, T. A., Swanson, G. T., Zhang, C., & Ehlers, M. D. (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *Journal of Neuroscience*, 21(9), 3063–3072.
- Scott, R., Lalic, T., Kullmann, D. M., Capogna, M., & Rusakov, D. A. (2008). Target-Cell Specificity of Kainate Autoreceptor and Ca²⁺-Store-Dependent Short-Term Plasticity at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Journal of Neuroscience*, 28(49), 13139–13149.
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1), 11–21.
- Seegerstrale, M., Juuri, J., Lanore, F., Piepponen, P., Lauri, S. E., Mulle, C., & Taira, T. (2010). High Firing Rate of Neonatal Hippocampal Interneurons Is Caused by Attenuation of Afterhyperpolarizing Potassium Currents by Tonic Active Kainate Receptors. *Journal of Neuroscience*, 30(19), 6507–6514.
- Seki, T., & Rutishauser, U. (1998). Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(10), 3757–3766.
- Selak, S., Paternain, A. V., Aller, I. M., PicO, E., Rivera, R., & Lerma, J. (2009). A Role for SNAP25 in Internalization of Kainate Receptors and Synaptic Plasticity. *Neuron*, 63(3), 357–371.
- Shanks, N. F., Savas, J. N., Maruo, T., Cais, O., Hirao, A., Oe, S., et al. (2012). Differences in AMPA and Kainate Receptor Interactomes Facilitate Identification of AMPA Receptor Auxiliary Subunit GSG1L. *Cell Reports*, 1(6), 590–598.
- Shen, L., Liang, F., Walensky, L. D., & Huganir, R. L. (2000). Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4. 1N-linked actin cytoskeletal association. *Journal of Neuroscience*, 20(21), 7932–7940.

- Silverman, J. B., Restituto, S., Lu, W., Lee-Edwards, L., Khatri, L., & Ziff, E. B. (2007). Synaptic anchorage of AMPA receptors by cadherins through neural plakophilin-related arm protein AMPA receptor-binding protein complexes. *Journal of Neuroscience*, 27(32), 8505–8516.
- Simonato, M., Manservigi, R., Marconi, P., & Glorioso, J. (2000). Gene transfer into neurones for the molecular analysis of behaviour: focus on herpes simplex vectors. *Trends in Neurosciences*, 23(5), 183–190.
- Slack, R. S., & Miller, F. D. (1996). Viral vectors for modulating gene expression in neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 6(5), 576–583.
- Small, B., Thomas, J., Kemp, M., Hoo, K., Ballyk, B., Deverill, M., et al. (1998). LY339434, a GluR5 kainate receptor agonist. *Neuropharmacology*, 37(10-11), 1261–1267.
- Smolders, I., Bortolotto, Z. A., Clarke, V. R. J., Warre, R., Khan, G. M., O'Neill, M. J., et al. (2002). Antagonists of GLU(K5)-containing kainate receptors prevent pilocarpine-induced limbic seizures. *Nature Neuroscience*, 5(8), 796–804.
- Sommer, B., Keinänen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., et al. (1990). Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science*, 249(4976), 1580–1585.
- Sommer, B., Burnashev, N., Verdoorn, T. A., Keinänen, K., Sakmann, B., & Seeburg, P. H. (1992). A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *The EMBO Journal*, 11(4), 1651–1656.
- Song, J. Y., Ichtchenko, K., Sudhof, T. C., & Brose, N. (1999). Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 1100–1105.
- Soto, D., Coombs, I. D., Kelly, L., Farrant, M., & Cull-Candy, S. G. (2007). Stargazin attenuates intracellular polyamine block of Ca²⁺-permeable AMPA receptors. *Nature Neuroscience*, 10(10), 1260–1267.
- Straub, C., Hunt, D. L., Yamasaki, M., Kim, K. S., Watanabe, M., Castillo, P. E., & Tomita, S. (2011). Distinct functions of kainate receptors in the brain are determined by the auxiliary subunit Neto1. *Nature Neuroscience*, 14(7), 866–873.
- Straub, C., Zhang, W., & Howe, J. R. (2011). Neto2 modulation of kainate receptors with different subunit compositions. *Journal of Neuroscience*, 31(22), 8078–8082. doi:10.1523/JNEUROSCI.0024-11.2011
- Staubli, U., Larson, J., & Lynch, G. (1990). Mossy fiber potentiation and long-term potentiation involve different expression mechanisms. *Synapse (New York, N.Y.)*, 5(4), 333–335.
- Stegeman, S., Jolly, L. A., Premaratne, S., Gecz, J., Richards, L. J., Mackay-Sim, A., & Wood, S. A. (2013). Loss of Usp9x disrupts cortical architecture, hippocampal development and TGFβ-mediated axonogenesis. *PLoS ONE*, 8(7), e68287.
- Stuart, G., Spruston, N., Sakmann, B., & Häusser, M. (1997). Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends in Neurosciences*, 20(3), 125–131.
- Subramanian, L., & Tole, S. (2009). Mechanisms underlying the specification, positional regulation, and function of the cortical hem. *Cerebral Cortex*, 19 Suppl 1, i90–5.
- Sun, H. Y., & Dobrunz, L. E. (2006). Presynaptic Kainate Receptor Activation Is a Novel Mechanism for Target Cell-Specific Short-Term Facilitation at Schaffer Collateral Synapses. *Journal of Neuroscience*, 26(42), 10796–10807.
- Sun, H., Lu, L., Zuo, Y., Wang, Y., Jiao, Y., Zeng, W.-Z., et al. (2014). Kainate receptor activation induces glycine receptor endocytosis through PKC deSUMOylation. *Nature Communications*, 5, 4980.
- Suto, F., Tsuboi, M., Kamiya, H., Mizuno, H., Kiyama, Y., Komai, S., et al. (2007). Interactions between plexin-A2, plexin-A4, and semaphorin 6A control lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. *Neuron*, 53(4), 535–547.
- Suzuki, S. C., Inoue, T., Kimura, Y., Tanaka, T., & Takeichi, M. (1997). Neuronal circuits are subdivided by differential expression of type-II classic cadherins in postnatal mouse brains. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 9(5-6), 433–447.

- Swanson, G. T., Feldmeyer, D., Kaneda, M., & Cull-Candy, S. G. (1996). Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *The Journal of Physiology*, 492 (Pt 1), 129–142.
- Swanson, G. T., Green, T., & Heinemann, S. F. (1998). Kainate receptors exhibit differential sensitivities to (S)-5-iodowillardiine. *Molecular Pharmacology*, 53(5), 942–949.
- Swanson, G. T., Green, T., Sakai, R., Contractor, A., Che, W., Kamiya, H., & Heinemann, S. F. (2002). Differential activation of individual subunits in heteromeric kainate receptors. *Neuron*, 34(4), 589–598.
- Sylwestrak, E. L., & Ghosh, A. (2012). Elfn1 Regulates Target-Specific Release Probability at CA1-Interneuron Synapses. *Science*, 338(6106), 536–540.
- Tai, C.-Y., Mysore, S. P., Chiu, C., & Schuman, E. M. (2007). Activity-regulated N-cadherin endocytosis. *Neuron*, 54(5), 771–785.
- Tanaka, H., Shan, W., Phillips, G. R., Arndt, K., Bozdagi, O., Shapiro, L., et al. (2000). Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron*, 25(1), 93–107.
- Tang, L., Hung, C. P., & Schuman, E. M. (1998). A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 20(6), 1165–1175.
- Tang, M., Pelkey, K. A., Ng, D., Ivakine, E., McBain, C. J., Salter, M. W., & McInnes, R. R. (2011). Neto1 Is an Auxiliary Subunit of Native Synaptic Kainate Receptors. *Journal of Neuroscience*, 31(27), 10009–10018.
- Tang, M., Ivakine, E., Mahadevan, V., Salter, M. W., & McInnes, R. R. (2012). Neto2 Interacts with the Scaffolding Protein GRIP and Regulates Synaptic Abundance of Kainate Receptors. *PLoS ONE*, 7(12), e51433.
- Tawarayama, H., Yoshida, Y., Suto, F., Mitchell, K. J., & Fujisawa, H. (2010). Roles of semaphorin-6B and plexin-A2 in lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. *Journal of Neuroscience*, 30(20), 7049–7060.
- Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M., & Peifer, M. (2000). Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(2), 91–100.
- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., & Takeichi, M. (2002). Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, 35(1), 77–89.
- Thompson, C. L., Pathak, S. D., Jeromin, A., Ng, L. L., MacPherson, C. R., Mortrud, M. T., et al. (2008). Genomic anatomy of the hippocampus. *Neuron*, 60(6), 1010–1021.
- Tole, S., Christian, C., & Grove, E. A. (1997). Early specification and autonomous development of cortical fields in the mouse hippocampus. *Development (Cambridge, England)*, 124(24), 4959–4970.
- Tole, S., & Grove, E. A. (2001). Detailed field pattern is intrinsic to the embryonic mouse hippocampus early in neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 21(5), 1580–1589.
- Toth, K., Soares, G., Lawrence, J. J., Philips-Tansey, E., & McBain, C. J. (2000). Differential mechanisms of transmission at three types of mossy fiber synapse. *Journal of Neuroscience*, 20(22), 8279–8289.
- Traynelis, S. F., & Wahl, P. (1997). Control of rat GluR6 glutamate receptor open probability by protein kinase A and calcineurin. *The Journal of Physiology*, 503 (Pt 3), 513–531.
- Traub, R. D., Miles, R., & Jefferys, J. G. (1993). Synaptic and intrinsic conductances shape picrotoxin-induced synchronized after-discharges in the guinea-pig hippocampal slice. *The Journal of Physiology*, 461, 525–547.
- Treves, A., & Rolls, E. T. (1992). Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus*, 2(2), 189–199.
- Trigo, F. F., Corrie, J. E. T., & Ogden, D. (2009). Laser photolysis of caged compounds at 405nm: Photochemical advantages, localisation, phototoxicity and methods for calibration. *Journal of Neuroscience Methods*, 180(1), 9–21.
- Trimmer, J. S. (1998). Regulation of ion channel expression by cytoplasmic subunits. *Current Opinion in Neurobiology*, 8(3), 370–374.

- Uchida, N., Honjo, Y., Johnson, K. R., Wheelock, M. J., & Takeichi, M. (1996). The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *The Journal of Cell Biology*, 135(3), 767–779.
- Vandenberghe, W., Nicoll, R. A., & Brecht, D. S. (2005). Stargazin is an AMPA receptor auxiliary subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), 485–490.
- Vandenbroucke, R. E., Lucas, B., Demeester, J., De Smedt, S. C., & Sanders, N. N. (2007). Nuclear accumulation of plasmid DNA can be enhanced by non-selective gating of the nuclear pore. *Nucleic Acids Research*, 35(12), e86.
- Veran, J., Kumar, J., Pinheiro, P. S., Athané, A., Mayer, M. L., Perrais, D., & Mülle, C. (2012). Zinc Potentiates GluK3 Glutamate Receptor Function by Stabilizing the Ligand Binding Domain-Dimer Interface. *Neuron*, 76(3), 565–578. doi:10.1016/j.neuron.2012.08.027
- Vincent, P., & Mülle, C. (2009). REVIEW KAINATE RECEPTORS IN EPILEPSY AND EXCITOTOXICITY. *Neuroscience*, 158(1), 309–323. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.066
- Vignes, M., & Collingridge, G. L. (1997). The synaptic activation of kainate receptors. *Nature*, 388(6638), 179–182.
- Villacres, E. C., Wong, S. T., Chavkin, C., & Storm, D. R. (1998). Type I adenylyl cyclase mutant mice have impaired mossy fiber long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), 3186–3194.
- Vissel, B., Royle, G. A., Christie, B. R., Schiffer, H. H., Ghetti, A., Tritto, T., et al. (2001). The Role of RNA Editing of Kainate Receptors in Synaptic Plasticity and Seizures. *Neuron*, 29(1), 217–227.
- Vivithanaporn, P., Yan, S., & Swanson, G. T. (2006). Intracellular trafficking of KA2 kainate receptors mediated by interactions with coatamer protein complex I (COPI) and 14-3-3 chaperone systems. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(22), 15475–15484.
- Vogt, K. E., & Nicoll, R. A. (1999). Glutamate and gamma-aminobutyric acid mediate a heterosynaptic depression at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(3), 1118–1122.
- Wang, L. Y., Taverna, F. A., Huang, X. P., MacDonald, J. F., & Hampson, D. R. (1993). Phosphorylation and modulation of a kainate receptor (GluR6) by cAMP-dependent protein kinase. *Science*, 259(5098), 1173–1175.
- Wang, Y. T., & Linden, D. J. (2000). Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron*, 25(3), 635–647.
- Wang, H., Pineda, V. V., Chan, G. C. K., Wong, S. T., Muglia, L. J., & Storm, D. R. (2003). Type 8 adenylyl cyclase is targeted to excitatory synapses and required for mossy fiber long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 23(30), 9710–9718.
- Washbourne, P., & McAllister, A. K. (2002). Techniques for gene transfer into neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(5), 566–573.
- Watkins, J. C. (1981). Pharmacology of excitatory amino acid transmitters. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 29, 205–212.
- Weisskopf, M. G., Castillo, P. E., Zalutsky, R. A., & Nicoll, R. A. (1994). Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science*, 265(5180), 1878–1882.
- Weisskopf, M. G., & Nicoll, R. A. (1995). Presynaptic changes during mossy fibre LTP revealed by NMDA receptor-mediated synaptic responses. *Nature*, 376(6537), 256–259.
- Werner, P., Voigt, M., Keinänen, K., Wisden, W., & Seeburg, P. H. (1991). Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature*, 351(6329), 742–744.
- White, R. R., Kwon, Y. G., Taing, M., Lawrence, D. S., & Edelman, A. M. (1998). Definition of optimal substrate recognition motifs of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinases IV and II reveals shared and distinctive features. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(6), 3166–3172.

- Wieboldt, R., Gee, K. R., Niu, L., Ramesh, D., Carpenter, B. K., & Hess, G. P. (1994). Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 8752–8756.
- Wilding, T. J., & Huettner, J. E. (1996). Antagonist pharmacology of kainate- and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid-preferring receptors. *Molecular Pharmacology*, 49(3), 540–546.
- Wilding, T. J., Chai, Y. H., & Huettner, J. E. (1998). Inhibition of rat neuronal kainate receptors by cis-unsaturated fatty acids. *The Journal of Physiology*, 513 (Pt 2), 331–339.
- Wilding, T. J., Zhou, Y., & Huettner, J. E. (2005). Q/R site editing controls kainate receptor inhibition by membrane fatty acids. *Journal of Neuroscience*, 25(41), 9470–9478.
- Wilke, S. A., Antonios, J. K., Bushong, E. A., Badkoobehi, A., Malek, E., Hwang, M., et al. (2013). Deconstructing complexity: serial block-face electron microscopic analysis of the hippocampal mossy fiber synapse. *Journal of Neuroscience*, 33(2), 507–522.
- Wilkinson, K. A., & Henley, J. M. (2010). Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *The Biochemical Journal*, 428(2), 133–145.
- Wilkinson, K. A., Nakamura, Y., & Henley, J. M. (2010). Targets and consequences of protein SUMOylation in neurons. *Brain Research Reviews*, 64(1), 195–212.
- Williams, M. E., Wilke, S. A., Daggett, A., Davis, E., Otto, S., Ravi, D., et al. (2011). Cadherin-9 Regulates Synapse-Specific Differentiation in the Developing Hippocampus. *Neuron*, 71(4), 640–655.
- Wisden, W., & Seeburg, P. H. (1993). A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(8), 3582–3598.
- Wondolowski, J., & Frerking, M. (2009). Subunit-dependent postsynaptic expression of kainate receptors on hippocampal interneurons in area CA1. *Journal of Neuroscience*, 29(2), 563–574.
- Wong, L. A., & Mayer, M. L. (1993). Differential modulation by cyclothiazide and concanavalin A of desensitization at native alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid- and kainate-preferring glutamate receptors. *Molecular Pharmacology*, 44(3), 504–510.
- Wyeth, M. S., Pelkey, K. A., Petralia, R. S., Salter, M. W., McInnes, R. R., & McBain, C. J. (2014). Neto Auxiliary Protein Interactions Regulate Kainate and NMDA Receptor Subunit Localization at Mossy Fiber-CA3 Pyramidal Cell Synapses. *Journal of Neuroscience*, 34(2), 622–628.
- Xiang, Z., Greenwood, A. C., Kairiss, E. W., & Brown, T. H. (1994). Quantal mechanism of long-term potentiation in hippocampal mossy-fiber synapses. *Journal of Neurophysiology*, 71(6), 2552–2556.
- Xu, N.-J., & Henkemeyer, M. (2009). Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. *Nature Neuroscience*, 12(3), 268–276.
- Yamagata, M., Herman, J. P., & Sanes, J. R. (1995). Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(6), 4556–4571.
- Yan, S., Sanders, J. M., Xu, J., Zhu, Y., Contractor, A., & Swanson, G. T. (2004). A C-terminal determinant of GluR6 kainate receptor trafficking. *Journal of Neuroscience*, 24(3), 679–691.
- Yan, D., & Tomita, S. (2012). Defined criteria for auxiliary subunits of glutamate receptors. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 1), 21–31.
- Yang, E. J., Harris, A. Z., & Pettit, D. L. (2007). Synaptic kainate currents reset interneuron firing phase. *The Journal of Physiology*, 578(Pt 1), 259–273.
- Yokoi, M., Kobayashi, K., Manabe, T., Takahashi, T., Sakaguchi, I., Katsuura, G., et al. (1996). Impairment of hippocampal mossy fiber LTD in mice lacking mGluR2. *Science*, 273(5275), 645–647.
- Yu, X., & Malenka, R. C. (2003). Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nature Neuroscience*, 6(11), 1169–1177.

- Yue, K. T., MacDonald, J. F., Pekhletski, R., & Hampson, D. R. (1995). Differential effects of lectins on recombinant glutamate receptors. *European Journal of Pharmacology*, 291(3), 229–235.
- Zeitelhofer, M., Vessey, J. P., Xie, Y., Tübing, F., Thomas, S., Kiebler, M., & Dahm, R. (2007). High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nature Protocols*, 2(7), 1692–1704.
- Zeitelhofer, M., Vessey, J. P., Thomas, S., Kiebler, M., & Dahm, R. (2009). Transfection of cultured primary neurons via nucleofection. *Current Protocols in Neuroscience / Editorial Board, Jacqueline N. Crawley ... [Et Al.], Chapter 4*, Unit4.32.
- Zhang, Y., & Yu, L.-C. (2008). Single-cell microinjection technology in cell biology. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 30(6), 606–610.
- Zhang, P., & Lisman, J. E. (2012). Activity-dependent regulation of synaptic strength by PSD-95 in CA1 neurons. *Journal of Neurophysiology*, 107(4), 1058–1066.
- Zhang, W., St-Gelais, F., Grabner, C. P., Trinidad, J. C., Sumioka, A., Morimoto-Tomita, M., et al. (2009). A Transmembrane Accessory Subunit that Modulates Kainate-Type Glutamate Receptors. *Neuron*, 61(3), 385–396.
- Zhou, L. M., Gu, Z. Q., Costa, A. M., Yamada, K. A., Mansson, P. E., Giordano, T., et al. (1997). (2S,4R)-4-methylglutamic acid (SYM 2081): a selective, high-affinity ligand for kainate receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(1), 422–427.
- Zukin, R. S., & Bennett, M. V. (1995). Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends in Neurosciences*, 18(7), 306–313.

Annexes

Annexes

Annexe 1

Titre : Kainate receptors in the hippocampus

Mario Carta, Sabine Fièvre, Adam Gorlewicz and Christophe Mulle

Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Correspondance: Christophe Mulle

Kainate receptors in the hippocampus

Mario Carta, Sabine Fièvre, Adam Gorlewicz and Christophe Mulle

Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Keywords: development, epilepsy, glutamate receptors, synapse, synaptic plasticity

Abstract

Kainate receptors (KARs) consist of a family of ionotropic glutamate receptors composed of the combinations of five subunits, GluK1–GluK5. Although KARs display close structural homology with AMPA receptors, they serve quite distinct functions. A great deal of our knowledge of the molecular and functional properties of KARs comes from their study in the hippocampus. This review aims at summarising the functions of KARs in the regulation of the activity of hippocampal synaptic circuits at the adult stage and throughout development. We focus on the variety of roles played by KARs in physiological conditions of activation, at pre- and postsynaptic sites, in different cell types and through either metabotropic or ionotropic actions. Finally, we present some of the few attempts to link the role of KARs in the regulation of local hippocampal circuits to the behavioural functions of the hippocampus in health and diseases.

Introduction

Glutamate, the principal excitatory neurotransmitter in the vertebrate brain, exerts its actions through distinct classes of receptors, the ionotropic glutamate receptors (iGluRs) and the G-protein-coupled metabotropic receptors. The iGluRs comprise the kainate, α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) families of receptors. Since the cloning of kainate receptor (KAR) subunits at the beginning of the 1990s it has become clear that KARs play roles in the brain that are quite distinct from those of other members of the iGluR family, despite structural and functional commonalities. While AMPARs and NMDARs mediate most of basal excitatory synaptic transmission by being positioned in postsynaptic densities, KARs seem to have more diverse functions that rely on a diversity of subcellular localisation and signalling mechanisms. KARs show diverse and complex signalling which underlie their unique role in regulating the activity of neural circuits. Recently, there has been excellent general reviews on the molecular properties and function of KARs in the brain (Perrais *et al.*, 2010; Contractor *et al.*, 2011; Lerma & Marques, 2013). Here we will focus on the function of KARs in the hippocampus. Although KARs are distributed throughout the nervous system, a great deal of our knowledge of KARs comes from studies in the hippocampus. Nonetheless, there is as yet no review integrating molecular and functional studies to provide an overview of the role of KARs in the hippocampus at a physiological and behavioural level. Following a brief overview of the studies reporting on hippocampal KAR activation by exogenous agonists, we concentrate on the function and plasticity of KARs activated in

physiological conditions by synaptically-released glutamate or by ambient glutamate. This review should help in better evaluating the variety of ways in which KARs regulate the activity of hippocampal circuits. This astonishing diversity of functions rely on KAR subtypes, on specific cellular and subcellular expression and on signalling mechanisms. The modulatory role of KARs make them attractive targets for the development of refined therapeutics aimed at pathological conditions affecting the hippocampus such as epilepsy, memory afflictions and mood disorders.

Molecular and biophysical properties of KARs – a brief overview

The molecular and biophysical study of KARs, following the cloning of five KAR subunits (named GluK1–5 but originally named GluR5–7 and KA1–2) has clearly established this family as separate from the AMPA receptor (AMPA) family (GluA1–4), despite structural commonalities and overlap in sensitivities for AMPA and kainate (Bettler & Mulle, 1995). KARs are homo- and heteromeric tetramers assembled from combinations of five different subunits. Each subunit displays a similar architecture with a large extracellular part composed of an amino terminal domain involved in subunit recognition, a ligand-binding site, three transmembrane α -helices and a re-entrant loop, and an intracellular carboxy-terminal region. Recombinant GluK1, GluK2 or GluK3 can form homomeric glutamate-gated cation channels although it is not yet clear whether native KARs can exist as homomers. GluK4 and GluK5 can co-assemble in heteromeric receptors with GluK1–3, resulting in receptors with different kinetic properties and higher affinities for kainate (Perrais *et al.*, 2010). The structural diversity of KARs is enhanced by the presence of splice variants for GluK1–3 with variable cytoplasmic C-terminal domains, probably conferring distinct modes of cellular trafficking and signalling with intracellular partners (Contractor

Correspondence: Christophe Mulle, as above.
E-mail: christophe.mulle@u-bordeaux.fr

Received 6 January 2014, revised 12 March 2014, accepted 14 March 2014

et al., 2011; Lerma & Marques, 2013). In addition, mRNAs encoding the GluK1 and GluK2 subunits are subject to enzymatic editing, resulting in alternate incorporation of an important amino acid in the channel pore-forming P-loop (the 'Q/R' site). Although KAR subunits edited at the Q/R site have markedly reduced divalent cation permeabilities and very low single-channel conductances, the physiological consequences of the tightly controlled changes in the editing of GluK1 and GluK2 receptors remain unclear.

Distribution of KARs in the hippocampus

The hippocampus displays a very high density of binding sites for ^3H -kainate, in particular in the CA3 region (Monaghan & Cotman, 1982). Following the cloning of KAR subunits, *in situ* hybridisation studies have shown that the five subunits are expressed in all subregions of the rat (Wisden & Seeburg, 1993) and mouse (Bureau *et al.*, 1999) hippocampus. GluK1 exhibits a punctate profile throughout the hippocampus, corresponding to expression in GABAergic interneurons located in all subregions and all layers of the hippocampus (Bureau *et al.*, 1999; Paternain *et al.*, 2000). GluK2 is highly expressed in the principal cell layers of CA1–CA3 and the dentate gyrus (DG) as well as in interneurons. GluK3 is predominantly present in the DG, but also exhibits punctate labelling in the stratum oriens and stratum radiatum. GluK4 shows marked expression in the CA3 pyramidal layer as well as weaker expression in CA1 and DG. Finally, GluK5 appears as the most abundantly expressed subunit, present in all subregions, mainly in the principal cell layers. In conclusion, although CA3 pyramidal cells appear to show the highest expression of KAR subunits (GluK2, GluK4 and GluK5), in agreement with the high density of H^3 -kainate binding sites, expression of KARs is far from being restricted to CA3 pyramidal cells. KAR subunits are also expressed in CA1 pyramidal cells (GluK2 and GluK5) and in granule cells of the DG (GluK2, GluK3, GluK4 and GluK5) as well as in interneurons of the stratum oriens and stratum radiatum (GluK1, GluK2 and in part GluK3). There is no evidence thus far for expression of KAR subunits in glial cells in control conditions.

The immunocytochemical localisation of KAR subunit proteins has proven to be more difficult due to the unclear specificity of the antibodies used. In conditions in which the specificity of the antibodies could be assessed with knockout mice as controls, as for GluK2, GluK4 and GluK5 antibodies, the most striking feature is the marked presence of KARs in the stratum lucidum of the CA3 region (Darstein *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2005). As demonstrated by electron microscopy immunogold staining (Darstein *et al.*, 2003), this labelling probably corresponds to the presence of both presynaptic and postsynaptic KARs at mossy fibre synapses, where GluK4 and GluK5 most probably coassemble with GluK2 subunits to form functional heteromeric KAR complexes. This strong expression of KARs in the stratum lucidum does not preclude the presence of KARs in several other cell types and subregions, as indicated by functional studies (see below), although this has not yet been directly investigated with EM immunolocalisation. It is worthwhile to indicate that there is as yet no satisfactory labelling of GluK1 or GluK3 subunits in hippocampal neurons, despite strong evidence for their presence based on functional comparisons with KAR subunit-knockout mice and use of subunit-specific pharmacological agents (Contractor *et al.*, 2011). With this note of caution in mind, astrocytes show immunocytochemical labelling for KAR subunits after status epilepticus induced by a chemoconvulsant, suggesting that their expression may contribute to the pathophysiology of epilepsy

(Vargas *et al.*, 2013). As further indicated by functional studies, the localisation of KARs is highly specific and compartmentalised. Postsynaptic KARs are present at only a subset of glutamatergic synapses in CA3 pyramidal cells and in a subpopulation of interneurons. Single axons (i.e. CA3–CA1 axons) which make synaptic contacts with different populations of interneurons or principal cells express or do not express presynaptic KARs depending on the target (Sun & Dobrunz, 2006). In CA3 pyramidal cells expression of synaptic KARs is highly restricted to mossy fibre synapses (Castillo *et al.*, 1997).

Probing hippocampal functional KARs with pharmacology

The presence of functional KARs in hippocampal neurons was assessed in several earlier studies using kainate or other selective agonists to probe for the presence of both pre- and postsynaptic KARs in hippocampal slices, taking advantage of GYKI53655, a selective antagonist of AMPARs (Paternain *et al.*, 1995). As a note of caution, it should be mentioned however that GYKI53655 also blocks GluK3-containing KARs at high concentrations (Perrais *et al.*, 2009). With this pharmacological assay, large KAR-evoked currents were observed in CA3 pyramidal cells (Castillo *et al.*, 1997), consistent with the hypersensitivity of these cells to excitotoxicity (Vincent & Mulle, 2009). Agonist-evoked KAR currents are also found, with a somewhat attenuated sensitivity, in CA1 pyramidal cells (Bureau *et al.*, 1999), in multiple classes of CA1 interneurons (Cossart *et al.*, 1998) and in DG cells (C. Mulle, unpublished observations). Activation of KAR-evoked currents depolarises interneurons resulting in increased spiking rate and in a marked augmentation in spontaneous inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) in CA1 pyramidal cells (Cossart *et al.*, 1998; Frerking *et al.*, 1998; Mulle *et al.*, 2000). Interestingly, low concentrations of kainate (200 nM) cause long-lasting inhibition of a postspike potassium current, the short-duration afterhyperpolarising current (IsAHP), through a metabotropic action in CA1 pyramidal cells activating a PKC-based signalling pathway (Melyan *et al.*, 2002). A similar regulation of IsAHP is found in CA3 pyramidal cells (Fisahn *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2005), with IC_{50} values for kainate of 15 nM (Ruiz *et al.*, 2005). Kainate not only directly depolarises CA1 and CA3 pyramidal neurons through an ionotropic action but also leads to a substantial increase in excitability through a metabotropic action at much lower concentrations of the agonist (Melyan *et al.*, 2002; Fisahn *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2005).

Kainate and other KAR agonists also exert a presynaptic action by depressing GABAergic transmission onto CA1 pyramidal cells (Clarke *et al.*, 1997; Rodriguez-Moreno & Lerma, 1998). This has been proposed to be mediated by a metabotropic action of presynaptic KARs (Rodriguez-Moreno & Lerma, 1998), although indirect effects following the kainate-induced release of GABA, adenosine or endocannabinoids from somatodendritic compartments clearly play a role (Frerking *et al.*, 1999; Partovi & Frerking, 2006; Lourenco *et al.*, 2011). In fact, low concentrations of kainate facilitate GABA release (unitary IPSCs) in recordings of cell pairs from CA1 interneurons and pyramidal cells, whereas high concentrations of KAR agonists depress GABAergic synapses (Jiang *et al.*, 2001). Kainate also increases GABAergic transmission between CA1 interneurons (Mulle *et al.*, 2000; Cossart *et al.*, 2001). Finally, there is considerable evidence for the pharmacological depression of excitatory synaptic transmission in CA1 and CA3 pyramidal cells with KAR agonists acting on putative presynaptic KARs (Chittajallu *et al.*, 1996; Kamiya & Ozawa, 1998; Frerking *et al.*, 2001). The

functional characterisation of KARs by pharmacological activation has been reviewed in many instances, which also describe the metabotropic functions of KARs (Lerma, 2003; Pinheiro & Mulle, 2006; Rodríguez-Moreno & Sihra, 2007; Jane *et al.*, 2009). Here we focus on the physiological roles of KARs in the hippocampus when activated by the endogenous agonist glutamate, as demonstrated by the use of KAR antagonists or KAR subunit-knockout mice.

KARs in CA3 pyramidal cells – the mossy fibre synapses

That KARs can serve as bona fide postsynaptic glutamate receptors was first demonstrated at synapses between mossy fibres and CA3 pyramidal cells (Castillo *et al.*, 1997; Vignes & Collingridge, 1997). In the presence of GYKI 53655 to block AMPA receptors, stimulation of mossy fibres, but not associative/commissural fibres, elicit excitatory postsynaptic currents (EPSCs) with small amplitudes and slow onset and decay kinetics (Castillo *et al.*, 1997). The synapse-specific expression of KARs is in line with the presence of high-affinity kainate binding sites in the stratum lucidum and is corroborated by the restricted expression of functional KARs in the stratum lucidum region, as demonstrated by localised puff application of kainate while recording from a CA3 pyramidal cell in the whole-cell mode (Castillo *et al.*, 1997). KAR EPSCs at mossy fibre–CA3 pyramidal cell synapses are absent in GluK2-knockout mice (Mulle *et al.*, 1998) but are preserved in GluK1- (Sachidhanandam *et al.*, 2009) and GluK3- (Pinheiro *et al.*, 2007) knockout mice. GluK4 and GluK5 are additional essential components of KARs mediating synaptic currents (Contractor *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2009). The slow kinetics of KAR EPSCs contrasts with the fast kinetics reported for recombinant KARs expressed in heterologous systems. This discrepancy can in part be explained by the biophysical properties of GluK2–GluK5 heteromers as opposed to homomeric GluK2 receptors (Contractor *et al.*, 2003; Barberis *et al.*, 2008). The association with the auxiliary subunits Neto1 and Neto2, which impart emerging functional properties to the KAR complex, seems to play a major role in shaping the kinetics of synaptic KARs (Copits & Swanson, 2012). The slow kinetics of mossy fibre KAR EPSCs critically depend on Neto1 which is expressed at a high level in CA3 pyramidal cells (Straub *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2011). In addition to their ionotropic function, postsynaptic KARs at mossy fibre–CA3 synapses operate in parallel through a metabotropic mode, in response to short bursts of high-frequency stimulation, leading to inhibition of IsAHP and increased excitability (Ruiz *et al.*, 2005; Chamberlain *et al.*, 2013). Concomitantly with the decreased amplitude of mossy fibre KAR EPSCs, the lack of Neto1 also affects the alleviation of IsAHP by KARs (Wyeth *et al.*, 2014). The molecular mechanisms for the compartmentalised expression of KARs at mossy fibre synapses remain to be directly analysed. The restricted expression of KARs at mossy fibre synapses appears to be preserved in the absence of GluK4 or GluK5 (Contractor *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2009) or the auxiliary subunit Neto1 (Zhang *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2011). However, electron microscopy has recently revealed a markedly diminished density of postsynaptic GluK2/3-labelled KARs in Neto1-knockout mice (Wyeth *et al.*, 2014). This indicates that Neto1 is involved in the trafficking of KARs to synaptic sites, although it does not demonstrate a role for Neto1 in the restricted expression of KARs at mossy fibre–CA3 synapses.

The complexity of KAR function at mossy fibre synapses is further increased by the presence of presynaptic KARs. Importantly, presynaptic KARs can be activated by a single glutamate release event, leading to facilitation of synaptic transmission in < 10 ms

(Contractor *et al.*, 2001; Lauri *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2007). Although presynaptic forms of short-term synaptic plasticity at mossy fibre–CA3 do not rely directly on presynaptic KARs, their activation accounts for a large part of the high dynamic range of synaptic facilitation observed with pairs or trains of stimuli as well as during frequency facilitation (when the rate of stimulation is increased from 0.05 to 1 Hz and above; Contractor *et al.*, 2001; Lauri *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2007). Presynaptic KARs facilitate the induction of the presynaptic form of long-term potentiation (LTP) at mossy fibre–CA3 synapses (Contractor *et al.*, 2001; Lauri *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2007), probably as a consequence of the facilitatory action of presynaptic KARs during the induction phase. In physiological conditions of KAR activation, experimental evidence favour an ionotropic mechanism underlying the facilitatory function of presynaptic KARs, including its fast action (< 10 ms; Schmitz *et al.*, 2001), the inhibition by philanthotoxin, a channel blocker of Ca²⁺-permeable AMPA and KARs (Pinheiro *et al.*, 2007), and the lack of effect of calphostin C (Lauri *et al.*, 2001). In addition, monitoring Ca²⁺ in identified mossy fibre boutons shows that a single action potential leads to increased Ca²⁺ transient through activation of presynaptic KARs (Nistico *et al.*, 2011) with a contribution of Ca²⁺ stores (Scott *et al.*, 2008). Presynaptic KARs comprise the GluK2 and GluK3 subunits (Contractor *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2007). Elimination of GluK4 or GluK5 alone has no impact on short-term plasticity (Contractor *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2009). Interestingly, paired-pulse facilitation is deficient in mice with constitutive deletions of both GluK4 and GluK5, while frequency facilitation is intact (Fernandes *et al.*, 2009), pleading for a more thorough evaluation of the distinct mode of participation of KARs in these separate processes.

Mossy fibre–CA3 pyramidal cell synapses are a key component of information processing along the hippocampal trisynaptic circuit. How the different functions of KARs integrate to shape the activity of CA3 pyramidal cells in an intact network has not yet been fully investigated. Postsynaptic AMPA receptors and KARs differ in their ability to encode temporal information (Frerking & Ohliger-Frerking, 2002). The slow decay of KAR EPSCs influences the integrative features of synaptic transmission in CA3 pyramidal cells. A systematic comparison of mutant mice for KAR subunits revealed that pre- and postsynaptic KARs both amplify mossy fibre synaptic inputs to trigger spike discharge within a wide range of frequencies of presynaptic stimulation (from 1 to 50 Hz), thus acting as conditional amplifiers of spike transmission (Sachidhanandam *et al.*, 2009). Presynaptic KARs modulate the dynamic range of short-term plasticity and, as such, control excitatory postsynaptic potential (EPSP) amplitude and spike discharge in response to repetitive stimulation of unitary mossy fibres, in particular in conditions mimicking the activity of DG granule cells *in vivo* (Sachidhanandam *et al.*, 2009). Selective block of KAR EPSCs with UBP310 shows that postsynaptic KARs contribute a prolonged depolarisation in conditions of sustained stimulation (Pinheiro *et al.*, 2013). Inhibition of IsAHP by postsynaptic KARs appears to have a dominant effect on the triggering of spikes following short trains of mossy fibre stimulation (Sachidhanandam *et al.*, 2009; Chamberlain *et al.*, 2013). Finally, mossy fibre KARs play a key role in heterosynaptic facilitation and plasticity of associative/commissural fibre synapses, known to lack these receptors (Sachidhanandam *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2013).

A better understanding of the role of KARs in the activity of CA3 circuits would need to take into account the expression of KARs in GABAergic interneurons, as interneurons are key players

in setting the temporal coherence critical for information transfer and neuronal network oscillations. It is as yet unclear whether functional KARs can be activated under physiological conditions in different classes of CA3 interneurons, as in CA1, in particular in interneurons directly contacted by mossy fibres. Although the implication of KARs in the generation of gamma oscillations induced by exogenous kainate in CA3 has been documented (Fisahn *et al.*, 2004), we have as yet no indication of the involvement of KARs activated by endogenous glutamate in the generation of any type of oscillation in the intact CA3 circuit.

Functional roles of KARs in CA1 – GABAergic interneurons

In contrast to CA3, much is known about the role of KARs in GABAergic interneurons in CA1. In CA1, KAR EPSCs can be elicited in several classes of interneurons by electrical stimulation of excitatory afferents (Cossart *et al.*, 1998; Frerking *et al.*, 1998). In CA1 pyramidal cells, KAR EPSCs cannot be evoked (Cossart *et al.*, 1998; Frerking *et al.*, 1998). However, activation of postsynaptic KARs by high-frequency stimulation of Schaffer collaterals (a train of five pulses at 100 Hz) inhibits the IsAHP current through a metabotropic signalling cascade (Melyan *et al.*, 2004). In interneurons [in stratum oriens–lacunosum moleculare (O-LM) cells] KARs can be activated by the quantal release of glutamate, generating a population of miniature EPSCs solely composed of KARs, suggesting that KARs and AMPARs may in part be targeted to different synaptic sites (Cossart *et al.*, 2002). A concurrent study reports, however, the expression of synaptic KARs on stratum radiatum and stratum lacunosum moleculare interneurons but not on stratum oriens interneurons (Wondolowski & Frerking, 2009), indicating that not all interneurons may express synaptic KARs. As in CA3 pyramidal cells, KAR EPSCs display slower decay kinetics than AMPAR EPSCs (although faster than KAR EPSCs in CA3 pyramidal cells), ranging from 5 ms for unitary KAR EPSCs to 50 ms for bulk stimulation of excitatory afferents (Cossart *et al.*, 1998, 2002; Frerking *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2007). Consistent with the preferential expression of GluK1 in GABAergic interneurons, the use of selective antagonists of GluK1 LY 293558 (Cossart *et al.*, 1998) and UBP302 (Wondolowski & Frerking, 2009) showed that synaptic KARs comprise the GluK1 subunit. This does not, however, preclude the presence of GluK2, as both subunits are known to be present in GABAergic interneurons and can form functional heteromers which are sensitive to GluK1-selective antagonists (Bureau *et al.*, 1999; Mulle *et al.*, 2000; Paternain *et al.*, 2000). The exact subunit composition, which may vary depending on cell type (Wondolowski & Frerking, 2009), has not yet been studied using subunit-specific knockout mice (in fact, all studies on synaptic KARs in GABAergic interneurons have been performed in rats).

Modelling of synaptic activity in hippocampal interneurons suggests that AMPARs and KARs differ in their ability to encode temporal information (Frerking & Ohliger-Frerking, 2002). Hippocampal interneuron activity is involved in the generation and maintenance of behaviourally relevant oscillations (Klausberger & Somogyi, 2008). Due to their slow decay kinetics, synaptic KARs in interneurons are much more effective than synaptic AMPA receptors at modulating firing patterns and at resetting the phase of spontaneously firing CA1 stratum oriens interneurons (Yang *et al.*, 2007). A study combining multibeam two-photon calcium imaging and electrophysiology in hippocampal slices revealed that somatostatin-positive O-LM neurons reliably follow synaptic stimulation of the alveus in the theta frequency range, and that this property requires the crucial contribution of synaptic KARs (Goldin *et al.*,

2007). It appears that this property is not shared by other stratum oriens interneurons, suggesting that a specific KAR spike-coupling mechanism may exist in somatostatin-positive O-LM neurons (Goldin *et al.*, 2007). *In vivo*, in awake freely behaving rats, the GluK1 antagonist UBP304 reduces the frequency of theta oscillations (by ~30%), without affecting its power, in all layers of the hippocampus (Huxter *et al.*, 2007). In addition, recording the spatial firing pattern of principal cells shows that place field coherence is reduced despite preservation of their mean firing rates (Huxter *et al.*, 2007). These effects may be accounted for by a decrease in rhythmic firing frequency in interneurons, which is consistent with a possible attenuation of the excitatory drive onto interneurons when synaptic KARs are blocked (Huxter *et al.*, 2007). Because of the selective expression of GluK1 in hippocampal interneurons, this suggests a role for endogenously activated KARs in interneurons in pacing theta frequency in behaving rats. It should be noted, however, that the related compounds UBP310 and UBP316 also inhibit heteromeric GluK2/GluK5 receptors; hence UBP304 may affect the activity of CA3 pyramidal cells as well (Pinheiro *et al.*, 2013).

The role of KARs in regulating GABAergic transmission in CA1, by acting either directly as presynaptic KARs or indirectly through the release of a neuromodulator, has been the subject of many studies (Lerma, 2003; Contractor *et al.*, 2011). Most studies have found that pharmacological activation of KARs inhibit GABAergic transmission. Comparatively little is known about the conditions under which presynaptic KARs regulate the activity of CA1 synaptic networks. Burst stimulation of Schaffer collaterals induces short-term inhibition of evoked IPSCs (eIPSCs) in CA1 pyramidal cells through the spillover of glutamate onto GABAergic terminals and activation of KARs (Min *et al.*, 1999) comprising the GluK1 subunit (Lourenço *et al.*, 2010). On average, the inhibition is of rather small magnitude (~15%). However, not all GABAergic synapses are affected by the induction protocol. When recording from pairs of CA1 interneurons and pyramidal cells, burst stimulation of Schaffer collaterals induced marked inhibition of unitary IPSCs (by ~40%) although in only a subpopulation of connections, corresponding to those expressing CB1 receptors (Lourenço *et al.*, 2010). The short-term inhibition of eIPSCs following the release of glutamate by a conditioning train of Schaffer collaterals relies on the endocannabinoid system and requires the concerted activation of CB1 receptors and presynaptic KARs (Lourenço *et al.*, 2010). In contrast, in paired recordings involving specific GABAergic interneuron subtypes (such as those devoid of presynaptic CB1 receptors), endogenous activation of KARs by ambient glutamate or stimulation of Schaffer collaterals increases the efficacy of GABAergic synapses by activating presynaptic KARs (Jiang *et al.*, 2001; Lourenço *et al.*, 2010). This facilitatory action is also mediated by GluK1, and possibly depends on the depolarisation of presynaptic terminals (Lourenço *et al.*, 2010). Thus, two sets of GABAergic connections onto CA1 pyramidal cells exist, in which KARs can either potentiate or inhibit synaptic transmission depending on the expression and activity of CB1 receptors.

Presynaptic KARs are also present as autoreceptors on Schaffer collaterals making synaptic contacts onto a subset of stratum radiatum interneurons (Sun & Dobrunz, 2006). Synapses made by Schaffer collaterals onto somatostatin interneurons display large short-term facilitation which depends on a low initial release probability and on synaptic activation of presynaptic KARs, similar to the situation at mossy fibre synapses (Sun & Dobrunz, 2006). Interestingly, KARs are not involved in short-term plasticity at Schaffer collateral synapses onto CA1 pyramidal cells (Sun & Dobrunz, 2006), pointing to the target-specific localisation of presynaptic KARs in given afferents. The large facilitation of synaptic transmission is observed

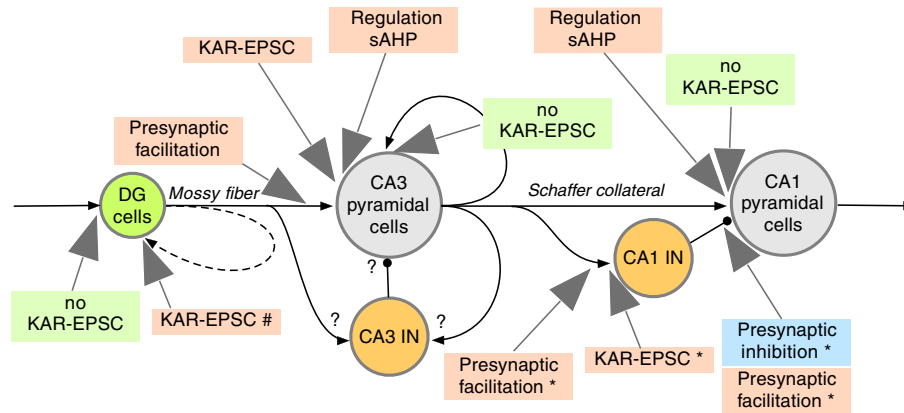


FIG. 1. Activation of KARs by synaptically released glutamate regulates the activity of mature hippocampal circuits by a variety of mechanisms through both ionotropic and metabotropic actions. Schematic diagram of hippocampal circuits. Gray arrows point to either pre- or postsynaptic sites of action of KARs. The pink boxes refer to facilitatory actions on synaptic transmission, the blue box to inhibitory actions and the green boxes to lack of action. (i) 'Presynaptic facilitation' by presynaptic KARs is involved in short-term plasticity of neurotransmitter release by either autoreceptors (for glutamate) or heteroreceptors (GABA). (ii) KAR EPSCs, due to slow kinetics of decay, are involved in synaptic summation and integration. (iii) Postsynaptic KARs can regulate sAHP through metabotropic signalling, leading to enhanced excitability. *In interneurons, only a subpopulation express postsynaptic KARs or show presynaptic regulation. #KAR EPSCs are expressed at recurrent mossy fibre synapses in animal models of TLE. Question marks point to synaptic connections for which the role of KARs has not yet been studied.

when using a physiologically derived pattern of stimulation, in contrast to the moderate facilitation observed for other interneurons (Sun *et al.*, 2009). Presynaptic calcium-permeable KARs are thought to be involved in the short-term facilitation of glutamate release based on the use of the calcium-permeable receptor antagonist NASPM (1-naphthyl acetyl spermine; Sun *et al.*, 2009). Excitatory synapses onto O-LM interneurons also show pronounced facilitation, which is attenuated with NS102, a selective GluK2 antagonist (Sylwestrak & Ghosh, 2012). The Elfn1 (extracellular leucine-rich repeat fibronectin-containing 1) protein is selectively expressed by O-LM interneurons and regulates the formation of highly facilitating pyramidal-O-LM synapses (Sylwestrak & Ghosh, 2012). It is tempting to speculate that the selective recruitment and stabilisation of GluK2-containing KARs at these synapses relies on this transsynaptic mechanism.

Altogether it is now clear that KARs are key regulators of the activity of CA1 local circuits, by preferentially acting at specific glutamatergic connections onto interneurons or by regulating GABAergic activity in a manner which depends on interneuron subtype (Fig. 1). More work is needed to link specific KAR subtypes to the generation and maintenance of oscillatory activity in a behaviourally relevant setting. Within the diversity of interneuronal subtypes, a better evaluation of cell-specific distributions and subcellular localisation of KARs may provide important clues about KAR-mediated effects on synaptic circuits and network oscillations. Functional mapping of KARs with local photolysis of caged glutamate has begun to provide evidence for a diversity of subcellular localisation of KARs in different interneuron subtypes (Yang *et al.*, 2006). Some interneurons exhibit a uniform distribution of KARs along dendrites (as in most O-LM neurons) whereas, in others, KAR-mediated currents are restricted to hot spots (in a subpopulations of O-LM and trilaminar interneurons; Yang *et al.*, 2006).

Functional roles of KARs in the DG – pathophysiological implication in epilepsy

Apart from the well-characterised presynaptic KARs on mossy fibre terminals, little is known of the role of KARs in DG cells although GluK2, GluK3, GluK4 and GluK5 are expressed at considerable levels

(Wisden & Seeburg, 1993). DG cells express functional somatodendritic KARs (C. Mulle, unpublished observation), but no KAR EPSC can be evoked by stimulation of afferent glutamatergic fibres in the molecular layer, and all miniature EPSCs are mediated by AMPARs (Epsztein *et al.*, 2005). Hence the role of KARs in the activity of local circuits in the DG has yet to be scrutinised. Kainate is a potent neurotoxin known to induce acute seizures. However, whether KARs play any role in the pathophysiology of temporal lobe epilepsy (TLE) is not known (Vincent & Mulle, 2009). A series of elegant studies have highlighted the crucial role of aberrant postsynaptic KARs in DG cells in the generation of chronic epileptic seizures (Epsztein *et al.*, 2005, 2010; Artinian *et al.*, 2011; A. Peret, L.A. Christie, D. Ouedraogo, A. Gorlewicz, J. Epsztein, C. Mulle and V. Crépel, unpublished observations). In animal models of TLE and in human patients, mossy fibres sprout to form an aberrant glutamatergic network between dentate granule cells (Nadler, 2003). Expression of KAR subunits is increased in the DG in patients with TLE (Mathern *et al.*, 1998), and the distribution of radioactive kainate correlates with mossy fibre sprouting in animal models of TLE (Represa *et al.*, 1987). Recurrent mossy fibres convert the nature of glutamatergic transmission in DG cells – the aberrant recurrent excitatory synapses mostly operate via ectopic KARs (Epsztein *et al.*, 2005) composed of heteromeric GluK2/GluK5 receptors known to be sensitive to UBP310 (Pinheiro *et al.*, 2013; A. Peret, L.A. Christie, D. Ouedraogo, A. Gorlewicz, J. Epsztein, C. Mulle and V. Crépel, unpublished observations). Due to their slow decay kinetics, aberrant synaptic KARs in interplay with the persistent sodium current dramatically expand the temporal window for synaptic integration, introducing a gain in the input–output operation of dentate granule cells (Epsztein *et al.*, 2010; Artinian *et al.*, 2011). Through this mechanism, aberrant KARs play a major role in chronic epileptic activity in the hippocampus in TLE, which is attenuated in GluK2-knockout mice and following administration of UBP310 (A. Peret, L.A. Christie, D. Ouedraogo, A. Gorlewicz, J. Epsztein, C. Mulle and V. Crépel, unpublished observations).

Role of KARs in the developing hippocampus

Several lines of evidence indicate an important role for KARs in the early development of the CNS and in the maturation of synaptic net-

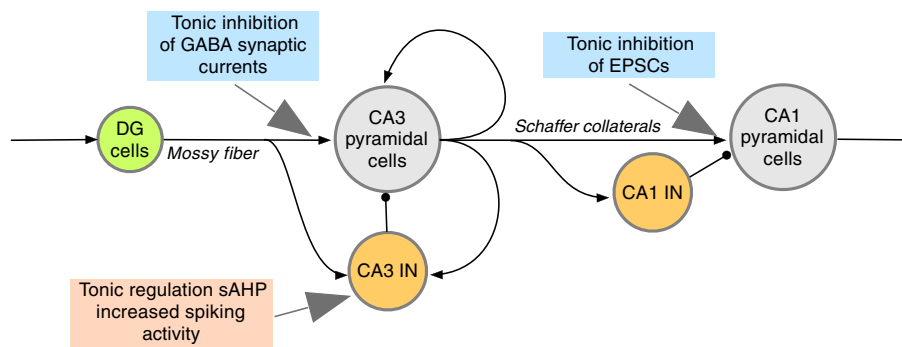


FIG. 2. Tonic activation of KARs shapes neuronal connectivity in early hippocampal development. Schematic diagram illustrating the various actions of KARs tonically activated by ambient glutamate during the first postnatal week in rodents.

works (Pinheiro & Mulle, 2006; Lerma & Marques, 2013). All KAR subunits are expressed at high levels in the hippocampus during development, with a peak during the first postnatal week (Bahn *et al.*, 1994). The rapid motility of filopodia in mossy fibre terminals prior to synapse formation is downregulated during development, in a manner which depends on the activity of KARs (Tashiro *et al.*, 2003). In a developmental period restricted to the first postnatal week, KARs tonically activated by ambient glutamate appear to play an essential role in shaping synaptic connectivity and network activity (Lauri *et al.*, 2005, 2006; Segerstrale *et al.*, 2010; also Fig. 2). GluK1 is the predominant subunit during this period, and appears to be expressed both in GABAergic neurons, as in the adult, as well as in principal cells of the hippocampus (Bahn *et al.*, 1994; Vesikansa *et al.*, 2012). Endogenous activation of KARs by ambient glutamate maintains a low glutamate release probability at immature excitatory synapses onto CA1 and CA3 pyramidal cells (Lauri *et al.*, 2005, 2006). This tonic activity of KARs provides immature synapses in CA1 with a large facilitation in response to high-frequency activity of CA3 neurons, the dominant pattern of activity of CA3 neurons during early postnatal development (Lauri *et al.*, 2006). Tonic control of the release probability requires presynaptic GluK1-containing KARs operating through a G-protein-coupled pathway (Lauri *et al.*, 2006). Interestingly, the tonic activity of KARs in neonate CA3–CA1 synapses is rapidly switched off in response to experimental induction of LTP (Lauri *et al.*, 2006). In addition, presynaptic KARs can be pharmacologically activated to depress glutamatergic transmission at postnatal days 14–16, but not tonically activated by endogenous glutamate (Lauri *et al.*, 2006). The molecular signalling mechanisms controlling the switch from the immature to the mature type of KAR function is not known, and may depend on a change in the affinity of KARs for the ambient glutamate (Lauri *et al.*, 2006). This is consistent with a marked decrease in the expression of the ‘high-affinity’ GluK4 subunits (Vesikansa *et al.*, 2012), although changes in signalling mechanisms or local levels of ambient glutamate cannot be excluded at this point. Activity-dependent downregulation of the tonic KAR activity during maturation of presynaptic properties involves BDNF-TrkB signalling (Sallert *et al.*, 2009). Similarly, tonic activation of presynaptic GluK1-containing KARs markedly depresses neonate mossy fibre synapses, which operate mostly with GABA as a neurotransmitter (Caiati *et al.*, 2010). Moreover, presynaptic GluK1-containing KARs present on mossy fibre terminals account for the persistent depression of GABAergic transmission at neonate synapses observed after pairing presynaptic mossy fibre stimulation with postsynaptic spiking (Caiati *et al.*, 2010). Overall, tonic activation of presynaptic KARs in the

neonate limits the activation of excitatory connections, being GABA-depolarising at this stage. In parallel, tonic activation of GluK1 subunit-containing KARs in the neonate markedly increases spontaneous action-potential firing by persistent G-protein-dependent inhibition of the medium-duration afterhyperpolarising current (ImAHP) (Segerstrale *et al.*, 2010). The KAR-dependent inhibition of the IMAHP disappears by the end of the second postnatal week, probably due to a developmental decoupling between KAR activation and IMAHP inhibition (Segerstrale *et al.*, 2010). Hence, early during development, GluK1-containing KARs tonically activated by ambient glutamate critically contribute to the genesis and synchronisation of early hippocampal network activities.

The maturation of hippocampal synaptic circuits extends beyond the first postnatal week in rodents. In particular, at mossy fibre synapses the morphological and functional properties continue changing until adulthood, with major events taking place during the second postnatal week (Amaral & Dent, 1981; Marchal & Mulle, 2004). Both the functional and morphological maturation of mossy fibre–CA3 pyramidal cell synapses is delayed in mice deficient in the GluK2 subunit (Lanore *et al.*, 2012). How GluK2-containing KARs shape morphofunctional properties of mossy fibre synapses is unknown. GluK2/GluK5 heteromers present at mossy fibre synapses interact with proteins linked to cytoskeletal dynamics such as the β -catenin/N-cadherin complex (Coussen *et al.*, 2002), the cytoskeletal adapter 4.1N (Copits & Swanson, 2013) or CRPM2 (Marques *et al.*, 2013), and it would be interesting to know whether these interactions play a role in the morphofunctional maturation of mossy fibre synapses. It is important to point out that a loss of a functional *grik2* gene, coding for GluK2, is associated with intellectual disability (Motazacker *et al.*, 2007), which could in part rely on an inappropriate maturation of synaptic circuits involved in learning and memory. Whether KARs play any role in adult neurogenesis in the DG and in the maturation of newly generated neurons is another open question.

Plasticity of KARs in the hippocampus

As indicated above, somatodendritic or presynaptic KARs can undergo rapid developmental changes in their properties (Lauri *et al.*, 2006; Segerstrale *et al.*, 2010). Although all functional KARs are probably subject to activity-dependent modifications, our knowledge of the plasticity of KARs in mature synaptic circuits is currently limited to postsynaptic KARs at mossy fibre–CA3 pyramidal cell synapses (Fig. 3). Mossy fibre–CA3 pyramidal cell synapses are characterised by presynaptic short-term plasticity mechanisms providing a high dynamic range of synaptic efficacy

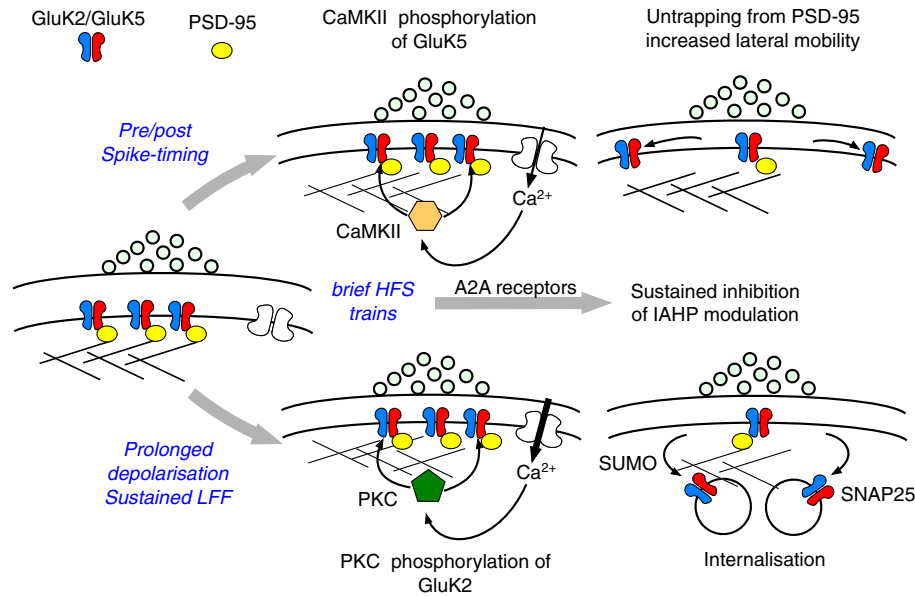


FIG. 3. Different mechanisms for the LTD of KAR EPSCs at mossy fibre-CA3 synapses. LTD of KARs can be induced by various stimulation protocols – top, a spike-timing-dependent pairing protocol; middle, brief trains of high-frequency stimuli which lead to both depression of KAR EPSCs and reduction in inhibition of IAHP; bottom, a sustained depolarisation or prolonged low-frequency stimulation. Current evidence points to a variety of molecular mechanisms depending on the induction protocol (see text).

as well as a presynaptic form of LTP (Nicoll & Schmitz, 2005). Presynaptic plasticity affects signalling through AMPARs, NMDARs and KARs, although not equally (Ito *et al.*, 2004). Indeed, synaptic KARs exhibit attenuated short-term facilitation and LTP (Ito *et al.*, 2004). This could potentially be explained by heterogeneity in presynaptic mossy fibre function, i.e. postsynaptic KARs may be preferentially located in synapses that have a higher release probability or that lack facilitatory autoreceptors, such as presynaptic KARs. Postsynaptic KARs also undergo a homosynaptic form of short-term depression, which can be triggered by synaptic NMDAR activation or sustained spiking activity and which leads to attenuation of mossy fibre EPSP summation (Rebola *et al.*, 2007). Short-term plasticity of KARs depends on a rise in Ca^{2+} in the postsynaptic cell and on the activation of the phosphatase calcineurin that probably binds to the GluK2b splice variant, allowing for the dephosphorylation of KARs and inhibition of synaptic currents (Rebola *et al.*, 2007). Long-term synaptic plasticity can be elicited by a variety of mechanisms even within a single type of synaptic connection. Long-term depression (LTD) of synaptic KARs can be induced by prolonged low-frequency stimulation or postsynaptic depolarisation (15 min depolarisation at +30 mV or 1 Hz stimulation for 5 min; Selak *et al.*, 2009; Chamberlain *et al.*, 2013), as well as by trains of high-frequency stimulation (50 stimuli at 25 Hz; Chamberlain *et al.*, 2013). Synaptic KARs also undergo LTD in response to a spike-timing-dependent plasticity (STDP) protocol known to trigger activation of CaMKII and induction of LTP of AMPARs at other synapses (Carta *et al.*, 2013). The molecular mechanisms involved in the depression of synaptic KARs appear different depending on the induction protocol. KAR LTD induced by prolonged low-frequency stimulation requires receptor endocytosis from the plasma membrane, as is the case with most other forms of postsynaptic depression of excitatory transmission (Selak *et al.*, 2009). This protocol engages dual synergistic processes initiated by PKC phosphorylation which lead to internalisation of GluK2/GluK5 KARs by destabilising surface

KARs containing the GluK5 subunit through an interaction with PICK1 and SNAP-25 and through SUMOylation of GluK2 (Selak *et al.*, 2009; Chamberlain *et al.*, 2012). In contrast, in KAR LTD induced by STDP the CaMKII-mediated phosphorylation of GluK5 subunits probably uncouples KARs from the postsynaptic scaffolding protein PSD-95, leading to the untrapping of KARs from mossy fibre synapses and increased lateral mobility (Carta *et al.*, 2013). KAR LTD induced by trains of high-frequency stimulation (50 stimuli at 25 Hz) depends on the activation of adenosine A2A receptors (Chamberlain *et al.*, 2013); this stimulation protocol has previously been shown to be required for the induction of NMDAR LTP at mossy fibre synapses triggered by the same protocol (Rebola *et al.*, 2008). Interestingly, high-frequency trains or natural patterns of spike discharge not only induce depression of synaptic KAR currents but also relieve inhibition of the sAHP by synaptic KARs, and this is thought to be the dominant effect of KAR LTD on cellular excitability (Chamberlain *et al.*, 2013). It is as yet unknown whether synaptic KARs in hippocampal interneurons, or any type of presynaptic KARs, can be regulated in mature circuits, as observed at early developmental stages (Lauri *et al.*, 2006). In addition, there is as yet no report of any short- or long-lasting potentiation of synaptic KARs except when blocking PKC activity, or whether KARs can undergo potentiation of their activity (Selak *et al.*, 2009). Finally, it will be important in the future to correlate the regulation of KAR activity to the plasticity of hippocampal circuits in spatial information processing or memory encoding.

Towards an integrated view of KAR function in the hippocampus in health and disease

This review highlights the great variety of functions of KARs in a brain region which has received particular attention with regards to this receptor family. Much is still to be discovered. There cannot be a single answer to the question of how KARs in the hippocampus

control higher brain functions, i.e. memory or spatial navigation. KARs, mainly depending on their cellular and subcellular localisation, on the subtypes and on the mode of signalling (ionotropic vs. metabotropic), exert a variety of regulatory roles in shaping the activity of hippocampal synaptic circuits. However the pharmacological tools at our disposal are essentially limited to antagonists targeting GluK1-containing KARs. These compounds can impair hippocampal oscillations and the coherence of place fields (Huxter *et al.*, 2007), but it would be useful to have more precise indications as to which cellular functions and which KAR subtypes are involved. Up to now, the analysis of constitutive knockout mice for KAR subunits have provided rather limited information about the role of KARs in hippocampus-dependent behaviours. Because of the high and restricted expression of GluK4 in the DG and CA3 in the forebrain (Wisden & Seeburg, 1993), GluK4-knockout mice provide an interesting mouse model in which to evaluate the role of KARs in hippocampus-dependent behaviours. Mice with a deletion of GluK4 have reduced anxiety and an antidepressant-like phenotype (Catches *et al.*, 2012; Lowry *et al.*, 2013). Although it is difficult to draw parallels between findings in mice and genetic defects associated with human neuropsychiatric disorders (Pickard *et al.*, 2006), it is worth mentioning that the behaviour of GluK4-knockout mice mirrors two of the hallmark endophenotypes of patients with schizophrenia and bipolar disorder, demonstrating marked hyperactivity and impaired pre-pulse inhibition (Lowry *et al.*, 2013). Previous studies on hippocampal KARs have mainly been conducted in the dorsal hippocampus, whereas the ventral hippocampus has a preferential role in brain processes associated with anxiety-related behaviours (Bannerman *et al.*, 2004), urging an evaluation of the role of KARs in the regulation of synaptic circuits in the ventral hippocampus as well. GluK4-knockout mice show moderate deficits in spatial memory acquisition and recall but not in working memory tasks (Catches *et al.*, 2012; Lowry *et al.*, 2013). GluK2-knockout mice did not exhibit any major memory deficit in the Morris water maze (Mulle *et al.*, 1998), but were impaired in contextual fear conditioning, a memory task which requires the hippocampus, although it is not clear whether hippocampal KARs and not KARs in the amygdala are at play in this task (Ko *et al.*, 2005). Why the ablation of GluK2, which is an essential subunit at DG–CA3 connections, induces rather moderate deficits in hippocampal-dependent memory is unclear. Although it can be explained by compensatory mechanisms, we can speculate that GluK2 may be involved in the precision of memory encoding and recall, and for pattern completion (Nakashiba *et al.*, 2008), features which have not yet been analysed. To address the specific role of KAR subtypes, of KARs expressed in given cell populations or at single synapses, we will need new tools, especially mice with the possibility to ablate KAR subunits in a cell-specific manner. In addition, there is an urgent need for pharmacological antagonists specific for physiologically important isoforms of KARs, i.e. GluK2/GluK5 receptors. Future studies should analyse the impact of cell-specific KARs in intact hippocampal circuits and operating in behaviourally defined conditions.

Abbreviations

AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid; AMPAR, AMPA receptor; DG, dentate gyrus; eIPSC, evoked IPSC; EPSC, excitatory postsynaptic current; EPSP, excitatory postsynaptic potential; IPSC, inhibitory postsynaptic current; IsAHP, short-duration afterhyperpolarising current; KAR, kainate receptor; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; O-LM, stratum oriens–lacunosum moleculare; TLE, temporal lobe epilepsy.

References

- Amaral, D.G. & Dent, J.A. (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol.*, **195**, 51–86.
- Artinian, J., Peret, A., Marti, G., Epsztein, J. & Crepel, V. (2011) Synaptic kainate receptors in interplay with INaP shift the sparse firing of dentate granule cells to a sustained rhythmic mode in temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.*, **31**, 10811–10818.
- Bahn, S., Volk, B. & Wisden, W. (1994) Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J. Neurosci.*, **14**, 5525–5547.
- Bannerman, D.M., Rawlins, J.N.P., McHugh, S.B., Deacon, R.M.J., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H.J. & Feldon, J. (2004) Regional dissociations within the hippocampus – memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. R.*, **28**, 273–283.
- Barberis, A., Sachidhanandam, S. & Mulle, C. (2008) GluR6/KA2 kainate receptors mediate slow-deactivating currents. *J. Neurosci.*, **28**, 6402–6406.
- Bettler, B. & Mulle, C. (1995) Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, **34**, 123–139.
- Bureau, I., Bischoff, S., Heinemann, S.F. & Mulle, C. (1999) Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *J. Neurosci.*, **19**, 653–663.
- Caiati, M.D., Sivakumaran, S. & Cherubini, E. (2010) In the developing rat hippocampus, endogenous activation of presynaptic kainate receptors reduces GABA release from mossy fiber terminals. *J. Neurosci.*, **30**, 1750–1759.
- Carta, M., Opazo, P., Veran, J., Athané, A., Choquet, D., Coussen, F. & Mulle, C. (2013) CaMKII-dependent phosphorylation of GluK5 mediates plasticity of kainate receptors. *EMBO J.*, **32**, 496–510.
- Castillo, P.E., Malenka, R.C. & Nicoll, R.A. (1997) Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature*, **388**, 182–186.
- Catches, J.S., Xu, J. & Contractor, A. (2012) Genetic ablation of the GluK4 kainate receptor subunit causes anxiolytic and antidepressant-like behavior in mice. *Behav. Brain Res.*, **228**, 406–414.
- Chamberlain, S.E.L., González-González, I.M., Wilkinson, K.A., Konopacki, F.A., Kantamneni, S., Henley, J.M. & Mellor, J.R. (2012) SUMOylation and phosphorylation of GluK2 regulate kainate receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.*, **15**, 845–852.
- Chamberlain, S.E.L., Sadowski, J.H.L.P., Teles-Grilo Ruivo, L.M., Atherton, L.A. & Mellor, J.R. (2013) Long-term depression of synaptic kainate receptors reduces excitability by relieving inhibition of the slow afterhyperpolarization. *J. Neurosci.*, **33**, 9536–9545.
- Chittajallu, R., Vignes, M., Dev, K.K., Barnes, J.M., Collingridge, G.L. & Henley, J.M. (1996) Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature*, **379**, 78–81.
- Clarke, V.R., Ballyk, B.A., Hoo, K.H., Mandelzys, A., Pellizzari, A., Bath, C.P., Thomas, J., Sharpe, E.F., Davies, C.H., Ornstein, P.L., Schoepp, D.D., Kamboj, R.K., Collingridge, G.L., Lodge, D. & Bleakman, D. (1997) A hippocampal GluR5 kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature*, **389**, 599–603.
- Contractor, A., Swanson, G. & Heinemann, S.F. (2001) Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron*, **29**, 209–216.
- Contractor, A., Sailer, A.W., Darstein, M., Maron, C., Xu, J., Swanson, G.T. & Heinemann, S.F. (2003) Loss of kainate receptor-mediated heterosynaptic facilitation of mossy-fiber synapses in KA2–/– mice. *J. Neurosci.*, **23**, 422–429.
- Contractor, A., Mulle, C. & Swanson, G.T. (2011) Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. *Trends Neurosci.*, **34**, 154–163.
- Copits, B.A. & Swanson, G.T. (2012) Dancing partners at the synapse: auxiliary subunits that shape kainate receptor function. *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 675–685.
- Copits, B.A. & Swanson, G.T. (2013) Kainate receptor post-translational modifications differentially regulate association with 4.1N to control activity-dependent receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.*, **288**, 8952–8965.
- Cossart, R., Esclapez, M., Hirsch, J.C., Bernard, C. & Ben-Ari, Y. (1998) GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat. Neurosci.*, **1**, 470–478.
- Cossart, R., Tyzio, R., Dinocourt, C., Esclapez, M., Hirsch, J.C., Ben-Ari, Y. & Bernard, C. (2001) Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. *Neuron*, **29**, 497–508.
- Cossart, R., Epsztein, J., Tyzio, R., Becq, H., Hirsch, J., Ben-Ari, Y. & Crépel, V. (2002) Quantal release of glutamate generates pure kainate and

- mixed AMPA/kainate EPSCs in hippocampal neurons. *Neuron*, **35**, 147–159.
- Coussen, F., Normand, E., Marchal, C., Costet, P., Choquet, D., Lambert, M., Mège, R.-M. & Mulle, C. (2002) Recruitment of the kainate receptor subunit glutamate receptor 6 by cadherin/catenin complexes. *J. Neurosci.*, **22**, 6426–6436.
- Darstein, M., Petralia, R.S., Swanson, G.T., Wenthold, R.J. & Heinemann, S.F. (2003) Distribution of kainate receptor subunits at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.*, **23**, 8013–8019.
- Epsztein, J., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y. & Crépel, V. (2005) Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. *J. Neurosci.*, **25**, 8229–8239.
- Epsztein, J., Sola, E., Represa, A., Ben-Ari, Y. & Crépel, V. (2010) A selective interplay between aberrant EPSPKA and INaP reduces spike timing precision in dentate granule cells of epileptic rats. *Cereb. Cortex*, **20**, 898–911.
- Fernandes, H.B., Catches, J.S., Petralia, R.S., Copits, B.A., Xu, J., Russell, T.A., Swanson, G.T. & Contractor, A. (2009) High-affinity kainate receptor subunits are necessary for ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron*, **63**, 818–829.
- Fisahn, A., Contractor, A., Traub, R.D., Buhl, E.H., Heinemann, S.F. & McBain, C.J. (2004) Distinct roles for the kainate receptor subunits GluR5 and GluR6 in kainate-induced hippocampal gamma oscillations. *J. Neurosci.*, **24**, 9658–9668.
- Fisahn, A., Heinemann, S.F. & McBain, C.J. (2005) The kainate receptor subunit GluR6 mediates metabotropic regulation of the slow and medium AHP currents in mouse hippocampal neurons. *J. Physiol.*, **562**, 199–203.
- Frerking, M. & Ohliger-Frerking, P. (2002) AMPA receptors and kainate receptors encode different features of afferent activity. *J. Neurosci.*, **22**, 7434–7443.
- Frerking, M., Malenka, R.C. & Nicoll, R.A. (1998) Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nat. Neurosci.*, **1**, 479–486.
- Frerking, M., Petersen, C.C. & Nicoll, R.A. (1999) Mechanisms underlying kainate receptor-mediated disinhibition in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12917–12922.
- Frerking, M., Schmitz, D., Zhou, Q., Johansen, J. & Nicoll, R.A. (2001) Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3→CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J. Neurosci.*, **21**, 2958–2966.
- Goldin, M., Epsztein, J., Jorquera, I., Represa, A., Ben-Ari, Y., Crépel, V. & Cossart, R. (2007) Synaptic kainate receptors tune oriens-lacunosum molecular interneurons to operate at theta frequency. *J. Neurosci.*, **27**, 9560–9572.
- Huxter, J.R., Zinyuk, L.E., Roloff, E.V.L., Clarke, V.R.J., Dolman, N.P., More, J.C.A., Jane, D.E., Collingridge, G.L. & Muller, R.U. (2007) Inhibition of kainate receptors reduces the frequency of hippocampal theta oscillations. *J. Neurosci.*, **27**, 2212–2223.
- Ito, K., Contractor, A. & Swanson, G.T. (2004) Attenuated plasticity of postsynaptic kainate receptors in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J. Neurosci.*, **24**, 6228–6236.
- Jane, D.E., Lodge, D. & Collingridge, G.L. (2009) Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology*, **56**, 90–113.
- Jiang, L., Xu, J., Nedergaard, M. & Kang, J. (2001) A kainate receptor increases the efficacy of GABAergic synapses. *Neuron*, **30**, 503–513.
- Kamiya, H. & Ozawa, S. (1998) Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca²⁺ influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Physiol.*, **509**(Pt. 3), 833–845.
- Klausberger, T. & Somogyi, P. (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*, **321**, 53–57.
- Ko, S., Zhao, M.-G., Toyoda, H., Qiu, C.-S. & Zhuo, M. (2005) Altered behavioral responses to noxious stimuli and fear in glutamate receptor 5 (GluR5)- or GluR6-deficient mice. *J. Neurosci.*, **25**, 977–984.
- Lanore, F., Labrousse, V.F., Szabo, Z., Normand, E., Blanchet, C. & Mulle, C. (2012) Deficits in morphofunctional maturation of hippocampal mossy fiber synapses in a mouse model of intellectual disability. *J. Neurosci.*, **32**, 17882–17893.
- Lauri, S.E., Bortolotto, Z.A., Bleakman, D., Ornstein, P.L., Lodge, D., Isaac, J.T. & Collingridge, G.L. (2001) A critical role of a facilitatory presynaptic kainate receptor in mossy fiber LTP. *Neuron*, **32**, 697–709.
- Lauri, S.E., Segerstråle, M., Vesikansa, A., Maingret, F., Mulle, C., Collingridge, G.L., Isaac, J.T.R. & Taira, T. (2005) Endogenous activation of kainate receptors regulates glutamate release and network activity in the developing hippocampus. *J. Neurosci.*, **25**, 4473–4484.
- Lauri, S.E., Vesikansa, A., Segerstråle, M., Collingridge, G.L., Isaac, J.T.R. & Taira, T. (2006) Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release. *Neuron*, **50**, 415–429.
- Lerma, J. (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 481–495.
- Lerma, J. & Marques, J.M. (2013) Kainate receptors in health and disease. *Neuron*, **80**, 292–311.
- Loureiro, J., Matias, I., Marsicano, G. & Mulle, C. (2011) Pharmacological activation of kainate receptors drives endocannabinoid mobilization. *J. Neurosci.*, **31**, 3243–3248.
- Loureiro, J., Cannich, A., Carta, M., Coussen, F., Mulle, C. & Marsicano, G. (2010) Synaptic activation of kainate receptors gates presynaptic CB(1) signaling at GABAergic synapses. *Nat. Neurosci.*, **13**, 197–204.
- Lowry, E.R., Krüyer, A., Norris, E.H., Cederroth, C.R. & Strickland, S. (2013) The GluK4 kainate receptor subunit regulates memory, mood and excitotoxic neurodegeneration. *Neuroscience*, **235**, 215–225.
- Marchal, C. & Mulle, C. (2004) Postnatal maturation of mossy fibre excitatory transmission in mouse CA3 pyramidal cells: a potential role for kainate receptors. *J. Physiol.*, **561**, 27–37.
- Marques, J.M., Rodrigues, R.J., Valbuena, S., Rozas, J.L., Selak, S., Marin, P., Aller, M.I. & Lerma, J. (2013) CRMP2 tethers kainate receptor activity to cytoskeleton dynamics during neuronal maturation. *J. Neurosci.*, **33**, 18298–18310.
- Mathern, G.W., Pretorius, J.K., Kornblum, H.I., Mendoza, D., Lozada, A., Leite, J.P., Chimelli, L., Born, D.E., Fried, I., Sakamoto, A.C., Assirati, J.A., Peacock, W.J., Ojemann, G.A. & Adelson, P.D. (1998) Altered hippocampal kainate-receptor mRNA levels in temporal lobe epilepsy patients. *Neurobiol. Dis.*, **5**, 151–176.
- Melyan, Z., Wheal, H.V. & Lancaster, B. (2002) Metabotropic-mediated kainate receptor regulation of IsAHP and excitability in pyramidal cells. *Neuron*, **34**, 107–114.
- Melyan, Z., Lancaster, B. & Wheal, H.V. (2004) Metabotropic regulation of intrinsic excitability by synaptic activation of kainate receptors. *J. Neurosci.*, **24**, 4530–4534.
- Min, M.Y., Melyan, Z. & Kullmann, D.M. (1999) Synaptically released glutamate reduces gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic inhibition in the hippocampus via kainate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9932–9937.
- Monaghan, D.T. & Cotman, C.W. (1982) The distribution of [3H]kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res.*, **252**, 91–100.
- Motazacker, M.M., Rost, B.R., Hucho, T., Garshasbi, M., Kahrizi, K., Ullmann, R., Abedini, S.S., Nieh, S.E., Amini, S.H., Goswami, C., Tzschach, A., Jensen, L.R., Schmitz, D., Ropers, H.H., Najmabadi, H. & Kuss, A.W. (2007) A defect in the ionotropic glutamate receptor 6 gene (GRIK2) is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.*, **81**, 792–798.
- Mulle, C., Sailer, A., Pérez-Otaño, I., Dickinson-Anson, H., Castillo, P.E., Bureau, I., Maron, C., Gage, F.H., Mann, J.R., Bettler, B. & Heinemann, S.F. (1998) Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature*, **392**, 601–605.
- Mulle, C., Sailer, A., Swanson, G.T., Brana, C., O’Gorman, S., Bettler, B. & Heinemann, S.F. (2000) Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron*, **28**, 475–484.
- Nadler, J.V. (2003) The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochem. Res.*, **28**, 1649–1658.
- Nakashiba, T., Young, J.Z., McHugh, T.J., Buhl, D.L. & Tonegawa, S. (2008) Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science*, **319**, 1260–1264.
- Nicoll, R.A. & Schmitz, D. (2005) Synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 863–876.
- Nistico, R., Dargan, S.L., Amici, M., Collingridge, G.L. & Bortolotto, Z.A. (2011) Synergistic interactions between kainate and mGlu receptors regulate bouton Ca²⁺ signalling and mossy fibre LTP. *Sci. Rep.*, **1**, 103–112.
- Partovi, D. & Frerking, M. (2006) Presynaptic inhibition by kainate receptors converges mechanistically with presynaptic inhibition by adenosine and GABAB receptors. *Neuropharmacology*, **51**, 1030–1037.
- Paternain, A.V., Morales, M. & Lerma, J. (1995) Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron*, **14**, 185–189.
- Paternain, A.V., Herrera, M.T., Nieto, M.A. & Lerma, J. (2000) GluR5 and GluR6 kainate receptor subunits coexist in hippocampal neurons and coassemble to form functional receptors. *J. Neurosci.*, **20**, 196–205.

- Perrais, D., Pinheiro, P.S., Jane, D.E. & Mulle, C. (2009) Antagonism of recombinant and native GluK3-containing kainate receptors. *Neuropharmacology*, **56**, 131–140.
- Perrais, D., Veran, J. & Mulle, C. (2010) Gating and permeation of kainate receptors: differences unveiled. *Trends Pharmacol. Sci.*, **31**, 516–522.
- Pickard, B.S., Malloy, M.P., Christoforou, A., Thomson, P.A., Evans, K.L., Morris, S.W., Hampson, M., Porteous, D.J., Blackwood, D.H.R. & Muir, W.J. (2006) Cytogenetic and genetic evidence supports a role for the kainate-type glutamate receptor gene, GRIK4, in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol. Psychiatr.*, **11**, 847–857.
- Pinheiro, P. & Mulle, C. (2006) Kainate receptors. *Cell Tissue Res.*, **326**, 457–482.
- Pinheiro, P.S., Perrais, D., Coussen, F., Barhanin, J., Bettler, B., Mann, J.R., Malva, J.O., Heinemann, S.F. & Mulle, C. (2007) GluR7 is an essential subunit of presynaptic kainate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 12181–12186.
- Pinheiro, P.S., Lanore, F., Veran, J., Artinian, J., Blanchet, C., Crepel, V., Perrais, D. & Mulle, C. (2013) Selective block of postsynaptic kainate receptors reveals their function at hippocampal mossy fiber synapses. *Cereb. Cortex*, **23**, 323–331.
- Rebola, N., Sachidhanandam, S., Perrais, D., Cunha, R.A. & Mulle, C. (2007) Short-term plasticity of kainate receptor-mediated EPSCs induced by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.*, **27**, 3987–3993.
- Rebola, N., Lujan, R., Cunha, R.A. & Mulle, C. (2008) Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, **57**, 121–134.
- Represa, A., Tremblay, E. & Ben-Ari, Y. (1987) Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers: localization and plasticity. *Neuroscience*, **20**, 739–748.
- Rodriguez-Moreno, A. & Lerma, J. (1998) Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron*, **20**, 1211–1218.
- Rodriguez-Moreno, A. & Sihra, T.S. (2007) Kainate receptors with a metabotropic modus operandi. *Trends Neurosci.*, **30**, 630–637.
- Ruiz, A., Sachidhanandam, S., Urvik, J.K., Coussen, F. & Mulle, C. (2005) Distinct subunits in heteromeric kainate receptors mediate ionotropic and metabotropic function at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.*, **25**, 11710–11718.
- Sachidhanandam, S., Blanchet, C., Jeantet, Y., Cho, Y.H. & Mulle, C. (2009) Kainate receptors act as conditional amplifiers of spike transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.*, **29**, 5000–5008.
- Sallert, M., Rantamaki, T., Vesikansa, A., Anthoni, H., Harju, K., Yli-Kauhaluoma, J., Taira, T., Castren, E. & Lauri, S.E. (2009) Brain-derived neurotrophic factor controls activity-dependent maturation of CA1 synapses by downregulating tonic activation of presynaptic kainate receptors. *J. Neurosci.*, **29**, 11294–11303.
- Schmitz, D., Mellor, J. & Nicoll, R.A. (2001) Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science*, **291**, 1972–1976.
- Scott, R., Lalic, T., Kullmann, D.M., Capogna, M. & Rusakov, D.A. (2008) Target-cell specificity of kainate autoreceptor and Ca²⁺-store-dependent short-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *J. Neurosci.*, **28**, 13139–13149.
- Segerstrale, M., Juuri, J., Lanore, F., Piepponen, P., Lauri, S.E., Mulle, C. & Taira, T. (2010) High firing rate of neonatal hippocampal interneurons is caused by attenuation of afterhyperpolarizing potassium currents by tonically active kainate receptors. *J. Neurosci.*, **30**, 6507–6514.
- Selak, S., Paternain, A.V., Aller, I.M., Pico, E., Rivera, R. & Lerma, J. (2009) A role for SNAP25 in internalization of kainate receptors and synaptic plasticity. *Neuron*, **63**, 357–371.
- Straub, C., Hunt, D.L., Yamasaki, M., Kim, K.S., Watanabe, M., Castillo, P.E. & Tomita, S. (2011) Distinct functions of kainate receptors in the brain are determined by the auxiliary subunit Neto1. *Nat. Neurosci.*, **14**, 866–873.
- Sun, H.Y. & Dobrunz, L.E. (2006) Presynaptic kainate receptor activation is a novel mechanism for target cell-specific short-term facilitation at schaffer collateral synapses. *J. Neurosci.*, **26**, 10796–10807.
- Sun, H.Y., Bartley, A.F. & Dobrunz, L.E. (2009) Calcium-permeable presynaptic kainate receptors involved in excitatory short-term facilitation onto somatostatin interneurons during natural stimulus patterns. *J. Neurophysiol.*, **101**, 1043–1055.
- Sylwestrak, E.L. & Ghosh, A. (2012) Elfn1 regulates target-specific release probability at CA1-interneuron synapses. *Science*, **338**, 536–540.
- Tang, M., Pelkey, K.A., Ng, D., Ivakine, E., McBain, C.J., Salter, M.W. & McInnes, R.R. (2011) Neto1 is an auxiliary subunit of native synaptic kainate receptors. *J. Neurosci.*, **31**, 10009–10018.
- Tashiro, A., Dunaevsky, A., Blazeski, R., Mason, C.A. & Yuste, R. (2003) Bidirectional regulation of hippocampal mossy fiber filopodial motility by kainate receptors: a two-step model of synaptogenesis. *Neuron*, **38**, 773–784.
- Vargas, J.R., Takahashi, D.K., Thomson, K.E. & Wilcox, K.S. (2013) The expression of kainate receptor subunits in hippocampal astrocytes after experimentally induced status epilepticus. *J. Neuropath. Exp. Neur.*, **72**, 919–932.
- Vesikansa, A., Sakha, P., Kuja-Panula, J., Molchanova, S., Rivera, C., Huttunen, H.J., Rauvala, H., Taira, T. & Lauri, S.E. (2012) Expression of GluK1c underlies the developmental switch in presynaptic kainate receptor function. *Sci. Rep.*, **2**, 310–321.
- Vignes, M. & Collingridge, G.L. (1997) The synaptic activation of kainate receptors. *Nature*, **388**, 179–182.
- Vincent, P. & Mulle, C. (2009) Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience*, **158**, 309–323.
- Wisden, W. & Seeburg, P.H. (1993) A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J. Neurosci.*, **13**, 3582–3598.
- Wondolowski, J. & Frerking, M. (2009) Subunit-dependent postsynaptic expression of kainate receptors on hippocampal interneurons in area CA1. *J. Neurosci.*, **29**, 563–574.
- Wyeth, M.S., Pelkey, K.A., Petralia, R.S., Salter, M.W., McInnes, R.R. & McBain, C.J. (2014) Neto auxiliary protein interactions regulate kainate and NMDA receptor subunit localization at mossy fiber-CA3 pyramidal cell synapses. *J. Neurosci.*, **34**, 622–628.
- Yang, E.J., Harris, A.Z. & Pettit, D.L. (2006) Variable kainate receptor distributions of oriens interneurons. *J. Neurophysiol.*, **96**, 1683–1689.
- Yang, E.J., Harris, A.Z. & Pettit, D.L. (2007) Synaptic kainate currents reset interneuron firing phase. *J. Physiol.*, **578**, 259–273.
- Zhang, W., St-Gelais, F., Grabner, C.P., Trinidad, J.C., Sumioka, A., Morimoto-Tomita, M., Kim, K.S., Straub, C., Burlingame, A.L., Howe, J.R. & Tomita, S. (2009) A transmembrane accessory subunit that modulates kainate-type glutamate receptors. *Neuron*, **61**, 385–396.

Annexe 2

Titre : Scribble1/AP2 Complex Coordinates NMDA Receptor Endocytic Recycling

Nicolas H. Piguel,^{1,2} Sabine Fiebre,^{3,4} Jean-Michel Blanc,^{1,5,6} Mario Carta,^{3,4} Maïté M. Moreau,^{1,2} Enora Moutin,^{7,8,9} Vera L. Pinheiro,^{1,2} Chantal Medina,^{1,2} Jerome Ezan,^{1,2} Léa Lasvaux,^{1,2} François Loll,^{1,2} Christelle M. Durand,^{1,2} Kai Chang,¹⁰ Ronald S. Petralia,^{10,11} Robert J. Wenthold,^{10,14} F. Anne Stephenson,¹² Laurent Vuillard,⁶ Hervé Darbon,⁵ Julie Perroy,^{7,8,9} Christophe Mülle,^{3,4} Mireille Montcouquiol,^{1,2} Claudia Racca,¹³ and Nathalie Sans^{1,2,*}

¹Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, Neurocentre Magendie, INSERM, U862, 33000 Bordeaux, France

²Neurocentre Magendie, University of Bordeaux, U862, 33000 Bordeaux, France

³Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, University of Bordeaux, UMR 5297, 33000 Bordeaux, France

⁴Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, CNRS, UMR 5297, 33000 Bordeaux, France

⁵Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR 7257, Campus de Luminy, CNRS/Aix-Marseille Université, 13288 Marseille, France

⁶BioXtal Structural Biology Unit, Campus de Luminy, 13288 Marseille, France

⁷UMR-5203, Institut de Génétique Fonctionnelle, CNRS, 34000 Montpellier, France

⁸INSERM, U661, 34000 Montpellier, France

⁹Universités de Montpellier 1 and 2, UMR 5203, 34000 Montpellier, France

¹⁰Laboratory of Neurochemistry, National Institute on Deafness and Other Communication Disorders, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

¹¹Advanced Imaging Core of NIDCD, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

¹²University College London School of Pharmacy, London WC1N 1AX, UK

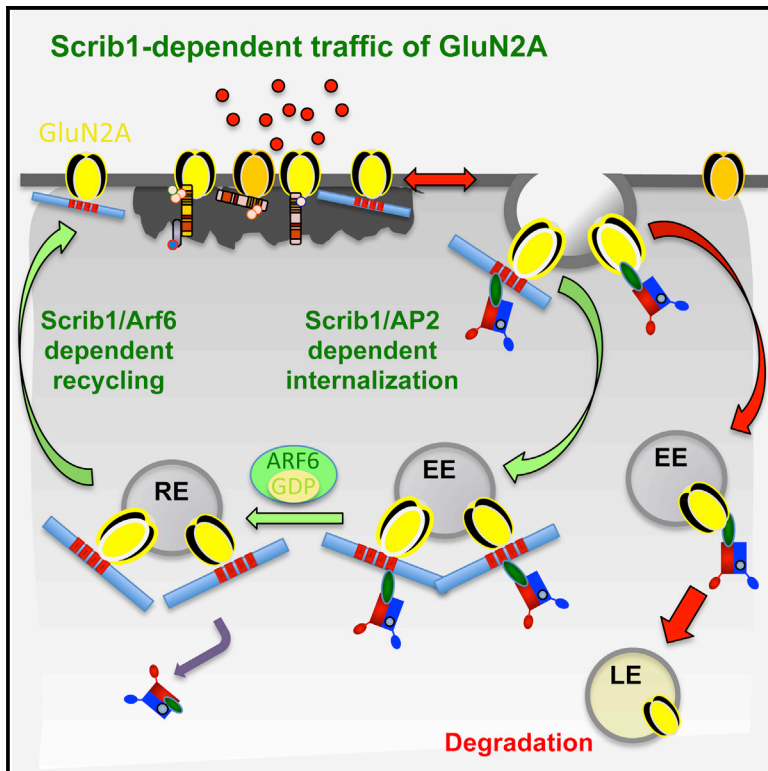
¹³Institute of Neuroscience, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, UK

*Correspondance: nathalie.sans@inserm.fr

Cell Reports

Scribble1/AP2 Complex Coordinates NMDA Receptor Endocytic Recycling

Graphical Abstract



Authors

Nicolas H. Piguel, Sabine Fiebre, ..., Claudia Racca, Nathalie Sans

Correspondence

nathalie.sans@inserm.fr

In Brief

Scribble1 (Scrib1) plays a major role in apico-basal and planar cell polarity in epithelial cells and was recently implicated in synaptic transmission and plasticity. Here, Piguel et al. report that Scrib1 is a key mediator of the endocytic sorting of NMDARs through its selective interactions with the AP2 complex. This Scrib1-dependent mechanism is likely to be involved in the regulation of synapse function in numerous physiological processes and pathological states that involve NMDARs.

Highlights

Scrib1 is regulated in an activity-dependent manner

Scrib1 drives the recycling of GluN2A subunits

AP2 interacts with Scrib1 YxxR motif to control NMDAR postendocytic traffic

Scrib1 is required for NMDAR maintenance at CA3-CA1 synapses



Scribble1/AP2 Complex Coordinates NMDA Receptor Endocytic Recycling

Nicolas H. Piguel,^{1,2} Sabine Fiebre,^{3,4} Jean-Michel Blanc,^{1,5,6} Mario Carta,^{3,4} Maïté M. Moreau,^{1,2} Enora Moutin,^{7,8,9} Vera L. Pinheiro,^{1,2} Chantal Medina,^{1,2} Jerome Ezan,^{1,2} Léa Lasvaux,^{1,2} François Loll,^{1,2} Christelle M. Durand,^{1,2} Kai Chang,¹⁰ Ronald S. Petralia,^{10,11} Robert J. Wenthold,^{10,14} F. Anne Stephenson,¹² Laurent Vuillard,⁶ Hervé Darbon,⁵ Julie Perroy,^{7,8,9} Christophe Mulle,^{3,4} Mireille Montcouquiol,^{1,2} Claudia Racca,¹³ and Nathalie Sans^{1,2,*}

¹Physiopathologie de la Plasticité Neuronale, Neurocentre Magendie, INSERM, U862, 33000 Bordeaux, France

²Neurocentre Magendie, University of Bordeaux, U862, 33000 Bordeaux, France

³Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, University of Bordeaux, UMR 5297, 33000 Bordeaux, France

⁴Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, CNRS, UMR 5297, 33000 Bordeaux, France

⁵Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR 7257, Campus de Luminy, CNRS/Aix-Marseille Université, 13288 Marseille, France

⁶BioXtal Structural Biology Unit, Campus de Luminy, 13288 Marseille, France

⁷UMR-5203, Institut de Génétique Fonctionnelle, CNRS, 34000 Montpellier, France

⁸INSERM, U661, 34000 Montpellier, France

⁹Universités de Montpellier 1 and 2, UMR 5203, 34000 Montpellier, France

¹⁰Laboratory of Neurochemistry, National Institute on Deafness and Other Communication Disorders, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

¹¹Advanced Imaging Core of NIDCD, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA

¹²University College London School of Pharmacy, London WC1N 1AX, UK

¹³Institute of Neuroscience, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, UK

¹⁴Deceased

*Correspondence: nathalie.sans@inserm.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.017>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

SUMMARY

The appropriate trafficking of glutamate receptors to synapses is crucial for basic synaptic function and synaptic plasticity. It is now accepted that NMDA receptors (NMDARs) internalize and are recycled at the plasma membrane but also exchange between synaptic and extrasynaptic pools; these NMDAR properties are also key to governing synaptic plasticity. Scribble1 is a large PDZ protein required for synaptogenesis and synaptic plasticity. Herein, we show that the level of Scribble1 is regulated in an activity-dependent manner and that Scribble1 controls the number of NMDARs at the plasma membrane. Notably, Scribble1 prevents GluN2A subunits from undergoing lysosomal trafficking and degradation by increasing their recycling to the plasma membrane following NMDAR activation. Finally, we show that a specific YxxR motif on Scribble1 controls these mechanisms through a direct interaction with AP2. Altogether, our findings define a molecular mechanism to control the levels of synaptic NMDARs via Scribble1 complex signaling.

INTRODUCTION

NMDA receptors (NMDARs) are widely distributed in the brain, where they play a key role in synapse development, synaptic

transmission, and plasticity (Traynelis et al., 2010). GluN2A and GluN2B are differentially localized in neurons, and GluN2A is reportedly more stable and synaptic than GluN2B, which is more mobile and preferentially, but not exclusively, found at extrasynaptic sites (Lau and Zukin, 2007; Wenthold et al., 2003; Yashiro and Philpot, 2008). The polarized trafficking process of GluN2A and GluN2B has been intensively studied, but the pathways controlling NMDAR trafficking processes remain poorly understood (Lau and Zukin, 2007; Wenthold et al., 2003; Yashiro and Philpot, 2008).

PSD-95/discs-large/ZO-1 (PDZ) domain-containing proteins were identified as the major synaptic scaffolding proteins anchoring the NMDAR at glutamatergic synapses (Elias and Nicoll, 2007; Sheng and Hoogenraad, 2007). The initial PDZ-based interaction studies with membrane-associated guanylate kinases (MAGUKs) led to the identification of many PDZ proteins and their roles in glutamate receptor (GluR) anchoring and trafficking. It is now believed that NMDARs are dynamically associated with PDZ proteins that play various and specific roles in their trafficking to and/or from synapses, either by direct sorting, exocytosis from internal compartments, internalization, recycling, or lateral movements (Elias and Nicoll, 2007; Groc et al., 2009; Lau and Zukin, 2007; Sheng and Hoogenraad, 2007; Wenthold et al., 2003; Yashiro and Philpot, 2008). Synaptic NMDARs appear to be exchanged with extrasynaptic receptors and to be recycled through clathrin-dependent endocytosis, but NMDAR subunits seem to behave differently (Groc et al., 2006; Lavezzari et al., 2004; Montgomery et al., 2005; Pérez-Otaño et al., 2006; Prybylowski et al., 2005; Scott et al., 2004). GluN2A subunits are preferentially trafficked through the late endosome

pathway for degradation after internalization; GluN2B subunits are constitutively recycled (Lau and Zukin, 2007; Lavezzari et al., 2004). Moreover, during activation, the presence of GluN2A at synapses is favored and GluN2B is degraded (Barria and Malinow, 2002; Jurd et al., 2008). Several proteins, such as PDZ proteins (i.e., MAGUKs; Chung et al., 2004; Howard et al., 2010; Losi et al., 2003; Mauceri et al., 2007; Sans et al., 2003), soluble NSF attachment protein receptor (SNARE)-related proteins (Lau et al., 2010; Sans et al., 2003; Suh et al., 2010), or kinases (Prybylowski et al., 2005; Sanz-Clemente et al., 2010, 2013) can specifically affect membrane NMDAR subunit levels and the GluN2A/GluN2B ratio. This complex trafficking of NMDARs participates in the fine-tuning of excitatory synapses and in some types of long-term potentiation and long-term depression (Yashiro and Philpot, 2008).

Scribble1 (Scrib1) is a highly conserved protein that contains 16 leucine-rich repeat domains, two LAP domains, and four PDZ domains. Recently, we showed that Scrib1 participates in the development of hippocampal neurons and that a *circletail* mutant form impacts not only learning and memory but also social behavior (Moreau et al., 2010). Here, we decipher an original molecular and functional relationship between Scrib1 and NMDAR subunits that identifies Scrib1 as a key regulator of synaptic fine-tuning of excitatory synapses.

RESULTS

Scribble1 Interacts with the PDZ Binding Domain of the GluN2A and GluN2B Subunits

We performed a yeast two-hybrid screen with the PDZ domains of Scrib1 to probe a mouse P10 brain yeast two-hybrid library as described previously (Yi et al., 2007). We isolated a clone containing the sequence of GluN2A. In a two-hybrid screen with the C termini of the GluN2A subunit as bait, we isolated a clone that encoded the entire PDZ domain region of Scrib1. Consequently, we used the PDZ domains of Scrib1 as prey and found that pGBKT7-GluN2A or -GluN2B chimeras interacted strongly with these PDZ domains, whereas removal of the last seven amino acids of GluN2A or GluN2B (including the PDZ binding domain or PDZ-BD) prevented the interaction (Figure 1A). In human embryonic kidney 293 (HEK293) cells cotransfected with GFP-Scrib1, GFP-Scrib1 Δ PDZ, and Tac-GluN2A or Tac-GluN2B chimeric transmembrane proteins, we were able to coimmunoprecipitate GFP-Scrib1. This interaction was lost upon deletion of the PDZ domains of Scrib1 (GFP-Scrib1 Δ PDZ), indicating that Scrib1 interacts with NMDARs through its PDZ domain (Figure 1B). In pull-down experiments, the PDZ domains 2 and 3 of Scrib1 were able to bind independently to GluN2A and GluN2B fusion proteins (data not shown). Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments revealed that both the GluN2A and GluN2B peptides bound to PDZ2 with a K_D of approximately 60 μ M for GluN2A and 48 μ M for GluN2B and to PDZ3 with a K_D of 11.6 μ M for GluN2A and 12.3 μ M for GluN2B. The binding of PDZ4 was weaker, with a K_D over 150 μ M, whereas no binding was observed with PDZ1 (Figures 1C and 1D; Table S1). We also tested the PDZ binding domain mutant peptides (GluN2A^{S1462A} and GluN2B^{S1480A}) and observed no binding (Figures 1E and 1F; Table S1). Taken together, these data demonstrate that

Scrib1 PDZ2 and PDZ3 interact specifically with the PDZ-BD of the GluN2A and GluN2B subunits.

The Spatio temporal Localization of Scribble1 Matches that of NMDARs

We examined the temporal expression and localization of Scrib1 in the rat brain. As illustrated in Figure 1G, Scrib1 expression level decreased from postnatal day 0 (P0) to adult with a persistent expression at P120. Other related proteins, such as densin-180 and Erbin, displayed different developmental profiles (Figure 1G). The early and strong expression of Scrib1 matches that of GluN2B and overlaps with GluN2A in later stages (starting at P9), which is consistent with an interaction of Scrib1 with the GluN subunits. The interaction of Scrib1 with the GluN1, GluN2A, and GluN2B subunits, but not with the GABA_A receptor β 3 subunit, was confirmed by coimmunoprecipitation (coIP) (Figure 1H).

Using postembedding immunogold electron microscopy, we showed that Scrib1 is localized with NMDARs postsynaptically at excitatory synapses in the stratum radiatum of the CA1 region of the hippocampus (Figures 1I–1K and S1A–S1G; Scrib1: 5 nm gold particles and GluN1: 15 nm gold particles). We also found Scrib1 associated with NMDARs in intracellular vesicles or organelles in the dendritic spine (Figures S1H and S1I). These localizations are consistent with our in vitro data and coIP experiments.

Scrib1 and GluN2A Levels Increase at Active Synapses

To investigate whether the levels of Scrib1 were relevant for function, we analyzed whether they were regulated by synaptic activity. We used the Na⁺ channel blocker tetrodotoxin to block synaptic activity or the GABA_A receptor antagonist bicuculline to increase excitatory activity by blocking inhibitory GABAergic transmission in cultured neurons. Enriched synaptosome preparations showed that Scrib1 levels mirrored GluN2A profile of expression and accumulated in active synaptosome fractions (Figures 2A and 2B). These data suggest that levels of Scrib1 and GluN2A-containing NMDARs are correlated and that Scrib1 participates in NMDAR regulation at the membrane to modify synaptic strength.

To investigate whether Scrib1 and NMDAR levels were also regulated by activity in vivo, we examined whether exposure of adult rats to a new enriched environment modified Scrib1 and NMDAR levels. Rats were subjected to an enriched open field for 10 min and left undisturbed in their home cages for 1 hr before collecting the hippocampus (enriched open field [EOF] animals), whereas control group rats were placed in their home cages until tissue collection (control; Figure 2C). Results showed that Scrib1 levels increased significantly in hippocampi of EOF rats compared to the control group ($p < 0.01$; Figure 2D). This upregulation of Scrib1 in the hippocampus of EOF rats was accompanied by a significant increase of GluN2A and a slight but significant reduction of GluN2B in the synaptosomal fraction ($p < 0.05$; Figure 2E). In hippocampal membrane fraction, Scrib1 coimmunoprecipitated GluN2A around 30% more in EOF condition than in basal conditions whereas the levels of GluN2B were not significantly different (Figures 2F and 2G). These results show that exposure to a new environment leads to a major increase in

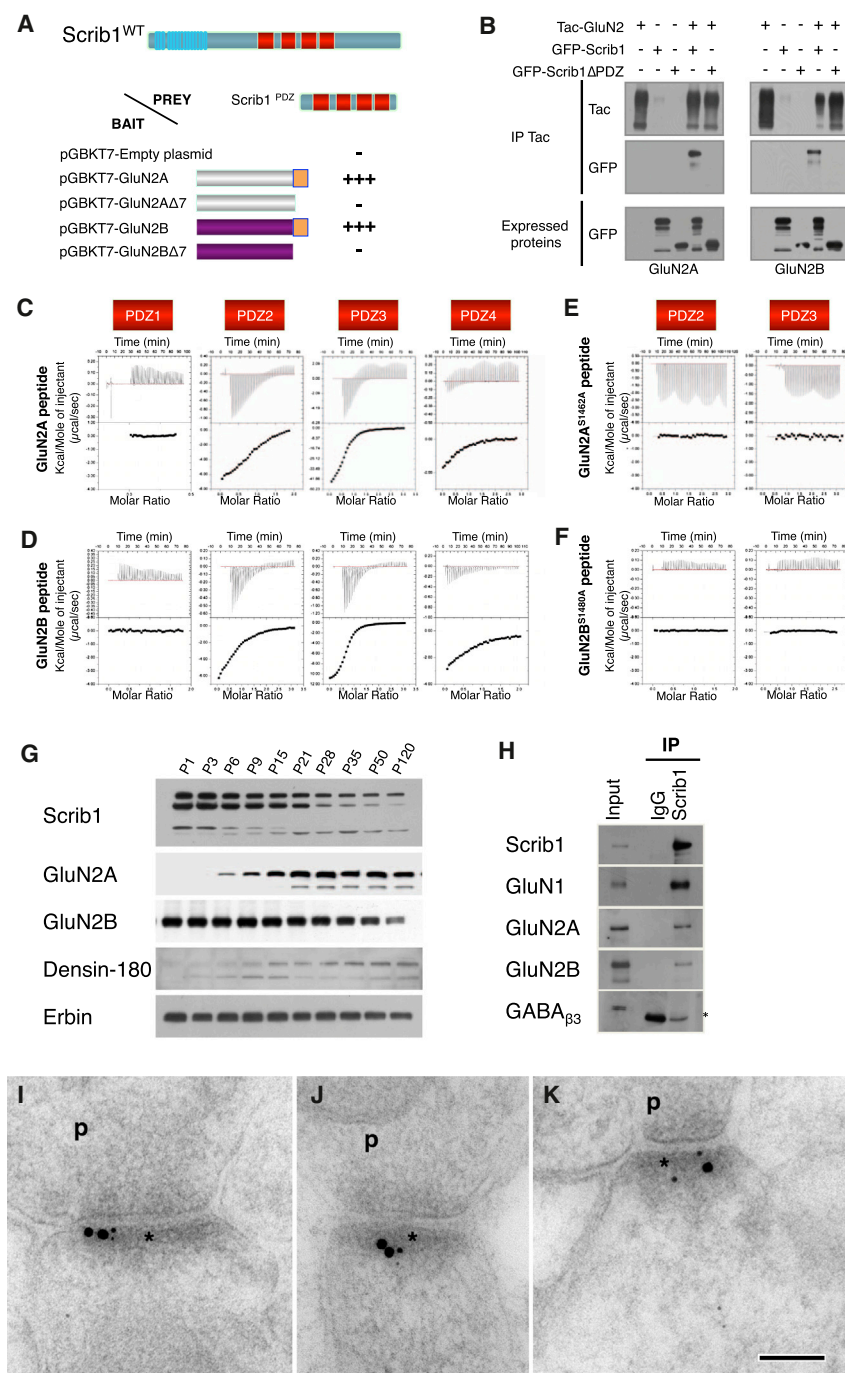


Figure 1. Scrib1 Interacts and Colocalizes with GluN2 Subunits

(A) Directed yeast two-hybrid assays with GluN2A, GluN2B, and Scrib1 constructs. Schematic domain structures of GluN2 C-terminal used as bait. Scrib1 binds the PDZ binding domain of GluN2A and GluN2B. For the same concentration and same dilution, >40 colonies grew on 4DO plates for 2A and 2B baits whereas none for Δ7 constructs after 4 days at 30°C.

(B) Lysates from HEK293 cells transfected with GFP-Scrib1 or GFP-Scrib1^{ΔPDZ} and Tac-GluN2A or Tac-GluN2B and immunoprecipitated with Tac antibodies. The precipitates were immunoblotted with anti-GFP or anti-Tac. GFP-Scrib1 coimmunoprecipitates with Tac-GluN2A and TacGluN2B.

(C–F) Calorimetric titrations of Scrib1 PDZs interaction with GluN2A (C), GluN2B (D), GluN2A^{S1462A} (E), and GluN2B^{S1480A} (F) peptides. Top: ITC heat variation after each ligand; the first peak corresponds to a small amount of injected ligand. Bottom: the corrected heat developed per mole of ligand. This curve allows the determination of the dissociation constant using the theory of Wiseman isotherm.

(G) Developmental protein expression pattern of Scrib1 and the GluN2A and GluN2B from P1 to P120 in rat hippocampus homogenates (30 μg protein per lane) analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with the antibodies described in the Supplemental Experimental Procedures. At all ages, the samples were analyzed with the different antibodies obtained from the same preparation of hippocampus. Representative results, n = 3 experiments.

(H) Endogenous coIP of Scrib1, GluN2A, and GluN2B from the hippocampus. The 100,000 × g detergent supernatants were immunoprecipitated with Scrib1 antibodies. The precipitates show positive immunoblotting for GluN2A and GluN2B subunits, but not β3-containing GABA_A receptor (star, bands in IP correspond to immunoglobulin G [IgG]).

(I–K) Immunogold localization of Scrib1 (5 nm) and its colocalization with GluN1 (15 nm) in hippocampal CA1 stratum radiatum synapses. Note the double labeling in PSD. Asterisk, postsynaptic density; p, presynaptic terminal. The scale bar represents 100 nm.

Scrib1 expression and modifies the amount of Scrib1-NMDAR subunit content in the hippocampus.

Scrib1 Levels Regulate Native NMDA Surface Receptors in Hippocampal Neurons

To determine the consequences of the levels of Scrib1 on the surface expression of native GluN2A and GluN2B receptors, we used loss- and gain-of-function approaches. We used the N-terminal antibodies developed against GluN2A (Groc et al., 2006) and the

commercially available N-terminal GluN2B from Alomone Labs. Number of puncta and global intensity of native GluN2A or GluN2B increased in the presence of GFP-Scrib1 protein (GluN2A puncta: Ctrl: 23.33 ± 0.75 versus Scrib1: 27.75 ± 0.99 , $p < 0.05$; intensity: 74.67 ± 2.55 versus 90.23 ± 3.96 , $p < 0.01$; GluN2B puncta: 20.97 ± 0.64 versus 25.22 ± 1.26 , $p < 0.01$; intensity: 96.57 ± 3.85 versus 113.73 ± 5.25 , $p < 0.05$; Figures 3A, 3B, 3D, and 3E), whereas surface staining for both subunits was not different in the presence of a mutated form of Scrib1 missing the two PDZ domains implicated in the interaction with NMDAR (GluN2A puncta: Ctrl: 23.33 ± 0.75 versus GFP-Scrib1^{ΔPDZ2-3}: 21.51 ± 0.61 , $p = 0.065$; intensity: 74.67 ± 2.55 versus 78.47 ± 3.25 , $p = 0.36$; GluN2B puncta: 20.97 ± 0.64 puncta versus

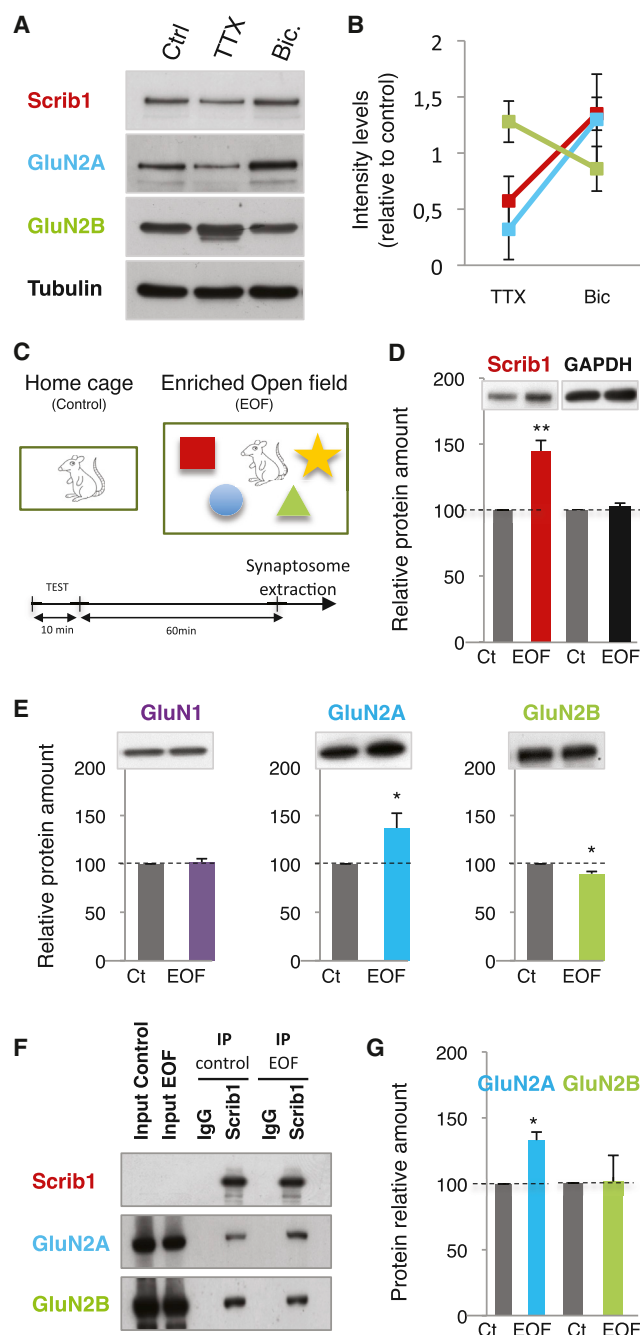


Figure 2. Expression of Scrib1 and GluN Proteins Is Regulated by Activity in the Hippocampus

(A) Immunoblot analysis of Scrib1, GluN2A, GluN2B, and tubulin in synaptic fractions isolated from cortical neurons treated 48 hr with control solution, TTX (2 μ M), or bicuculline (Bic.) (40 μ M).

(B) Quantitative analysis of the abundance of Scrib1 (red), GluN2A (blue), and GluN2B (green) in synaptic fractions treated with TTX or bicuculline of the band intensities 48 hr after drug treatment and normalized to the control values from the untreated control neuron synaptic fraction. Note that abscissa values reflect drug treatments. All data are presented as mean $\pm$ SEM (n = 3 experiments). Error bars are all $\pm$ SEM.

(C) Experimental design protocol of the hippocampal synaptosome extraction after new environment stimulation in an enriched open field (EOF).

20.35 $\pm$ 0.52, p = 0.45; intensity: 96.57 $\pm$ 3.85 versus 97.2 $\pm$ 3.86, p = 0.48; Figures 3A, 3C, 3D, and 3F). On the other hand, down-regulation of Scrib1 led to a decrease of the density of surface staining of native GluN2A or native GluN2B (GluN2A: small hairpin control [shCtrl]: 23.69 $\pm$ 0.67 versus shScrib1: 16.82 $\pm$ 0.83, p < 0.001; GluN2B: 20.03 $\pm$ 0.85 versus 16.23 $\pm$ 0.49, p < 0.01; Figures 3G, 3H, 3J, and 3K). The total intensity for GluN2A in dendrites measured as the ratio of the surface-staining intensity per unit area was also decreased (69.99 $\pm$ 2.81 versus 58.05 $\pm$ 2.9, p < 0.05; Figures 3G and 3I). Surprisingly, a similar quantification revealed no change in this ratio for GluN2B (92.96 $\pm$ 4.48 versus 104.02 $\pm$ 4.32, p = 0.08; Figures 3J and 3L). We found the same trend with transfected myc-GluN2A or myc-GluN2B (Figure S2). We were able to rescue the sh-induced phenotype using an sh-resistant form of Scrib1, but not with the mutated form of Scrib1 missing the two PDZ domains (GluN2A/shScrib1 puncta: rescue by Scrib1: 24.42 $\pm$ 0.78 versus no rescue by GFP-Scrib1 ^{Δ PDZ2-3}: 16.11 $\pm$ 0.46, p < 0.001; intensity: 74.99 $\pm$ 3.66 versus 57.09 $\pm$ 3.32, p < 0.01; GluN2B/shScrib1 puncta: rescue: 21.89 $\pm$ 0.9 versus no rescue: 16.09 $\pm$ 0.53, p < 0.01; intensity: 94.62 $\pm$ 4.47 versus 104.64 $\pm$ 5.43, p = 0.17; Figures 3G–3I and 3J–3L). Scrib1 overexpression or downregulation had no impact on native α 1-containing GABA_A receptors (Figures 3M and 3N) or on the number of synapses (Figures 3O and 3P). Altogether, our results show that Scrib1 levels affect NMDA surface receptors via PDZ2 and PDZ3 interaction with GluN2 because the Scrib1 mutated form missing these two specific domains has no effect on NMDAR trafficking.

Differential Regulation of Native NMDA Surface Receptors after D-Serine Stimulation prior to NMDA/D-Serine Activation

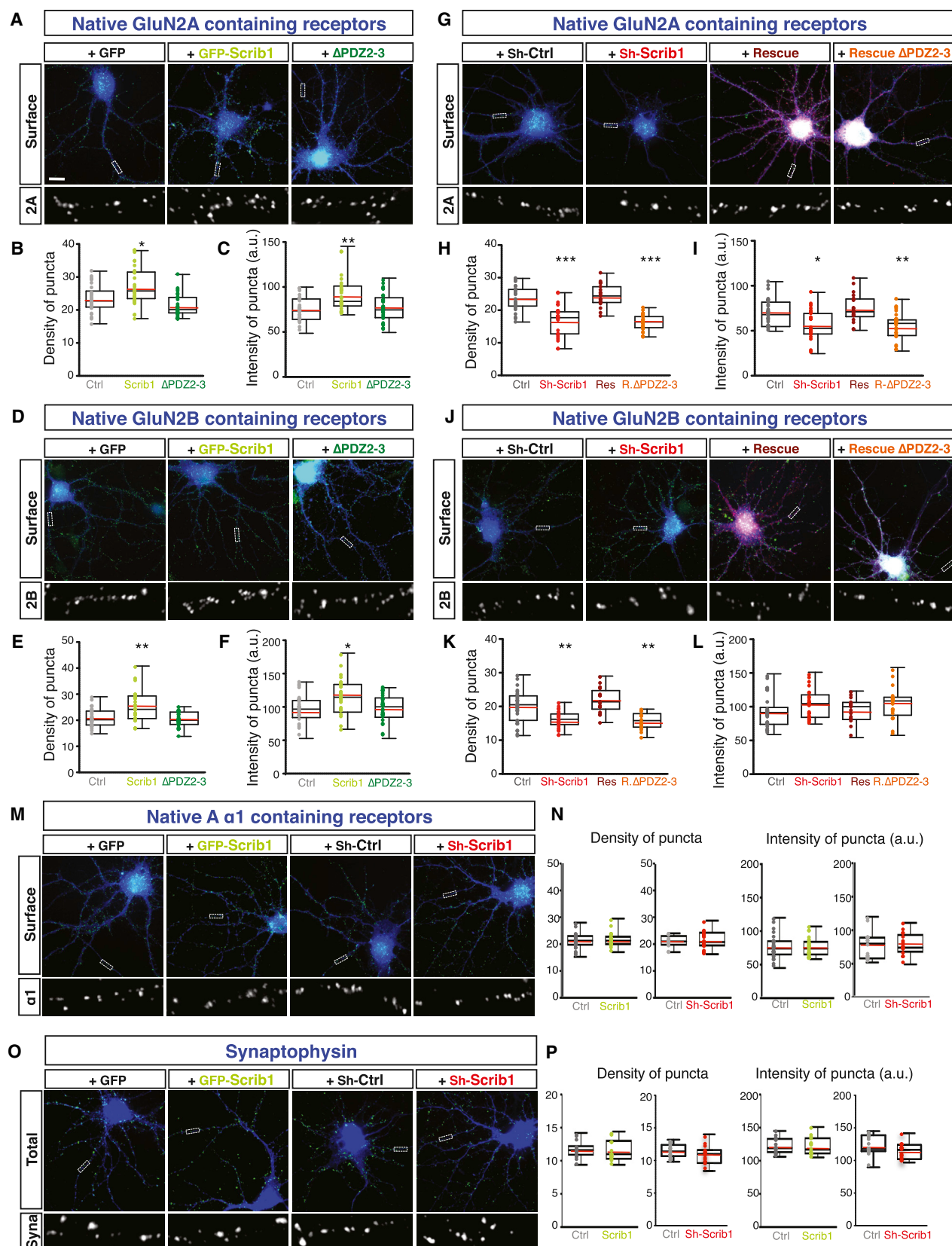
To investigate whether a stimulation of the receptors could differently modify the surface expression of NMDAR depending on Scrib1 levels, we compared basal conditions to D-serine stimulation prior to NMDA/D-serine activation, thus “priming” the NMDAR (Nong et al., 2003). After stimulation, surface staining of native GluN2A increased with increased Scrib1 levels and decreased with decreased Scrib1 levels as shown previously without stimulation (GluN2A puncta: Ctrl: 24.97 $\pm$ 0.56 versus Scrib1: 29.28 $\pm$ 0.84 puncta, p < 0.001; shCtrl: 24.36 $\pm$ 0.34 versus shScrib1: 20.92 $\pm$ 0.38, p < 0.001; Figures S3A and S3B). Total intensity varied in the same manner (Figures S3A and S3B). However, after stimulation, surface staining of native GluN2B

(D) Quantitation of Scrib1 and GAPDH levels in hippocampus extracts by western blot.

(E) Western blot of GluN1, GluN2A, and GluN2B protein in P2 subcellular fractionation of rat hippocampus lysates. Error bars are all $\pm$ SEM.

(F) Endogenous coIP of GluN2A and GluN2B with Scrib1 from the hippocampus of control or EOF rats. The 100,000 $\times$ g detergent supernatants were immunoprecipitated with anti-Scrib1. Ten microliters of bound immunoprecipitate fractions were separated by SDS-PAGE; immunoblotted; and incubated with Scrib1, GluN2A, or GluN2B antibodies. Percentage of immunostaining in the bound fraction is shown in (G).

(G) Quantitation of the IP bands normalized to control (100% = control gray histograms). Levels were measured using the ChemiDoc MP imager system. There is a significant difference in GluN2A-bound fraction to Scrib1 in the EOF compared to control condition. Error bars are all $\pm$ SEM.



(legend on next page)

decreased with increased Scrib1 levels and increased with decreased Scrib1 levels (GluN2B puncta: Ctrl: 19.00 ± 0.52 versus Scrib1: 16.58 ± 0.64 , $p < 0.01$; shCtrl: 19.05 ± 0.47 versus shScrib1: 22.69 ± 0.4 , $p < 0.001$; Figures S3C and S3D). The total intensity varied in the same manner (Figures S3C and S3D). Altogether, these data suggest that Scrib1 regulates the pool of surface GluN2A and GluN2B dynamically, depending on neuronal activity context, and the stimulation or not of NMDARs affect differently the pool of surface GluN2A and GluN2B.

Scrib1 Interacts with Tac-GluN2A and Tac-GluN2B Chimeras at the Plasma Membrane and in Endosomes of COS-7 Cells

To investigate the involvement of Scrib1 in NMDAR internalization and recycling, we carried out experiments in COS-7 cells with NMDAR subunit chimeras. In these cells, Scrib1 was redistributed and colocalized with GluN2 chimeras at the plasma membrane and in vesicle-like clusters (Figures S4A and S4B) and the removal of the PDZ-BD of the chimeras (Tac-GluN2A Δ 7 or Tac-GluN2B Δ 7) abolished this redistribution (Figures S4C and S4D).

The localization of the GluN2 chimeras-Scrib1 complex in intracellular clusters suggests two nonmutually exclusive possibilities: (1) these clusters are involved in the sorting of GluN2 chimeras from the Golgi complex to the plasma membrane and/or (2) Scrib1 is associated with internalized receptors. First, surface staining was performed to validate that some of the Scrib1 puncta colocalized with surface Tac-GluN2A and Tac-GluN2B chimeras (data not shown). After 15 min of internalization, we observed a complete colocalization of Scrib1/internalized GluN2 chimeras with Rab5a (Figures S4E and S4F). After 30 min of internalization, the majority of Tac-GluN2A was colocalized with CD63 in late endosomes and lysosomes and only 20% was associated with Rab11 in recycling endosomes (Figures S4G and S4H) as previously published (Lavezzari et al., 2004). In the presence of Scrib1, we observed a shift in the localization of the GluN2A chimeras, with 40% of the GluN2A chimeras found in Rab11-positive recycling endosomes (Figures S4G, S4H, S4K, and S4L). Scrib1 expression slightly increased the colocalization of GluN2B with Rab11 in recycling endosomes (Figures S4I and S4J) and decreased the colocalization with CD63 (Figures S4M and S4N). Scrib1 promotes GluN2A chimera

recycling (Figures S4O and S4P) and to a lesser extent GluN2B chimera recycling (Figures S4Q and S4R). These results show that Scrib1 participates in Tac-GluN2A and Tac-GluN2B internalization and favors the recycling pathway in COS-7.

Scrib1 Levels Differentially Modulate myc-GluN2A and myc-GluN2B Internalization in Hippocampal Neurons

Next, we wanted to determine whether Scrib1 affected specifically internalization or recycling of GluN2A and/or GluN2B subunits in hippocampal neurons. First, we examined whether an upregulation or downregulation of Scrib1 could modulate internalization of GluN2 subunits (Figure 4A). Because these experiments require a large amount of antibodies, we used surface-expressed receptors. We also compared basal conditions to D-serine stimulation after priming the NMDAR for endocytosis, as before. Increasing Scrib1 levels did not change the internalized/surface ratio of myc-GluN2A or myc-GluN2B ($P_s > 0.1$; Figures 4B, 4C, 4F, and 4H). The activation of NMDARs significantly reduced the surface expression of myc-GluN2A independently of Scrib1 levels (stimulus effect: $p < 0.001$; treatment effect: $p = 0.10$; Figures 4B and 4F). Decrease of Scrib1 levels had the opposite effect on the internalization of both subunits (Figures 4D, 4E, 4G, and 4I). In basal conditions, a decrease of Scrib1 levels increased the internalization/surface ratio of GluN2A, whereas this ratio was decreased for GluN2B ($p < 0.001$; Figures 4D, 4E, 4G, and 4I). The activation of NMDARs in neurons with decreased Scrib1 levels abolished the effect seen in basal conditions for GluN2B ($p > 0.3$; Figures 4D, 4E, 4G, and 4I). Using an sh-resistant form of Scrib1, we could rescue the sh-induced phenotype for GluN2A (Figures 4J and 4K) or GluN2B (Figures 4L and 4M) in basal conditions. Together, these data show that the upregulation of Scrib1 does not change the internalized/surface ratio of either GluN2A or GluN2B in basal or activated conditions. On the other hand, the downregulation of Scrib1 has a differential effect on the internalized/surface ratio of GluN2A and GluN2B.

Scrib1 Facilitates myc-GluN2A Recycling in Hippocampal Neurons

We tested whether Scrib1 levels modulated NMDAR subunit recycling after internalization in neurons (Figure 5A). Recycling experiments under basal conditions showed that increased Scrib1

Figure 3. Modification of Scrib1 Levels Affects Surface Expression of Endogenous GluN2A and GluN2B-Containing Receptors

(A–C) Surface staining of endogenous GluN2A-containing NMDAR with overexpression of GFP-control, GFP-Scrib1, or GFP-Scrib1 Δ PDZ2-3 in primary hippocampal neuron culture (A) and box-and-whisker plots indicate the median value (black line) and mean value (red line), the 25th–75th (box), and the 10th–90th (whiskers); open circles represent individual values for GluN2A puncta number (B) or intensity (C). (D–F) Surface staining of endogenous GluN2B-containing NMDAR with overexpression of GFP-control, GFP-Scrib1, or GFP-Scrib1 Δ PDZ2-3 in primary hippocampal neuron culture (D) and box-and-whisker plots; open circles represent individual values for GluN2B puncta number (E) or intensity (F). (G–I) Surface staining of endogenous GluN2A-containing NMDAR with overexpression of sh-control, sh-Scrib1, or rescue with Scrib1 or Scrib1 Δ PDZ2-3 in primary hippocampal neuron culture (G) and box-and-whisker; open circles represent individual values for GluN2A puncta number (H) or intensity (I). (J–L) Surface staining of endogenous GluN2B-containing NMDAR with overexpression of sh-control, sh-Scrib1, or rescue with Scrib1 or Scrib1 Δ PDZ2-3 in primary hippocampal neuron culture (J) and box-and-whisker plots; open circles represent individual values for GluN2B puncta number (K) or intensity (L). Data were compared using Kruskal-Wallis one way with Dunn's multiple comparison. a.u., arbitrary units ($n = 20$ –30 neurons). (M and N) Surface staining of endogenous α 1-containing GABAAR with overexpression of GFP-control or GFP-Scrib1 and sh-control or sh-Scrib1 in primary hippocampal neuron culture (M) and box-and-whisker plots; open circles represent individual values puncta number (left) or intensity (right; N). (O and P) Surface staining of endogenous synaptophysin with overexpression of GFP-control or GFP-Scrib1 and sh-control or sh-Scrib1 in primary hippocampal neuron culture (O) and box-and-whisker plots; open circles represent individual values puncta number (left) or intensity (right; P). Data were compared using t test ($n = 15$ –26 neurons). The scale bar represents 10 μ m.

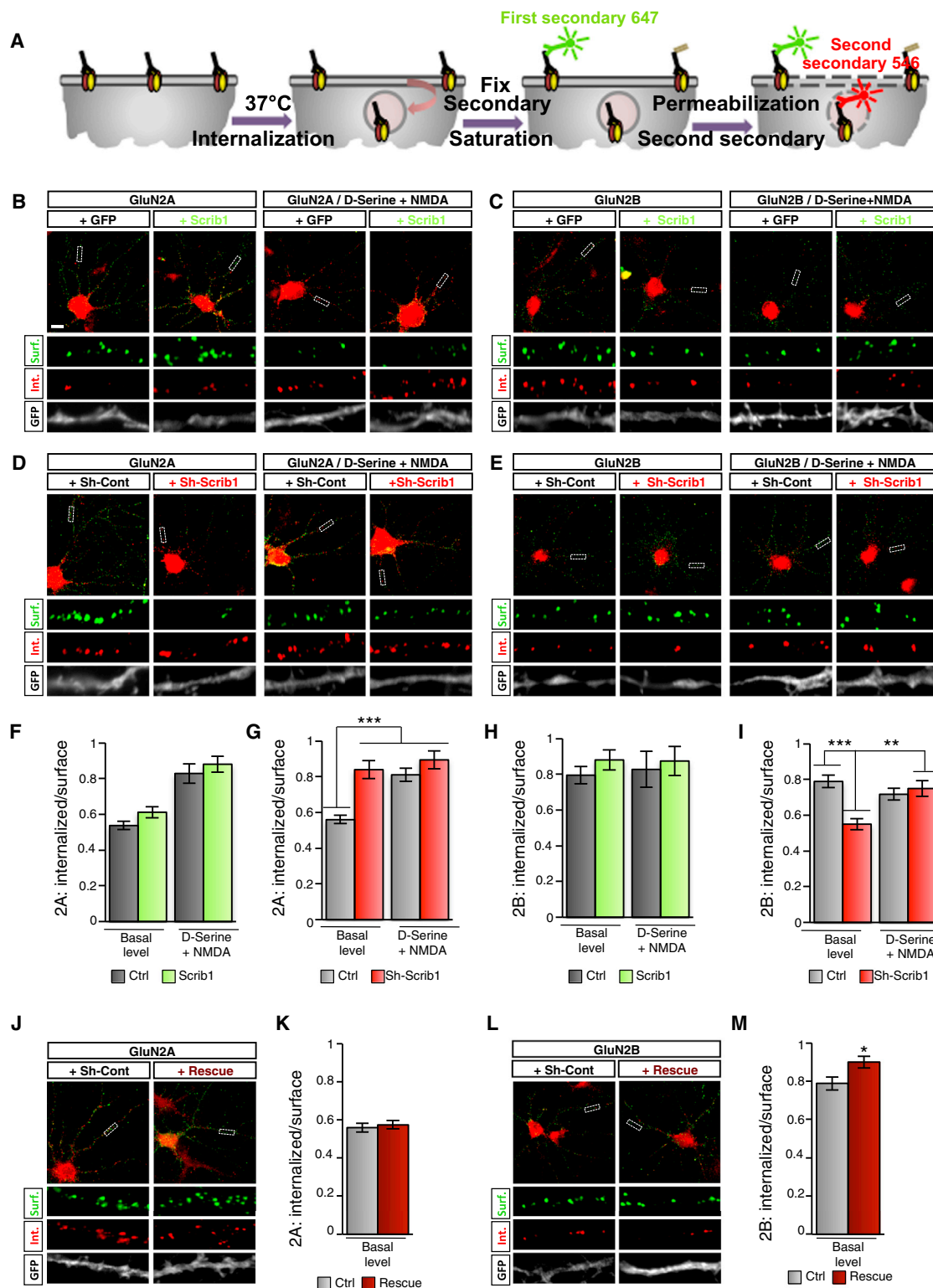


Figure 4. The Loss of Scrib1 Stabilizes GluN2B and Increases GluN2A Internalization

(A) Timeline of the endocytosis experiments.

(B and C) Internalization of GluN2A-containing NMDARs (B) and GluN2B-containing NMDARs (C) with or without stimulation, respectively. Primary hippocampal neuron cultures were transfected with myc-GluN2A (B) or myc-GluN2B (C) and GFP-control or GFP-Scrib1 at 14 or 15 DIV.

(legend continued on next page)

levels specifically increased the recycling of internalized myc-GluN2A back to the plasma membrane, which is otherwise degraded ($p < 0.001$; Figures 5B and 5F), but had no effect on GluN2B ($p = 0.79$; Figures 5C and 5H) or GABA_A receptor $\beta 3$ subunit ($p = 0.99$; data not shown). Additional activation of NMDARs further increased recycling of the internalized GluN2A back to the plasma membrane in the presence of overexpressed Scrib1 ($p < 0.01$; Figures 5B and 5F) and significantly decreased the recycling of GluN2B, independently of Scrib1 overexpression ($p < 0.001$; Figures 5C and 5H). Thus, NMDARs activation influenced differently the recycling traffic of GluN2A and GluN2B in the presence of Scrib1 through a specific GluN2A recycling increase whereas GluN2B recycling appeared insensitive to Scrib1 increased levels.

Loss-of-function experiments were done to evaluate the impact of decreased levels of Scrib1 expression. Under basal conditions, decreased Scrib1 levels did not affect the recycling rate of GluN2A at the membrane ($p = 0.70$; Figures 5D and 5G). NMDAR activation slightly increased the recycling of GluN2A, which was abolished in the absence of Scrib1 ($p < 0.05$; Figures 5D and 5G). Under basal conditions, downregulation of Scrib1 levels significantly decreased GluN2B recycling at the membrane ($p < 0.001$; Figures 5E and 5I). Notably, NMDAR activation changed the ratio of recycled/internalized GluN2B; here, downregulation of Scrib1 increased the recycling of GluN2B compared to control shRNA ($p < 0.001$). To further decipher the Scrib1-dependent trafficking pathway, we performed endosomal staining in neurons transfected with GFP-Rab11 and GFP-CD63, 30 min after internalization of myc-GluNs in the presence of hemagglutinin (HA)-Scrib1 (Figure S5) or mCherry-pSuper-Scrib1 (Figure S6). As expected, we observed a stronger colocalization of GluNs with Rab11 than with CD63 for all the conditions showing an increasing recycling. On the contrary, a decrease in recycling was always associated with a stronger colocalization with CD63 at the expense of Rab11 (Figures S5 and S6). In conclusion, GluN2A and GluN2B behave differently in response to the expression level of Scrib1: Scrib1 upregulation affects the recycling of GluN2A more than that of GluN2B, whereas Scrib1 downregulation blocks GluN2A recycling, with opposite effects on GluN2B recycling depending on the activation state of the neuron.

We wanted to study the role of ARF6 in the regulation of NMDAR by Scrib1, as it is a known regulator of other transmembrane receptor (Lahuna et al., 2005). Interestingly, ARF6 increased GluN2A recycling and ARF6^{T27N} (a dominant-negative form) inhibited Scrib1-dependent effect on recycling (Figures 5J

and 5K). Expression of a catalytically inactive form of ARF6 guanine nucleotide exchange factor EFA6 (EFA6-E242K), known to regulate constitutive endosomal recycling to the cell surface (Franco et al., 1999), also inhibited Scrib1-induced effect on recycling (Figures 5L and 5M). These results strongly suggest that Scrib1 regulates the recycling of GluN2A through ARF6 activation.

The AP2 Adaptor Interacts with Scrib1 to Allow Internalization and Recycling of the NMDAR/Scrib1 Complex

Several studies have shown that PDZ proteins, such as PSD-95, stabilize NMDARs at the membrane (Groc et al., 2006; Prybylowski et al., 2005; Roche et al., 2001). In the case of GluN2B-containing NMDARs, the PDZ protein dissociates from the receptor to allow the AP2 adaptors to bind a distal YEKL motif on the GluN2B tail and to induce its internalization, which is followed by a rapid recycling of the synaptic receptor (Prybylowski et al., 2005; Scott et al., 2004). The GluN2A subunit is regulated differently (Prybylowski et al., 2005). Because Scrib1 is a PDZ protein that colocalizes with GluRs at the membrane and in endocytic vesicles, it was difficult to reconcile our data with this model. We also noticed in our electron microscopic analysis that Scrib1 was sometime present at the lateral domain of the spine (Figure 6A), where activity-dependent exocytosis and endocytosis domains have been identified (Kennedy et al., 2010). In our yeast two-hybrid screen with the PDZ-containing domains of Scrib1, we found a clone containing an ~0.7 kb insert encoding amino acids 200–429 of the open reading frame of the AP2 μ subunit (NP_033809.1). Sequence analysis showed that this clone contained the C-terminal domain of AP2 μ , which recognizes tyrosine-based sorting motifs, such as Yxx Φ (where x is a polar or charged amino acid and Φ is a hydrophobic residue; Traub, 2009). We found one putative binding site for AP2 close to the consensus sequence found in vertebrates in the Scrib1 sequence between PDZ1 and PDZ2 (Figure 6B). This sequence (YSPR) differs from the consensus sequence for AP2 binding site in substitution of the Y+3 hydrophobic residue with a charged arginine. However, it should be noted that Arg was found in this position in other proteins that bind AP2 adaptors with a strong affinity (Uekita et al., 2001). The mutation of one amino acid in this sequence prevented Scrib1 binding to AP2 both in a yeast two-hybrid assay and pull-down experiments (Figures 6C and 6D). We further validated this interaction by coimmunoprecipitation of AP2 in hippocampal lysates from P21 rats using an antibody against Scrib1 (Figure 6E). We then modeled the binding of our target sequence to AP2 μ . The

(D and E) Internalization of GluN2A-containing NMDARs (D) and GluN2B-containing NMDARs (E) with or without stimulation, respectively. Primary hippocampal neuron cultures were transfected with myc-GluN2A (D) or myc-GluN2B (E) and sh-control or sh-Scrib1 at 14 or 15 DIV.

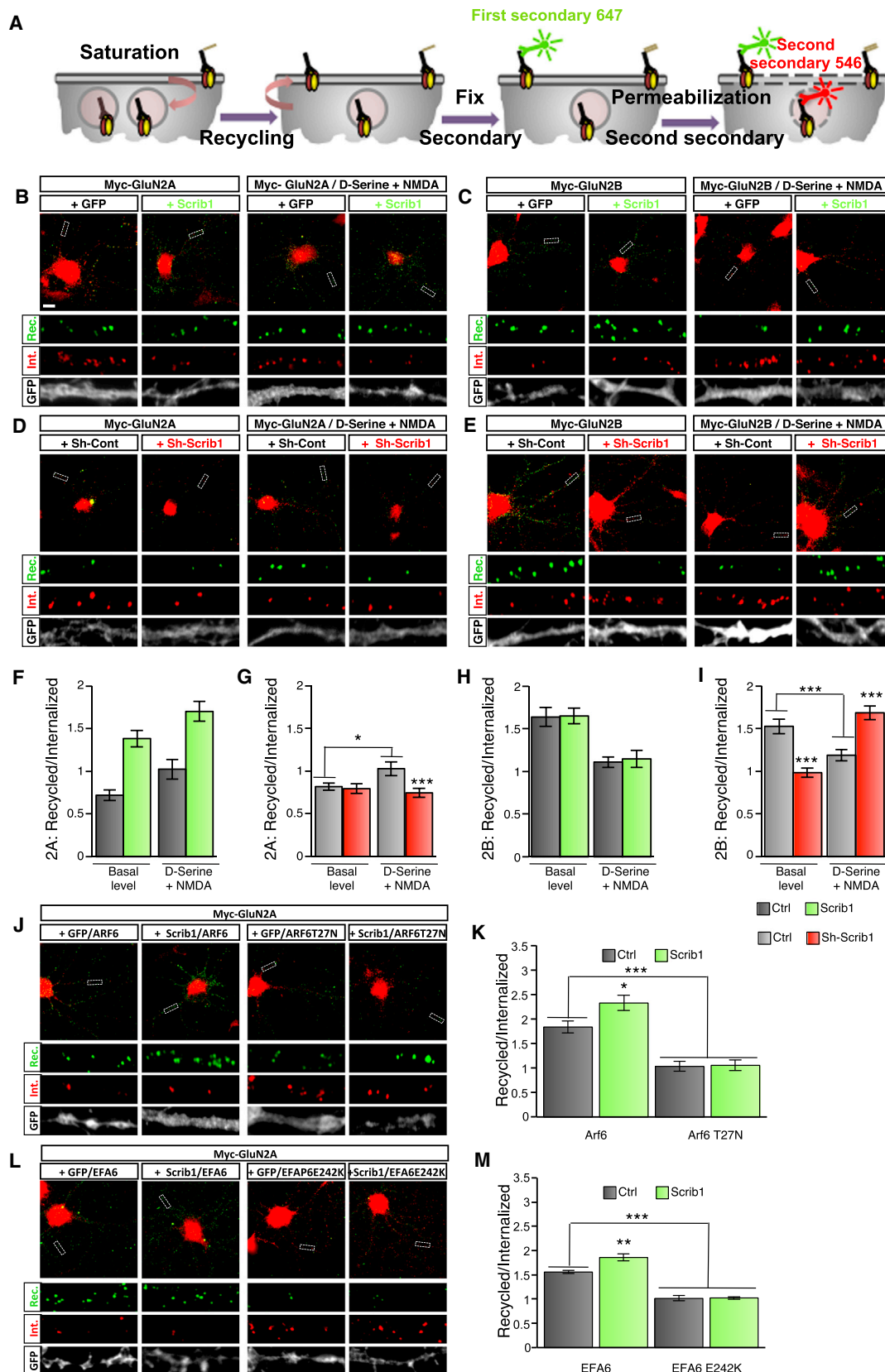
Surface receptor populations are labeled in green, and internalized receptor populations are in red.

(F–I) Histograms represent the means of the ratio of internalized puncta over the surface receptor puncta, corresponding, respectively, to the images in (B)–(E). (F) Data were compared using two-way ANOVA ($n = 19$ to 20 neurons). (G) Data were compared using two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test ($n = 15$ –20 neurons). (H) Data were compared using two-way ANOVA ($n = 16$ –20 neurons). (I) Data were compared using two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test ($n = 15$ –17 neurons) $\pm$ SEM. Error bars are all $\pm$ SEM.

(J and K) Internalization of GluN2A-containing NMDARs with sh-control or sh-Scrib1 and shRNA-resistant HA-Scrib1 form (rescue; J) and histograms represent the means of the ratio of internalized puncta over the surface receptor puncta (K). Error bars are all $\pm$ SEM.

(L and M) Internalization of GluN2B-containing NMDARs with sh-control or sh-Scrib1 and shRNA-resistant HA-Scrib1 form (rescue; L) and histograms represent the means of the ratio of internalized puncta over the surface receptor puncta (M). Error bars are all $\pm$ SEM.

Data were compared using an unpaired t test $\pm$ SEM. The scale bar represents 10 μ m.



(legend on next page)

potential interacting site on Scrib1 fits in the classic binding site of AP2 μ (Figures 6F–6H). In addition to the canonical Tyr834, several ionic bonds were observed (Arg839/Asp415, Glu838/Lys420, and Glu831/Arg357; Figure 6H). Notably, we identified a putative ionic bond between Glu838 and Lys420 at a position where there is typically a hydrophobic interaction, such as with residue Met204 from CTLA-4 (Follows et al., 2001). Our results suggest that the interaction of AP2 with Scrib1 uses a slightly different binding mode than the previously described associations with AP2 μ . We further show that the internalizations of both GluN2A and GluN2B were reduced in the presence of a nonfunctional GFP-Scrib1^{Y834A} construct in hippocampal neurons (Figure 6I). These results show that a noncanonical, vertebrate-specific, endocytic motif in Scrib1 is recognized by the AP2 adaptors. Although Scrib1 does not change the internalization rate of GluN2A or GluN2B per se, binding of the AP2 adaptors to Scrib1 plays a role in the internalization (Figures 6I–6K) and likely in the subsequent recycling of NMDARs.

Scrib1 Regulates the Level of Synaptic NMDARs at Schaffer Collateral CA1 Pyramidal Cell Synapses

We performed single-cell electroporation of CA1 pyramidal cells in organotypic hippocampal slices with either pSUPER-shRNA-Scrib1 or pSUPER-shRNA-control. Three days after transfection, we recorded pharmacologically isolated NMDAR-mediated excitatory postsynaptic currents (EPSCs) from a transfected neuron and a neighboring nontransfected neuron in pairs (Figure 7A). Decreased levels of Scrib1 significantly reduced the amplitude of synaptic NMDAR-mediated responses compared to control (Figures 7B and 7C). The decay time of synaptic NMDAR-mediated EPSCs did not vary between the two conditions, suggesting that the acute downregulation of Scrib1 did not modify the composition of synaptic NMDARs (Figures 7B and 7C). On the other hand, in a similar experimental setting, overexpression of Scrib1 or GFP did not alter the amplitude or decay time of NMDAR-mediated EPSCs (Figure S7A). The reduction in the NMDAR-mediated EPSCs observed with the knockdown of Scrib1 could be mediated by the reduction in the number of synapses and not by a selective loss of NMDAR. To address this concern, we measured the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)/NMDA ratio in orga-

notypic cultures. In our transfection time frame, we observed a change in the AMPA/NMDA ratio (Figure 7D). This imbalance can explain the decrease in NMDAR synaptic currents seen in Figure 7B. To further verify the selective effect on NMDAR, we measured the amplitude of pharmacologically isolated AMPA receptor (AMPA)-mediated EPSCs and found that they were not different from controls when assessed with the paired recording experiment (Figures 7E and 7F). Our results confirm that Scrib1 downregulation affects specifically NMDAR currents with no major effect on AMPAR. The overexpression of Scrib1 did not cause any significant differences compared to control GFP (Figures S7B and S7C), suggesting that additional signals are necessary to drive the entry of GluN2A in synapses, as we have observed in Figure 2.

To confirm that the loss of Scrib1 does not alter the subunit composition of synaptic NMDARs, we tested the effect of Ro25-2981, a selective antagonist of NMDARs containing GluN2B. The effects of Ro25-2981 on the amplitude and decay time of NMDAR-mediated EPSCs in neurons transfected with pSUPER-shRNA-Scrib1 or with pSUPER-shRNA-control were not significantly different (Figure S7D) as compared to controls (Figure S7E). In conclusion, these data confirm that the loss of Scrib1 affects the levels of synaptic NMDARs in hippocampal excitatory synapses.

DISCUSSION

Here, we identified Scrib1 as a key PDZ protein involved in the functional and spatial regulation of synaptic NMDARs. First, we found a direct physical interaction between GluN2 subunits and Scrib1. Second, we demonstrated that Scrib1 levels modulate NMDAR trafficking and recycling to the membrane through a direct interaction with the AP2 adaptor proteins and the use of regulatory proteins, such as ARF6. Third, we showed that downregulation of Scrib1 in hippocampal neurons leads to a decrease in synaptic NMDAR currents.

NMDARs play a central role in controlling synaptic transmission and plasticity. Therefore, it has been a challenge to identify the molecular mechanisms that regulate GluN2A and GluN2B synaptic expression. In our previous study, we showed that, after 5 or 6 days posttransfection, the downregulation of Scrib1 in

Figure 5. Scrib1 Promotes GluN2A Recycling and Inhibits GluN2B Recycling upon Stimulation in Neuron Culture

(A) Timeline of the recycling experiments.

(B and C) Recycling of GluN2A- (B) and GluN2B- (C) containing NMDARs with or without stimulation. Overexpression of GFP-control or GFP-Scrib1 in primary hippocampal neuron culture transfected with myc-GluN2A (B) or myc-GluN2B (C) at 14 or 15 DIV.

(D and E) Recycling of GluN2A- (D) and GluN2B- (E) containing NMDARs with or without stimulation. Overexpression of sh-control or sh-Scrib1 in primary hippocampal neuron culture transfected with myc-GluN2A (D) or myc-GluN2B (E) at 14 or 15 DIV.

Recycling receptor populations are labeled in green, and internalized receptor populations are in red.

(F–I) Histograms represent the means of the ratio of recycled receptor puncta over internalized puncta corresponding, respectively, to the images in (B)–(E). (F) Data were compared using two-way ANOVA ($n = 17$ to 18 neurons). (G) Data were compared using two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test ($n = 13$ –15 neurons). (H) Data were compared using two-way ANOVA ($n = 15$ –18 neurons). (I) Data were compared using two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test ($n = 15$ –20 neurons). Error bars are all $\pm$ SEM.

(J and K) Recycling of GluN2A-containing NMDARs with stimulation and overexpression of ARF6-HA, ARF6-DN-HA with GFP-control, or GFP-Scrib1 (J) and histograms represent the means of the ratio of recycled receptor puncta over internalized puncta (K). Data were compared using two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test ($n = 15$ –20 neurons) $\pm$ SEM. Error bars are all $\pm$ SEM.

(L and M) Recycling of GluN2A-containing NMDARs with stimulation and overexpression of EFA6-VSVG, EFA6-DN-VSVG with GFP-control, or GFP-Scrib1 (L) and histograms represent the means of the ratio of recycled receptor puncta over internalized puncta (M). Data were compared using two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test ($n = 10$) $\pm$ SEM. Error bars are all $\pm$ SEM.

The scale bar represents 10 μ m.

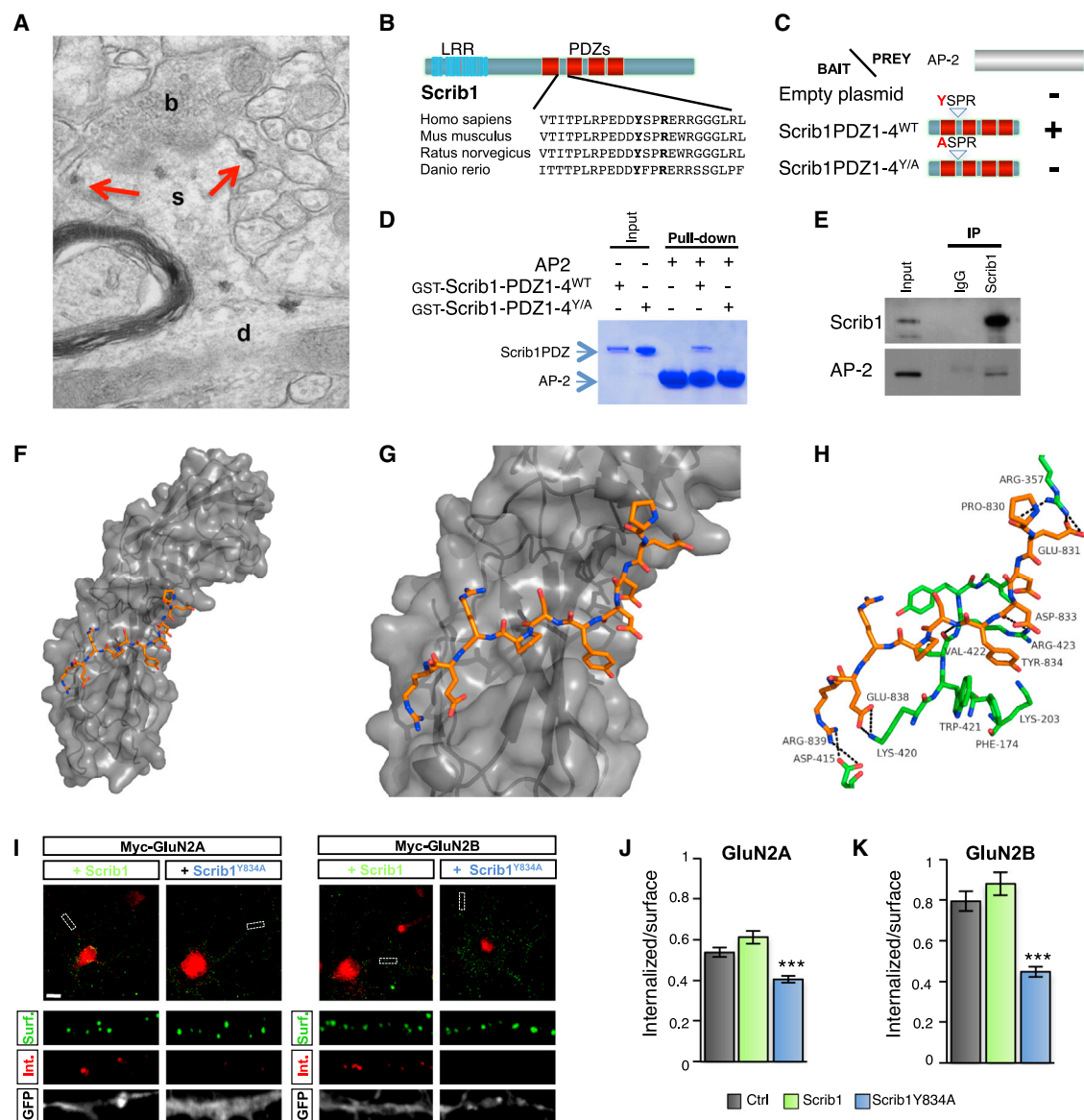


Figure 6. The Direct Interaction between Scrib1 and AP2 Is Necessary for Internalization of the Scrib1/GluN2 Complex

(A) Immunolabeling of Scrib1 in a dendritic spine in the CA1 stratum radiatum of the hippocampus. Electron microscopy image shows Scrib1 is found in the PSD and associated with the membrane of the spine (arrows). b, bouton; d, dendrite; s, spine.

(B) Schematic view of the Scrib1 YxxR motif, a conserved AP2 binding motif found between PDZ1 and PDZ2 of Scribble1.

(C) Directed yeast two-hybrid assays with AP2 fragment and Scrib1 PDZ domain constructs. Schematic of Scrib1 PDZ domain structures used as bait in yeast two-hybrid. Scrib1 binds AP2 via the YxxR binding domain site, and replacement of the lysine (Y) with an alanine (A; AxxR) disrupts this interaction. WT, wild-type.

(D) A pull-down assay indicates that AP2 binds to Scrib1 YxxR His-tagged protein, but not to mutated Scrib1 AxxR.

(E) Coimmunoprecipitation of endogenous Scrib1 and AP2 from the hippocampus. The lysates were immunoprecipitated with Scrib1 antibodies, and the precipitates were immunoblotted for AP2.

(F and G) Overall view of the model of the interaction between the binding region (gray) and the linker between PDZ1 and PDZ2 from Scrib1 (orange). Scrib1 residues 830–839 are represented as sticks, and AP2 is shown as a gray surface model.

(H) Stick model of the interactions of Phe174, Lys203, Arg357, Asp415, and Lys420 to Iso425 (green) with the Pro830 to Arg839 residues from the linker sequence between PDZ1 and PDZ2 from Scrib1 (orange).

(I) Internalization of GluN2A- and GluN2B-containing NMDARs. Myc-GluN2A and GFP-Scrib1 or GFP-Scrib1^{Y834A} (left panel) and Myc-GluN2B and GFP-Scrib1 or GFP-Scrib1^{Y834A} (right panel) were transfected into 14 or 15 DIV hippocampal neuron culture. The scale bar represents 10 μ m.

(J and K) Histograms represent the means of the ratio of internalized receptor puncta over the surface receptor puncta $\pm$ SEM. (J) Data were compared using one-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test ($n = 19$ to 20 neurons). (K) Data were compared using one-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison test ($n = 15$ –18 neurons). Error bars are all $\pm$ SEM.

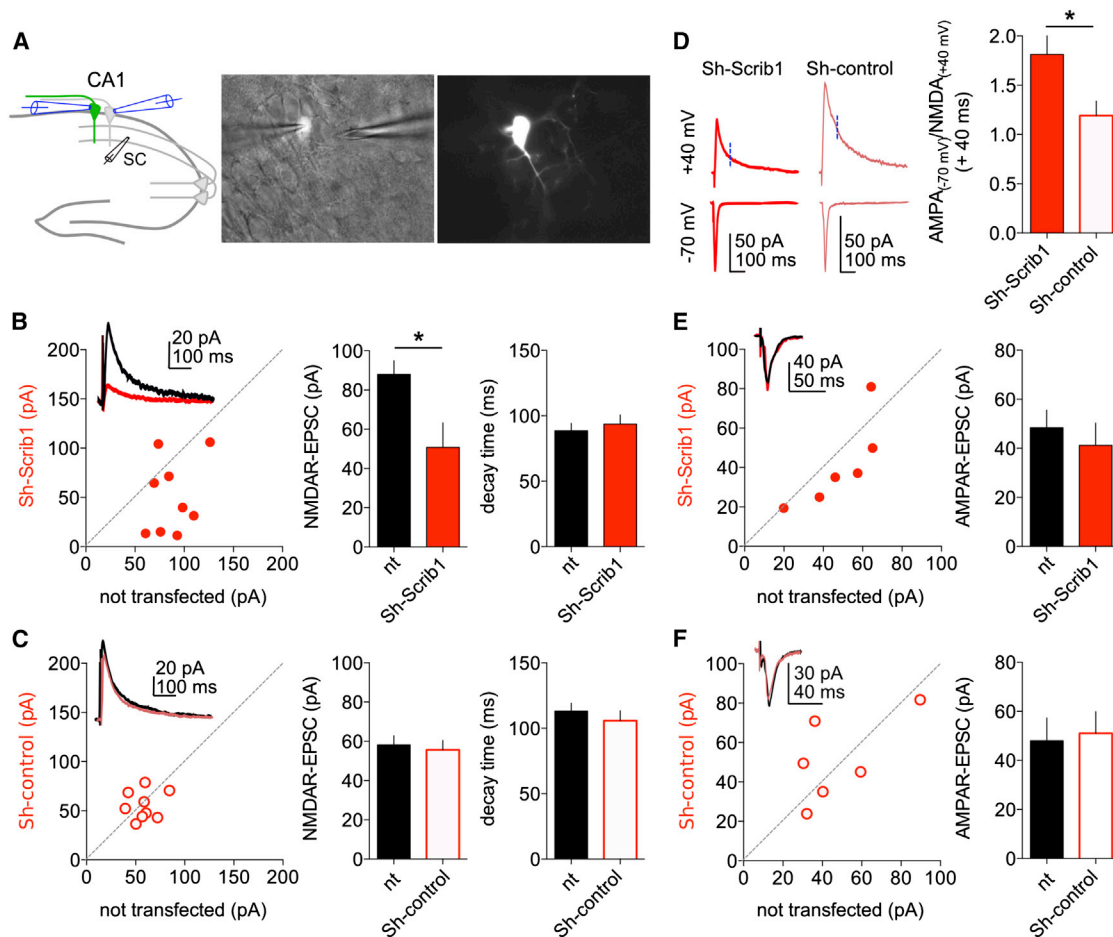


Figure 7. Scrib1 Regulates the Level of Synaptic NMDARs at Schaffer Collaterals CA1 Pyramidal Cells Synapse

(A) Schematic cartoon illustrating paired recordings from neighboring electroporated and not electroporated (control) neurons in CA1 pyramidal layer. Whole-cell voltage-clamp recordings were performed at +40 mV while stimulating the Schaffer collaterals (SC) every 10 s. On the right, example images of a pair of recorded neighboring neurons.

(B) Transfection with pSUPER-shRNA-Scrib1 reduces the amplitude of NMDAR-mediated EPSCs at SC-CA1 synapse but does not modify their decay time. Sample traces shown in the inset (control: n = 9; pSUPER-shRNA-Scrib1: n = 9). nt, not transfected.

(C) pSUPER-shRNA-control transfection does not affect the NMDAR-mediated EPSCs at SC-CA1 synapse (amplitude and decay time); sample traces shown in the inset (control: n = 9; pSUPER-shRNA-control: n = 9).

(D) Sample traces and summary graphs illustrating transfection of pSUPER-shRNA-Scrib1 induces a significant change in the AMPA/NMDA ratio when compared to cells transfected with pSUPER-shRNA-control inset (pSUPER-shRNA-Scrib1: n = 10; pSUPER-shRNA-control: n = 11).

(E) Transfection with pSUPER-shRNA-Scrib1 does not modify the amplitude of AMPAR-mediated EPSCs at SC-CA1 synapse (control: n = 6; pSUPER-shRNA-Scrib1: n = 6).

(F) Transfection with pSUPER-shRNA-control does not modify the amplitude of AMPAR-mediated EPSCs at SC-CA1 synapse (control: n = 6; pSUPER-shRNA-control: n = 6).

dissociated hippocampal resulted in a decrease in spine density (Moreau et al., 2010). In the present study, we studied the early effect of Scrib1 loss on NMDAR trafficking, with a reduced post-transfection delay and processing of 48 hr. This shorter time was carefully chosen to minimize spine loss while still having a down-regulation of Scrib1 protein above 70%. The unchanged synaptophysin puncta density after 48 hr posttransfection supports our claim of an absence of massive loss of synapses. Under these experimental conditions, we were able to reveal specific effects of Scrib1 levels on NMDAR trafficking. Our results suggest that the first effect of Scrib1 knockdown in hippocampal

neurons is the decreased levels of GluN2A and GluN2B at the membrane, with a difference in the endocytosis or recycling rates of the two subunits. These differential effects of Scrib1 levels on GluN2A versus GluN2B endocytosis and recycling are consistent with previously observed differences in GluN2A and GluN2B secretory trafficking (Roche et al., 2001; Lavezzari et al., 2004). We showed that this Scrib1-dependent regulation of GluN2A and GluN2B endocytosis and recycling is specific because $\beta 3$ -containing GABA_A receptors are not affected under the same conditions. Moreover, 3 days after transfection of shRNA for Scrib1 in organotypic slice cultures, the loss of Scrib1

in CA1 neurons decreased the amplitude of NMDAR-synaptic currents, but not of AMPAR-EPSCs, supporting the idea that Scrib1 regulates the number of NMDARs present at synapses. The changes in the surface expression of NMDARs could result from either impaired exocytosis of novel receptors or enhanced endocytosis followed by an impaired exocytosis of recycled receptors. Similar effects to Scrib1 on trafficking were also observed for G-protein-coupled receptor thyrotropin receptors (Lahuna et al., 2005) and integrin $\alpha 5$ (Michaelis et al., 2013). This impairment in recycling is presumably due to a failure of the normal recycling pathway in early endosomes that contain GluN2 but lack Scrib1, thus driving the receptors to the late lysosomal compartment. Scrib1 colocalizes strongly with Rab5a and Rab11 in early and recycling endosomes, respectively, suggesting that Scrib1 has a dynamic function in endocytosis and the recycling of NMDARs. Scrib1 is likely to interact with components of the membrane fusion machinery involved in the recycling of NMDARs. Consistent with this, we found that Sec8, a member of the exocyst complex, interacts with Scrib1 in the hippocampus (N.H.P. and N.S., data not shown). It is known that the exocyst complex and ARF6 control postendocytic recycling (Prigent et al., 2003) and that Scrib1 signaling involves ARF6 (Lahuna et al., 2005). Our own data show that ARF6^{T27N} or EFA6^{E242K} constructs both block GluN2A recycling, implicating the ARF6 pathway in the regulation of NMDARs. This is also consistent with previous studies showing that SNAP23 or SNAP25 regulate NMDAR trafficking by acting as a component of the membrane fusion machinery and not by directly binding NMDAR (Lau et al., 2010; Suh et al., 2010). Electron microscopy analysis showed that Scrib1 colocalizes with NMDARs and is often localized to the lateral domain of the spine, where activity-dependent exocytosis and endocytosis domains are present (Kennedy and Ehlers, 2006). Moreover, it has been shown that Scrib1 can form a complex with syntaxin 4 (Massimi et al., 2008), one of the target-membrane-associated SNARE involved in spine exocytosis (Kennedy et al., 2010). We thus favor a model whereby Scrib1 facilitates AP2-dependent internalization of NMDAR and then associates with syntaxin to drive recycling of NMDAR-containing endocytic compartments back to the membrane, probably through a SNARE/exocyst complex.

After the priming of the receptors by D-serine stimulation, the major NMDAR coagonist at the synapse (Papouin et al., 2012), AP2 either binds directly to the NMDARs and drives them to the degradation pathway or binds to Scrib1 and initiates endocytosis and recycling of the NMDAR/Scrib1 complex. Moreover, D-serine stimulation prior to D-serine/NMDA activation affects differently the pool of surface GluN2A and GluN2B. Further work is needed to understand the molecular mechanism underlying the differences upon D-serine stimulation described in this study.

Interestingly, we show that the overexpression of a Scrib1-AP2 binding-defective mutant (Scrib1^{Y834A}) reduces both GluN2A and GluN2B internalization (Figure 6J) whereas Scrib1 shRNA has the opposite effect (Figures 5G and 5I). This differential effect of Scrib1 knockdown versus ectopic expression reveals presumably a dominant-negative role of Scrib1^{Y834A}. The sh-Scrib1 experiments reveal the effect of the absence of Scrib1 on GluN2A and GluN2B receptors. Indeed, we showed that GluN2A endocytosis increases in absence of Scrib1 expression.

We believe this emphasizes the role of Scrib1 on the stabilization of GluN2A at the membrane. Hence, in absence of Scrib1, GluN2A is less stable, and nothing prevents the direct binding of AP2 to the subunit and its internalization (Lavezzari et al., 2004). On the contrary, GluN2B endocytosis decreases in absence of Scrib1 expression, supporting an active role for Scrib1 in the endocytosis process, but not in the stabilization of the GluN2B subunit. In presence of Scrib1^{Y834A} mutant, both GluN2A and GluN2B endocytosis is reduced, revealing the dependence of each subunit on the AP2 binding motif of Scrib1 for endocytosis. Here, the mutated Scrib1 can still bind the subunits via the PDZ domains and fulfil some of its function: stabilization for GluN2A and blocking of the internalization for GluN2B. However, the mutation of the AP2 motif on Scrib1^{Y834A} partially affects some of Scrib1 downstream effects, revealing an AP2-dependent mechanism in NMDAR-induced internalization via Scrib1. Only one previous study has described a direct interaction between a cytoplasmic cargo protein and the μ -adaptein subunits during membrane receptor internalization. In Yu et al. (2007), the authors showed that the planar cell polarity protein Dishevelled associates with AP2 to induce the endocytosis of Frizzled coupled to its degradation (Yu et al., 2007). Interestingly, Scrib1, which is also a planar cell polarity protein, couples the internalization of the receptors to recycling.

We found that the interaction between GluN2 and Scrib1 is mediated by the carboxy-terminal PDZ-BD of GluN2 and the Scrib1 PDZ domains 2 and 3 because a Scrib1 form lacking these two domains has no influence on NMDAR trafficking. NMDARs have been shown to bind numerous PDZ proteins, including all four members of the PSD-95 family of MAGUKs (PSD-95, SAP102, PSD-93, and SAP97), MAGI1–MAGI3, MALS1–MALS3, CIPP, and GIPC (Wenthold et al., 2003; Yi et al., 2007); several of these proteins play roles in anchoring the receptors (Roche et al., 2001; Sans et al., 2000) and likely compete with Scrib1 for NMDAR binding. Various studies have shown that AP2 binds directly to NMDARs (Prybylowski et al., 2005; Scott et al., 2004) and that, after direct binding to AP2, GluN2A or GluN2B are degraded, except when AP2 binds the Y_{EKL} motif near the PDZ-BD of GluN2B (Scott et al., 2004). We and others have shown that Fyn kinase or hippocalcin can cause the dissociation of PSD-95 from NMDARs, allowing AP2 to bind to the receptors, thus inducing their internalization (Jo et al., 2010; Prybylowski et al., 2005). Our model shows that Scrib1 can stabilize GluN2A-containing NMDARs in basal conditions, whereas upon activation, Scrib1 leads to the entry of GluN2A-containing NMDARs into the recycling pathway. In contrast, Scrib1 plays a role in GluN2B-containing NMDAR trafficking by preventing their recycling upon stimulation. These different mechanisms maintain the GluN2A/GluN2B ratio in basal conditions and mediate the switch from surface GluN2B to GluN2A, leading to an increased GluN2A/GluN2B ratio upon stimulation. The fact that GluN2A can be recycled in the presence of Scrib1 after the activation of NMDARs is consistent with the concept that the activation pathways of distinct NMDARs use different scaffold and adaptor complexes for proper intracellular traffic and regulation. It is also possible that Scrib1 participates in the direct sorting of NMDAR. Our data using a mutated form of Scrib1 missing the two PDZ domains seem to argue against

the latter hypothesis (Figures 3A–3F), but additional experiments will be needed to answer this question.

We showed that, in the presence of Scrib1, GluN2A can recycle back to the membrane, and thus GluN2B is not the only NMDAR subunit that can recycle. This dual mechanism has been known for a long time for AMPARs. It has been demonstrated quite convincingly that activation of NMDAR triggers internalization and recycling of GluA1-containing AMPARs and that GluA2 and GluA2/GluA3 constitutively recycle (Barry and Ziff, 2002; Ehlers, 2000; Henley et al., 2011; Shepherd and Huganir, 2007). It will be important for future studies to assess the specific consequences of the recycling of GluN2A on AMPAR trafficking at synapses.

Together, our results show that Scrib1 is a key scaffolding molecule regulated by activity in vivo and in vitro and that it is responsible for the internalization and recycling of NMDA receptors. Together with recent publications (Groc et al., 2006; Prybylowski et al., 2005; Suh et al., 2010), our work strengthens the emerging idea that different PDZ proteins regulate GluR trafficking at the membrane via the endosomal system. This mechanism involving Scrib1 is likely to be implicated in the regulation of synapse function in numerous physiological processes and pathological states that involve interactions between NMDARs, Scrib1, and AP2.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

All rats were Sprague-Dawley between embryonic day 18 (E18) and 10 weeks old at the time of experiments. Rats had free access to food and water and were housed in polypropylene cages under controlled conditions (at 23°C ± 1°C, with lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m., assuring a 12:12 hr light/dark cycle), with the behavioral testing or the other experiments performed during the light portion of the cycle. All procedures were performed according to the requirements of the United Kingdom Animals (Scientific Procedures) Act 1986, AWERB Newcastle University (ID: 374), the European Communities Council Directives (86/609/EEC), and the French National Committee (87/848) recommendations.

Antibodies and Vector Constructions

The detailed information on antibodies and constructs used in this study are in the Supplemental Experimental Procedures.

Yeast Two-Hybrid Assays

pGBT7-GluN2A and pGBT7-GluN2B were used as described previously (Yi et al., 2007). Scrib1^{PDZ} (amino acids 712–1,187 of the Q80U72-3 sequence) was subcloned into pGAD and pGBT7 and modified by site-directed mutagenesis (Stratagen). Yeast two-hybrid screening was performed only once with the library, and yeast assays to confirm the interaction were performed at least three times as described in the Clontech protocol.

Detergent Solubilization and Immunoprecipitation Experiment

IP experiments were performed after 1% sodium deoxycholate, 0.1% Triton X-100 solubilization as described previously (Sans et al., 2003).

Culture and Transfections of Hippocampal Neurons

Primary hippocampal cultures were prepared from E18 Sprague-Dawley rats. Cultures were transfected with the different constructs at 12 or 14 days in culture using the calcium phosphate method (Moreau et al., 2010; Sans et al., 2005).

Surface, Internalization, and Recycling Experiments in Neurons

Hippocampal neurons (12 days in vitro [DIV]) were transfected with GFP control or GFP-Scrib1; control shRNA or Scrib1 shRNA; or myc-tagged GluN2A,

GluN2B, or GABA_A β3 using calcium phosphate methods (Sans et al., 2003). The experiments were performed 36–48 hr after transfection. The protocol to measure recycled NMDARs after internalization in hippocampal neurons was adapted from previous studies (Suh et al., 2010). The stimulation was adapted from Nong et al. (2003). Briefly, prestimulation with D-serine (100 μM) was performed for 5 min followed by a stimulation with NMDA (50 μM) plus D-serine (1 μM) over 5 min before the internalization step. See also the Supplemental Experimental Procedures.

Data Presentation and Statistical Analysis

The results are described as mean ± SEM or whiskers boxes. Two-way ANOVA, one-way ANOVA, or Kruskal-Wallis one way was performed where indicated. For most experiments, the Student's *t* test was used to determine statistical significance (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). Statistical analyses were performed using the Statistica or GraphPad Prism statistical package (GraphPad). See also the Supplemental Experimental Procedures and Table S2.

Additional Methods

Details regarding the methods used for ITC, pull-down assays; fractionation; culture and transfections of HEK293 or COS-7 cells; surface, internalization, and recycling experiments in fibroblasts and neurons; pre-embedding immunocytochemistry or postembedding immunogold; electrophysiological recordings in slice; and data analysis are provided in the Supplemental Experimental Procedures.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, seven figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.017>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M.C. Donat, D. Arma, E. Richard, and Y.-X. Wang for technical assistance. We thank I. Macara for the GFP-Scrib constructs, J.P. Borg for the Lano and Erbin antibodies and the HA-Scrib1 construct, K. Roche for supplying the Tac constructs, T. Galli for the CD63 cDNA, P.D. Stahl for the Rab5 cDNAs, F. Luton for the EFA6 mutated construct, G. Köhr for the GluN monoclonal antibodies, and M. Garret for supplying the β3 cDNA and antibody. We also thank the Biochemistry and Biophysics Facility of the Bordeaux Neurocampus funded by the Labex BRAIN (ANR-10-LABX-43), the Sequencing facility (Bordeaux University), and the Electron Microscopy Research Services (Faculty of Medical Sciences, Newcastle University). This work was supported by INSERM and INSERM AVENIR grants to N.S. and M.M., Conseil Régional d'Aquitaine (to N.S. and M.M.), Neurocampus program (to M.M.), La Fondation pour la Recherche Médicale (to N.S. and M.M.), ANR NeuroScrib ANR-07-NEUR-031-01 (to N.S. and M.M.), ANR MossyPCP ANR-12-BSV4-0016-01 (to N.S. and C. Mulle), Conseil Régional d'Aquitaine/INSERM Ph.D. fellowship and FRM Bourse de soudure fellowship (to N.P.), the Cifre Program (to J.-M.B.), the European ITN SyMBaD and FRM 4ème année de these FDT20130928124 (to V.L.P.), FRM fellowships SPF20081215186 (to C.M.D.), BioXtal SARL (to L.V.), Royal Society International Joint Project grant (to C.R. and N.S.), and the Wellcome Trust Institutional Strategic Support Fund Project, Faculty of Medical Sciences, Newcastle University (to C.R.). K.C., R.S.P., and R.J.W. were supported by the Intramural Research Program of NIDCD/NIH. The M.M. and N.S. and the C.M. labs are members of the Labex BRAIN.

Received: October 3, 2013

Revised: June 18, 2014

Accepted: September 9, 2014

Published: October 9, 2014

REFERENCES

Barria, A., and Malinow, R. (2002). Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron* 35, 345–353.

- Barry, M.F., and Ziff, E.B. (2002). Receptor trafficking and the plasticity of excitatory synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 279–286.
- Chung, H.J., Huang, Y.H., Lau, L.F., and Haganir, R.L. (2004). Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J. Neurosci.* 24, 10248–10259.
- Ehlers, M.D. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28, 511–525.
- Elias, G.M., and Nicoll, R.A. (2007). Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends Cell Biol.* 17, 343–352.
- Follows, E.R., McPheat, J.C., Minshull, C., Moore, N.C., Paupit, R.A., Rowsell, S., Stacey, C.L., Stanway, J.J., Taylor, I.W., and Abbott, W.M. (2001). Study of the interaction of the medium chain mu 2 subunit of the clathrin-associated adapter protein complex 2 with cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and CD28. *Biochem. J.* 359, 427–434.
- Franco, M., Peters, P.J., Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (1999). EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *EMBO J.* 18, 1480–1491.
- Groc, L., Heine, M., Cousins, S.L., Stephenson, F.A., Lounis, B., Cognet, L., and Choquet, D. (2006). NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18769–18774.
- Groc, L., Bard, L., and Choquet, D. (2009). Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* 158, 4–18.
- Henley, J.M., Barker, E.A., and Glebov, O.O. (2011). Routes, destinations and delays: recent advances in AMPA receptor trafficking. *Trends Neurosci.* 34, 258–268.
- Howard, M.A., Elias, G.M., Elias, L.A., Swat, W., and Nicoll, R.A. (2010). The role of SAP97 in synaptic glutamate receptor dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 3805–3810.
- Jo, J., Son, G.H., Winters, B.L., Kim, M.J., Whitcomb, D.J., Dickinson, B.A., Lee, Y.B., Futai, K., Amici, M., Sheng, M., et al. (2010). Muscarinic receptors induce LTD of NMDAR EPSCs via a mechanism involving hippocampal, AP2 and PSD-95. *Nat. Neurosci.* 13, 1216–1224.
- Jurd, R., Thornton, C., Wang, J., Luong, K., Phamluong, K., Kharazia, V., Gibb, S.L., and Ron, D. (2008). Mind bomb-2 is an E3 ligase that ubiquitinates the N-methyl-D-aspartate receptor NR2B subunit in a phosphorylation-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 283, 301–310.
- Kennedy, M.J., and Ehlers, M.D. (2006). Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 325–362.
- Kennedy, M.J., Davison, I.G., Robinson, C.G., and Ehlers, M.D. (2010). Syntaxin-4 defines a domain for activity-dependent exocytosis in dendritic spines. *Cell* 141, 524–535.
- Lahuna, O., Quellar, M., Achard, C., Nola, S., Méduri, G., Navarro, C., Vitale, N., Borg, J.P., and Misrahi, M. (2005). Thyrotropin receptor trafficking relies on the hScrib-betaPIX-GIT1-ARF6 pathway. *EMBO J.* 24, 1364–1374.
- Lau, C.G., and Zukin, R.S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 413–426.
- Lau, C.G., Takayasu, Y., Rodenas-Ruano, A., Paternain, A.V., Lerma, J., Bennett, M.V., and Zukin, R.S. (2010). SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA receptor trafficking. *J. Neurosci.* 30, 242–254.
- Lavezzari, G., McCallum, J., Dewey, C.M., and Roche, K.W. (2004). Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *J. Neurosci.* 24, 6383–6391.
- Losi, G., Prybylowski, K., Fu, Z., Luo, J., Wenthold, R.J., and Vicini, S. (2003). PSD-95 regulates NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons of the rat. *J. Physiol.* 548, 21–29.
- Massimi, P., Narayan, N., Thomas, M., Gammoh, N., Strand, S., Strand, D., and Banks, L. (2008). Regulation of the hDlg/hScrib/HuGl-1 tumour suppressor complex. *Exp. Cell Res.* 314, 3306–3317.
- Mauceri, D., Gardoni, F., Marcello, E., and Di Luca, M. (2007). Dual role of CaMKII-dependent SAP97 phosphorylation in mediating trafficking and insertion of NMDA receptor subunit NR2A. *J. Neurochem.* 100, 1032–1046.
- Michaelis, U.R., Chavakis, E., Kruse, C., Jungblut, B., Kaluza, D., Wandzioch, K., Manavski, Y., Heide, H., Santoni, M.J., Potente, M., et al. (2013). The polarity protein Scrib is essential for directed endothelial cell migration. *Circ. Res.* 112, 924–934.
- Montgomery, J.M., Selcher, J.C., Hanson, J.E., and Madison, D.V. (2005). Dynamically dependent NMDAR endocytosis during LTD and its dependence on synaptic state. *BMC Neurosci.* 6, 48.
- Moreau, M.M., Pigué, N., Papouin, T., Koehl, M., Durand, C.M., Rubio, M.E., Loll, F., Richard, E.M., Mazzocco, C., Racca, C., et al. (2010). The planar polarity protein Scribble1 is essential for neuronal plasticity and brain function. *J. Neurosci.* 30, 9738–9752.
- Nong, Y., Huang, Y.Q., Ju, W., Kalia, L.V., Ahmadian, G., Wang, Y.T., and Salter, M.W. (2003). Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature* 422, 302–307.
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.P., and Oliet, S.H. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150, 633–646.
- Pérez-Otaño, I., Luján, R., Tavalin, S.J., Plomann, M., Modregger, J., Liu, X.B., Jones, E.G., Heinemann, S.F., Lo, D.C., and Ehlers, M.D. (2006). Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nat. Neurosci.* 9, 611–621.
- Prigent, M., Dubois, T., Raposo, G., Derrien, V., Tenza, D., Rossé, C., Camonis, J., and Chavrier, P. (2003). ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J. Cell Biol.* 163, 1111–1121.
- Prybylowski, K., Chang, K., Sans, N., Kan, L., Vicini, S., and Wenthold, R.J. (2005). The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron* 47, 845–857.
- Roche, K.W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M.D., and Wenthold, R.J. (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat. Neurosci.* 4, 794–802.
- Sans, N., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Blahos, J., 2nd, Hell, J.W., and Wenthold, R.J. (2000). A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J. Neurosci.* 20, 1260–1271.
- Sans, N., Prybylowski, K., Petralia, R.S., Chang, K., Wang, Y.X., Racca, C., Vicini, S., and Wenthold, R.J. (2003). NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nat. Cell Biol.* 5, 520–530.
- Sans, N., Wang, P.Y., Du, Q., Petralia, R.S., Wang, Y.X., Nakka, S., Blumer, J.B., Macara, I.G., and Wenthold, R.J. (2005). mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. *Nat. Cell Biol.* 7, 1179–1190.
- Sanz-Clemente, A., Matta, J.A., Isaac, J.T., and Roche, K.W. (2010). Casein kinase 2 regulates the NR2 subunit composition of synaptic NMDA receptors. *Neuron* 67, 984–996.
- Sanz-Clemente, A., Gray, J.A., Ogilvie, K.A., Nicoll, R.A., and Roche, K.W. (2013). Activated CaMKII couples GluN2B and casein kinase 2 to control synaptic NMDA receptors. *Cell Reports* 3, 607–614.
- Scott, D.B., Michailidis, I., Mu, Y., Logothetis, D., and Ehlers, M.D. (2004). Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *J. Neurosci.* 24, 7096–7109.
- Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 823–847.
- Shepherd, J.D., and Haganir, R.L. (2007). The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 613–643.
- Suh, Y.H., Terashima, A., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., Isaac, J.T., Roche, K.W., and Roche, P.A. (2010). A neuronal role for SNAP-23 in postsynaptic glutamate receptor trafficking. *Nat. Neurosci.* 13, 338–343.

- Traub, L.M. (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 583–596.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Oden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496.
- Uekita, T., Itoh, Y., Yana, I., Ohno, H., and Seiki, M. (2001). Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *J. Cell Biol.* 155, 1345–1356.
- Wenthold, R.J., Prybylowski, K., Standley, S., Sans, N., and Petralia, R.S. (2003). Trafficking of NMDA receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 335–358.
- Yashiro, K., and Philpot, B.D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55, 1081–1094.
- Yi, Z., Petralia, R.S., Fu, Z., Swanwick, C.C., Wang, Y.X., Prybylowski, K., Sans, N., Vicini, S., and Wenthold, R.J. (2007). The role of the PDZ protein GIPC in regulating NMDA receptor trafficking. *J. Neurosci.* 27, 11663–11675.
- Yu, A., Rual, J.F., Tamai, K., Harada, Y., Vidal, M., He, X., and Kirchhausen, T. (2007). Association of Dishevelled with the clathrin AP-2 adaptor is required for Frizzled endocytosis and planar cell polarity signaling. *Dev. Cell* 12, 129–141.

Cell Reports, Volume 9

Supplemental Information

Scribble1/AP2 Complex Coordinates

NMDA Receptor Endocytic Recycling

Nicolas H. Piguel, Sabine Fievre, Jean-Michel Blanc, Mario Carta, Maïté M. Moreau, Enora Moutin, Vera L. Pinheiro, Chantal Medina, Jerome Ezan, Léa Lasvaux, François Loll, Christelle M. Durand, Kai Chang, Ronald S. Petralia, Robert J. Wenthold, F. Anne Stephenson, Laurent Vuillard, Hervé Darbon, Julie Perroy, Christophe Mulle, Mireille Montcouquiol, Claudia Racca, and Nathalie Sans

Inventory of Supplemental Informations:

Supplemental informations include eight supplemental figures (Figures S1–S8), two supplemental tables (Tables S1 and S2), one file with supplemental experimental procedures and supplemental references.

Figure S1. Scribble1 expression at synapses and in vesicles. Related to Figure 1.

Figure S2. Scrib1 levels affect the surface expression of myc-GluN2A- and myc-GluN2B-containing receptors. Related to Figure 3.

Figure S3. Scrib1 levels affect the surface expression of GluN2A- and GluN2B-containing receptors after stimulation. Related to Figure 3.

Figure S4. Co-expression of Scrib1, Tac-GluN2A or Tac-GluN2B and endosomal markers in heterologous cells. Related to Figure 4 and Figure 5.

Figure S5. Overexpression of Scrib1 modifies GluN2A receptors endocytic sorting. Related to Figure 5.

Figure S6. Down regulation of Scrib1 modifies differentially GluN2A and GluN2B-containing receptors endocytic sorting. Related to Figure 5.

Figure S7. Overexpression of Scrib1 does not regulate the level of NMDARs at Schaffer collaterals CA1 pyramidal cells synapse. Related to Figure 7.

Table S1. Thermodynamic Binding Parameters for Scrib1 PDZ domains and GluN2A or GluN2B peptides determined by ITC. Related to Figure 1.

Table S2. Statistics reporting, by figure.

Supplemental experimental procedures.

Supplemental references.

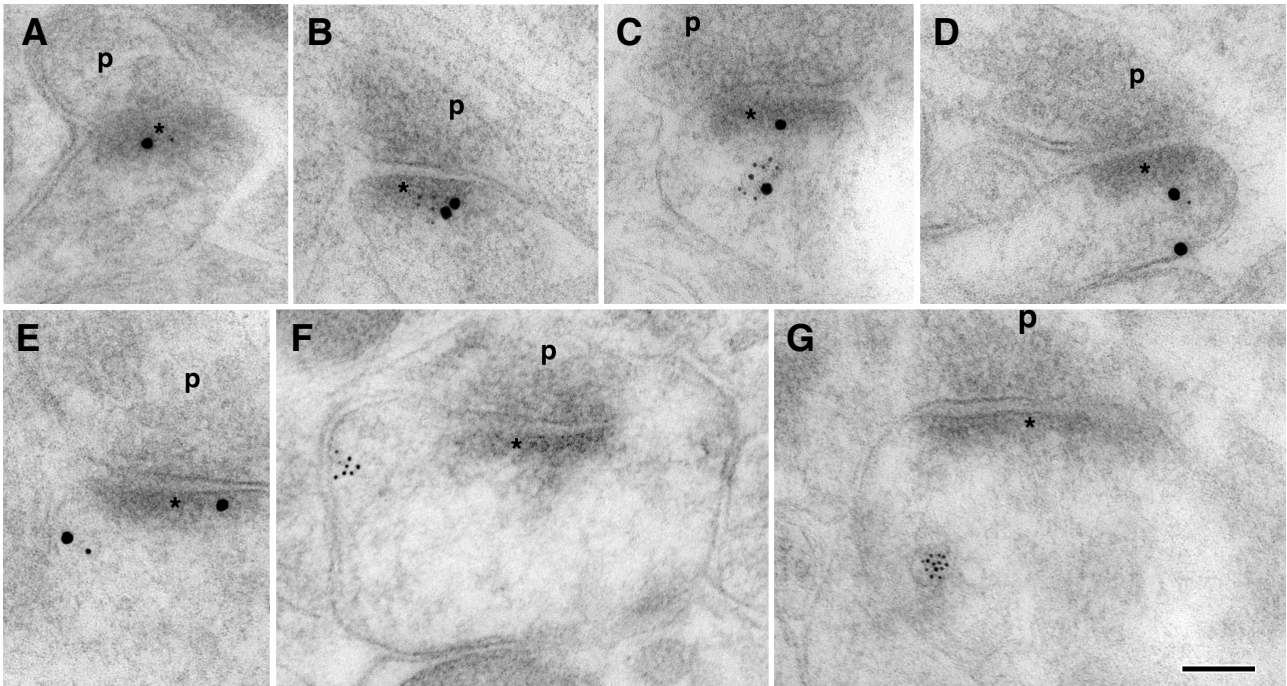


Figure S1. Scribble1 expression at synapses and in vesicles. Related to Figure 1.

(A,E) Immunogold localization of Scrib1 (5 nm) and its colocalization with GluN1 (15 nm) in hippocampal CA1 stratum radiatum synapses. Asterisk, postsynaptic density; p, presynaptic terminal. Note the double labelling at the synapse (A-B) as well as in a vesicle in the spine cytoplasm (C-E).

(F,G) The bottom two images show labelling for Scrib1 at the extrasynaptic membrane (F) and in a cytoplasmic vesicle (G). Scale bar, 100 nm.

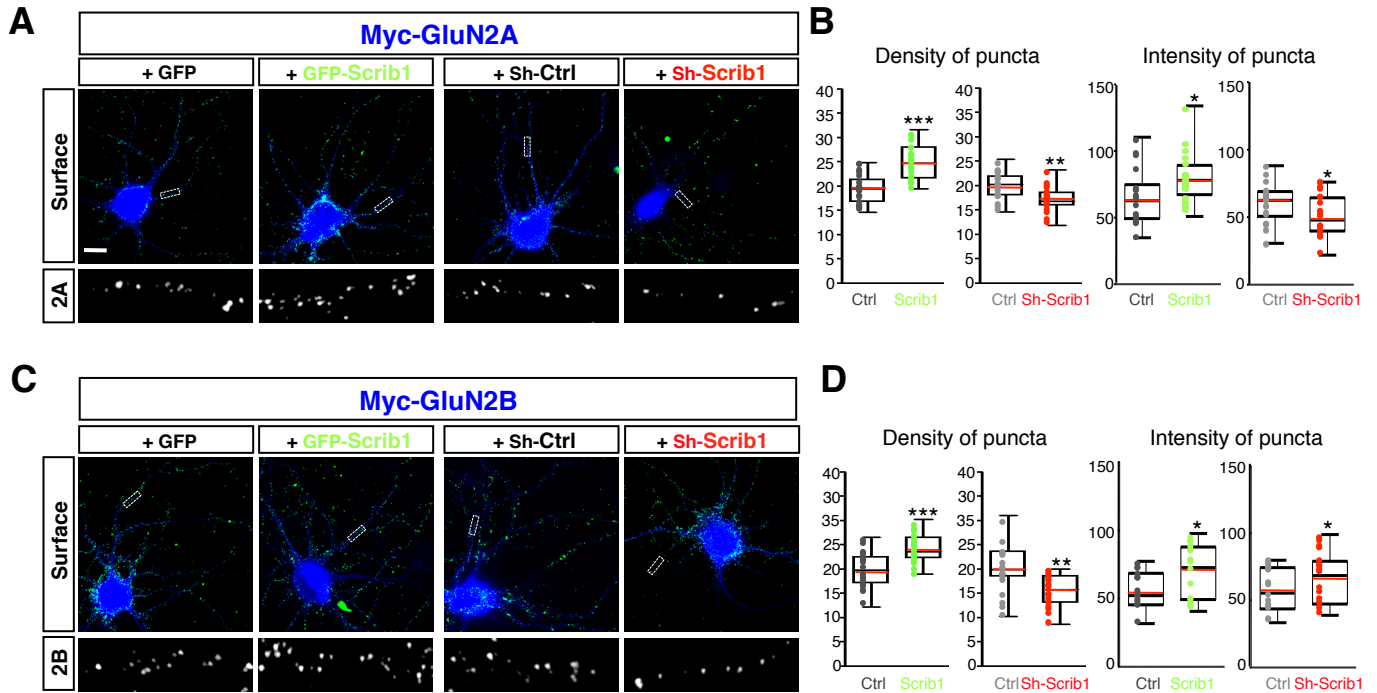


Figure S2. Scrib1 levels affect the surface expression of myc-GluN2A- and myc-GluN2B-containing receptors. Related to Figure 3.

(A,C) The surface expression of myc-GluN2A- (A) and myc-GluN2B-containing NMDARs (C). Overexpression of GFP-control, GFP-Scrib1, Sh-Control or Sh-Scrib1 in primary hippocampal neuron cultures transfected with myc-GluN2A (A) or myc-GluN2B (C) at 14 to 15 DIV. Surface receptor populations are labelled in green (scale bar = 10µm).

(B, D) Box-and-whisker plots indicate the median value (black line) and mean value (red line), the 25-75th (box) and the 10-90th (whiskers); open circles represent individual values for puncta number or intensity (n = 20 from at least 3 experiments). (B) Data were compared using Unpaired t test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Density for Scrib1: t(38)=3.811, p<0.001 and ShScrib1: t(38)=3.063, p=0.004; Intensity for Scrib1: t(38)=2.31, p=0.023 and ShScrib1: t(38)=2.276, p=0.029. (D) Data were compared using Unpaired t test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Density for Scrib1 t(38)=4.078, p<0.001 and ShScrib1: t(38)=3.334, p=0.0019; Intensity for Scrib1: t(38)=2.44, p=0.0196 and ShScrib1: t(38)=3.33, p=0.019.

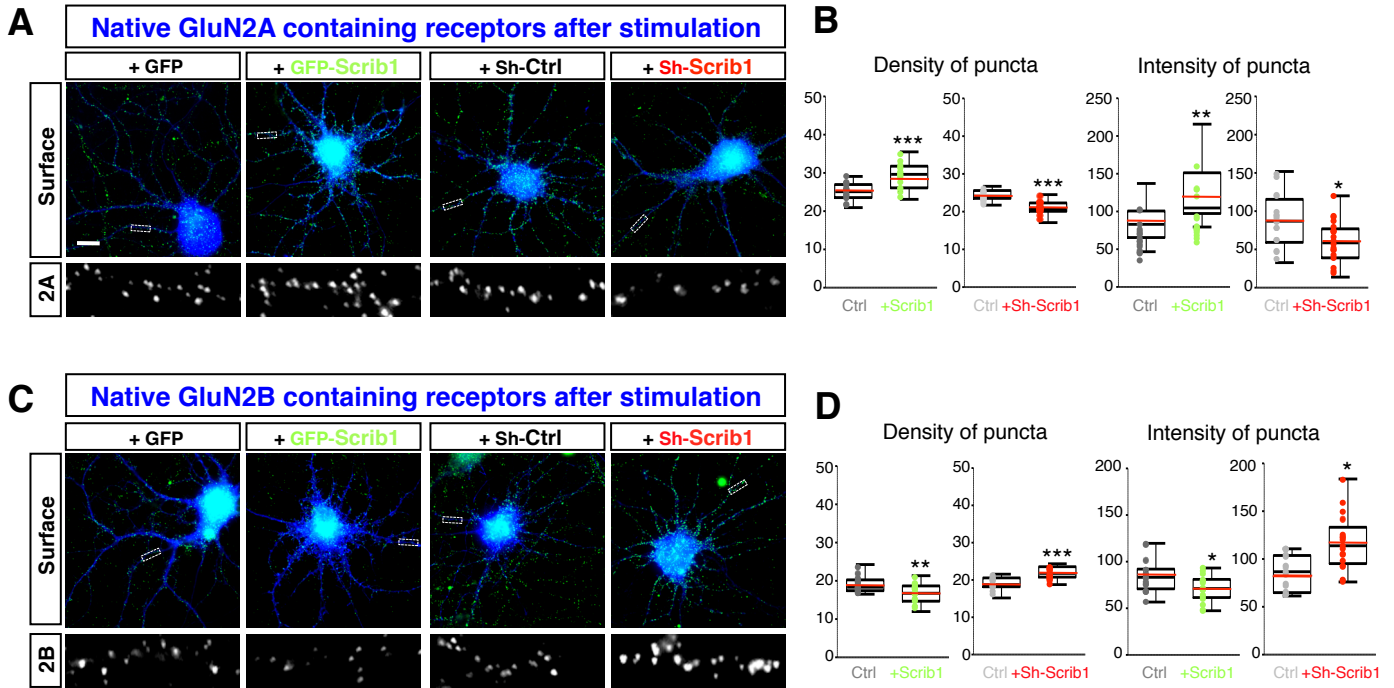


Figure S3. Scrib1 levels affect the surface expression of GluN2A- and GluN2B-containing receptors after stimulation. Related to Figure 3.

(A,C) The surface expression of GluN2A- (A) and GluN2B-containing NMDARs (C). Overexpression of GFP-control, GFP-Scrib1, Sh-Control or Sh-Scrib1 in primary hippocampal neuron cultures transfected with myc-GluN2A (A) or myc-GluN2B (C) at 14 to 15 DIV and stimulated with D-Serine/NMDA. Surface receptor populations are labelled in green (scale bar = 10µm).

(B, D) Box-and-whisker plots indicate the median value (black line) and mean value (red line), the 25-75th (box) and the 10-90th (whiskers); open circles represent individual values (n = 20 from at least 3 experiments). (B) Data were compared using Unpaired t test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Density for Scrib1: t(30)=4.27, p<0.001 and ShScrib1: t(33)=6.616, p<0.001; Intensity for Scrib1: t(30)=2.98, p=0.006 and ShScrib1: t(33)=2.62, p=0.013. (D) Data were compared using Unpaired t test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001). Density for Scrib1: t(32)=2.85, p=0.007 and ShScrib1: t(30)=4.847, p<0.001; Intensity for Scrib1: t(32)=259, p=0.014 and ShScrib1: t(30)=3.62, p=0.0011.

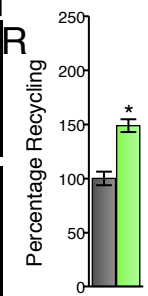
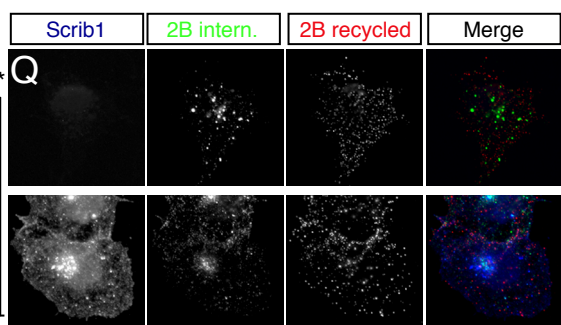
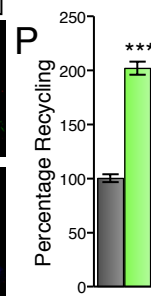
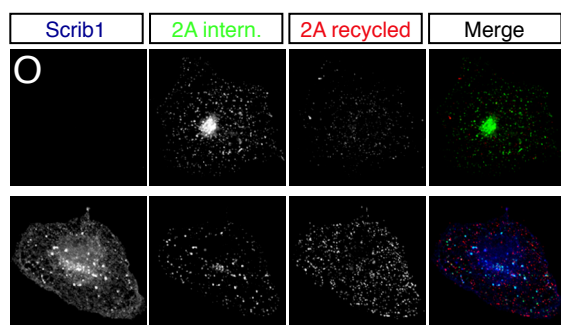
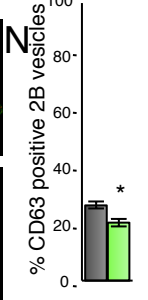
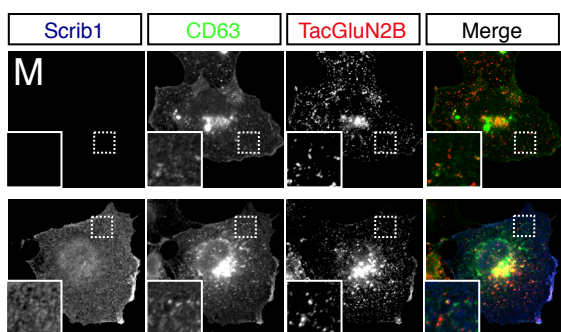
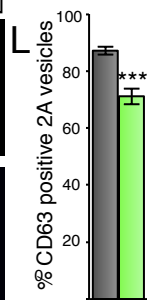
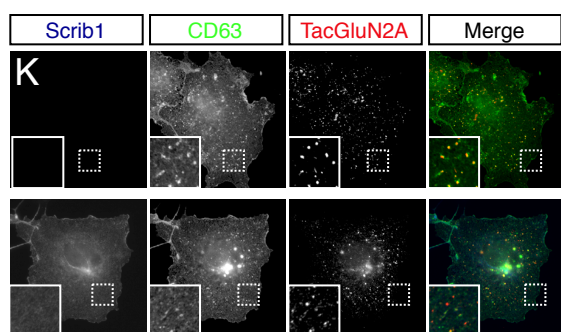
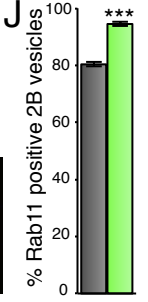
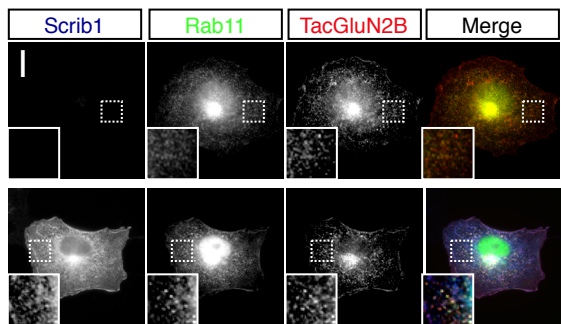
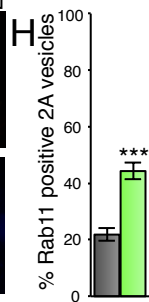
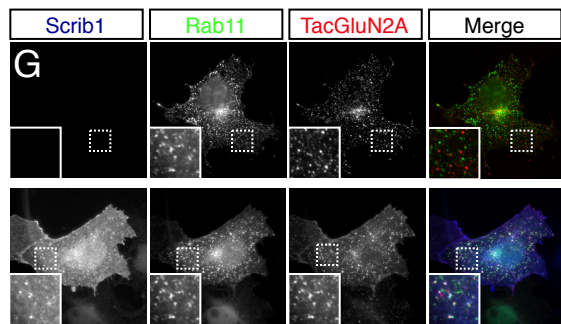
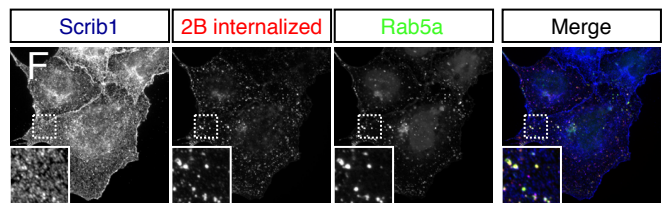
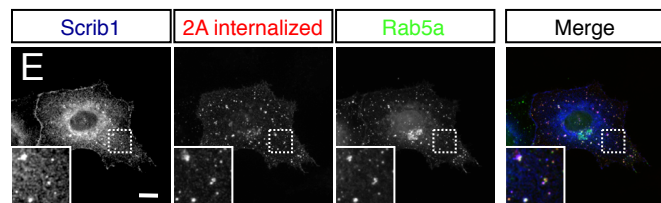
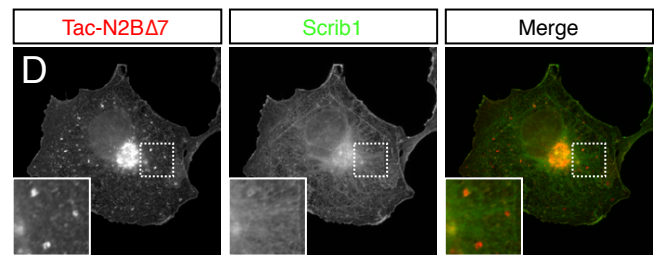
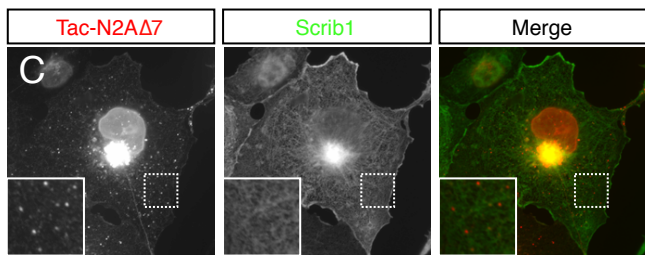
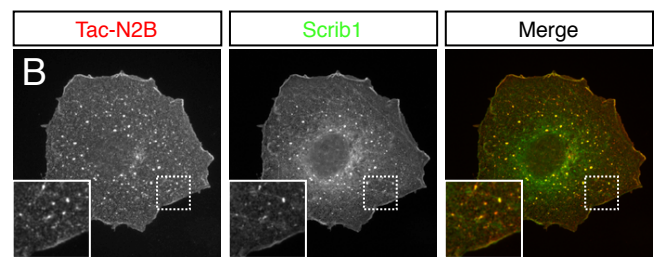
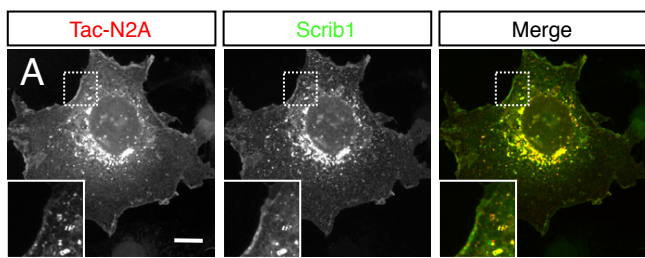


Figure S4. Co-expression of Scrib1, Tac-GluN2A or Tac-GluN2B and endosomal markers in heterologous cells. Related to Figure 4 and Figure 5.

(A-D) Immunofluorescence microscopy of COS-7 cells transiently double-transfected with GFP-Scrib1 (green) and Tac-GluN2A, Tac-GluN2A Δ 7, Tac-GluN2B or Tac-GluN2B Δ 7 (red). GFP-Scrib1 and Tac-GluN2A colocalize at the plasma membrane and in cytoplasmic vesicle-like puncta (A), but GFP-Scrib1 does not colocalize with the truncated Tac-GluN2A Δ 7 (C). GFP-Scrib1 and Tac-GluN2B colocalize at the plasma membrane and in cytoplasmic vesicle-like puncta (B), but GFP-Scrib1 does not colocalize with the truncated Tac-GluN2B Δ 7 (D) (scale bar = 10 μ m).

(E,F,G,I,K,M) The labeling of Tac-GluN2A (E, G and K) or Tac-GluN2B (F, I and M) internalization (red) with the early endosome marker GFP-Rab5 (E and F, green), recycling endosome marker GFP-Rab11 (G and I, green) or late endosome marker GFP-CD63 (K and M, green) with or without HA-Scrib1 (blue). The cells with surface-labeled receptors were incubated at 37°C for 15 min for GFP-Rab5 staining and 30 min for GFP-Rab11 and GFP-CD63 staining.

(H,J,L,N) Quantification of (G), (I), (K) and (M). The histograms represent the means of the percentage of TacGluN2 vesicles that co-localize with the endosome markers GFP-Rab11 (H and J) or GFP-CD63 (L and M) $\pm$ sem. (H) Data were compared using Unpaired t test: n = 30 cells for each condition from 3 independent experiments; $t(58)=7.021$; $p<0.001$. (J) Data were compared using Unpaired t test: n = 30 cells for each condition from 3 independent experiments; $t(58)=14.22$; $p<0.001$. (L) Data were compared using Unpaired t test with Welch's correction: n = 20 to 25 cells for each condition from 3 independent experiments; $t(43)=5.089$; $p<0.001$. (N) Data were compared using Unpaired t test: n = 10 cells for each condition from 3 independent experiments; $t(18)=3.299$; $p=0.0047$.

(O,Q) Labeling of recycled (red) and internalized (green) Tac-GluN2A (O) or Tac-GluN2B (Q) with or without Scrib1 (blue).

(P, R) Quantification of GluN2A (P) and GluN2B (R) recycling. The histograms represent the means of the percent recycling $\pm$ sem. Data were compared using Unpaired t test with Welch's correction: n = 20 to 35 cells for each condition from 3 independent experiments: $t(54)=4.985$; $p<0.001$ (p) and $t(67)=2.083$; $p<0.001$.

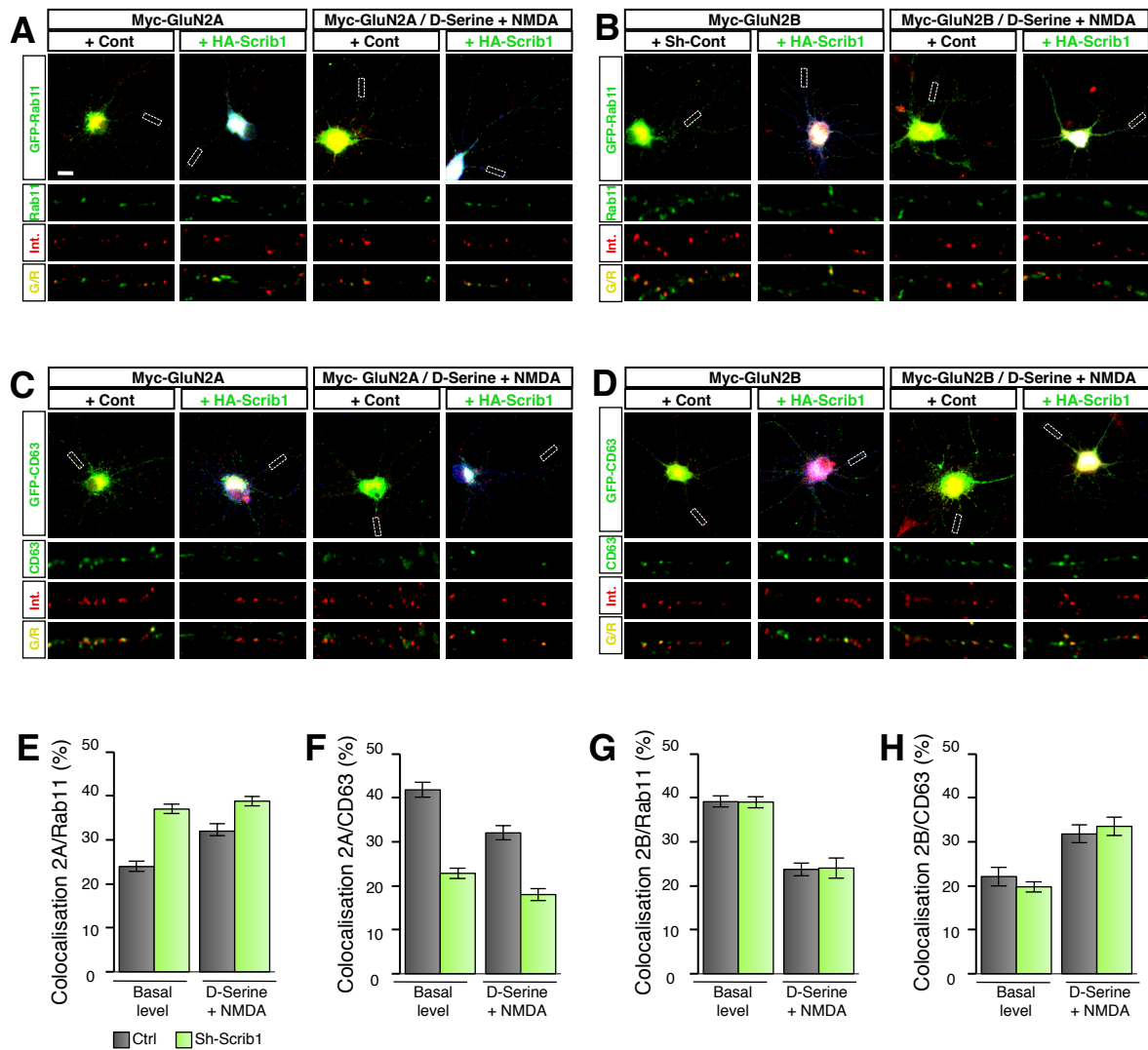


Figure S5. Overexpression of Scrib1 modifies GluN2A receptors endocytic sorting. Related to Figure 5.

(A-D) Internalization staining of transfected myc-GluN2A (A,C), and myc-GluN2B (B-D) with over-expression of recycling endosome marker GFP-Rab11 (A,B) or late endosomal marker GFP-CD63 (C,D) and Control or HA-Scrib1 in primary hippocampal neuron culture with or without stimulation (scale bar = 10µm).

(E-H) Histograms represent means of colocalization percentage of internalized receptor with endosome marker $\pm$ S.E.M.. After 30 min of internalization, the colocalization of GluN2A with GFP-Rab11 increases dependently of Scrib1 overexpression (Treatment effect: $F_{1,40}=53.28$, $p<0.001$) and stimulation (Stimulus effect: $F_{1,40}=12.67$, $p<0.001$) (E). The colocalization of GluN2A with GFP-CD63 decreases (Treatment effect: $F_{1,36}=103.6$, $p<0.001$, Stimulus effect: $F_{1,36}=20.3$, $p<0.001$) (F). No effect of Scrib1 overexpression on GluN2B colocalization with Rab11 was observed in normal or stimulated condition but the stimulation decreases the colocalization with of without Scrib1 (Stimulus effect: $F_{1,25}=79.54$ for Rab11) (G). No effect of Scrib1 overexpression on GluN2B colocalization with CD63 was observed in normal or stimulated condition but the stimulation increases the colocalization with of without Scrib1 (Stimulus effect: $F_{1,23}=38.77$, $p<0.001$ for CD63) (H). Data were compared using 2-way ANOVA (Stimulus effect and treatment effect, $p<0.001$, $p<0.001$, $n = 10$ to 15 from 3 experiments).

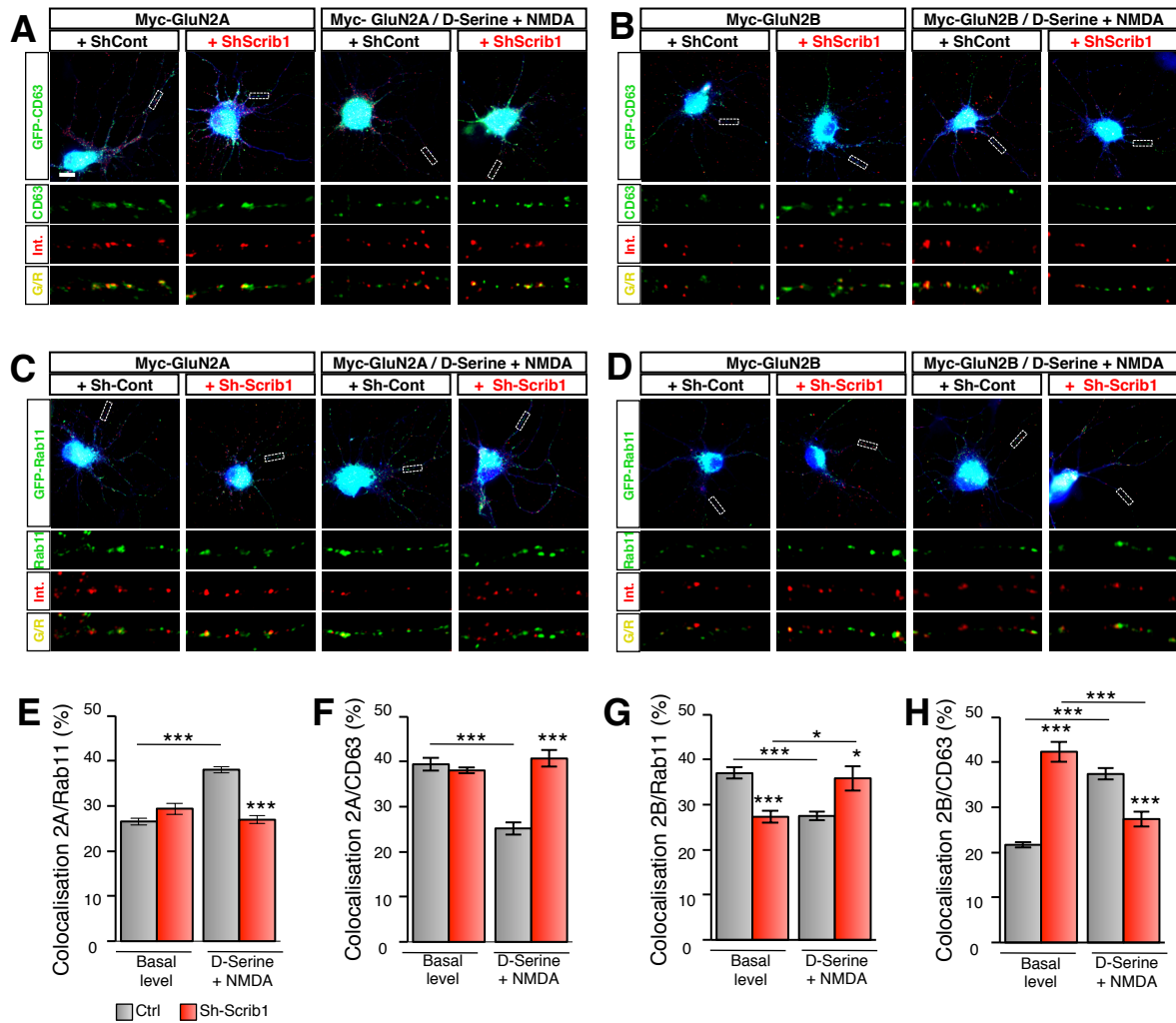


Figure S6. Down regulation of Scrib1 modifies differentially GluN2A and GluN2B-containing receptors endocytic sorting. Related to Figure 5.

(A-D) Internalization staining of transfected myc-GluN2A (A,C), and myc-GluN2B (B-D) with over-expression of the late endosomal marker CD63 tagged with GFP (A,B) or recycling endosome marker GFP-Rab11 (C,D) and Sh-Control or Sh-Scrib1 in primary hippocampal neuron culture and with or without stimulation scale bar = 10µm).

(E-H) Histograms represent means of colocalization percentage of internalized receptor with endosome marker $\pm$ S.E.M.. We showed that after 30 min of internalization the amount of colocalization of GluN2A with GFP-Rab11 or GFP-CD63 was the same with Sh-control or Sh-Scrib1 in basal condition and that stimulation decreased the traffic of GluN2A to Rab11 positive endosomes and increased the traffic of GluN2A to CD63 positive lysosomes (Interaction treatment x stimulus effect: $F_{1,34}=53.43$, Bonferroni corrected t test: $***p<0.001$ for Rab11 and Interaction treatment x stimulus effect: $F_{1,35}=36.27$, Bonferroni corrected t test: $***p<0.001$ for CD63 (E,F). In the presence of Sh-Scrib1, we observed that after 30 min of internalization the amount of colocalization of GluN2B and CD63 increased while the colocalization with Rab11 positive endosome decreased in basal condition (Interaction treatment x stimulus effect: $F_{1,31}=21.9$, Bonferroni corrected t test: $***p<0.001$ for Rab11 and Interaction treatment x stimulus effect: $F_{1,32}=112.19$, Bonferroni corrected t test: $***p<0.001$ for CD63) and that stimulation increased the traffic of GluN2B to Rab11 positive endosomes and decreased the traffic of GluN2B to CD63 positive lysosomes (Bonferroni corrected t test: $*p<0.05$ for Rab11; Bonferroni corrected t test: $***p<0.001$ for CD63 (G,H). Data were compared using Two-way ANOVA (Stimulus effect and treatment effect), with Bonferroni post-hoc test $*p<0,05$ $**p<0,005$ $***p<0,001$ (n = 10 to 15 from 3 experiments).

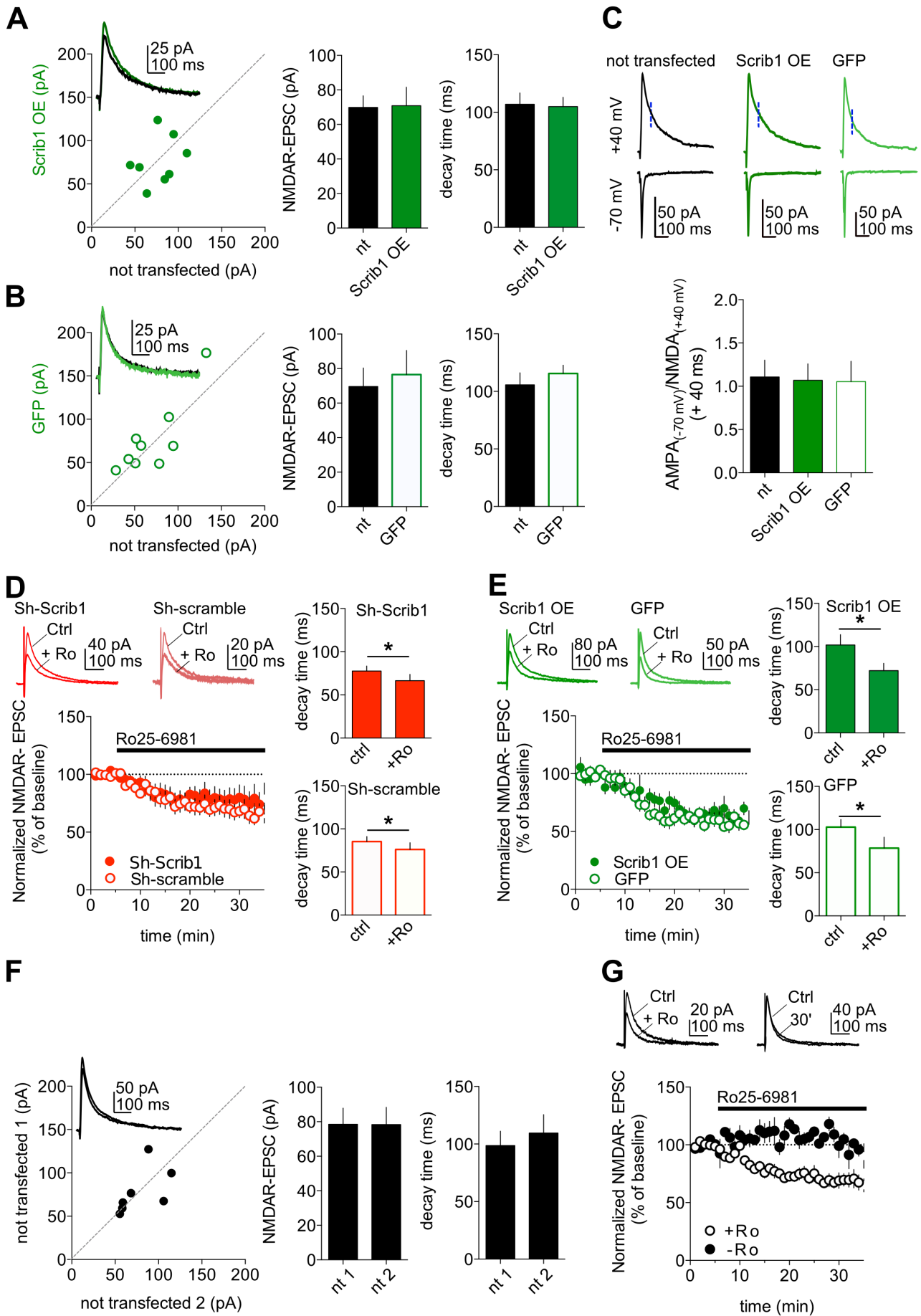


Figure S7. Overexpression of Scrib1 does not regulate the level of NMDARs at Schaffer collaterals CA1 pyramidal cells synapse. Related to Figure 7.

(A) Transfection with Scrib1 does not affect neither the amplitude nor the decay time of NMDAR-mediated EPSCs at SC-CA1 synapse. Sample traces shown in the inset (control: 69.8 ± 6.7 pA, $n = 8$; Scrib1: 70.8 ± 10.8 pA, $n = 8$, Paired t test: NMDAR amplitude: $t(8) = 0.095$, $p = 0.926$; NMDAR decay: $t(8) = 0.606$, $p = 0.56$).

(B) GFP transfection does not affect the NMDAR-mediated EPSCs at SC-CA1 synapse (amplitude and decay time), sample traces shown in the inset (control: 69.6 ± 10.7 pA, $n = 9$; pSUPER -GFP: 76.5 ± 13.9 pA, $n = 9$; Paired t test: NMDAR amplitude: $t(8) = 0.894$, $p = 0.397$; NMDAR decay: $t(8) = 0.919$, $p = 0.384$). (C) Sample traces and summary graphs illustrating that the AMPA/NMDA does not differ between not transfected cells and cells transfected with Scrib1 or pSUPER -GFP (not transfected: 1.11 ± 0.19 , $n = 12$; Scrib1: 1.81 ± 0.38 , $n = 11$; pSUPER -GFP: 1.05 ± 0.23 , $n = 6$).

(D) Sample traces and summary graph illustrating the effect of Ro25-2981 (1 μ M) on NMDAR-mediated currents amplitude (pSUPER-ShRNA-Scrib1: 76.9 ± 11.6 %, $n = 9$; pSUPER-ShRNA-control: 63.0 ± 7.1 %, $n = 8$) and decay (pSUPER-ShRNA-Scrib1; baseline: 77.6 ± 5.9 ms, after Ro25-2981: 66.5 ± 7.3 ms, $n = 9$; pSUPER-ShRNA-control baseline: 85.3 ± 5.8 ms, after Ro25-2981: 76.2 ± 7.8 ms, $n = 8$; Paired t test: Ro effect on Sh-Scrib1 transfected cells: $t(8) = 2.963$, $p = 0.018$; Ro effect on pSUPER transfected cells: $t(7) = 2.373$, $p = 0.049$).

(E) Sample traces and summary graph illustrating the effect of Ro25-2981 (1 μ M) on NMDAR-mediated currents amplitude (Scrib1: 76.9 ± 11.6 %, $n = 9$; pSUPER-GFP: 63.0 ± 7.1 %, $n = 8$) and decay (Scrib1: baseline: 77.6 ± 5.9 ms, after Ro25-2981: 66.5 ± 7.3 ms, $n = 9$; pSUPER-GFP baseline: 85.3 ± 5.8 ms, after Ro25-2981: 76.2 ± 7.8 ms, $n = 8$; Paired t test: Ro effect on Scrib1 transfected cells: $t(8) = 2.963$, $p = 0.018$; Ro effect on pSUPER -GFP transfected cells: $t(7) = 2.373$, $p = 0.049$).

(F) Sample traces and summary graphs illustrating that two randomly patched and adjacent not transfected neurons showed similar amplitude and decay time ($n = 7$).

(G) Sample traces and summary graph illustrating the changes in amplitude of NMDAR-mediated currents amplitude in not transfected neurons in the presence ($n = 12$) or absence ($n = 3$) of Ro25-2981 (1 μ M).

Proteins	Peptides	Kd (μ M)	dG (kcal/mol)	dH (kcal/mol)	TdS Kcal/mol)
7PDZ1s	GluN2A WT	No interaction			
	GluN2B WT	No interaction			
7PDZ2s	GluN2A WT	60.0 $\pm$ 4.2	-5.7 $\pm$ 0.0	-7.1 $\pm$ 0.7	-1.4 $\pm$ 0.7
	GluN2A S1462A	No interaction			
	GluN2B WT	48.0 $\pm$ 7.8	-5.8 $\pm$ 0.1	-10.3 $\pm$ 0.9	-4.5 $\pm$ 1.1
	GluN2B S1480A	No interaction			
7PDZ3s	GluN2A WT	11.6 $\pm$ 2.3	-7.9 $\pm$ 1.7	-16.3 $\pm$ 1.1	-8.4 $\pm$ 0.6
	GluN2A S1462A	No interaction			
	GluN2B WT	12.3 $\pm$ 1.8	-7.2 $\pm$ 0.5	-14.7 $\pm$ 0.1	-8.8 $\pm$ 0.6
	GluN2B S1480A	No interaction			
7PDZ4s	GluN2A WT	202.5 $\pm$ 21.9	-5.4 $\pm$ 0.6	-5.4 $\pm$ 0.5	0.0
	GluN2A S1462A	No interaction			
	GluN2B WT	156.5 $\pm$ 16.3	-5.7 $\pm$ 0.4	-5.7 $\pm$ 0.4	0.0
	GluN2B S1480A	No interaction			
TRX (fusion protein)	GluN2A WT	No interaction			

Table S1. Thermodynamic Binding Parameters for Scrib1 PDZ domains and GluN2A or GluN2B peptides determined by ITC. Related to Figure 1.

Values are the arithmetic mean of at least two independent experiments (Kd: dissociation constant; G: Gibbs free energy ; H: enthalpy; S: entropy). All c-values were measured between 10 and 100. Stoichiometric (n) values ranged from 0.85 to 0.99.

Figure number	Conditions	Exact value (n)	Number of independent experiment	Error bars	Test	Degree of freedom & F/T Value	p value
2B	Ctrl,TTX,Bicuculin Scrib1 GluN2A GluN2B	6 6 6	3	SEM	Unpaired t-test	t(5)=4.547 t(5)=2.908 t(5)=2.632	p=0039 p=0.027 p=0.5507
2D	Ctrl vs. EOF Scrib1 GAPDH	5 5	3	SEM	One sample t-test	t(4)=5.675 t(4)=0.92	p=0.0024 p=0.39
2E	Ctrl vs. EOF GluN1 GluN2A GluN2B	5 5 5	3	SEM	One sample t-test	t(4)=0.3846 t(4)=0.2931 t(4)=0.0348	p=0.7163 p=0.0326 p=0.0348
2G	Ctrl vs. EOF GluN2A GluN2B	4 6	3	SEM	One sample t-test	t(3)=3.311 t(5)=0.04756	p=0.045 p=0.96
3B	Ctrl Scrib1 Scrib1ΔPDZ2-3	30 28 30	3	min-max	Kruskal-Wallis one way Dunn's Multiple comparison: Ctrl vs Scrib1 Scrib1 vs Scrib1ΔPDZ2-3	F(2,85)=20.71	p<0.001 p<0.05 p<0.001
3C	Ctrl Scrib1 Scrib1ΔPDZ2-3	30 28 30	3	min-max	Kruskal-Wallis one way Dunn's Multiple comparison: Ctrl vs Scrib1 Scrib1 vs Scrib1ΔPDZ2-3	F(2,85)=11.32	p<0.01 p<0.01 p<0.05
3E	Ctrl Scrib1 Scrib1ΔPDZ2-3	29 28 30	3	min-max	Kruskal-Wallis one way Dunn's Multiple comparison: Ctrl vs Scrib1 Scrib1 vs Scrib1ΔPDZ2-3	F(2,84)=14.2	p<0.001 p<0.01 p<0.01
3F	Ctrl Scrib1 Scrib1ΔPDZ2-3	29 28 30	3	min-max	Kruskal-Wallis one way Dunn's Multiple comparison: Ctrl vs Scrib1 Scrib1 vs Scrib1ΔPDZ2-3	F(2,84)=9.55	p<0.01 p<0.05 p<0.05
3H	ShCtrl ShScrib1 Rescue RescueΔPDZ2-3	29 30 20 30	3	min-max	Kruskal-Wallis one way Dunn's Multiple comparison: ShCtrl vs ShScrib1 ShScrib1 vs RescueΔPDZ2-3 ShScrib1 vs Rescue Rescue vs RescueΔPDZ2-3	F(3,106)=60.42	p<0.001 p<0.001 p<0.001 p<0.001 p<0.001
3I	ShCtrl ShScrib1 Rescue RescueΔPDZ2-3	29 30 20 30	3	min-max	Kruskal-Wallis one way Dunn's Multiple comparison: ShCtrl vs ShScrib1 ShScrib1 vs RescueΔPDZ2-3 ShScrib1 vs Rescue Rescue vs RescueΔPDZ2-3	F(3,106)=22.75	p<0.001 p<0.05 p<0.01 p<0.01 p<0.01
3K	ShCtrl ShScrib1 Rescue RescueΔPDZ2-3	30 26 17 22	3	min-max	Kruskal-Wallis one way Dunn's Multiple comparison: ShCtrl vs ShScrib1 ShScrib1 vs RescueΔPDZ2-3 ShScrib1 vs Rescue Rescue vs RescueΔPDZ2-3	F(3,94)=31.31	p<0.001 p<0.01 p<0.01 p<0.001 p<0.001
3L	ShCtrl ShScrib1 Rescue RescueΔPDZ2-3	30 26 17 22	3	min-max	Kruskal-Wallis one way Dunn's Multiple comparison	F(3,94)=5.43	p=0.14
3N	Density: Ctrl Scrib1 ShCtrl ShScrib1 Intensity: Ctrl Scrib1 ShCtrl ShScrib1	24 26 15 17 24 26 15 17	3	min-max	Unpaired t-test: Ctrl vs Scrib1 ShCtrl vs ShScrib1 Ctrl vs Scrib1 ShCtrl vs ShScrib1	t(48)=0.598 t(30)=0.59 t(48)=0.197 t(30)=0.051	p=0.55 p=0.56 p=0.84 p=0.96
3P	Density: Ctrl Scrib1 ShCtrl ShScrib1 Intensity: Ctrl Scrib1 ShCtrl ShScrib1	15 15 15 15 15 15 15 15	3	min-max	Unpaired t-test: Ctrl vs Scrib1 ShCtrl vs ShScrib1 Ctrl vs Scrib1 ShCtrl vs ShScrib1	t(28)=0.61 t(28)=1.25 t(28)=0.19 t(28)=1.94	p=0.54 p=0.22 p=0.85 p=0.063
4F	Ctrl Scrib1 Ctrl-Stim Scrib1-Stim	20 19 20 19	3	SEM	Two-way Anova: Treatment Stimulus Interaction treatment x stimulus effect	F(1,74)=3.839 F(1,74)=75.625 F(1,74)=0.125	p=0.54 p<0.001 p=0.724
4G	ShCtrl ShScrib1	15 18	3	SEM	Two-way Anova: Interaction treatment x stimulus effect	F(1,68)=5.072	p=0.027

	ShCtrl-Stim ShScrib1-Stim	20 19			Bonferroni's Multiple Comparison Test: ShCtrl vs ShScrib1 ShCtrl vs ShCtrl-Stim ShCtrl vs ShScrib1-Stim		p<0.001 p<0.001 p<0.001
4H	Ctrl Scrib1 Ctrl-Stim Scrib1-Stim	20 16 20 16	3	SEM	Two-way Anova Treatment Stimulus Interaction treatment x stimulus effect	F(1,69)=0.101 F(1,69)=0.375 F(1,69)=0.781	p=0.75 p=0.54 p=0.38
4I	ShCtrl ShScrib1 ShCtrl-Stim ShScrib1-Stim	17 16 16 15	3	SEM	Two-way Anova: Interaction treatment x stimulus effect Bonferroni's Multiple Comparison Test: ShCtrl vs ShScrib1 ShScrib1 vs ShScrib1-Stim	F(1,60)=15.252	p<0.001 p<0.001 p=0.0011
4K	ShCtrl Rescue	15 17	3	SEM	Unpaired t-test	t(30)=0.451	p=0.66
4M	ShCtrl Rescue	17 17	3	SEM	Unpaired t-test	t(32)=2.524	p=0.017
5F	Ctrl Scrib1 Ctrl-Stim Scrib1-Stim	18 17 18 17	3	SEM	Two-way Anova Treatment Stimulus Interaction treatment x stimulus effect	F(1,66)=44.318 F(1,66)=9.564 F(1,66)=0.0036	p<0.001 p=0.0029 p=0.95
5G	ShCtrl ShScrib1 ShCtrl-Stim ShScrib1-Stim	13 15 15 13	3	SEM	Two-way Anova: Interaction treatment x stimulus effect Bonferroni's Multiple Comparison Test: ShCtrl vs ShCtrl-Stim ShCtrl vs ShScrib1-Stim	F(1,51)=6.993	p=0.011 p=0.016 p=0.0138
5H	Ctrl Scrib1 Ctrl-Stim Scrib1-Stim	18 15 15 15	3	SEM	Two-way Anova Treatment Stimulus Interaction treatment x stimulus effect	F(1,59)=0.069 F(1,59)=29.632 F(1,59)=0.017	p=0.79 p<0.001 p=0.90
5I	ShCtrl ShScrib1 ShCtrl-Stim ShScrib1-Stim	20 17 15 18	3	SEM	Two-way Anova: Interaction treatment x stimulus effect Bonferroni's Multiple Comparison Test: ShCtrl vs ShScrib1 ShCtrl vs ShCtrl-Stim ShCtrl vs ShScrib1-Stim	F(1,66)=47.216	p<0.001 p<0.001 p=0.0148 p<0.001
5K	Ctrl-ARF6 Scrib1-ARF6 Ctrl-ARF6DN Scrib1-ARF6DN	20 19 20 15	3	SEM	Two-way Anova: Interaction treatment1 x treatment2 Bonferroni's Multiple Comparison Test: Ctrl-ARF6 vs Scrib1-ARF6 Ctrl-ARF6 vs Ctrl-ARF6DN Ctrl-ARF6 vs Scrib1-ARF6DN	F(1,69)=4.98	p=0.0289 p=0.0134 p<0.001 p<0.001
5M	Ctrl-EFA6 Scrib1-EFA6 Ctrl-EFA6DN Scrib1-EFA6DN	10 10 10 10	3	SEM	Two-way Anova Interaction treatment1 x treatment2 Bonferroni's Multiple Comparison Test: Ctrl-EFA6 vs Scrib1-EFA6 Ctrl-EFA6 vs Ctrl-EFA6DN Ctrl-EFA6 vs Scrib1-EFA6DN	F(1,36)=8.85	p=0.0052 p<0.001 p<0.001 p<0.001
6J	Ctrl Scrib1 Scrib1Y834A	20 19 20	3	SEM	One-way Anova Bonferroni's Multiple Comparison Test: Ctrl vs Scrib1 Ctrl vs Scrib1Y834A	F(2,56)=18.846	p<0.001 p<0.001 p<0.001
6K	Ctrl Scrib1 Scrib1Y834A	15 18 15	3	SEM	One-way Anova Bonferroni's Multiple Comparison Test: Ctrl vs Scrib1 Ctrl vs Scrib1Y834A	F(2,45)=29.623	p<0.001 p<0.001 p<0.001
7B	Ctrl ShScrib1	9 9	6	SEM	Paired t-test NMDA amplitude: NMDA decay:	t(8)=2.964 t(8)=0.771	p=0.018 p=0.46
7C	Ctrl ShCtrl	9 9	6	SEM	Paired t-test NMDA amplitude: NMDA decay:	t(8)=0.423 t(8)=1.391	p=0.68 p=0.2
7D	ShScrib1 ShCtrl	11 10	7	SEM	Unpaired t-test (Mann Whitney)	U=26	p=0.043
7E	Ctrl ShScrib1	6 6	4	SEM	Paired t-test	t(8)=1.323	p=0.24
7F	Ctrl ShCtrl	6 6	4	SEM	Paired t-test	t(8)=0.376	p=0.72

Table S2. Statistics reporting, by figure

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies

The following primary antibodies were used in this study: anti-Scrib1 antibody (AbMM468) (Montcouquiol et al., 2006); anti-Scrib1 (C20, sc-11049, Santa Cruz Biotechnology); anti-GluN1 (clone 54.1, 556308, BD Pharmingen, San Diego, CA); anti-GluN2A C-ter (clone 5530, gift from G. Köhr); anti-GluN2B (610417, BD Biosciences); anti-GluN2A N-ter and GluN2B N-ter (Groc et al., 2006); anti-GluN2B (AGC-003, Alomone Labs); anti-GABA(A) α 1 extracellular (AGA-001, Alomone Labs); anti-Densin-180 (G1, sc-390153, Santa Cruz Biotechnology), anti-Erbin and anti-Lano (gift from J.P. Borg); anti-GABA_A receptor β 3 subunit (75-149, NeuroMab, gift from M. Garret); anti-AP50 (611350, BD Transduction lab); anti-Tac (Sans et al., 2005); anti-myc mouse 9E11 (MMS-164P, Covance); anti-GFP (AB3080P, Merck-Millipore). Secondary antibodies used as follows: Alexa Fluor 488, 546 and 470 conjugated antibodies (Invitrogen), AMCA, FITC, Cy3 conjugated antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories); biotin conjugated antibodies (Vector Laboratories); HRP conjugated antibodies (GE Healthcare).

Vector constructions

Full-length human Scribble, cloned in pEGFP-C1, was generously provided by Prof. Ian Macara (UVA, Charlottesville, VA, USA). Mutated forms of GFP-Scribble1 were generated using the Quick Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Scrib1- Δ PDZ2-3 is a truncated form of hScrib1 lacking both PDZ domains #2 and #3 (amino acids 1-301) that was generated by site-directed mutagenesis using the GFP-Scrib1 as template and the following primer:

5'cccgggccctccgctcagcgccacgcacccccgggctacgggaa3'. Cloning and mutagenesis were verified by sequencing for all constructions. The Super-GFP plasmids were purchased from Oligoengine. Tac-GluN2A, Tac-GluN2A Δ 7, Tac-GluN2B, Tac-GluN2B Δ 7, Myc-GluN2A and myc-GluN2B were used previously (Lavezzari et al., 2004; Prybylowski et al., 2005; Roche et al., 2001; Sans et al., 2005). GFP-Rab5 and GFP-Rab11 were generously provided by Dr Philip D. Stahl (Washington University School of Medicine, St Louis, Missouri, USA), GFP-CD63 by Dr Thierry Galli (INSERM ERL U950, Paris, France), and myc-GABA_A β 3 by Dr Maurice Garret (INCIA, Bordeaux, France); ARF6^{WT}-HA and ARF6^{T27N}-HA were from Addgene and EFA6 wt and E242K were from Dr Frédéric Luton (IPMC, CNRS, Nice, France).

Protein production and purification for isothermal titration calorimetry (ITC)

The gene encoding full-length, wild-type mouse Scrib1 was used as a template to generate PCR products corresponding to each of the four individual PDZ domains of Scrib1 (PDZ1-PDZ4). These products were cloned into a pET28a+ vector modified to be used as a ligation-independent cloning (LIC) system, confirmed by DNA sequencing and expressed in *E. coli* BL21 cells to produce the PDZs as thioredoxin fusion proteins. Creating the PDZ-thioredoxin fusion proteins allowed quantification by UV spectrophotometry, which would have been impossible for some isolated PDZs because some of them have no aromatic residues. The expressed proteins were purified using immobilized Ni²⁺ affinity chromatography followed by SEC on Superdex S200 (or S75) columns (GE Healthcare) in ITC buffer containing 250 mM NaCl, 20 mM Hepes pH 7.5 and 2 mM DTT at 4°C, then concentrated. Purified proteins were confirmed by SDS-PAGE and MALDI mass spectrometry. The 12-residue C-terminal peptides of the NMDAR subunits (GluN2A, GluN2A^{S1462A}, GluN2B or GluN2B^{S1480A}) were purchased from GeneCust. ITC experiments were performed on an ITC₂₀₀ (GE Healthcare). For each run, 43 injections of 1 μ l of 1.5 to 3 mM peptide solutions were added at 100-second intervals from a stirring syringe into the sample cell containing 200 μ l of 120 to 250 μ M PDZ domains. The peptides were dissolved in ITC buffer and readjusted to pH 7.5 when necessary. Both protein and peptide solutions were extensively degassed. The experiments were performed with a reference power of 10 μ cal/s and a sample cell temperature of 20°C. The titration curves were analyzed using the ORIGIN 7.0 software

(MicroCal Inc.). The experimental data were corrected for the effects of peptide dilution by subtracting the curve obtained by the titration of the peptide solution into buffer alone. All protein concentrations were determined by absorbance measurements at 280 nm using calculated molar extinction coefficients. ITC was used as it allows a fine determination of the dissociation constants between a protein and a target peptide. However this is obtained at the expense of significant sample volume and concentration. As we were only concerned by: a) finding out which PDZ could bind the target peptides and b) a ranking of very different affinities between different PDZs, two experiments were thus enough for our purpose: $n = 2$ allowed to rule out any large experimental mistake and confirm the ranking order of the Kds. Supplementary determinations using ITC would have required significant amount of material to perform several extra determinations and only result in a marginally increased accuracy of no consequence on our interpretation.

Pull-down assays

Scrib1^{PDZ1-PDZ4} containing the AP2 μ interacting motif, the mutated form Scrib1^{PDZ1-PDZ4-Y834A} and full length AP2 μ were cloned in a modified pET28 plasmid then expressed in E.Coli BL21 DE3 RIPL at 17°C in ZYP media overnight. Proteins were purified on His Trap HP columns (GE Healthcare), followed directly by gel filtration on Superdex 75 (GE Healthcare). The Scrib1^{PDZ1-PDZ4} and Scrib1^{PDZ1-PDZ4-Y834A} constructs were desalted treated with TEV protease then passed over a His Trap HP column to fix the uncut material, TEV protease and cleaved His tag. The flow through of this second pass on His Trap HP, which contains cleaved Scrib1 constructs, was further purified on a Superdex75 column (GE Healthcare). All purified proteins were >95% pure as assessed by SDS PAGE and identities were confirmed using MALDI. Talon magnetic beads with 50 μ g of His-tagged AP2 μ protein were incubated with Scrib1 or Scrib1^{Y834A} in 50 mM Tris pH 8, 250 mM NaCl, 25 mM imidazole and incubated for 60 min at 4°C. Beads were then washed extensively with 50 mM Tris pH 8, 250 mM NaCl, 25 mM imidazole. Bound protein complexes were eluted from the beads with 5 μ l of buffer containing 500mM of imidazole, and then mixed with SDS-PAGE sample buffer before SDS-PAGE and Coomassie coloration.

Bioinformatics analysis and modeling

To build a model of residues 830 to 839 of Scrib1 and AP2 μ , a starting model was constructed using the structure of AP2 μ complexed with residues 197 to 206 from the CTLA-4 internalization peptide (PDB 1H6E) (Follows et al., 2001). There are several structures of PDB showing AP2 μ complexed with peptides from different partners, and all of them have a conserved Tyr residue bound to a hydrophobic pocket in AP2 μ . This Tyr is also present in the Scrib1 region responsible for the interaction with AP2 μ , so this Tyr position was kept and used as a reference point to build our model. We first mutated the sequences from CTLA-4 to those of Scrib1. An initial analysis of the structure confirmed that, in addition to Tyr binding, we could model several ionic bonds between AP2 μ and Scrib1. Using this new PDB file as a starting model, we first ran the geometry regularization module from the Phoenix suite (Adams et al., 2010) to remove obvious steric clashes. Then, we used coot (Emsley et al., 2010) to build a model that would take into account the existence of ionic bonds and checked the quality of the model using MolProbity (DeLano et al., 2002). The final model did not show clashes between μ 2-AP2 and the Scrib1 peptide. We used PyMOL to prepare the figures (Stoppini et al., 1991).

Detergent solubilization and immunoprecipitation experiment

IP experiments were performed after 1% sodium deoxycholate (DOC), 0.1% Triton X-100 solubilization as described previously (Wentholt et al., 1996; Sans et al., 2003). Briefly, hippocampi from rat were homogenized with a polytron in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing a protease inhibitor mixture (Roche). Membranes were sedimented by centrifugation (100,000 $\times$ g; 30 min; 4°C), solubilized in 1% DOC, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.1, for 30–45 min at 37°C, and before

insoluble material was removed by centrifugation, 0.1% Triton X-100 was added. For immunoprecipitation, 40 µl of polyclonal anti-goat Scrib1 antibodies (C20) were attached to protein-A/G beads. Protein-A/G beads were then pelleted, washed in PBS plus 0.1% Triton X-100, and incubated with 1.4 ml of the DOC-solubilized tissue at 4°C with constant rotation. The beads were then washed three times with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.1% Triton X-100 and 150 mM NaCl and, then, were boiled in 100 µl of 2X SDS-PAGE sample buffer for 5 min as described by Sans et al. (2003). Experiments were repeated more than 3 times. Samples were analyzed by SDS/PAGE and immunoblotting.

Subcellular fractionation from cortical neurons

Synaptosomes from cultured cortical neurons were prepared using a small-scale modification of this procedure. For subcellular fractionation, hippocampi were homogenized in Buffer A (0.32 M sucrose, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, containing a protease inhibitor mixture). The homogenate was subfractionated by centrifugation at 1,000 x g for 15 min and the supernatant S1 removed and further centrifuged at 10,000 x g for 20 min to obtain P2. The P2 pellet was resuspended in hypotonic buffer B (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, containing a protease inhibitor mixture) and incubated for 30 min on ice, briefly sonicated, and 2 M sucrose was added to make a final concentration of 1.3 M. The lysate was overlaid with a layers of 0.8 M sucrose and 0.32 M sucrose and centrifuged at 60,000 x g for 20 min. Synaptic membranes were recovered from the 1.3 M and 0.8 M sucrose interface.

Synaptosome extraction after new environment stimulation

Experiments were done using 10 week-old male Sprague Dawley rats (n = 12). All subjects were housed in groups of 2 per cage for 2 weeks before starting the experiments, in standard laboratory conditions with a 12 h light/12 h dark cycle (light on: 07:00) with food and water supplied ad libitum. Rats were exposed to the enriched open field (EOF) for 10 min. During the same period, control rats were left in their home cage. At the end of the test, all rats returned in their home cage and left undisturbed for 60 min. Then, rats were anesthetized by brief inhalation of isoflurane (0.05% in air) and sacrificed by decapitation. The hippocampus was rapidly dissected and homogenized in 50 mM Tris HCl, pH 7.4, containing a cocktail of protease inhibitors (Roche). P2 subcellular fractionation was performed as described previously (Sans et al., 2003).

Culture and Transfections of HEK-293 or COS-7 cells

HEK-293 (ATCC® CRL-1573™) or COS-7 (ATCC® CRL1651™) cells were cultured in DMEM (Invitrogen) supplemented with FCS and antibiotics. Transfections were done using the calcium phosphate coprecipitation method (Sans et al., 2003).

Surface, internalization, and recycling experiments in fibroblasts

For surface labeling, the cells were incubated live with Tac monoclonal antibodies for 1 h at 4°C, washed with PBS and blocked with 10% NGS before applying the secondary antibody. The cells were then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized in PBS containing 0.25% Triton X-100 for 5 min, and blocked in 10% normal goat serum (NGS) in PBS/0.1% Triton X-100 for 1 h. The cells were incubated with a primary antibody in PBS containing 3% NGS for 1 h, washed and incubated with secondary antibodies for 30 min in 3% NGS/PBS. The GFP immunofluorescence was visualized with an FITC filter.

To measure internalization, after labeling the surface receptors for 1 h at 4°C and the PBS washes, the cells were returned to 37°C for internalization. After 5 to 30 min, the cells were chilled with ice-cold PBS and exposed to 0.5 M NaCl/0.2 M acetic acid for 4 min at 4°C to remove the remaining labeling from the surface. The cells were incubated with excess unconjugated secondary antibody to block all remaining surface receptors. After a PBS wash, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS,

washed with PBS and permeabilized in 0.25% Triton X-100 for 5 min. The coverslips were then incubated with FITC- or Cy3-conjugated anti-mouse secondary antibodies for 30 min.

For the recycling assays, after stripping, the cells were incubated at 37°C for 30 min in the presence of a fluorophore-conjugated secondary antibody to visualize the internalized receptors that had recycled back to the plasma membrane. The cells were then fixed, permeabilized and incubated with a second fluorescent secondary antibody to visualize the internalized receptors that had failed to recycle back to the plasma membrane. The average fluorescence of the recycled receptors and internalized receptors was then determined and plotted as a ratio (recycling index).

Surface, internalization, and recycling experiments in neurons

For surface labelling, an anti-myc antibody (Covance) was applied to live cells for 1 h at room temperature. Neurons were then washed with Neurobasal before applying the secondary antibody and then fixed and processed for total staining.

For the internalization and recycling experiments, The hippocampal neurons were incubated with mouse anti-myc antibody (1: 1000, Invitrogen) at RT for 20 min and then incubated at 37°C for 30 min to allow internalization of receptors (after stimulation or not). For internalisation staining, neurons were fixed and incubated for 30 min with Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse secondary antibody before blocking with excess of unconjugated anti-mouse IgG Fab for 20 min. For recycling staining, non-internalized surface bound antibody was then blocked with excess of unconjugated anti-mouse IgG Fab at RT for 20 min. Neuron were then incubated at 37 °C for 1 h to allow recycling back to the plasma membrane. Neurons were fixed and incubated for 30 min with Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse secondary antibody to label the recycled surface population of receptors before permeabilization. Remaining surface primary antibodies were blocked with excess of unconjugated anti-mouse IgG Fab (1:50). After permeabilization, neurons were incubated with Alexa Fluor 546-conjugated anti-mouse secondary antibody to label the internalized population of receptors.

Fluorescence Microscopy

Images were acquired with a Leica DM6000 microscope equipped with a CoolSNAPHQ2 camera (PhotoMetrics) and MetaMorph 7.5 software (Universal Imaging) or with a Zeiss AxioImager Z1 equipped with an AxioCam MRm and the Zeiss software. All quantitation was done using MetaMorph 7.5 software on isolated dendrites. The number of puncta or intensity was calculated from 5 different regions of a 20- μ m length per neuron and averaged. Statistical significance was determined using a Student's unpaired t-test or ANOVA one-way with Bonferroni post-hoc test.

Pre-embedding immunocytochemistry

Three Sprague Dawley male rats (~3 week old) of approximately 150 g were used. After terminal anesthesia was induced by brief inhalation of isoflurane (0.05% in air), followed by an intramuscular injection of ketamine (100 mg kg⁻¹) and xylazine (10 mg kg⁻¹), rats were intracardially perfused with 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in PBS (0.1 M, pH 7.2), and brain sections (100 μ m) were cut on a Leica VT1000S vibratome (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK). All procedures were performed according to the requirements of the United Kingdom Animals (Scientific Procedures) Act 1986, the European Communities Council Directives (86/609/EEC) and the French national Committee (87/848) recommendations. The immunolabeling method has been described previously (Moreau et al., 2010). Briefly, the sections were immunolabeled with Scrib1 polyclonal antibody (AbMM468) (Montcouquiol et al., 2006), followed by a biotinylated secondary antibody, ABC Elite Kit (Vector Laboratories), and the peroxidase reaction was revealed by VIP substrate Kit (Vector Laboratories). Then the sections were osmicated, dehydrated, and flat embedded in Durcupan resin (Sigma-Aldrich). Ultrathin sections (70–90 nm) were countercolored with uranyl acetate and lead citrate. Experiments were repeated three times per animal. Control experiments, in which the primary antibody was omitted, resulted in no immunoreactivity.

Post-embedding immunogold

Three Sprague Dawley male rats (3 week old) were terminally anesthetized and intracardially perfused with 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in PBS (see above). The post-embedding immunogold method has been previously described (Sans et al., 2003; Sans et al., 2001; Sans et al., 2005). Briefly, after perfusion, the brains were sectioned, and cryoprotected. Sections were then frozen in a Leica CPC cryofixation system and freeze-substituted into Lowicryl HM-20 (EMS) in a Leica automatic freeze-substitution system (AFS). For double-labeling, sections were incubated with Scrib1 polyclonal antibody (AbMM468) (Montcouquiol et al., 2006) and GluN1 monoclonal antibody (556308, BD Pharmingen), followed by 5-nm goat anti-rabbit and 15-nm goat anti-mouse immunogold (British Biocell Intl.). Experiments were repeated three times per animal. Control experiments, in which the primary antibodies were omitted, resulted in no immunoreactivity.

Slice culture preparation and transfection for electrophysiological recordings

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared from P5-P7 Sprague Dawley rats. Three to four days after plating, the medium was replaced and then changed every 2-3 days. After 7-9 days in vitro we performed single cell electroporation (SCE) to transfect individual cells with cDNAs encoding pSuperGFP (to localize transfected neuron) and pSUPER-ShRNA-Scrib1 or pSUPER-ShRNA-control or Scrib1. Plasmids (100 ng/ μ l) were dissolved in a filtered K^+ -based intracellular solution to fill 6-9 M Ω patch clamp pipettes. Electroporation was performed in a pre-warmed HEPES based ACSF by the delivery of 50-100 square-pulses (600 μ s duration) at 100 Hz with an amplitude of -10 mV. Electrophysiological recording were performed 3 days after transfection.

Electrophysiological recordings in slice and data analysis

Whole-cell voltage-clamp recordings (3.5 to 4.5 M Ω electrodes) were made at 30-32°C from CA1 pyramidal cells visualized by infrared videomicroscopy. Transfected cells were recognized by the GFP fluorescence. Slices were perfused with an extracellular solution composed of 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM $NaHCO_3$, 2.3 mM $CaCl_2$, 1.3 mM $MgCl_2$, and 25 mM glucose saturated with 95% O_2 /5% CO_2 . NMDAR-mediated currents were recorded in the presence of NBQX (20 μ M), bicuculline (10 μ M) and N6-cyclopentyladenosine (50-100 nM) to reduce polysynaptic activity. The intracellular solution was composed of: 140 mM cesium methanesulfonate, 2 mM $MgCl_2$, 4 mM NaCl, 5 mM phospho-creatine, 2 mM Na_2ATP , 0.2 mM EGTA, 10 mM HEPES, 0.33 mM GTP (pH 7.3). Schaffer collateral-CA1 synapses were stimulated with a glass pipette positioned 100-150 μ m from the recorded neurons. Small, hyperpolarizing voltage/current steps were given before each afferent stimulus allowing online monitoring of input and series resistance. The access resistance was <20 M Ω , and cells were discarded if it changed by >20%. NMDAR-mediated EPSCs decay time was calculated with a single weighted decay measure (referred in the text as decay time) and calculated from the area under the peak-normalized current for 0.7 s after the peak. For AMPA/NMDA ratio, NMDAR-mediated EPSCs were measured 50 ms after the initiation of the EPSC, a time point at which AMPAR-mediated currents are absent or minimal. No series resistance compensation was used. Recordings were made using EPC 9 and 10 amplifiers (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany) and were filtered at 0.5–1 kHz, digitized at 5 kHz, and stored on a personal computer. Analysis was performed using Neuromatic (www.neuromatic.thinkrandom.com) written within the Igor Pro 6.0 environment (WaveMetrics, Lake Oswego, OR). Values are presented as mean $\pm$ s.e.m.. Either a paired or unpaired Student's t-test was used to define statistical differences between values.

Data presentation and statistical analysis

For each representative image (including western-blot and immunostaining), experiment results were successfully repeated with at least 3 independent experiments, except if stated otherwise. Sample size was determined using the Mead's resource equation method or using a formal method such as

power analysis. For data analysis, quantifications were performed using randomly selected transfected COS-7 and HEK-293 cells or neurons. Data are presented in the text as mean $\pm$ s.e.m. or whiskers boxes. When it was appropriate, plotting independent data points was considered as more informative. Details of statistical analyses and n values are provided in the methods subsections referring to method used. Statistical analyses were performed using the Statistica or GraphPad Prism statistical package (GraphPad, San Diego, CA). Normality of distribution and homogeneity of variance were validated and unpaired Student's two-tailed t-test for two data sets were used to compare groups with similar variance and are indicated along the p values in figures. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistics were derived from at least 3 independent experiments. See Table S2.

Supplemental References

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C. and Zwart P.H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst. D* 66, 213-221.
- DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. <http://www.pymol.org/>
- Montcouquiol, M., Sans, N., Huss, D., Kach, J., Dickman, J.D., Forge, A., Rachel, R.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Bogani, D., et al. (2006). Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals. *J Neurosci* 26, 5265-5275.
- Sans, N., Racca, C., Petralia, R.S., Wang, Y.X., McCallum, J., and Wenthold, R.J. (2001). Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J Neurosci* 21, 7506-7516.
- Stoppini, L., Buchs, P.A., and Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37, 173-182.