

Caractérisation de la co-organisation nanoscopique des récepteurs glutamatergiques à l'état basal et dans un modèle d'autisme

Julia Goncalves

▶ **To cite this version:**

Julia Goncalves. Caractérisation de la co-organisation nanoscopique des récepteurs glutamatergiques à l'état basal et dans un modèle d'autisme. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0275 . tel-02295016

HAL Id: tel-02295016
https://theses.hal.science/tel-02295016

Submitted on 24 Sep 2019

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.

université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Julia GONCALVES

Caractérisation de la co-organisation nanoscopique des récepteurs glutamatergiques à l'état basal et dans un modèle d'autisme

Sous la direction de : Eric HOSY

Soutenue le 27 Novembre 2018

Membres du jury :

Laurent Cognet	Directeur de recherche CNRS	Président
Julie Perroy	Directeur de recherche CNRS	Rapporteur
Cyril Goudet	Chargé de recherche CNRS	Rapporteur
Camilla Bellone	Professeure assistante Université de Genève	Examinateur
Pierre Paoletti	Directeur de recherche INSERM	Examinateur
Daniel Choquet	Directeur de recherche CNRS	Invité

Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS)
CNRS UMR 5297

Université de Bordeaux Centre Broca Nouvelle-Aquitaine
146 Rue Léo Saignat
33076 Bordeaux (France)

RÉSUMÉ

Les récepteurs AMPA, NMDA et mGluR5 sont responsables de la majeure partie des courants excitateurs dans la transmission synaptique glutamatergique. Le contrôle de la dynamique et de l'organisation de ces récepteurs dans la synapse, via une combinaison de diffusion latérale et d'endo/exocytose, est essentiel à la régulation de l'intensité de la transmission synaptique. Les protéines de la densité post-synaptique, telles que Homer, Shank et GKAP, régulent la diffusion de ces derniers, contrôlent leur nombre et leur organisation à la post-synapse.

Mon travail de thèse a consisté à étudier la co-organisation nanoscopique des récepteurs AMPA, NMDA et mGluR5 à la post-synapse. Dans un premier temps, grâce au développement de différents outils méthodologiques, j'ai caractérisé les propriétés individuelles d'organisation et de dynamique des récepteurs glutamatergiques, ainsi que leurs propriétés de co-organisation au sein de la post-synapse. Dans un second temps, j'ai cherché à explorer l'impact d'une modification structurelle de la densité post-synaptique sur leur nano-organisation. L'utilisation d'un modèle de troubles du spectre autistique, basé sur la variation d'expression de la protéine d'échafaudage Shank3, a permis d'étudier la désorganisation fonctionnelle des récepteurs au glutamate induite par une perturbation structurelle de la densité post-synaptique.

Mes travaux démontrent une organisation clusterisée des récepteurs AMPA et NMDA à la post-synapse, et une distribution homogène des mGluR5 à leur périphérie. Les nanodomaines des AMPARs et des NMDARs ne sont pas co-localisés mais co-organisés, avec une tendance pour les NMDARs à occuper une place centrale dans la post-synapse. Les propriétés individuelles d'organisation des récepteurs AMPA ne sont pas affectées par une variation d'expression de la protéine Shank3, alors que les NMDARs et les mGluR5 voient leurs pools synaptiques affectés dans ce modèle de troubles du spectre autistique.

Ces résultats apportent de nouveaux éléments de compréhension des bases moléculaires de la transmission synaptique glutamatergique en conditions physiologique et pathologique, et proposent une nouvelle vision de l'utilisation du glutamate par les synapses.

Mots-clés : synapse, récepteurs glutamatergiques, autisme

ABSTRACT

AMPA, NMDA and mGluR5 receptors are responsible of the majority of excitatory currents in glutamatergic synaptic transmission. Controlling the organization and the mobility of these receptors in the synapse, via a combination of lateral diffusion and endo/exocytosis, is essential for the regulation of synaptic transmission intensity. The proteins of the post-synaptic density, such as Homer, Shank and GKAP, regulate the diffusion of these receptors and control their number and organization at the post-synapse.

My PhD work consisted of studying the nanoscale organization of AMPA, NMDA and mGluR5 receptors at the post-synapse. As a first step, thanks to the development of different methodological tools, I characterized the organization and dynamic properties of glutamatergic receptors, together with their co-organization within the post-synapse. As a second step, I explored the impact of structural modification of the post-synaptic density on the nano-organization of these receptors. The use of a model of autism spectrum disorder, based on a variation of the scaffold protein Shank3, enabled the study of functional disorganization of glutamate receptors induced by a structural disturbance of the post-synaptic density.

This work shows a clustered organization of AMPA and NMDA receptors at the post-synapse, and a homogenous distribution of mGluR5 at their periphery. The AMPARs and NMDARs nanodomains are not co-localized but co-organized, with a tendency for the NMDARs to occupy a central place at the post-synapse. The individual organizational properties of AMPA receptors are not affected by the variation of Shank3 expression, whereas NMDARs and mGluR5 see their synaptic pool affected in this model of autism spectrum disorder.

These results provide new evidence on the molecular bases of glutamatergic synaptic transmission in physiological and pathological conditions and propose a new vision of the use of glutamate by synapses.

Keywords: synapse, glutamatergic receptors, autism

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse : Camilla Bellone, Julie Perroy, Laurent Cognet, Cyril Goudet et Pierre Paoletti.

Mon plus grand merci revient à **Eric Hosy** pour sa supervision pendant ces quatre dernières années. Tu m'as pris sous ton aile dès mon stage de Master 1, pendant lequel je pensais ne pas vouloir faire de thèse, et voilà où j'en suis aujourd'hui ! Tu as toujours été à l'écoute, patient et disponible, tu as su me guider et me faire grandir scientifiquement, je n'en serais pas là sans tout ce que tu m'as apporté. Ta sincérité et ton paternalisme m'ont donné confiance et m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse avec l'objectif d'être fière du travail accompli. Merci pour tout …

Je voudrais également remercier **Daniel Choquet** pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Ta volonté de nous procurer un cadre de travail exceptionnel est une chose que j'ai vraiment appréciée chaque jour au laboratoire. En plus d'être notre chef d'équipe, tu m'as souvent donné le sentiment d'être notre chef de « famille », toujours disponible pour un conseil avisé, et partant pour réunir tout le monde dans la bonne humeur ! Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir embarquée dans l'aventure Choquet.

Je tiens également à remercier tous ceux qui font que l'IINS est un lieu de travail formidable. Merci à Anna, Françoise, David, Matthieu, Christelle et Sophie pour votre bienveillance et vos conseils lorsque j'en ai eu besoin. Merci à Emeline et Rémi pour le travail extraordinaire que vous faites tous les jours « dans l'ombre » pour nous rendre la vie plus facile. Merci à Corey et Florian pour votre disponibilité et votre aide précieuse dans des domaines si lointains pour moi, vous avez su me faire aimer les analyses !

Merci à Léa, Matthieu, Sébastien et Konstantina pour l'ambiance que vous mettez dans le bureau, vous aurez largement participé à ma bonne humeur (et ma gourmandise …) quotidienne !

Merci à Tiaginou, Carlita, Magalie, Niclones, Côme, Lulu et Josiane pour les pauses du midi qui sont toujours intenses en rigolade !

Un merci très spécial, et plein d'émotions, pour mes Copinous : **Nat'**, **Coup'**, **Amandinette**, **Gégé**, **Chaquinou** et **Fabinou**. J'ai débarqué dans vos vies, encore toute petite au laboratoire, et j'ai trouvé en vous une seconde famille. J'ajoute une mention spéciale pour toi **Ben**, nous avons eu le même chef, le même bureau, les mêmes salles de manip, au point où l'on ne se déplaçait jamais l'un sans l'autre au labo … Tout partager et se connaitre par cœur, se soutenir dans les coups durs, et surtout multiplier les moments de folie ! Voilà comment se découvrir un « frère de cœur » à 25 ans, et ce n'est que le début d'une longue amitié ! Vous avez toujours été là pour moi dans les bons moments comme dans les plus difficiles … Merci mille fois d'être vous.

Parce qu'une thèse ne se vit pas qu'au laboratoire, merci à **Cyrielle** et **Amandine** (mon Petit Chat) pour leur amitié sans limite. Plus de vingt ans à vos côtés, sans pour autant se voir tous les jours, nos retrouvailles et moments partagés sont toujours plein d'amour et de sincérité. Nous nous voyons grandir et devenir adulte, mais gardons cette âme d'enfant que nous sommes les seules à connaître, restez comme vous êtes !

Enfin, je ne remercierai jamais assez mes parents pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Ma vie n'a été remplie que d'amour grâce à vous, votre éducation ont fait de moi une adulte fière de sa famille et de ses origines, des gens simples et travailleurs qui se donnent les moyens d'atteindre leurs objectifs, dans le respect et l'écoute de l'autre. Vous avez toujours cru en moi, et tout fait pour que je sois épanouie et que je réussisse dans mes études. Merci infiniment pour tout cela, sans vous je n'aurais jamais pu être "Docteur en Neurosciences" …

Pour finir, c'est un merci du fond du cœur que je t'adresse, **Romain**. Merci pour tout ce que tu fais pour moi, tout l'amour que tu me donnes, j'aime profondément la vie à deux que nous nous sommes construit, et je suis impatiente de voir ce que l'avenir nous réserve …

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPAR	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors
ATD	Amino terminal domain
BSA	Bovine serum albumin
CamKII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CID	Contraste interférentiel différentiel
CRD	Cystein-rich domain
CTD	Carboxy-terminal domain
DLC	Dynein light chain
dSTORM	Direct stochastic optical reconstruction microscopy
EC50	Concentration efficace médiane
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGFP	Enhanced green fluorescence protein
EMCCD	Electron multiplied charge coupled device
EPSC	Excitatory post-synaptic currents
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GFP	Green fluorescence protein
GKAP	Guanylate-kinase-associated protein
GluA	Glutamate AMPA receptor subunit
GluN	Glutamate NMDA receptor subunit
GRIP	Glutamate receptor interacting protein 1
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
IgG	Immunoglobuline de type G
iGluR	Récepteurs ionotropiques du glutamate
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphate

IPSC	Inhibitory post-synaptic currents
KO	Knock out
LBD	Ligand binding domain
LMH	Largeur à mi-hauteur
LRRTM	Leucine-rich repeat transmembrane protein
LTD	Long term depression
LTP	Long term potentiation
MAGUK	Membrane associated guanylate kinase
mGluR	Récepteurs métabotropiques du glutamate
miARN	Micro-acides ribonucléiques
MSD	Mean square displacement
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor
NV	Nitrogen-vacancy
PA-GFP	Photo-activable green fluorescence protein
PBS	Phosphate buffered saline
PDZ	Post-synaptic density / discs large / zona occludens1
PFA	Paraformaldehyde
PIKE	PI3K enhancer
PKC	Protéine kinase C
PSD	Post-synaptic density
PSF	Point spread function
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
Rich2	Rho-GAP interacting CIP4 homolog 2
RyR	Ryanodine receptor
SAM	Silent allosteric modulator
SAP102	Synapse associated protein 102
SAP97	Synapse associated protein 97
SH3	Src homology

Shank	SH3 and multiple ankyrin
SIM	Structured illumination microscopy
SMLM	Single molecule localization microscopy
sptPALM	Single particle tracking photo-activation localization microscopy
SSCAM	Synaptic scaffolding molecule
SSTR2	Somatostatin receptor 2
STED	Stimulated emition depletion microscopy
TIRF	Total internal reflection microscopy
TMD	Transmembrane domain
TRPC	Transient receptor potential cation channels
TSA	Troubles du spectre de l'autisme
uPAINT	Universal point accumulation in nanoscale topography
UV	Ultra-violet
VFT	Venus-fly trap domain

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ 3

ABSTRACT 4

REMERCIEMENTS 5

ABREVIATIONS 7

TABLE DES MATIERES 10

INTRODUCTION 13

I. LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE GLUTAMATERGIQUE 14

II. LA DENSITE POST-SYNAPTIQUE 16

III. LES RECEPTEURS AU GLUTAMATE 22

1. LES RECEPTEURS AMPA 23

a. Structure des récepteurs AMPA 23

b. Activation des récepteurs AMPA 24

c. Nano-organisation et dynamique des récepteurs AMPA 25

2. LES RECEPTEURS NMDA 29

a. Structure des récepteurs NMDA 29

b. Activation des récepteurs NMDA 31

c. Nano-organisation et dynamique des récepteurs NMDA 32

3. LES RECEPTEURS MGLUR 34

a. Structure des récepteurs mGluR 34

b. Activation des récepteurs mGluR 36

c. Nano-organisation et dynamique des mGluR5 38

MATERIEL ET METHODES 40

I. CULTURES PRIMAIRES DE NEURONES D'HIPPOCAMPE 41
II. TRANSFECTIONS AU CALCIUM PHOSPHATE 42
III. BIOLOGIE MOLECULAIRE 43
IV. MARQUAGES IMMUNOCYTOCHIMIQUES 44
V. MICROSCOPIE DE SUPER-RESOLUTION 46
1. PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE DE LOCALISATION DE MOLECULES UNIQUES 46
2. UPAINT 51
a. Principe du uPAINT 51
b. Application du uPAINT 53
3. SPTPALM 54
a. Principe du sptPALM 54
b. Application du sptPALM 56
4. DSTORM 57
a. Principe du dSTORM 57
b. Application du dSTORM 58
5. ACQUISITION ET ANALYSE DES IMAGES DE SUPER-RESOLUTION 61
VI. ELECTROPHYSIOLOGIE 63

RESULTATS 64

I. MISE EN PLACE ET AMELIORATION DU DSTORM 2-COULEURS 67
1. DSTORM 2-COULEURS 67
a. Tests des fluorophores Alexa 488, Alexa 532 et Alexa 561 67
b. Caractérisation des anticorps 70
2. QUANTIFICATION DES IMAGES DE SUPER-RESOLUTION 72
a. Correction des aberrations chromatiques 72
b. Correction du drift au cours du temps 74
c. Quantification des propriétés des molécules uniques et des clusters de récepteurs 76

II. CO-ORGANISATION DES RECEPTEURS AU GLUTAMATE A L'ETAT BASAL ET ROLE PHYSIOLOGIQUE 79
1. NANO-ORGANISATION ET DYNAMIQUE DES RECEPTEURS AMPA 79
2. NANO-ORGANISATION DES RECEPTEURS NMDA 82
3. NANO-ORGANISATION ET DYNAMIQUE DES RECEPTEURS MGLUR5 84
4. CARACTERISATION DE LA PRECISION DE CO-LOCALISATION 87
5. MESURE DES DISTANCES ENTRE LES CLUSTERS DES RECEPTEURS AMPA ET NMDA 92
III. CO-ORGANISATION DES RECEPTEURS AU GLUTAMATE DANS UN MODELE PATHOLOGIQUE 95
1. LES MODELES DE TROUBLES DU SPECTRE DE L'AUTISME 96
2. ROLE DE SHANK3 DANS LES TROUBLES DU SPECTRE DE L'AUTISME 97
3. VALIDATION DU MODELE SHANK3 98
4. ETUDE DE L'ORGANISATION DES RECEPTEURS AU GLUTAMATE DANS UN MODELE D'AUTISME 100
a. Nano-organisation des récepteurs AMPA 100
b. Dynamique des récepteurs AMPA 103
c. Nano-organisation des récepteurs NMDA 104
d. Nano-organisation des récepteurs mGluR5 106

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 108

BIBLIOGRAPHIE 116

INTRODUCTION

I. LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE GLUTAMATERGIQUE

Les neurones sont les cellules du système nerveux permettant la conduction et la régulation de l'information électrique. Ils sont constitués d'un corps cellulaire duquel partent des prolongements plus ou moins ramifiés : les dendrites (voies d'entrée) et un axone (voie de sortie). La communication entre les neurones est assurée par les synapses. Le corps cellulaire centralise et intègre les informations électriques qu'il reçoit des synapses, il en fait la synthèse et, si la somme des signaux dépasse un certain seuil, un potentiel d'action se déclenche et se propage le long de l'axone vers les terminaisons pré-synaptiques.

Au niveau des synapses, la dépolarisation liée au potentiel d'action permet l'entrée de calcium dans la terminaison pré-synaptique, provoquant la libération de neurotransmetteurs dans l'espace synaptique. Ces neurotransmetteurs vont diffuser dans la fente synaptique et se fixer sur les récepteurs de la post-synapse, provoquant leur ouverture. Le flux d'ions circulant dans le pore des canaux entrainera soit une dépolarisation de la membrane dans le cas de synapses excitatrices (l'entrée de cations initie un EPSC pour Excitatory Post-Synaptic Current), soit une hyperpolarisation dans celui de synapses inhibitrices (l'entrée de Chlore initie un IPSC pour Inhibitory Post-Synaptic Current).

Dans le système nerveux central, la majorité des synapses excitatrices est de type glutamatergique. Ces synapses présentent un grand nombre de vésicules contenant les neurotransmetteurs au niveau de la pré-synapse, séparée d'une distance de 20 à 30 nm de la post-synapse, qui est caractérisée par un épaississement post-synaptique appelée densité post-synaptique (PSD) (**Figure 1**). Cet épaississement post-synaptique, de 30 à 60 nm d'épaisseur et d'un diamètre variant de 200 à 800 nm (Schikorski and Stevens, 1997; Harris et al., 2012; Walker et al., 2017), correspond à une accumulation de protéines membranaires, de protéines d'échafaudage, de kinases et phosphatases et de messagers secondaires. Les récepteurs au glutamate peuvent être séparés en deux grandes catégories : les métabotropiques (mGluRs) et les ionotropiques (iGluRs). Les premiers sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), ils modulent l'activité électrique des neurones et régulent la

transmission synaptique. Les seconds sont des récepteurs-canaux responsables de la dépolarisation membranaire rapide.

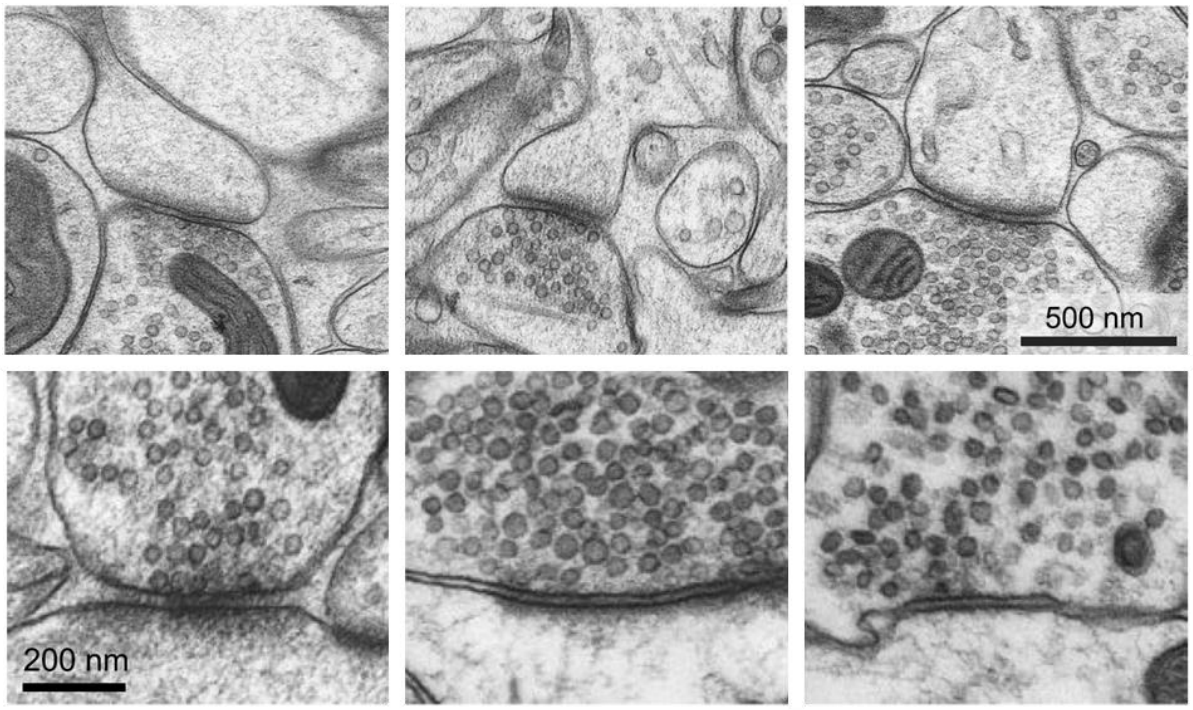


Figure 1. Images de cryo-microscopie électronique de synapses excitatrices du système nerveux central. *Le bouton pré-synaptique est rempli de vésicules contenant du glutamate qui peuvent être ancrées à la zone active, faisant face à la densité post-synaptique (d'après Korogod et al., 2015).*

Je présenterai dans la suite de l'introduction les composants et caractéristiques de la densité post-synaptique et les propriétés des différents récepteurs au glutamate.

II. LA DENSITE POST-SYNAPTIQUE

La densité post-synaptique est composée de plusieurs centaines de protéines d'échafaudage occupant une place centrale dans la post-synapse. Ces protéines jouent un rôle important dans le développement synaptique, la transmission synaptique et la plasticité synaptique. Elles peuvent être situées proches de la membrane plasmique, ce qui est le cas des protéines MAGUK (Membrane-Associated GUanylate Kinases), ou bien plus à la base de la PSD telles que Homer, Shank ou GKAP (**Figure 2**).

Les principaux membres des protéines MAGUK sont PSD-93, PSD-95, SAP97 et SAP102. PSD-95 est très impliquée dans l'organisation de la densité post-synaptique car elle a tendance à s'accumuler avant et à se placer plus près de la membrane post-synaptique que les autres protéines de la densité post-synaptique. De plus, son niveau d'expression a une influence sur la maturation synaptique et la force synaptique (El-husseini et al., 2000; Chen et al., 2011; Woods et al., 2011). Il a cependant été montré que les autres membres de la famille MAGUK, ayant une forte homologie avec PSD-95, pourraient compenser son absence (Elias et al., 2006; Levy et al., 2015). De par son rôle central dans la densité post-synaptique, PSD-95 est impliquée dans de nombreuses interactions protéine-protéine, nécessitant une structure moléculaire particulière. Elle possède trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine Guanylate-Kinase (Okabe, 2007; Sheng and Kim, 2011). Ses domaines PDZ lui permettent de recruter et de stabiliser plusieurs protéines synaptiques au niveau de la membrane post-synaptique. Il a été montré que les deux premiers domaines PDZ forment un tandem (Sainlos et al., 2011) et jouent un rôle crucial dans l'organisation synaptique des récepteurs AMPA et NMDA, et la partie N-terminale permet à PSD-95 de s'ancrer à la membrane post-synaptique grâce à la palmitoylation de deux résidus cystéine (El-husseini et al., 2002; Fukata et al., 2013). PSD-95 possède une première conformation en forme de C et une seconde conformation où la protéine est allongée, l'une ou l'autre est adoptée en fonction de son état de palmitoylation et de phosphorylation (Nakagawa et al., 2004; Chen et al., 2011; Fukata et al., 2013; Nelson et al., 2013). Des expériences de FRAP ont montré que cette protéine est très stable aux synapses et a un taux de renouvellement relativement bas afin d'assurer son rôle de protéine d'échafaudage (Kuriu et al., 2006; Sharma et al., 2006). Une fois que PSD-95 est ancrée à la

synapse dans une conformation ouverte, ses domaines d'interaction sont étirés, permettant son interaction avec plusieurs protéines cruciales pour la transmission synaptique telles que des récepteurs glutamatergiques ou des protéines d'adhésion. Tout d'abord, PSD-95 stabilise les récepteurs NMDA aux synapses via une interaction directe entre les quatre derniers acides aminés du domaine C-terminal de la sous-unité GluN2 des NMDARs et les deux premiers domaines PDZ de PSD-95 (Groc et al., 2004, 2006). Mais PSD-95 a aussi été identifié comme un des organisateurs majeurs des récepteurs AMPA. Bien que les sous-unités des AMPARs aient un motif de liaison à PDZ, ils sont incapables d'interagir directement avec PSD-95. En effet, il a été montré dans l'équipe que la troncature du domaine C-terminal de la sous-unité GluA2 des AMPARs n'a pas d'impact sur sa diffusion de surface ou sa stabilisation synaptique, mais affecte seulement son expression à la surface de la cellule (Bats et al., 2007). Ainsi, ce domaine C-terminal est important pour plusieurs fonctions des récepteurs AMPA, mais pas pour leur interaction avec PSD-95. Les récepteurs AMPA interagissent avec PSD-95 via des protéines intermédiaires appelées TARP (Transmembrane AMPAR Regulatory Proteins) (Chen et al., 2000; Schnell et al., 2002; Nicoll et al., 2006; Bats et al., 2007). Plus de détails sur le rôle des TARP seront donnés dans la partie III.

Les protéines Homer sont également des protéines d'échafaudage cruciales dans la PSD. Elles présentent un domaine EHV1 leur permettant de s'associer avec entre autres les récepteurs mGluR1 et mGluR5, mais aussi les récepteurs IP3 (intracellular calcium channel inositol trisphosphate), récepteurs de la ryanodine (RyR), les canaux TRPC, la sous-unité Cav2.1 des canaux calciques de type P/Q-type, la protéine d'échafaudage Shank, PIKE-L, la Dynamine III ainsi que le facteur NFAT (nuclear factor of activated T cells). Les formes longues Homer 1b/c, 2 et 3 sont exprimées de manière constitutive et polymérisent via leur domaine « coiled-coil » C-terminal pour former une structure tétramérique. Dans les épines dendritiques, les multimères d'Homer se lient aux polymères de la protéine Shank et constituent ensemble une plateforme structurale reliant les différents composants de l'épine dendritique entre eux (Hayashi et al., 2006). En revanche, les formes courtes d'Homer 1a et ania-3 (un variant de Homer3) ne polymérisent pas. Ces formes courtes agissent comme des dominant-négatifs capables de rompre les complexes protéiques reliés par les formes longues d'Homer. Les récepteurs mGluR1 colocalisent préférentiellement avec Homer 3 tandis que la distribution de mGluR5 coïncide préférentiellement avec celle de Homer 1b/c ce qui suggère

des interactions préférentielles entre les différent variants de mGluRs et Homer (Bockaert et al., 2004; Fagni et al., 2004). De plus, les formes courtes et longues d'Homer participent à l'adressage de mGluR5 à la membrane post-synaptique (Ango et al., 2002). En plus de leur rôle structural et d'adressage, les complexes Homer régulent la signalisation des mGluRs du groupe I. D'une part, les complexes Homer-PIKE relient les récepteurs mGluR5 à la voie de signalisation PI3K-Akt-mTor (Guhan and Lu, 2004). Par ailleurs, les formes longues d'Homer interagissent (directement ou par l'intermédiaire de Shank) avec les récepteurs IP3 et RyR créant ainsi un lien physique entre les récepteurs mGluR1 ou mGluR5 et les stocks de calcium intracellulaire (Fagni et al., 2000; Jardin et al., 2013). Enfin, en contrôlant le lien entre les récepteurs métabotropiques mGluR1/5 et les récepteurs NMDA via le complexe Shank-GKAP-PSD95, les formes courtes et longues d'Homer contrôlent de façon dynamique la transmission synaptique.

Les protéines Shank sont impliquées dans le recrutement, le regroupement, et le couplage fonctionnel des récepteurs glutamatergiques AMPA, NMDA et mGluR, pouvant ainsi moduler l'activité glutamatergique et la plasticité synaptique. Une multitude d'interactions protéine-protéine existe entre les protéines Shank et ces différents types de récepteurs. Ces interactions peuvent se produire de manière directe et indirecte via des protéines adaptatrices. Parmi celles-ci il y a les GKAPs, des molécules qui peuvent se lier au domaine PDZ de Shank via leur partie C-terminale, mais aussi les MAGUKs tels que PSD-93 et PSD-95 qui s'associent via leur partie N-terminale (Boeckers et al., 1999; Naisbitt et al., 1999). Des études ont permis de montrer que Shank1 et Shank3 pouvaient se lier de façon directe et indirecte via Homer aux récepteurs mGluR1 et mGluR5 (Tu et al., 1999; Sala et al., 2001, 2005). De plus, une expérience d'invalidation de Shank3 dans des neurones d'hippocampe murins a montré que la perte de la protéine était associée à une diminution de l'expression synaptique de mGluR5, et à des défauts de transmission synaptique glutamatergique de type LTD (Verpelli et al., 2011). Une autre étude in vitro a permis de montrer que l'expression de Shank3 dans des neurones permettait le recrutement de nouveaux récepteurs NMDA fonctionnels, via le domaine PDZ, ainsi que des récepteurs mGluR1, via les domaines SH3 et Hbs, accompagné d'une augmentation des courants excitateurs (Roussignol et al., 2005). Concernant le lien entre les récepteurs AMPA et la protéine Shank, la formation du complexe Shank-Homer a été impliquée dans le recrutement des récepteurs AMPA ainsi que dans la maturation des

synapses et l'augmentation de la force synaptique (Sala et al., 2001). De plus, une étude a montré que les membres de la famille Shank peuvent se lier de manière directe, via leur domaine PDZ, à la sous-unité GluA1 des récepteurs à AMPA (Uchino et al., 2006). De plus, Shank3 serait également capable de moduler l'exocytose de la sous unité GluA1 d'une manière indirecte en interagissant avec Rich2 (Rho-GAP interacting CIP4 homolog 2) (Raynaud et al., 2013) ou encore GRIP (Glutamate receptor-interacting protein 1) (Sheng and Kim, 2011). Toutes ces observations et interactions définissent un rôle crucial des protéines Shank sur les différents types de récepteurs au glutamate, leur liaison entre eux, leur recrutement et leur maintien. De plus, elles régulent l'homéostasie du calcium intracellulaire et moduleraient ainsi la maturation et la plasticité synaptique. Leur rôle va encore plus loin dans l'activité et le bon fonctionnement synaptique car les protéines Shank ne régulent pas seulement les récepteurs au glutamate mais aussi les récepteurs couplés aux protéines G et des canaux ioniques protéiques voltage-dépendants. Parmi les récepteurs couplés aux protéines G, le récepteur SSTR2 (somatostatin receptor 2) a été identifié comme étant maintenu à la PSD par son interaction avec SHANK via son domaine PDZ (Zitzer et al., 1999).

Les protéines GKAP sont enrichies dans la PSD, et quatre gènes codent pour les protéines GKAP1 à 4, avec pour GKAP1 deux variants d'épissage qui donnent les protéines GKAP1a et GKAP1b. Les quatre membres de la famille ont un domaine C-terminal identique, se terminant par les acides aminés QTRL, excepté le variant d'épissage GKAP1b. Au niveau N-terminal, il y a une région contenant 5 répétitions de 14 acides aminés, très conservée dans la famille GKAP et qui permet l'interaction avec les protéines MAGUK (Kim et al., 1997). GKAP interagit également avec les protéines de la famille Shank via son extrémité C-terminale (Boeckers et al., 1999; Naisbitt et al., 1999; Yao et al., 1999). De ce fait, le variant GKAP1b est le seul membre à ne pas interagir avec Shank. Enfin, GKAP interagit avec SSCAM (Synaptic Scaffolding Molecule) (Hirao et al., 1998), nArgBP2 (Kawabe et al., 1999) et DLC (Dynein Light Chain) *(*(Naisbitt et al., 2000). Il a été montré que l'association de Shank avec GKAP et PSD95 était requise pour assurer un trafic correct de GKAP vers la synapse et que le complexe GKAP/PSD-95 semble réguler l'adressage et la stabilité de Shank au niveau des épines (Romorini, 2004). La fonction de l'interaction Shank/GKAP semble ainsi importante pour la localisation des deux partenaires. Dans une lignée cellulaire, il a été montré que GKAP permet de recruter PSD-95 à la membrane (Takeuchi et al., 1997). La protéine GKAP, qui est associée au cytosquelette,

permet également de recruter SAP97 (Sabio et al., 2005). Ces différentes études montrent que GKAP est un élément important dans l'organisation de la PSD.

A

Protéines d'échafaudage	*Fonctions*	*Partenaires*
(1) PSD-95	*Organisation de la PSD* *Modulation de la maturation synaptique et de la force synaptique*	*NMDAR* *TARPs*
(2) Homer	*Plateforme structurale reliant les composants de l'épine dendritique entre eux* *Adressage de mGluR5 à la membrane* *Modulation de la transmission synaptique*	*Canaux calciques de type P-Q* *Canaux TRPC* *Dynamine III* *Facteur NFAT* *mGluR1* *mGluR5* *PIKE-L* *Récepteurs IP3* *Récepteurs de la ryanodine* *Shank*
(3) Shank	*Recrutement, regroupement et couplage fonctionnel des AMPAR, NMDAR et mGluR* *Modulation de l'activité glutamatergique et de la force synaptique*	*GKAP* *GRIP* *Homer* *MAGUK (PSD-93 / PSD-95)* *Rich2* *SSTR2*
(4) GKAP	*Régulation de l'adressage et de la stabilité de Shank dans les épines dendritiques*	*DLC* *nArgBP2* *SAP-97* *Shank* *SSCAM* *PSD-95*
(5) TARPs	*Adressage, régulation de la diffusion et modulation des propriétés biophysiques des AMPAR*	*AMPAR* *PSD-95*

B

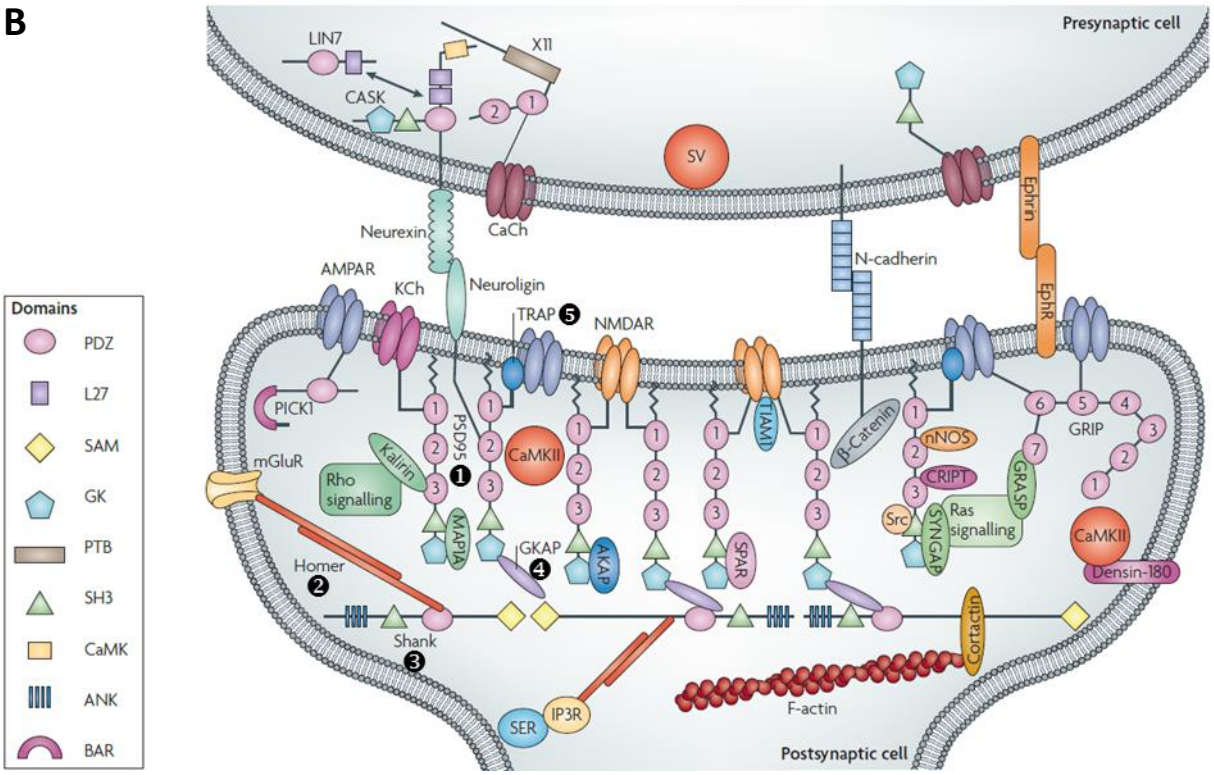


Figure 2. Fonctions et partenaires des protéines d'échafaudage de la densité post-synaptique. (A) *Tableau récapitulatif des protéines majeures de la densité post-synaptique et de leurs partenaires.* ***(B)*** *Schéma de l'organisation moléculaire de la densité post-synaptique des synapses glutamatergiques (d'après Feng and Zhang, 2009).*

Pour conclure, la densité post-synaptique n'est pas un agrégat déstructuré de protéines d'échafaudage, mais une structure complexe capable d'organiser de manière précise les différents récepteurs au glutamate, et ainsi de définir les propriétés de la transmission synaptique. L'organisation moléculaire précise de ces protéines d'échafaudage et des récepteurs glutamatergiques vis-à-vis du site de libération du glutamate détermine alors le nombre de récepteurs activés lors de signaux synaptiques. Ce quantum de réponse correspond à une unité de transmission synaptique, et peut être régulée par le neurone à la fois en termes d'intensité et de cinétique, tout au long de la vie de la synapse.

III. LES RECEPTEURS AU GLUTAMATE

Les récepteurs glutamatergiques ionotropiques sont des récepteurs-canaux pouvant être divisés en quatre groupes en se basant sur leurs propriétés pharmacologiques. On distingue ainsi les récepteurs AMPA (α-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole-Propionic Acid), NMDA (N-Methyl-D-Aspartate), Kaïnate et Delta (Lodge, 2009). Ces quatre types de récepteurs sont perméables aux cations mais ils se différencient par leurs propriétés cinétiques et leur perméabilité au calcium. Les récepteurs AMPA peuvent être considérés comme responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide (de l'ordre de la milliseconde), et catalysent principalement des courants Na^+/K^+. Les récepteurs NMDA quant à eux diffèrent des récepteurs AMPA à de nombreux points de vue. Le pore du récepteur-canal NMDA est bloqué par l'ion Mg^{2+} jusqu'à ce que la membrane post-synaptique soit suffisamment dépolarisée, par exemple après l'activation des récepteurs AMPA. De plus, ils sont activés par le glutamate pour lequel ils ont une haute affinité mais il leur est nécessaire d'avoir en parallèle la présence d'un co-agoniste qui peut être soit de la glycine soit de la D-serine. Suite à cette activation, les courants qu'ils catalysent sont plus lents que ceux des récepteurs AMPA et sont Na^+/K^+ et calciques, ce qui leur confère un rôle majeur dans la modulation de la force synaptique et dans les phénomènes de plasticité synaptique que sont la LTP (Long-Term Potentiation) et la LTD (Long-Term Depression). Les récepteurs Kaïnate et Delta, quant à eux, ont des rôles physiologiques moins connus, ils semblent plus être impliqués dans la régulation de la transmission synaptique plutôt qu'être de réels acteurs directs (Traynelis et al., 2010), et pourraient potentiellement faire intervenir la signalisation des mGluRs (Lomeli et al., 1993; Ady et al., 2014; Dadak et al., 2017).

Les récepteurs glutamatergiques métabotropiques quant à eux jouent un rôle dans la modulation de la transmission synaptique avec une cinétique d'action plus lente (de quelques secondes à quelques minutes). La famille des mGluRs est composée de huit récepteurs différents (de mGluR1 à mGluR8), qui peuvent être situés au niveau de la pré-synapse et de la post-synapse. Suite à une activation par le glutamate, ils ont tous la capacité d'induire des réponses via les protéines G, mais les cascades de signalisation sont différentes selon le type de mGluR activé. Bien que leurs rôles dépendent de leur composition et de leurs partenaires, ils sont tous impliqués dans la maturation et la plasticité synaptique ainsi que dans l'homéostasie calcique.

Nous détaillerons dans la suite de l'introduction les propriétés structurales, d'activation, et de localisation des récepteurs AMPA, NMDA et mGluR5.

1. Les récepteurs AMPA

a. Structure des récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA sont des protéines membranaires composées de quatre sous-unités formant un pore central permettant le passage des ions. Ces sous-unités sont nommées GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4, et contribuent différemment à la cinétique et aux propriétés dynamiques des récepteurs AMPA. Ces derniers présentent une distribution homogène dans le cerveau, bien que les sous-unités GluA1, GluA2 et GluA3 sont présentes dans l'ensemble du système nerveux central alors que la sous-unité GluA4 semble majoritairement restreinte au niveau du cervelet.

Chaque sous-unité présente quatre domaines : un domaine amino-terminal extracellulaire (ATD pour Amino-Terminal Domain ou NTD pour N-Terminal Domain), un domaine extracellulaire de liaison du ligand (LBD pour Ligand Binding Domain), un domaine transmembranaire (TMD pour Trans-Membrane Domain) et un domaine carboxy-terminal intracellulaire (CTD pour Carboxy-Terminal Domain) (**Figure 3**). Le rôle du domaine ATD est peu compris mais il comprend le peptide signal nécessaire à l'insertion de la protéine dans la membrane. Il est suivi d'une séquence de liaison qui le connecte au site de liaison du ligand. La structure de ce deuxième domaine est séparée en deux sous-fragments appelés S1 et S2. Lors de la fixation du glutamate, ce site de liaison du ligand subit des changements conformationnels entrainant l'ouverture ou la fermeture du pore (Armstrong et al., 2006). Les sous-fragments S1 et S2 sont encadrés par quatre domaines hydrophobes : S1 et S2 sont séparés par deux segments transmembranaires M1 et M3 et une boucle membranaire M2, et le quatrième segment transmembranaire M4 est situé au niveau de la partie carboxy-terminale du fragment S2. La boucle M2 forme la partie supérieure du pore du récepteur et les segments transmembranaires M1 et M3 forment sa partie inférieure. Enfin, le domaine carboxy-terminal est situé à l'intérieur de la cellule, sa longueur peut varier en fonction des sous-unités (il est plus long pour GluA1 et GluA4), lui conférant ainsi un rôle important dans

le trafic des AMPARs. Dans les sous-unités adjacentes des récepteurs, ce sont les sites de liaison du ligand qui se lient via leur sous-fragment S1. Lorsque le glutamate vient s'y fixer, ces sous-fragments S1 changent de conformation, entrainant la séparation des sous-fragments S2, qui transmettent cette force au TMD et induisent l'ouverture du pore du canal (Mayer, 2006; Greger et al., 2017; Twomey et al., 2017).

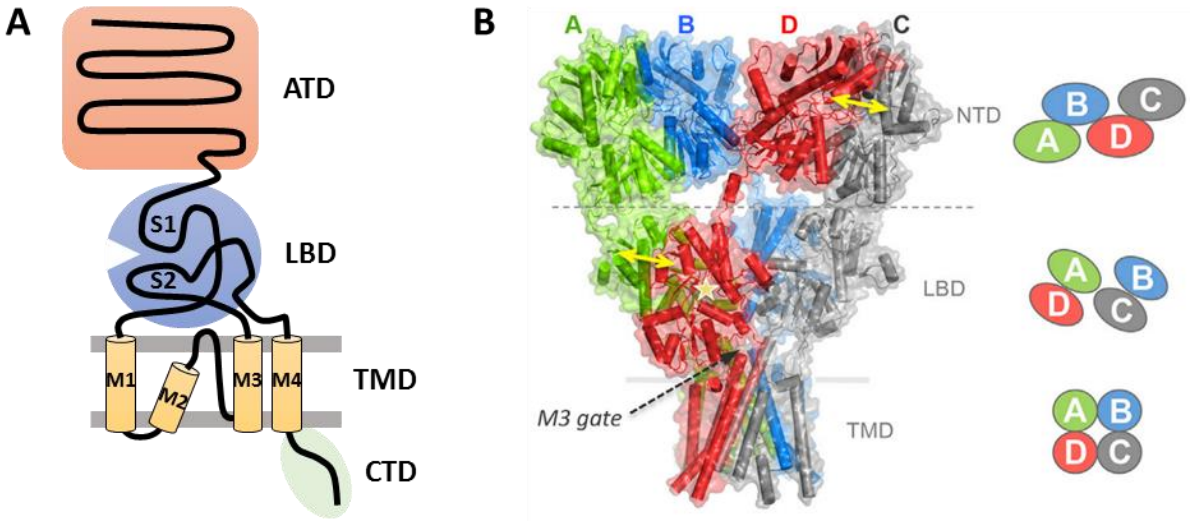


Figure 3. Structure des sous-unités des récepteurs AMPA. (A) *Représentation schématique d'une sous-unité GluA des récepteurs AMPA, montrant les quatre domaines ATD, LBD, TMD et CTD.* ***(B)*** *Structure des récepteurs AMPA et organisation des quatre sous-unités (A, B, C et D) (d'après Greger et al., 2017).*

b. Activation des récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA ont une affinité relativement faible pour le glutamate comparé aux autres récepteurs au glutamate, avec une concentration efficace médiane (EC_{50}) d'environ 0,5 mM. Leur conductance moyenne peut être très variable, allant de moins d'un picoSiemens à une trentaine de picoSiemens, dépendant des types de sous-unités présentes et du nombre de molécules de glutamate qui se lient au récepteur. Lorsqu'une vésicule de glutamate est libérée dans la fente synaptique, les récepteurs AMPA s'ouvrent, entrainant la clairance du glutamate en quelques centaines de microsecondes. Les récepteurs sont alors désactivés en 2,5 ms environ, conduisant à la fin des EPSCs dépendants des AMPARs (Colquhoun et al., 1992;

Raghavachari and Lisman, 2004). Il se peut que la clairance du glutamate ne soit pas assez rapide suite à une forte stimulation ou à une libération glutamatergique à haute fréquence. Dans ce cas, les récepteurs AMPA se ferment rapidement et passent dans un état désensibilisé, où leur conformation les empêche de fixer du glutamate pendant quelques dizaines à quelques centaines de millisecondes (**Figure 4**).

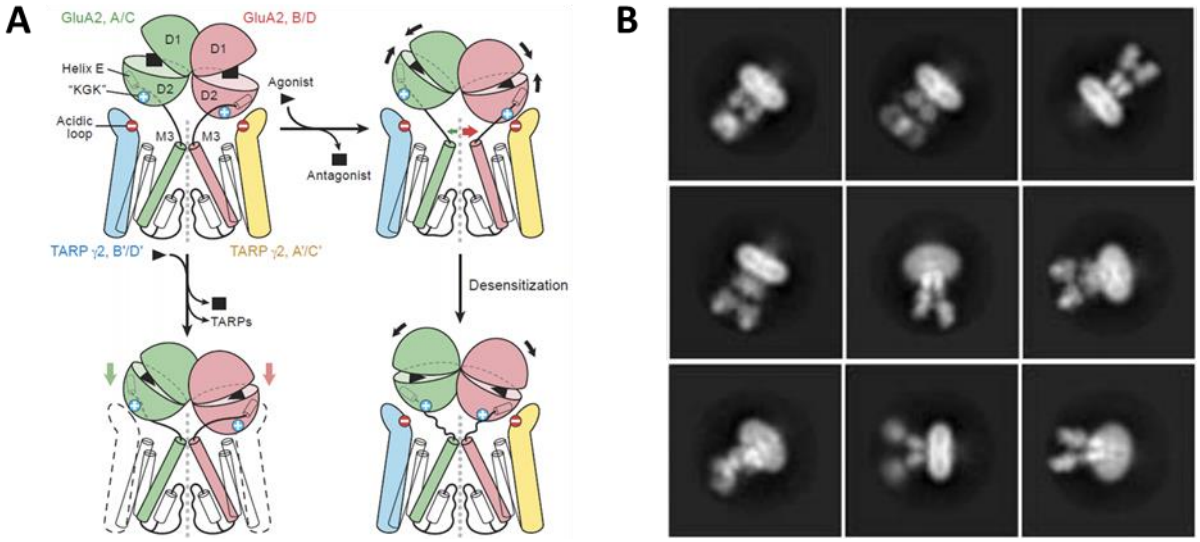


Figure 4. Etats conformationnels des récepteurs AMPA *dans* ***(A)*** *une représentation schématique et* ***(B)*** *des images de cryo-microscopie électronique (d'après Chen et al., 2018).*

c. Nano-organisation et dynamique des récepteurs AMPA

La plupart des récepteurs AMPA sont synthétisés dans le soma. Une fois leurs quatre sous-unités assemblées, ils sont transportés jusqu'à la membrane plasmique grâce à des vésicules de transport. Il est également possible que les AMPARs soient synthétisés localement au niveau du réticulum endoplasmique dans les dendrites, sous les épines dendritiques (Esteban and Greger, 2007). Suite à leur exocytose, les récepteurs AMPA diffusent vers la synapse où leur nombre, leur localisation et leur régulation ont un rôle majeur dans l'intégration des signaux synaptiques. En effet, la libération d'une seule vésicule de glutamate dans la fente synaptique ne suffit pas pour saturer tous les récepteurs AMPA post-synaptiques (Liu et al., 1999), seuls ceux situés en face du site de libération du glutamate dans

une aire ayant une largeur à mi-hauteur de 100 à 150 nm seront activés (Lisman et al., 2007; Savtchenko and Rusakov, 2013). Ces propriétés permettent ainsi de définir un quantum de réponse post-synaptique non par le nombre de molécules de glutamate par vésicule, mais par le niveau de clusterisation des récepteurs AMPA et leur position vis-à-vis du site de libération du glutamate (MacGillavry et al., 2013; Nair et al., 2013). Il est donc nécessaire qu'il y ait un équilibre dynamique entre les compartiments synaptiques, extra-synaptiques et intra-cellulaires afin de moduler leur nombre et leur organisation au niveau de la densité post-synaptique.

Les TARPs, protéines auxiliaires des récepteurs AMPA, jouent un rôle dans leur adressage à la surface neuronale, régulent leur diffusion latérale mais aussi modulent leurs propriétés biophysiques (Nicoll et al., 2006; Milstein and Nicoll, 2008; Coombs and Cull-Candy, 2009; Sager et al., 2009). La famille des TARPs est sous-divisée en type I et II suivant leurs fonctions (Kato et al., 2010). Le groupe de type I comprend la Stargazin (aussi appelée γ-2), γ-3, γ-4 et γ-8 et le groupe de type II comprend γ-5 et γ-7 (dont la séquence est très proche de γ-5). Les TARPs de type I cumulent un rôle régulateur des propriétés biophysiques et pharmacologiques des récepteurs AMPA à celui de protéine d'adressage des récepteurs AMPA à la surface neuronale, tandis que les TARPs de type II n'influencent pas le trafic des récepteurs AMPA vers la surface neuronale et leurs effets sur les propriétés biophysiques des récepteurs varient en fonction de la composition du récepteur AMPA. Toutes les TARPs sont composées de quatre segments transmembranaires et leurs queues carboxyliques et amino-terminales sont cytosoliques. L'expression de différents isoformes des TARPs varie de manière spatio-temporelle, en fonction du type et de la localisation des neurones ainsi que de leur stade de développement. Toutefois, dans les neurones d'hippocampe, l'expression de γ-2 semble spécifiquement enrichie au niveau synaptique alors que γ-8 serait présente aussi bien au niveau synaptique qu'extra-synaptique (Inamura et al., 2006).

Les TARPs facilitent l'export des récepteurs AMPA depuis le réticulum endoplasmique, favorisant leur trafic intracellulaire ainsi que leur expression à la surface des cellules. Tout d'abord, la co-expression de Stargazin avec la sous-unité GluA2 facilite l'export de cette sous-unité du réticulum endoplasmique et favorise l'expression surfacique des récepteurs AMPA homériques ne contenant que la sous-unité GluA2 (Yamazaki et al., 2004). Des études de FRET

(Fluorescence Resonance Energy Transfer) ont également prouvé l'existence de cette interaction entre les récepteurs AMPA et la Stargazin au niveau du réticulum endoplasmique (Bedoukian et al., 2006). Les TARPs ont aussi pour rôle de réguler l'organisation des récepteurs AMPA à la surface neuronale, et plus particulièrement leur accumulation au niveau des compartiments synaptiques (Chen et al., 2000). En effet, les interactions entre la partie carboxy-terminale de la Stargazin et des protéines à domaines PDZ de la densité post-synaptique telles que PSD-95 constituent un mécanisme essentiel à la stabilisation des récepteurs AMPA à la synapse (Bats et al., 2007). D'un point de vue mécanistique, un ensemble de phosphorylations au niveau de cette queue carboxylique lui permettrait, via un phénomène de répulsion électronique, de s'éloigner de la membrane plasmique pour venir se fixer aux domaines PDZ des protéines d'échafaudage de la PSD (Sumioka et al., 2010).

Pour ce qui est des propriétés dynamiques des récepteurs AMPA, le développement des techniques d'imagerie a permis d'avoir une vision plus juste de leur mobilité à la surface des neurones, notamment avec l'utilisation des techniques de suivi de molécules uniques (Borgdorff and Choquet, 2002; Groc et al., 2004; Bats et al., 2007). Les différentes expériences ayant pour but de caractériser la dynamique des récepteurs AMPA ont montré qu'ils peuvent changer de comportement en quelques secondes, oscillant entre une diffusion libre Brownienne et une immobilisation. De plus, leur diffusion, qui peut être régulée par l'activité synaptique, est plus importante au niveau extra-synaptique que dans la synapse où ils sont confinés, via entre autre leur interaction avec PSD-95, induisant leur rétention au sein des synapses (Opazo and Choquet, 2011; Opazo et al., 2012). La diffusion des récepteurs AMPA est désormais reconnue comme un moyen pour les neurones d'opérer des échanges rapides entre des récepteurs désensibilisés et des récepteurs naïfs, plus rapidement que le simple retour de désensibilisation ne le permettrait, assurant ainsi le maintien de la transmission synaptique (Heine et al., 2008). De plus, le nombre de molécules de glutamate présentes dans les vésicules pré-synaptiques est limité, ce qui créé un gradient local de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Lisman et al., 2007). Les récepteurs AMPA ayant une affinité assez faible pour le glutamate, ne voient donc qu'une fraction de leur population synaptique activée lors de la libération de glutamate. Leur dynamique, affectant leur localisation au sein de la synapse, joue donc un rôle important dans l'efficacité de la transmission synaptique.

Au cours des dix dernières années, de nombreuses approches expérimentales d'imageries telles que le STED, la microscopie de localisation de molécule unique (sptPALM, uPAINT) et le STORM, ont permis de caractériser l'organisation des récepteurs AMPA dans les synapses avec une résolution spatiale de l'ordre de 10 à 100 nm (**Figure 5**).

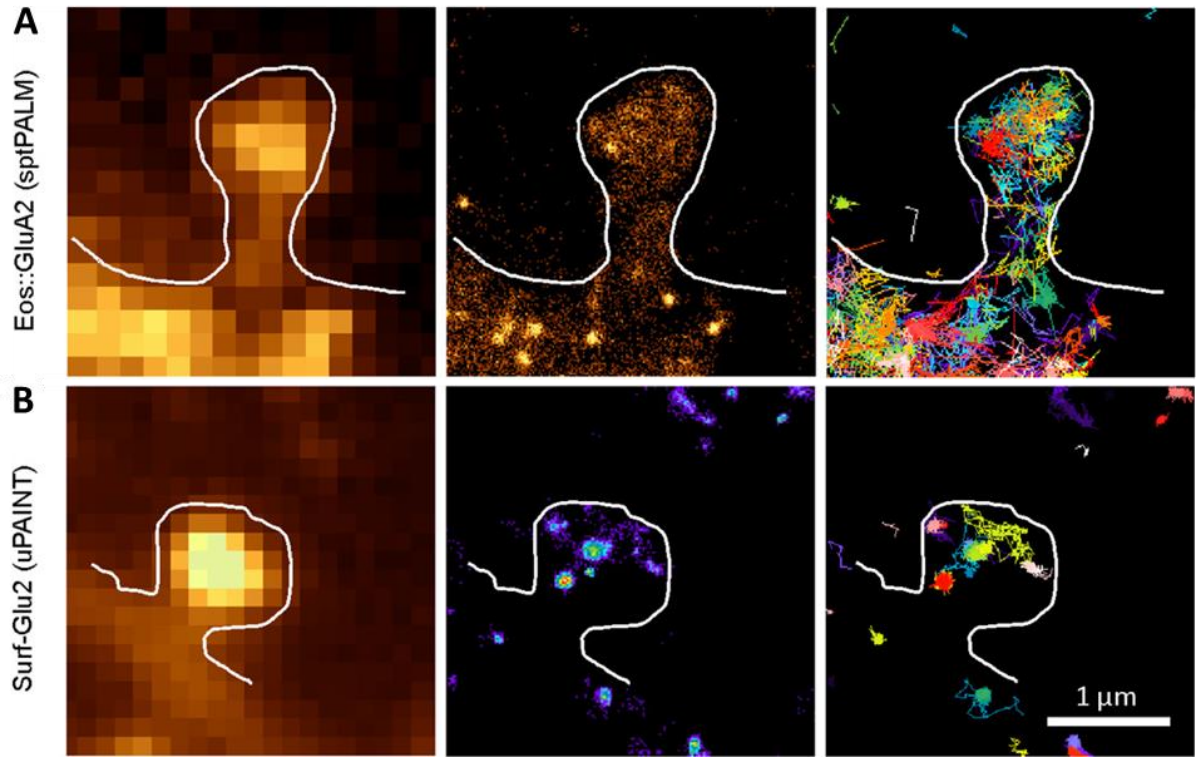


Figure 5. Nano-organisation et dynamique des récepteurs AMPA. *Exemples de l'organisation de la sous-unité GluA2 des récepteurs AMPA dans des épines dendritiques de neurones d'hippocampe vivants, observée* ***(A)*** *par sptPALM et* ***(B)*** *par uPAINT. Les synapses sont marquées par l'expression de Homer1c::Cerulean pour le sptPALM ou Homer1c::GFP pour le uPAINT. De gauche à droite : images d'épifluorescence de Homer1c surexprimé, image d'intensité de sptPALM et trajectoires des sous-unités GluA2::Eos surexprimées, ou image d'intensité de uPAINT et trajectoires des sous-unités endogènes GluA2 (d'après Nair et al., 2013).*

Ces études ont montré que les récepteurs AMPA ne sont pas répartis de manière homogène dans la synapse mais plutôt accumulés dans des clusters appelés « nanodomaines », comprenant entre 20 et 25 récepteurs chacun dans un diamètre d'environ 80 nm (Fukata et al., 2013; MacGillavry et al., 2013; Nair et al., 2013). Il a également été observé des clusters de la protéine d'échafaudage PSD-95 au sein de la densité post-

synaptique, avec des diamètres variant de 80 à 150 nm, le nombre de ces clusters variant de un à quatre en fonction de la taille de la PSD. Pour la première fois, la nano-organisation des récepteurs AMPA et de PSD-95 a été caractérisée vis-à-vis de la pré-synapse (Tang et al., 2016), en particulier par rapport à la protéine pré-synaptique RIM intervenant dans le mécanisme de libération des vésicules synaptiques. Ces travaux montrent que RIM1/2 présente une organisation clusterisée similaire aux nanoclusters de PSD-95 en termes de taille et de nombre de clusters par synapse. De plus, les clusters pré-synaptiques de RIM1/2 sont alignés en face des clusters post-synaptiques de PSD-95. Le concept de ces nanocolonnes trans-synaptiques révèle ainsi l'existence d'une organisation au niveau moléculaire entre la pré- et la post-synapse, ce qui pourrait améliorer de manière non négligeable l'efficacité de la transmission synaptique.

2. Les récepteurs NMDA

a. Structure des récepteurs NMDA

Un autre type de récepteur glutamatergique ionotropique est le récepteur NMDA. Les NMDARs sont des hétérotétramères issus de l'assemblage de quatre sous-unités. Il existe sept sous-unités réparties dans trois familles différentes (Moriyoshi et al., 1991; Paoletti et al., 2013). La famille des sous-unités GluN1 est composée d'un seul membre (GluN1) qui est ubiquitaire. C'est sur cette sous-unité que se situe le site de liaison du co-agoniste. La famille des sous-unités GluN2 est constituée de quatre membres (GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D), sa fonction principale est de lier le glutamate. Elle est aussi impliquée dans la cinétique des courants, l'affinité pour le ligand (Paoletti, 2011), la spécificité des interactions avec des protéines intracellulaires (Bard et al., 2010; Bard and Groc, 2011) ou extracellulaires (Groc et al., 2007), et la mobilité membranaire (Groc et al., 2006; Dupuis et al., 2014). La famille des sous-unités GluN3 est composée de deux membres (GluN3A et GluN3B) (Low and Wee, 2010). Bien que leurs rôles soient moins connus, on sait tout de même qu'elles lient le co-agoniste et déterminent les propriétés fonctionnelles des récepteurs NMDA (Henson et al., 2010).

Le récepteur NMDA est un tétramère formé classiquement de deux sous-unité GluN1 et de deux sous-unités GluN2 (Karakas and Furukawa, 2014) (**Figure 6**). L'architecture des sous-unités est similaire entre les trois familles, et, à l'instar des récepteurs AMPA, est composée de quatre domaines différents (Traynelis et al., 2010; Paoletti et al., 2013; Lee et al., 2014). Le domaine ATD (Amino-Terminal Domain) est impliqué dans l'assemblage des sous-unités mais permet aussi la régulation du gating comme en cas de présence de zinc (Rachline et al., 2005). Le domaine LBD (Ligand-Binding Domain) est formé de deux segments, S1 et S2. C'est au niveau de ce domaine que le co-agoniste se lie sur les sous-unités GluN1 et GluN3 (Furukawa et al., 2005) et le glutamate sur les sous-unités GluN2. Le domaine TMD (Trans-Membrane Domain) est composé de quatre segments (M1 à M4). M2 a la particularité de ne pas entrer en contact avec l'espace extracellulaire, mais d'effectuer une boucle qui débute et se termine au niveau cytoplasmique. Le domaine CTD (Carboxy-Terminal Domain) possède de nombreux sites de phosphorylation et joue un rôle déterminant dans l'ancrage et le trafic du récepteur (Lau and Zukin, 2007).

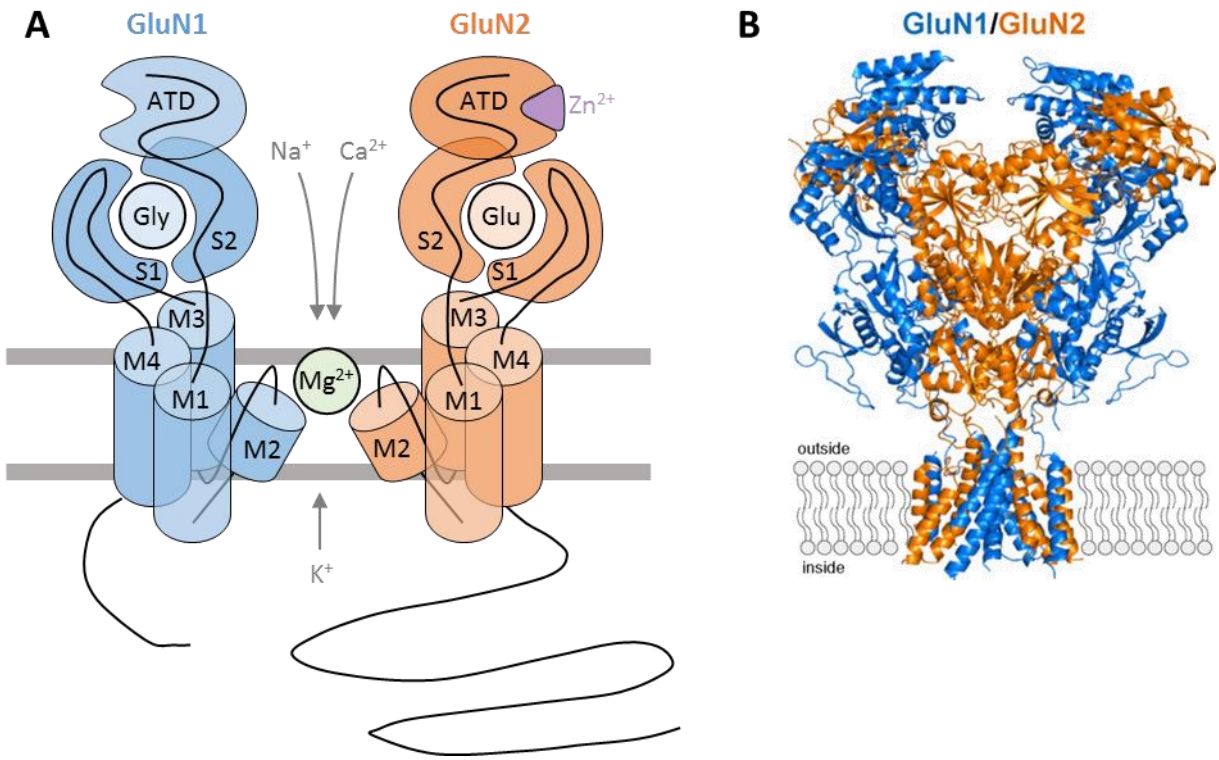


Figure 6. Structure des sous-unités des récepteurs NMDA. (A) *Représentation schématique des sous-unités GluN1 et GluN2 des récepteurs NMDA, montrant les quatre domaines ATD, LBD, TMD et CTD (d'après Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004).* ***(B)*** *Structure des récepteurs NMDA et organisation des sous-unités GluN1 et GluN2 (d'après Hansen et al., 2018).*

b. Activation des récepteurs NMDA

L'activation du récepteur NMDA requiert la liaison de 2 molécules de glutamate et de 2 co-agonistes au niveau des quatre domaines LBD (Paoletti et al., 2013). Son ouverture est lente, elle dure environ 10 ms (Dzubay and Jahr, 1996), entrainant le phénomène de désactivation : le canal ionique reste fermé malgré la présence des ligands. La désactivation du récepteur NMDA est elle aussi lente et dépend de la composition des sous-unités. L'affinité du récepteur NMDA pour le glutamate (EC_{50} < 5 µM) (Paoletti et al., 2013) est supérieure à celle des récepteurs AMPA et Kaïnate (EC_{50} > 100 µM) (Attwell and Gibb, 2005). L'affinité du récepteur NMDA pour la D-serine (EC_{50} ≈ 0,2 µM) et la glycine (EC_{50} ≈ 0,05 - 0,5 µM) est supérieure à celle pour le glutamate (Matsui et al., 1995; Priestley et al., 1995; Madry et al., 2007).

L'activation du récepteur NMDA le rend perméable à différents ions dont le K^+, le Na^+ et surtout le Ca^{2+}. Sa perméabilité est dépendante du potentiel de membrane de la cellule. En effet, le pore du canal est sujet à un blocage par des ions Mg^{2+}. Le potentiel d'équilibre des ions Mg^{2+} est proche de 0 mV. Au potentiel de repos d'un neurone (-70 mV), les ions Mg^{2+} vont s'introduire dans le canal ionique du récepteur NMDA et y rester bloqués. En conséquence, le passage des ions Ca^{2+} est stoppé. Une augmentation du potentiel de membrane est donc nécessaire à l'enlèvement des ions Mg^{2+} du pore. Lorsque ce bloc Mg^{2+} est enlevé, l'entrée de Ca^{2+} par les NMDARs active la CaMKII qui est un acteur essentiel pour l'établissement de la LTP (Lisman et al., 2002, 2012; Lucchesi et al., 2011). L'influx calcique qui suit l'activation des NMDARs induit la liaison de la Ca^{2+}/CaM à la CaMKII, entraînant son activation par autophosphorylation et sa redistribution dans les densités post-synaptiques (Shen and Meyer, 1999; Bayer et al., 2001; Otmakhov et al., 2004; Merrill et al., 2005) où elle sera stabilisée *(Sharma et al., 2006)*. Une fois dans ce compartiment, la CaMKII interagit avec diverses protéines dont les sous-unités GluN1, GluN2A et GluN2B des NMDARs. Cependant, dans des systèmes *in vitro*, il semble que l'affinité de la CaMKII pour les sous-unités GluN1 et GluN2B soit plus forte que pour la sous-unité GluN2A (Strack and Colbran, 1998; Soren Leonard et al., 1999; Strack et al., 2000). L'interaction de la CaMKII à la sous-unité GluN1 nécessite l'autophosphorylation de la CaMKII (Leonard et al., 2002). Le site de liaison est le même que pour l'α-actinine et la Ca^{2+}/CaM. La CaMKII entre donc en compétition avec l'α-

actinine pour la liaison à cette région. Après déplacement de l'α-actinine, la Ca^{2+}/CaM et la CaMKII interagissent simultanément (Merrill et al., 2007). La CaMKII est également capable de se lier à la partie C-terminale de GluN2B. Cette interaction dépend, comme pour GluN1, de l'autophosphorylation de la CaMKII, qui est nécessaire pour la translocation synaptique de la CaMKII (Strack et al., 2000; Robison et al., 2005; Gustin et al., 2011). Elle augmente également l'activité kinase autonome de l'enzyme, c'est-à-dire indépendamment des réactions d'autophosphorylation et de la liaison à la Ca^{2+}/CaM (Bayer et al., 2001, 2006). Deux sites de liaison à la CaMKII ont été identifiés au niveau de la partie C-terminale de GluN2B. Ces différentes interactions sont régulées par des réactions de phosphorylation. En effet, la phosphorylation de la sous-unité GluN2B par la CaMKII et de la sous-unité GluN2A par la PKC inhibe l'interaction avec la CaMKII. Cette interaction avec la CaMKII pourrait conférer à la sous-unité GluN2B une voie de signalisation propre, impliquée dans le développement et la plasticité synaptique, qui ne semble pas récupérable par la sous-unité GluN2A (Wang et al., 2011).

c. Nano-organisation et dynamique des récepteurs NMDA

La distribution des sous-types de NMDARs à la surface des neurones est hétérogène, ils ont été détectés dans des sites pré-synaptiques (Tzingounis and Nicoll, 2004) et post-synaptiques. Ces derniers sont très majoritaires et se répartissent entre les compartiments synaptique, péri-synaptique (défini comme une zone de 200 à 300 nm autour de la PSD (Petralia et al., 2005; Zhang and Diamond, 2006) et extra-synaptique. Le contenu en sous-unités NR2 conditionne la localisation particulière des NMDARs par rapport à la synapse. Selon leur localisation subcellulaire, les récepteurs NMDA ne sont pas impliqués dans les mêmes fonctions (Köhr, 2006; Gladding and Raymond, 2011).

Au niveau pré-synaptique, on distingue les autorécepteurs, activés par une libération de neurotransmetteur issue de la cellule qui les porte, et les hétérorécepteurs activés par un neurotransmetteur libéré par une cellule adjacente, de nature neuronale ou gliale (Engelman and MacDermott, 2004; Corlew et al., 2008; Pinheiro and Mulle, 2008; Rodríguez-Moreno et al., 2010). Le principal rôle des NMDARs pré-synaptiques est de réguler la libération de

neurotransmetteur, le plus souvent en la facilitant, au niveau des terminaisons glutamatergiques ou GABAergiques.

A la surface du neurone post-synaptique, les NMDARs diffusent et échangent entre les compartiments synaptique et péri-synaptique (Tovar and Westbrook, 2002; Groc et al., 2006). Les NMDARs péri-synaptiques, situés à plus de 100 nm de la densité postsynaptique (PSD), ne sont pas activés par le glutamate libéré lors de l'activité synaptique ayant lieu à basse fréquence (Harris and Pettit, 2007). Par ailleurs, des NMDARs péri -synaptiques ont été détectés sous formes d'agrégats (Li et al., 1998; Rao et al., 1998). Une étude plus récente a également trouvé des agrégats de NMDARs péri -synaptiques associés aux protéines PSD-95 et SAP102 (Petralia et al., 2010). Ces protéines à domaines PDZ auraient un rôle stabilisateur de ces récepteurs NMDA.

Leur distribution dans la post-synapse a été décrite pour la première fois avec la sous-unité NR1 révélant leur présence dans les sites synaptiques, apposés près des axones (Aoki et al., 1994). Au sein des synapses, les NMDARs sont accumulés dans la densité post-synaptique (Valtschanoff and Weinberg, 2001; Barrow et al., 2009). De récents travaux ont montré que ces récepteurs sont clusterisés sous forme de nanodomaines d'environ 55 nm de diamètre (**Figure 7**). En fonction des sous-unités GluN2A et GluN2B qu'ils contiennent, ils présentent des propriétés spécifiques de taille et de contenu (Kellermayer et al., 2018).

De la même manière que les récepteurs AMPA, la nano-organisation des récepteurs NMDA est finement régulée par leur mobilité à la surface de la membrane plasmique. Ce n'est seulement qu'en 2002 que leur diffusion latérale a été démontrée pour la première fois sur neurones vivants (Tovar and Westbrook, 2002). Depuis, de nombreuses techniques ont été utilisées pour caractériser leur dynamique, telles que l'électrophysiologie (Harris and Pettit, 2007) ou le FRAP (Bard et al., 2010) pour mesurer la diffusion moyenne des populations de récepteurs, ou des techniques de détections de molécules uniques afin de suivre des récepteurs individuels au cours du temps (Groc et al., 2009). Il est ainsi désormais reconnu que la dynamique des récepteurs NMDA à la surface de la membrane des neurones contribue à de nombreux processus biologiques, tels que la maturation synaptique pendant le développement (Bellone and Nicoll, 2007; Groc et al., 2007) et les phénomènes de plasticité synaptique (Dupuis et al., 2014).

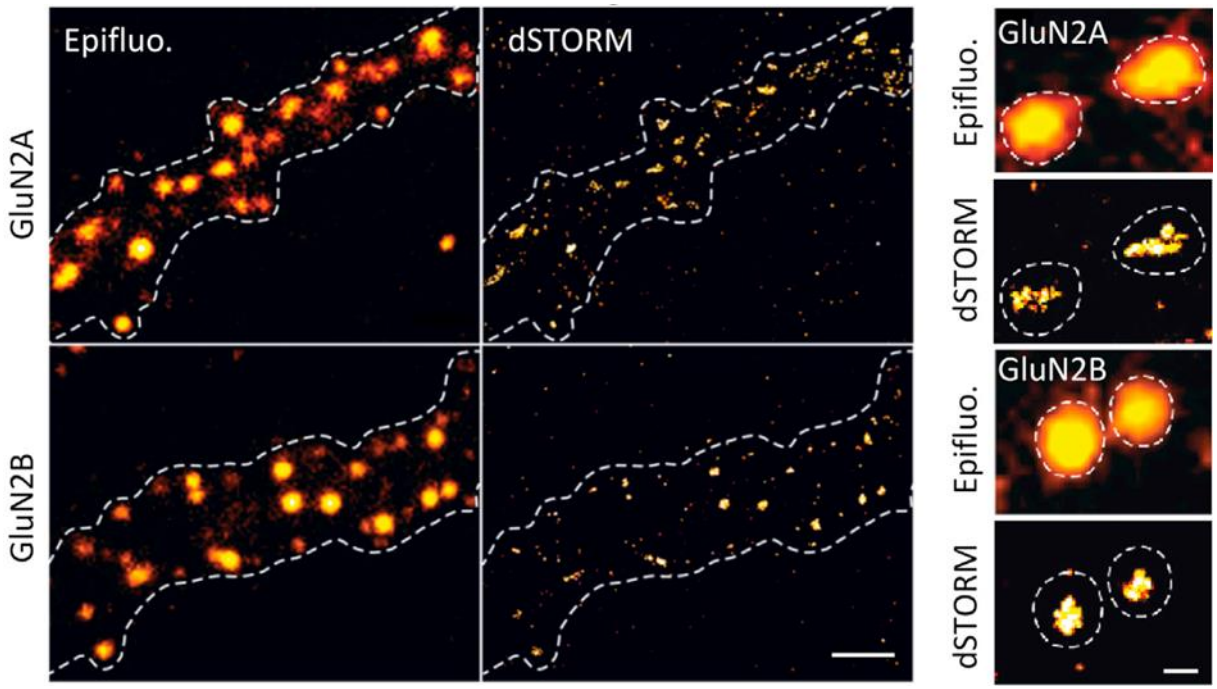


Figure 7. Nano-organisation des récepteurs NMDA. *Exemples de l'organisation des sous-unités GluN2A et GluN2B des récepteurs NMDA dans des épines dendritiques de neurones d'hippocampe fixés, observée par dSTORM. De gauche à droite : images d'épifluorescence de GluN2A ou GluN2B, images d'intensité de dSTORM et zooms sur des clusters au sein d'épines dendritiques (d'après Kellermayer et al., 2018).*

3. Les récepteurs mGluR

a. Structure des récepteurs mGluR

En parallèle des récepteurs ionotropiques se trouvent les récepteurs métabotropiques mGluRs. Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) (Simeone et al., 2004), et sont impliqués dans la modulation de la transmission synaptique. Ils sont une famille de huit récepteurs et sont classés en trois groupes (Nakanishi, 1994). Le groupe I contient les récepteurs mGluR1 et mGluR5 qui sont couplés positivement à la phospholipase C via la protéine $G_{q/11}$. Le groupe II comprend mGluR2 et mGluR3, et les récepteurs mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8 appartiennent au groupe III (Pin and Duvoisin, 1995; Niswender and Conn, 2010). Ces six mGluRs sont couplés négativement à l'adénylate cyclase (AC) via la protéine $G_{i/o}$.

Les mGluRs se composent de trois domaines : (i) une chaîne de sept domaines transmembranaires hélicoïdaux (TMD) reliés par de courtes boucles intra- et extracellulaires, (ii) une extrémité N-terminale extracellulaire reliée au TMD par une région riche en cystéines et (iii) une queue C-terminale cytosolique (Pin and Duvoisin, 1995; Jingami et al., 2003; Niswender and Conn, 2010) (**Figure 8**). Leur site de liaison au glutamate se trouve au niveau du domaine N- terminal extracellulaire, appelé Venus-Flytrap Domain (VFT) en raison de sa forme (Takahashi et al., 1993).

Les mGluRs existent sous forme de dimères constitutifs. Cette dimérisation nécessite la formation de ponts disulfures entre les domaines N-terminaux des sous-unités (Romano et al., 1996, 2001; Kunishima et al., 2000) et est essentielle à leur activation. Si l'on a longtemps pensé que ces dimères étaient des homodimères stricts, des études plus récentes ont révélé que les récepteurs mGluR1 et mGluR5 du groupe I pouvaient s'associer entre eux mais pas avec les mGluRs du groupe II et III. En revanche, les mGluRs du groupe II et III peuvent s'assembler entre eux. Par ailleurs, un travail récemment publié démontre que les mGluR2 peuvent former des oligomères d'ordre supérieur lorsqu'ils sont activés ou inhibés en neurones (Møller et al., 2018). Quelle que soit la nature de la dimérisation, elle est essentielle à l'activation des mGluRs et est susceptible de conférer des propriétés pharmacologiques spécifiques au dimère (Pin and Bettler, 2016).

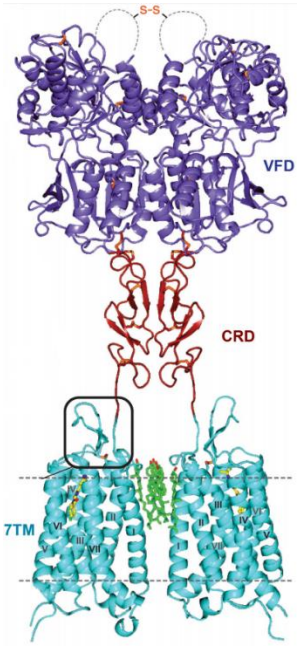


Figure 8. Structure du récepteur mGlu1. *Modèle du récepteur mGlu1 contenant le Venus Flytrap Domain (VFD) en violet, la région riche en cystéines (CRD) en rouge et les sept domaines transmembranaires (7TM) en bleu (d'après Wu et al., 2014).*

b. Activation des récepteurs mGluR

Suite à la réponse rapide des récepteurs glutamatergiques ionotropiques présentés précédemment, l'activation des mGluRs induit une signalisation impliquant des messagers secondaires, permettant alors de moduler la transmission synaptique.

Les mGluRs agissent en stimulant l'échange GDP-GTP sur la sous-unité α du complexe G hétérotrimérique (composé de trois sous-unités α, β et γ). La sous-unité Gα chargée en GTP se dissocie du complexe Gβγ et chaque entité active différents effecteurs de la signalisation (Hall et al., 1999). Le type de protéines G (Gq/11, Gs, Gi/o, G12/13) auxquelles sont couplés les mGluRs définit la spécificité de leur réponse. Pour les groupes II et III, lors de l'activation des récepteurs, la sous-unité βγ des protéines G interagit directement avec les canaux Cav et GIRK, inhibant l'entrée des ions Ca^{2+} par les uns et augmentant l'entrée des ions K^{+} par les autres.

Les structures des sites de liaison au glutamate ont deux conformations principales : une conformation ouverte qui crée une large poche entre les deux lobes, et une conformation fermée caractérisée par le rapprochement des deux lobes (**Figure 9**). En absence de ligand, ces deux types de conformation sont en équilibre constant (Doumazane et al., 2013; Olofsson et al., 2014). La conformation fermée ou « active » est stabilisée par la fixation de l'agoniste, alors que la forme ouverte ou « inactive » est stabilisée lorsque que l'antagoniste se fixe (Kunishima et al., 2000; Tsuchiya et al., 2002; Jingami et al., 2003). Des états conformationnels intermédiaires ont récemment été mis en évidence et seraient essentiels pour la transition de la forme inactive à la forme active du dimère (Vafabakhsh et al., 2015; Pin and Bettler, 2016).

Le couplage des mGluRs à la protéine G se fait au niveau des boucles intracellulaires (Gomeza et al., 1996; Francesconi and Duvoisin, 1998; Havlickova et al., 2003; Kammermeier, 2010). Entre le site de liaison au glutamate et le site de couplage à la protéine G, c'est un domaine riche en cystéines (CRD) qui assure la propagation du signal. Le pont disulfure permet de ressentir l'état conformationnel du site de liaison au glutamate et de le transmettre aux 7 domaines transmembranaires. Ces derniers changent alors de conformation pour activer la protéine G (Rondard et al., 2006; Muto et al., 2007).

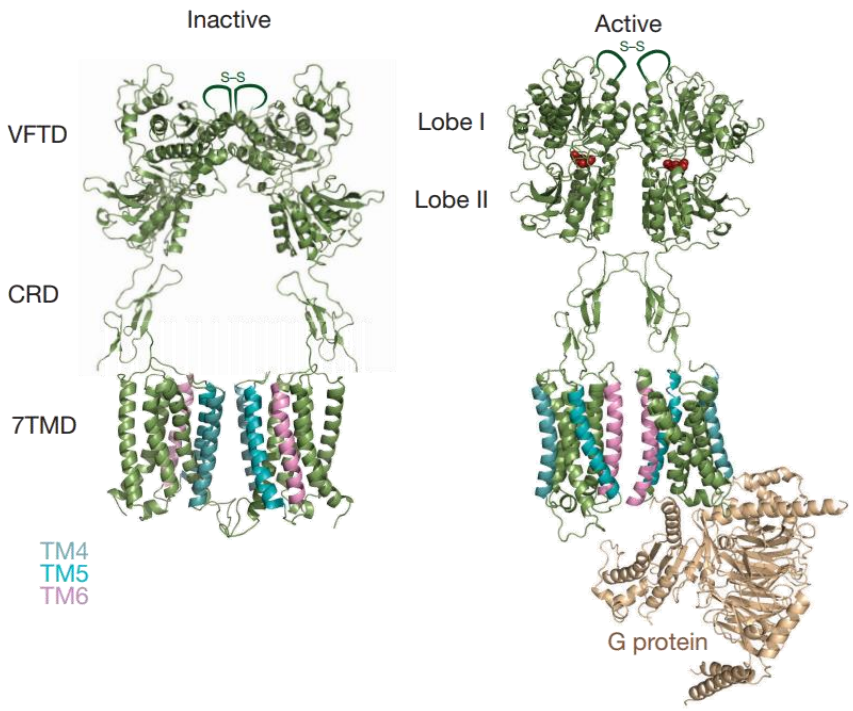


Figure 9. Etats conformationnels des dimères de récepteurs mGluR. *Modèles structuraux des récepteurs mGluR dans un état actif et inactif (d'après Pin and Bettler, 2016).*

Ainsi, l'activation des mGluRs est assurée grâce à de nombreuses interactions moléculaires entre les différents domaines des sous-unités. De plus, la transduction du signal est basée sur des interactions protéines-protéines, dites en cascade, qui nécessitent d'être finement régulées dans le temps et dans l'espace. Ces propriétés complexes des mGluRs font d'eux d'importants modulateurs de la transmission excitatrice synaptique.

Dans la suite de mon projet, je m'intéresserai plus particulièrement aux récepteurs mGluR5.

c. Nano-organisation et dynamique des mGluR5

Les récepteurs mGluR5 sont localisés à la surface de la membrane plasmique, notamment en périphérie de la synapse, autour de la densité post-synaptique. On peut également les trouver à la pré-synapse où ils inhibent la libération de glutamate en tant qu'autorécepteurs. Leur distribution majoritaire en péri-synapse est cohérente avec le fait que l'activation de mGluR5 nécessite une stimulation répétitive des afférences synaptiques et confirme son rôle modulateur de la neurotransmission (Lujan and Somogyi, 1996; Ferraguti and Shigemoto, 2006). Leur localisation péri-synaptique est liée à leur interaction avec des protéines intracellulaires qui régulent leur fonction en intervenant dans le trafic intracellulaire, l'adressage, le recyclage ainsi que la modulation du signal intracellulaire. C'est notamment le cas avec les formes longues de la protéine Homer (Homer1b/c) qui jouent un rôle dans sa rétention intracellulaire, son adressage aux dendrites et son agrégation dans la post-synapse, tandis que la forme courte Homer1a libérée par l'activité neuronale permet son insertion à la membrane post-synaptique (Ango et al., 2002). De plus, l'interaction de mGluR5 avec la protéine Tamaline facilite le trafic du récepteur vers la membrane plasmique (Kitano et al., 2002; Sugi et al., 2007), et la protéine Norbine augmente la densité membranaire des récepteurs mGluR5 et leur signalisation (Wang et al., 2009).

Par ailleurs, le suivi de la dynamique de surface de mGluR5 par microscopie à particule unique a révélé que Homer contrôle la dynamique de surface de mGluR5 et favorise son confinement sous forme de clusters péri-synaptiques. Cependant, cette stabilisation est réversible et dynamique, aussi bien en terme de mouvements que de composition des clusters (Sergé et al., 2002).

Ces propriétés confirment donc que les récepteurs mGluR5 ont une nano-organisation et une dynamique finement régulées par leurs partenaires intracellulaires.

Après cette introduction présentant les acteurs principaux de la transmission synaptique glutamatergique, je décrirai dans le chapitre suivant de ce manuscrit l'ensemble des matériels et méthodes utilisés au cours de ma thèse.

La partie suivante correspond à la présentation de mes résultats de thèse. Dans cet écrit, j'aborderai dans un premier temps les outils méthodologiques que j'ai été amenée à développer afin de répondre à la problématique physiologique de mon projet de recherche. Dans un deuxième temps, je présenterai les résultats obtenus quant à la caractérisation nanoscopique de la co-organisation des récepteurs au glutamate à l'état basal. Finalement, j'exposerai les résultats préliminaires obtenus concernant la modification de cette co-organisation des récepteurs glutamatergiques dans un modèle de troubles du spectre autistique.

Une discussion de mes résultats et quelques perspectives ouvertes par mon travail seront finalement exposées.

MATERIEL ET METHODES

I. CULTURES PRIMAIRES DE NEURONES D'HIPPOCAMPE

Les cultures primaires de neurones d'hippocampe dissociés sont obtenues suivant le protocole de Banker (Banker and Cowan, 1977), les neurones poussent sur des lamelles de verre reposant sur un tapis de cellules gliales attachées en fond de boite de Pétri.

Les cellules gliales sont préparées à partir des hippocampes dissociés, étalées avec une densité de 20 000 à 40 000 cellules par boites de Pétri de 60 mm de diamètre (selon le lot de sérum de cheval utilisé), et mises en culture dans du MEM (Fisher Scientific) contenant 4,5 g/L de glucose, 2 mM de L-Glutamine (PAA, GE Healthcare) et 10% de sérum de cheval (Invitrogen) pendant 14 jours.

Les neurones sont préparés à partir de cerveaux d'embryons de rats Sprague-Dawley à E18, comme décrit dans (Kaech and Banker, 2006). Les cerveaux sont extraits et les hippocampes sont isolés dans du HBSS contenant de la Pénicilline-Streptomycine (PS). Pour la dissociation, les hippocampes sont incubés dans 5 mL d'une solution de Trypsine-EDTA/PS/HEPES pendant 15 minutes à 37°C. Après deux rinçages avec de l'HBSS chaud, une dissociation mécanique avec une pipette Pasteur pré-enduite est faite avec du sérum de cheval. Le nombre de cellules est compté dans une cellule de Malassez pour les ensemencer avec une densité de 200 000 cellules par boite de Pétri de diamètre de 60 mm contenant 4 lamelles de diamètre de 18 mm (Mariefield), préalablement enduites de poly-L-lysine (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, USA). Les cellules sont étalées dans du milieu Neurobasal (Gibco, Invitrogen) supplémenté contenant 10% de sérum de cheval. Après deux heures, temps nécessaire aux neurones pour adhérer aux lamelles, les lamelles sont transférées dans les boites de Pétri de diamètre de 60 mm contenant la couche de cellules gliales âgées de 14 jours, et le MEM est remplacé par du milieu Neurobasal supplémenté. Chaque lamelle est surélevée du tapis de cellules gliales par trois plots de paraffine. La taille des plots est suffisamment petite pour permettre les échanges cellulaires en laissant circuler le milieu de culture. 5 µM d'Ara-C (cytosine α-D-arabinofuranoside hydrochloryde, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) sont ajoutés après 3 jours *in vitro* pour stopper la prolifération des cellules gliales. Avant les expériences, les neurones d'hippocampes en culture sont maintenus à 36,6°C et 5% de CO_2 pendant 14-15 jours.

II. TRANSFECTIONS AU CALCIUM PHOSPHATE

Les neurones sont chimiquement transfectés à 9-11 jours *in vitro* avec la méthode de transfection au Calcium Phosphate.

Les solutions de transfections utilisées contiennent :

- TE 1X (pH 7,3) : Tris-HCL (1 M – pH 7,5), EDTA (250 mM – pH 8,0)
- $CaCl_2$ (2,5 M) dans HEPES (10 mM) (pH 7,2)
- HBS-solution tampon 2X (pH 7,2) : NaCl (275 mM), HEPES (40 mM), Glucose (10 mM), KCl (10 mM), Na_2HPO_4 (1,5 mM)
- Acide kynurénique (10 mM) dissout dans du milieu Neurobasal non supplémenté en glutamine
- HCl (5 M)

Pour une boite de Pétri de 60 mm de diamètre, la solution de transfection contient : 125 µL de TE, 10 µg de plasmide d'ADN, 12,5 µL de $CaCl_2$/HEPES et 125 µL de HBS. Le mélange est laissé au repos à température ambiante pendant 5 minutes, puis chaque lamelle de 18 mm de diamètre est incubée dans 250 µL de solution de transfection et 50 µL d'acide kynurénique à 36,6°C pendant 2 heures. Les lamelles sont ensuite rincées avec un milieu acide contenant : 2 mL de milieu Neurobasal non supplémenté en glutamine, 500 µL d'acide kynurénique et 2,5 µL de HCl. Elles sont enfin transférées dans leur boite de Pétri d'origine et maintenues à 36,6°C et 5% de CO_2 pendant 4-7 jours.

III. BIOLOGIE MOLECULAIRE

J'ai travaillé la plupart du temps sur des protéines endogènes, mais quand ce ne fût pas possible, les neurones ont été transfectés avec les constructions suivantes.

- EGFP : provenant de la compagnie Clontech, la « enhanced » GFP a été utilisée comme un marqueur cytosolique et un rapporteur de transfection.

- mEos2 mGluR5a : pour les expériences de sptPALM, l'ADN codant le récepteur mGluR5a a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pRK5, puis la mEos2 a été insérée entre la séquence du peptide signal et le début de mGluR5a.

- EGFP miR Shank3 : la « enhanced » GFP a été insérée en position N-terminale du miARN Shank3 dans le vecteur d'expression pCAG miR30. La séquence du miARN-Shank3 utilisée est la suivante : TGCTGTTGACAGTGAGCGTGAAGTCACCAGAGGACAAGATAGTGAAGCCACA GATGTATCTTGTCCTCTGGTGACTTCCTGCCTACTGCCTCGGA.

- EGFP Shank3 : l'ADN codant pour Shank3 a été sous-cloné dans le vecteur d'expression pRK5, puis la « enhanced » GFP a été insérée en position N-terminale.

IV. MARQUAGES IMMUNOCYTOCHIMIQUES

Afin de caractériser l'organisation individuelle et la co-organisation des récepteurs AMPA, NMDA et mGluR5 avec la technique du dSTORM, des immunomarquages simple et double couleurs ont été réalisés sur ces protéines de surface.

Pour cela, à 14 jours *in vitro*, dans le cas d'un immunomarquage des récepteurs AMPA et/ou NMDA, les cellules sont incubées avec un anticorps anti-GluA2 de souris ayant une spécificité pour l'isotype IgG2b et/ou un anticorps anti-GluN1 de souris ayant une spécificité pour l'isotype IgG1 (fournis par Eric Gouaux, Portland, USA), dilué(s) à 0,33 µg/µL dans du milieu de culture, pendant respectivement 7 et 15 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées avec une solution de PFA/sucrose 4% pendant 10 minutes à température ambiante. Après trois rinçages dans du PBS 1X, les neurones sont incubés dans une solution de NH_4Cl 50 mM (Sigma-Aldrich, USA) pendant 10 minutes afin de bloquer les fonctions aldéhydes du PFA et réduire l'autofluorescence induite par ces fonctions aldéhydes. Les cellules sont de nouveau rincées trois fois avec une solution de PBS 1X.

Dans le cas d'un immunomarquage des récepteurs mGluR5, une perméabilisation des cellules est nécessaire car l'anticorps primaire anti-mGluR5 possède un site de liaison intracellulaire. Le protocole utilisé consiste donc, suite à la fixation au PFA et à l'incubation en NH_4Cl expliqués précédemment, à traiter les neurones avec du Triton X100 à 0,2% pendant 5 minutes à température ambiante pour perméabiliser leurs membranes, puis rincer trois fois avec du PBS 1X, et les incuber dans une solution de PBS/BSA 2% pendant 45 minutes pour saturer les sites de liaison non spécifiques. L'anticorps primaire anti-mGluR5 de lapin (AB5675, Merck Millipore, France) est dilué au 1/300ème dans une solution de PBS/BSA 2% et incubé pendant 1 heure à température ambiante, puis les cellules sont rincées trois fois avec une solution de PBS/BSA 2%.

Les étapes suivantes sont communes aux marquages intra- et extracellulaires, simple et double couleurs. Les neurones sont incubés dans une solution de PBS/BSA 2% (Sigma-Aldrich, USA) pendant 1 heure à température ambiante afin de saturer les sites de liaison non

spécifiques. Les anticorps primaires sont ensuite révélés avec des anticorps secondaires de chèvre dilués au 1/500ème dans une solution de PBS/BSA 2% et incubés pendant 45 minutes à température ambiante.

Pour les marquages simple-couleur (i) des récepteurs AMPA ou NMDA, l'anticorps secondaire utilisé est un anti-souris couplé au fluorophore Alexa 647 (A21236, ThermoFisher Scientific, USA), (ii) et pour les récepteur mGluR5, l'anticorps secondaire utilisé est un anti-lapin couplé au fluorophore Alexa 647 (A21244, ThermoFisher Scientific, USA).

Pour les marquages double-couleurs, (i) dans le cas du couple AMPA-NMDA, le premier anticorps secondaire est un anti-souris spécifique de l'isotype IgG1 et couplé à l'Alexa 532 (couplé par Matthieu Sainlos au laboratoire) pour révéler les récepteurs NMDA, et le deuxième anticorps secondaire est un anti-souris spécifique de l'isotype IgG2b couplé à l'Alexa 647 (A21242, ThermoFisher Scientific, USA) pour révéler les récepteurs AMPA. (ii) Dans le cas du couple AMPA-mGluR5, le premier anticorps secondaire est un anti-souris couplé au fluorophore Alexa 532 (A11002, ThermoFisher Scientific, USA) pour révéler les récepteurs AMPA, et le deuxième anticorps secondaire est un anti-lapin couplé au fluorophore Alexa 647 (A21244, ThermoFisher Scientific, USA) pour révéler les récepteurs mGluR5.

Les cellules sont ensuite rincées trois fois en PBS/BSA 2% et trois fois en PBS 1X, puis fixées dans du PFA/sucrose 2% pendant 10 minutes à température ambiante, et rincées trois fois dans du PBS 1X. Cette deuxième fixation à l'issue du marquage avec les anticorps secondaires permet d'immobiliser ces derniers pour les expériences de dSTORM. Les cellules sont ensuite conservées dans du PBS 1X dans le noir et à 4°C avant d'être imagées.

V. MICROSCOPIE DE SUPER-RESOLUTION

1. Principe de la microscopie de localisation de molécules uniques

La microscopie de fluorescence est la méthode la plus utilisée pour étudier l'organisation des protéines dans des cellules vivantes et fixées. Son principe est basé sur l'exploitation des différents états électroniques que peut atteindre un électron d'une molécule fluorescente (**Figure 10**). L'excitation d'un électron d'un fluorophore, due à l'absorption d'un photon, le fait passer d'un état électronique fondamental S_0 dit « stable » à un état excité singulet S_1. Au cours des quelques nanosecondes en état excité, l'électron subit une relaxation vibrationnelle ou une conversion interne, correspondant à une perte d'énergie par la vibration ou la chaleur. Cette perte d'énergie entre le photon absorbé et le photon émis s'appelle le déplacement de Stokes. L'électron est alors dans l'état excité le plus faible et peut revenir à l'état stable en émettant un photon de plus basse énergie que celui absorbé, induisant de la fluorescence.

En plus des états S_0 et S_1, les fluorophores peuvent passer d'un état excité singulet S_1 à un ou plusieurs états excités triplet T_n. Ces derniers sont métastables, ce qui signifie qu'ils peuvent durer de quelques nanosecondes à quelques secondes voire minutes. La relaxation de l'état excité triplet T_n à l'état fondamental S_0 est à la base du phénomène de phosphorescence.

En parallèle de ces deux états d'excitation, singulet et triplet, les fluorophores sont aussi confrontés au phénomène de photoblanchiment. Le photoblanchiment correspond à l'excitation d'un électron du fluorophore par un photon lors de sa relaxation vibrationnelle. Le fluorophore perd alors l'électron qui sort de son orbite et réagit avec l'oxygène environnant pour former des dérivés réactifs de l'oxygène. Cette accumulation locale de dérivés réactifs de l'oxygène induit une réaction chimique brisant la molécule du fluorophore.

Lors du phénomène de fluorescence, la molécule fluorescente peut être décrite comme un point source d'ondes lumineuses. Les fronts des ondes fluorescentes émanant du point source sont diffractés aux bords de l'ouverture de l'objectif et des lentilles. Ces ondes diffractées produisent une image composée d'une tache centrale de haute intensité et de

plusieurs anneaux d'interférence d'intensité inférieure. Ce point diffracté est appelé le disque d'Airy et représente la Fonction d'Etalement du Point en deux dimensions (PSF pour Point Spread Function en anglais).

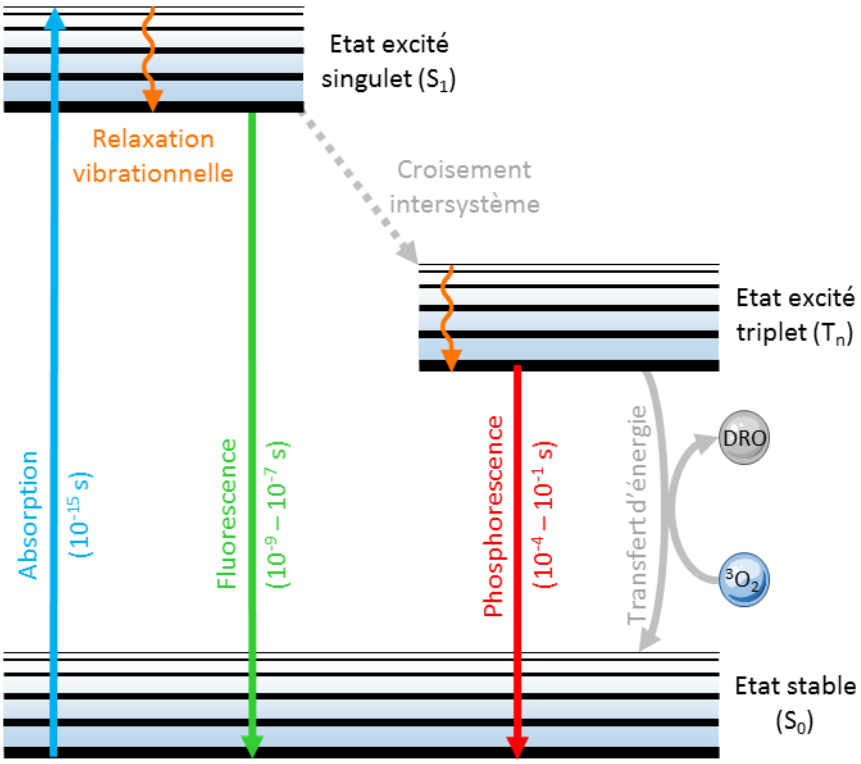


Figure 10. Diagramme de Jablonski. *Illustration de la chronologie de la fluorescence et les différents niveaux énergétiques par lesquels passe un fluorophore.*

Au cours de la dernière décennie, de nouvelles techniques de microscopie ont été développées pour (i) contourner la limite de diffraction et (ii) améliorer la résolution, afin d'observer l'organisation précise de protéines dans des échantillons biologiques. Cette partie se concentrera seulement sur la Microscopie de Localisation de Molécule Unique (SMLM pour Single Molecule Localization Microscopy), même si d'autres techniques comme l'Appauvrissement à Emission Stimulée (STED pour Stimulated Emission Depletion) ou la Microscopie d'Illumination Structurée (SIM pour Structured Illumination Microscopy) peuvent être utilisées.

Pour contourner la limite de diffraction, la SMLM vise à décorreler au cours du temps l'émission de fluorescence d'émetteurs uniques (**Figure 11**).

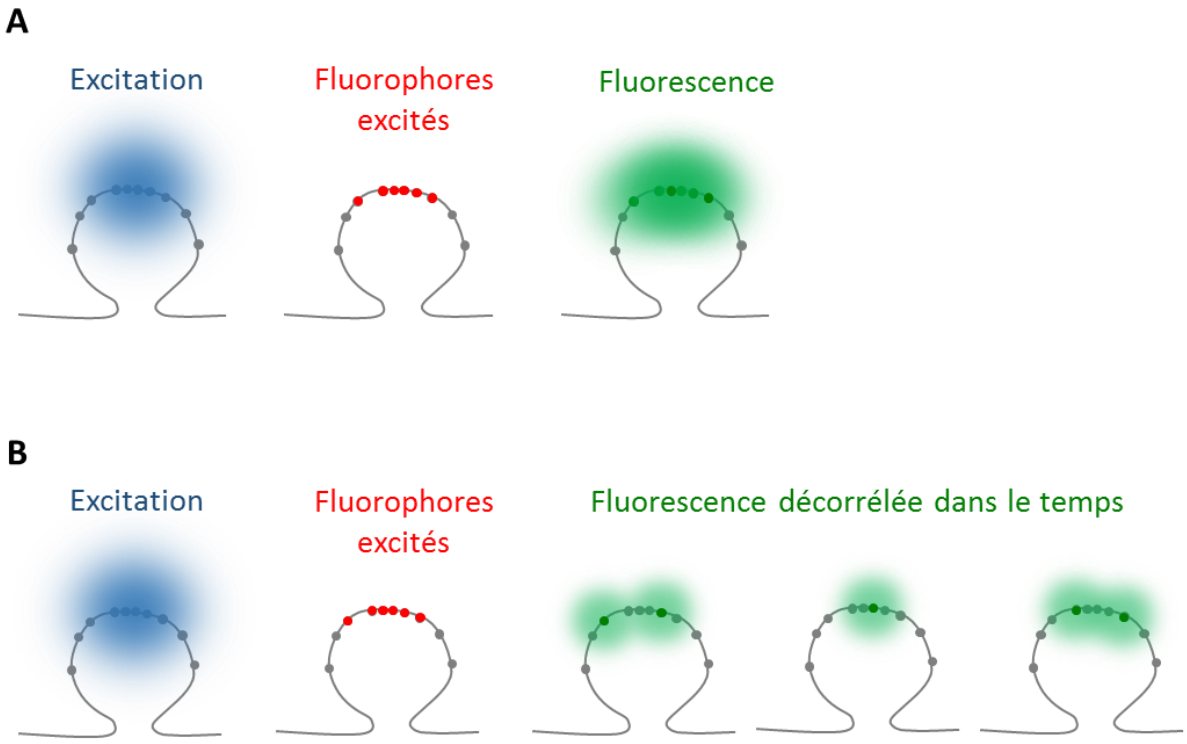


Figure 11. Microscopie de localisation de molécules uniques. (A) *En microscopie à fluorescence classique, les fluorophores excités émettent en même temps un signal fluorescent diffracté d'environ 250 nm de diamètre.* ***(B)*** *Les techniques de microscopie de localisation de molécules uniques permettent d'obtenir un signal fluorescent décorrélé dans le temps. La fluorescence émise individuellement par chaque fluorophore peut ensuite être ajustée par une fonction Gaussienne pour déterminer la position du fluorophore à l'échelle nanométrique.*

Ceci permet d'observer des PSF individuelles et d'ajuster mathématiquement ce signal pour déterminer les coordonnées x et y du point source (centroïde de la PSF) (**Figure 12**). Les méthodes pour déterminer les coordonnées du centroïde sont généralement basées sur des algorithmes d'ajustement de courbe pour ajuster la distribution des photons (la PSF) avec une fonction Gaussienne.

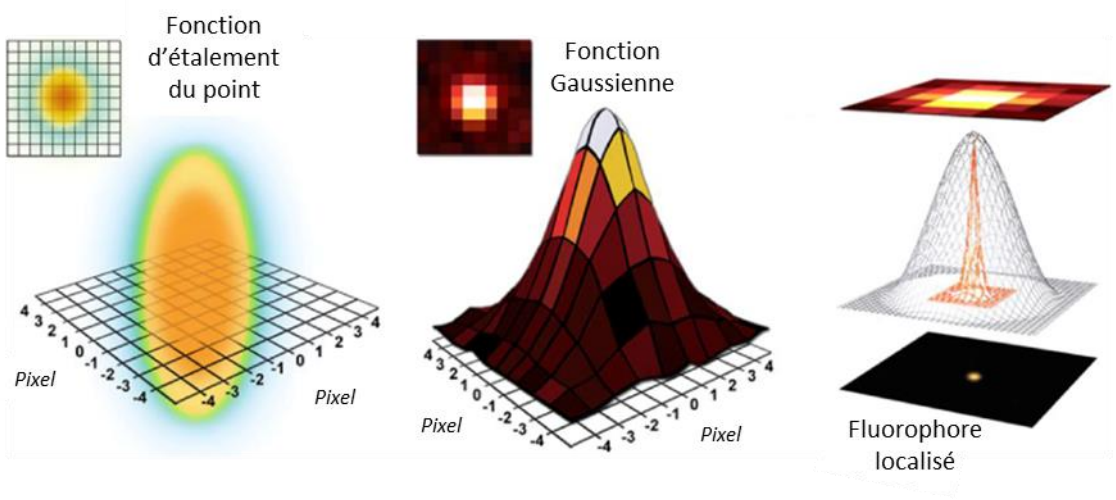


Figure 12. Fonction d'étalement du point. *La fluorescence émise en trois dimensions par un fluorophore (fonction d'étalement du point ou PSF) est ajustée par une fonction Gaussienne. Les coordonnées x et y du maximum de la fonction correspondent aux coordonnées du fluorophore.*

La résolution, quant à elle, peut être définie comme la distance de séparation minimale entre deux objets semblables à laquelle ils peuvent encore être distingués comme des émetteurs individuels. Cependant avec la SMLM, la résolution n'est plus dépendante de notre capacité à distinguer deux points proches, mais dépend de la précision pour localiser l'objet à partir de son image diffractée. La résolution obtenue est ainsi dans la gamme de 10 à 50 nm contre environ 250 nm avec la microscopie de fluorescence conventionnelle (**Figure 13**).

Plusieurs facteurs peuvent affecter la précision de localisation : le nombre de photons émis par le fluorophore, le bruit de fond, la stabilité du système d'imagerie pendant l'acquisition, la densité de marquage et la spécificité de marquage. L'objectif est donc de s'assurer que l'émission de fluorescence de l'échantillon biologique est dans une condition de détection de molécules uniques. Pour atteindre ce but, trois approches peuvent être utilisées : (i) le contrôle de l'efficacité de marquage pour maintenir une concentration de molécules fluorescentes assez faible afin d'être dans une condition de molécules uniques (uPAINT pour universal Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography), (ii) l'utilisation de protéines fluorescentes qui nécessitent d'être photo-activées pour émettre de la fluorescence (PALM pour Photo-Activated Localization Microscopy), et (iii) exploiter l'état triplet que peuvent atteindre les électrons pour contrôler la densité de fluorophores émettant de la fluorescence au cours du temps (dSTORM pour direct-STochastic Optical Reconstruction Microscopy).

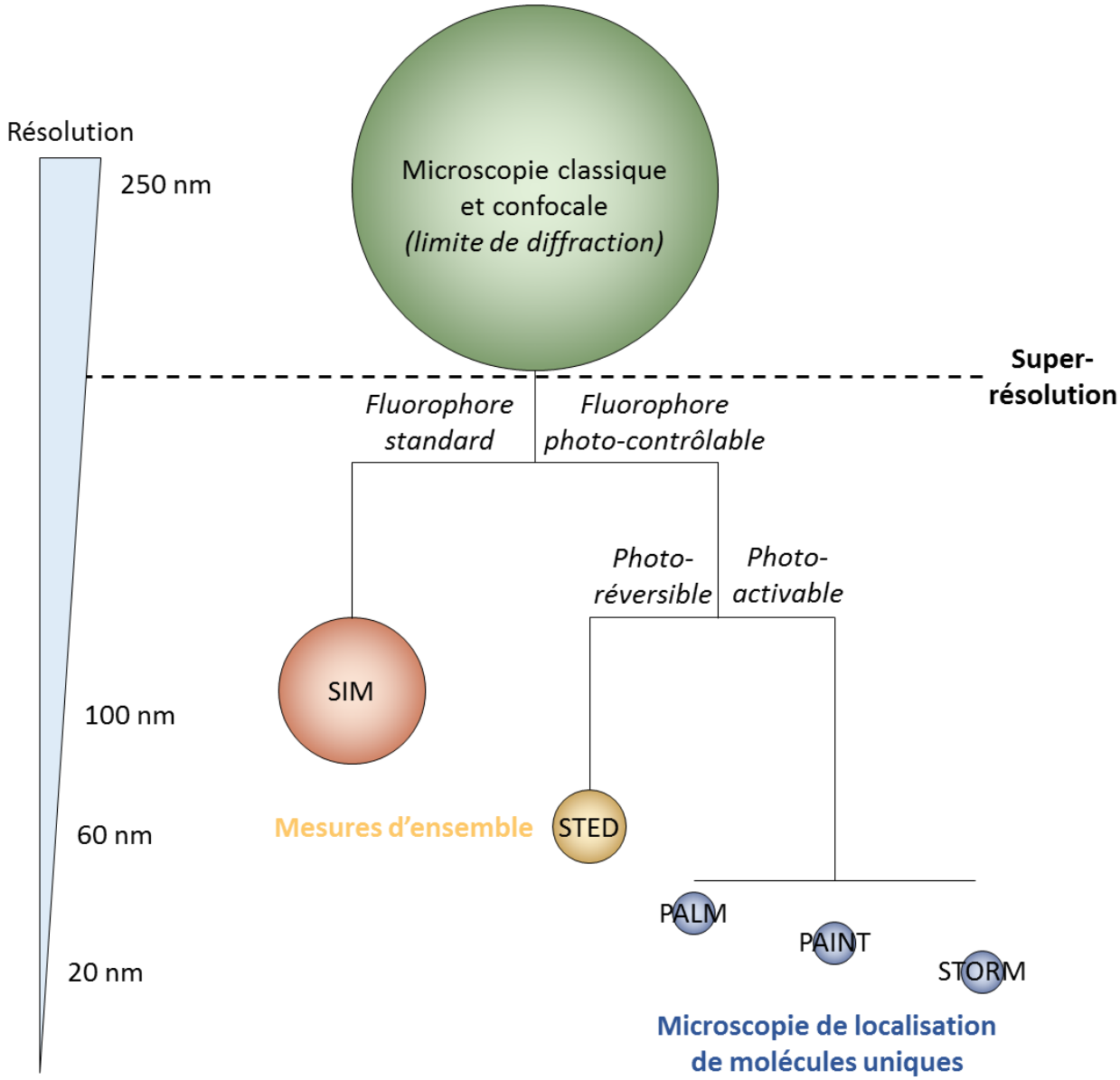


Figure 13. Résolutions optimales obtenues avec les différentes techniques de microscopie de super-résolution. *La microscopie à fluorescence classique est soumise à la loi de diffraction de la lumière, sa résolution est d'environ 250 nm. Les techniques de super-résolution contournent cette barrière de diffraction, telle que la SIM (microscopie à illumination structurée) avec une résolution de 100-120 nm, le STED (déplétion par émission stimulée) avec une résolution de 30-70 nm, et les techniques SMLM (microscopie de localisation de molécules uniques) avec une résolution de 10-50 nm.*

2. uPAINT

a. Principe du uPAINT

Les propriétés dynamiques des récepteurs AMPA ont été obtenues par suivi de particule unique avec la technique du uPAINT (universal-Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography). Son principe est basé sur le PAINT (Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography), consistant à localiser précisément des fluorophores individuels attachés momentanément à la membrane cellulaire, et qui deviennent fluorescents seulement au contact de la couche lipidique (Sharonov and Hochstrasser, 2006). Ce principe de marquage stochastique au cours du temps pendant le processus d'imagerie a fait naître l'idée du uPAINT (Giannone et al., 2010) (**Figure 14**).

Cette technique, développée au sein du laboratoire, consiste à ajouter dans le milieu d'imagerie des ligands fluorescents de la protéine d'intérêt à faible concentration, et à éclairer avec une illumination oblique seulement ceux qui sont fixés à la membrane de la cellule. Les fluorophores utilisés, appartenant à la famille des ATTO, ont l'avantage d'être suffisamment photostables et ont un rendement quantique suffisamment élevé pour permettre son utilisation en molécules uniques avec une précision de localisation d'environ 40-50 nm, et leur petite taille de 1-2 nm permet de suivre les protéines d'intérêt dans de petits espaces tels que les fentes synaptiques. L'échantillon est illuminé par une lumière rasante (oblique) qui permet de diminuer le bruit de fond dû aux fluorophores flottant dans le milieu d'imagerie. Bien qu'une grande quantité de fluorophores flotte dans le milieu d'imagerie, leur coefficient de diffusion (D) d'environ 100 $\mu m^2.s^{-1}$ est largement supérieur à celui des protéines membranaires qui ont un coefficient de diffusion (D) compris entre 0,0001 et 0,1 $\mu m^2.s^{-1}$. Les molécules libres ne sont donc pas détectées en tant que telles mais comme du bruit de par leur vitesse hautement supérieure à notre fréquence d'acquisition (20 ms).

L'utilisation d'un fluorophore photostable tel que l'ATTO647N, couplée au renouvellement constant de ce marquage stochastique de faible densité, permet d'obtenir des centaines de trajectoires d'une durée de quelques secondes en seulement quelques minutes d'enregistrement. Le nombre de trajectoires augmentant en fonction de la durée de l'enregistrement, il est ainsi possible d'étudier la diffusion de protéines endogènes, avec un

rendement statistique important permettant de s'intéresser plus particulièrement à la diffusion synaptique.

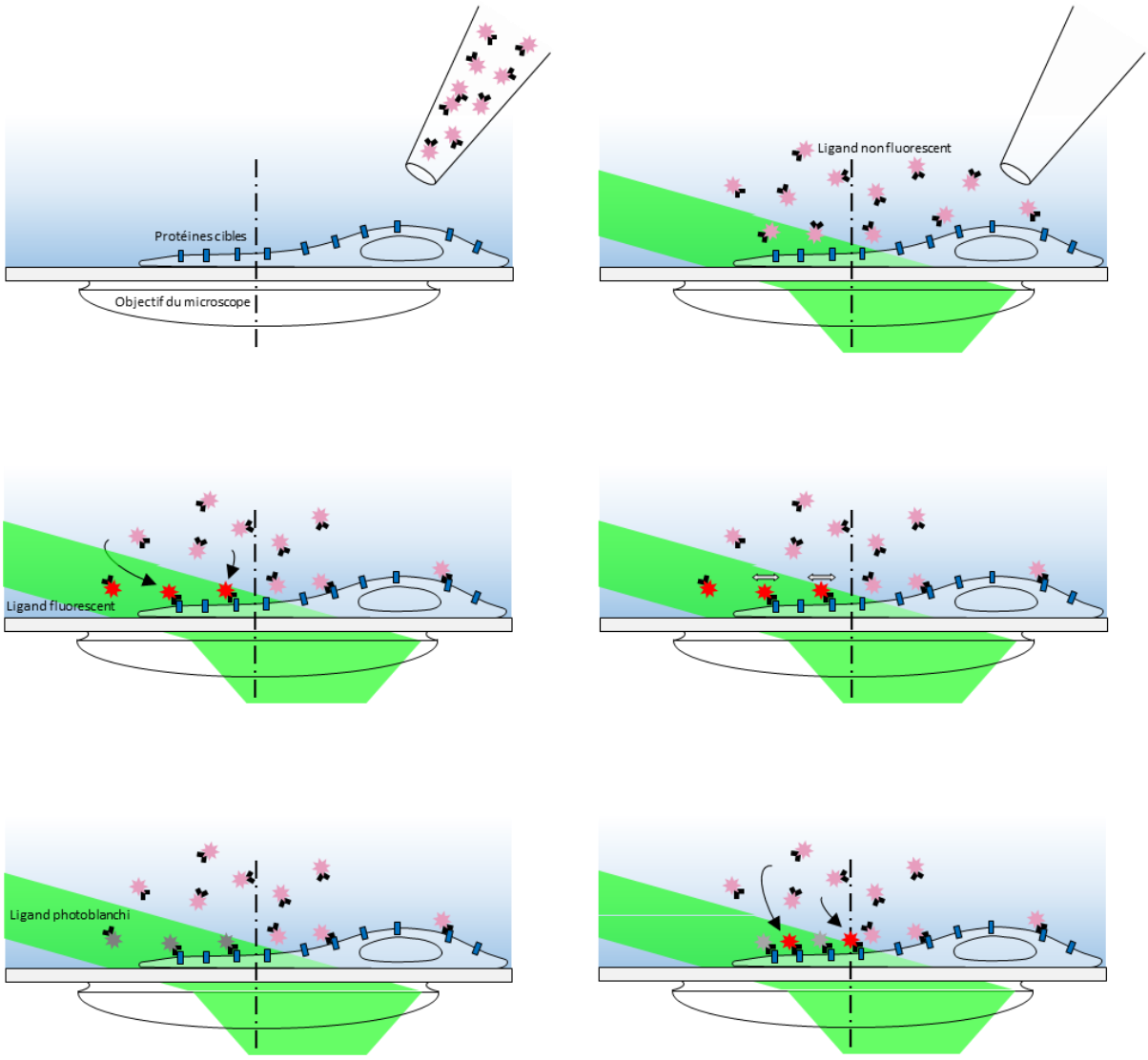


Figure 14. Principe du uPAINT *(schéma adapté de Giannone et al., 2010).*

b. Application du uPAINT

Les expériences de uPAINT sont faites à 37°C dans une chambre ouverte (chambre Ludin, Life Imaging Services, Suisse), remplie avec 600 µL de solution à base d'HEPES nommée Tyrode. Cette solution contient (en mM) : 100 NaCl, 15 D-glucose, 10 HEPES, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$. Son pH est de 7,4 et son osmolarité est ajustée avant chaque expérience avec du NaCl et du D-glucose pour atteindre celle du milieu de culture. La chambre est placée sur un microscope LEICA DMi8 monté sur une table anti-vibrations (TMC, USA) afin de minimiser les drifts, et équipé d'un objectif TIRF Leica HCX PL APO 160x 1,43 NA à immersion (huile), et de lasers aux longueurs d'ondes suivantes : 405 nm, 488 nm, 532 nm, 561 nm, 642 nm (Roper Scientific, Evry, France). Un dispositif TIRF (**T**otal **I**nternal **R**eflection **F**luorescence) (Ilas2, Roper Scientific, Evry, France) est positionné sur le trajet optique pour modifier l'angle d'illumination. Le signal fluorescent est collecté par une caméra EMCCD (Evolve, Roper Scientific, Evry, France). L'acquisition des images et le contrôle du microscope sont gérés par le logiciel Metamorph (Molecular Devices, USA).

Afin de visualiser la structure du neurone, difficile à distinguer en CID, les neurones d'hippocampe dissociés sont transfectés au Calcium Phosphate avec de la GFP soluble. Les expériences ont lieu entre 14 et 16 jours *in vitro*. La première étape consiste à trouver un neurone transfecté, reconnaissable à son signal GFP. Cette protéine fluorescente est utilisée pour visualiser le neurone d'intérêt et les épines dendritiques pour une analyse plus spécifique qui sera décrite plus tard. Après avoir sélectionné le segment dendritique d'intérêt, un anticorps anti-GluA2 (anticorps primaire issu de la souris, fourni par Eric Gouaux, USA) couplé à l'ATTO647N (Atto-Tec, Siegen, Allemagne) est ajouté en faible concentration dans la chambre Ludin pour marquer stochastiquement et de manière éparse les sous-unités GluA2 des récepteurs AMPA endogènes. Une orientation oblique est donnée à l'illumination TIRF afin de détecter le signal des fluorophores ATTO647N seulement à la surface de la cellule, et diminuer le bruit de fond dû aux anticorps couplés à l'ATTO647 bougeant librement dans le milieu d'imagerie. Un laser ayant une longueur d'onde de 647 nm est activé à faible puissance pour éviter le phénomène de phototoxicité tout en permettant une précision de pointé de 50 nm. Une acquisition de 6000 images à une fréquence de 50 Hz est faite à l'aide du logiciel Metamorph. Le traitement des images est effectué à l'aide de PALMTracer, un module de Metamorph mis en place au laboratoire par Jean-Baptiste Sibarita.

3. sptPALM

a. Principe du sptPALM

La technique du PALM (PhotoActivated Localization Microscopy) est basée sur des protéines fluorescentes capables de modifier leurs propriétés optiques quand elles sont exposées à différents types de lumière (photochromisme) (Betzig et al., 2006). Il existe trois types de photochromisme : la photo-activation, la photo-conversion et la photo-commutation.

Le principe de ces trois photochromismes est basé sur le fait que l'illumination par une longueur d'onde fortement énergétique (souvent UV) entraîne une modification structurale du chromophore et donc de ses propriétés d'émission.

Les protéines fluorescentes photo-activables (telle que la PA-GFP) sont capables d'être activées en passant d'un état noir à un état fluorescent. Cette activation dépend de leur probabilité de changer de conformation après une excitation lumineuse. D'autre part, les protéines fluorescentes photo-convertibles (mEOS par exemple) peuvent basculer d'une bande d'émission de fluorescence à une autre, également suite à une illumination UV. Enfin, les protéines fluorescentes photo-commutables (telle que Iris-FP) détectent la présence de lumière ou un changement de son intensité. Elles peuvent alors être commutées entre au moins deux états thermodynamiques stables. Ainsi ces trois types de photochromisme, qui sont des phénomènes stochastiques, offrent la possibilité à ces protéines fluorescentes de modifier leurs propriétés de spectre après une excitation UV et donc d'isoler leur activation pour les extraire du bruit ambiant.

Jusqu'à présent, un des fluorophores les plus utilisés est la protéine fluorescente mEos. Quand elle n'est pas photo-convertie, elle est excitée à une longueur d'onde de 503 nm et émet vers 525 nm. En revanche, en présence d'une illumination UV, une partie de la mEos se brise, modifiant ses propriétés d'émission. La molécule devient alors excitable à 561 nm. Ainsi, dans un contexte de faible niveau de photo-activation ou de photo-conversion, les conditions de suivi de particule unique sont atteintes (**Figure 15**).

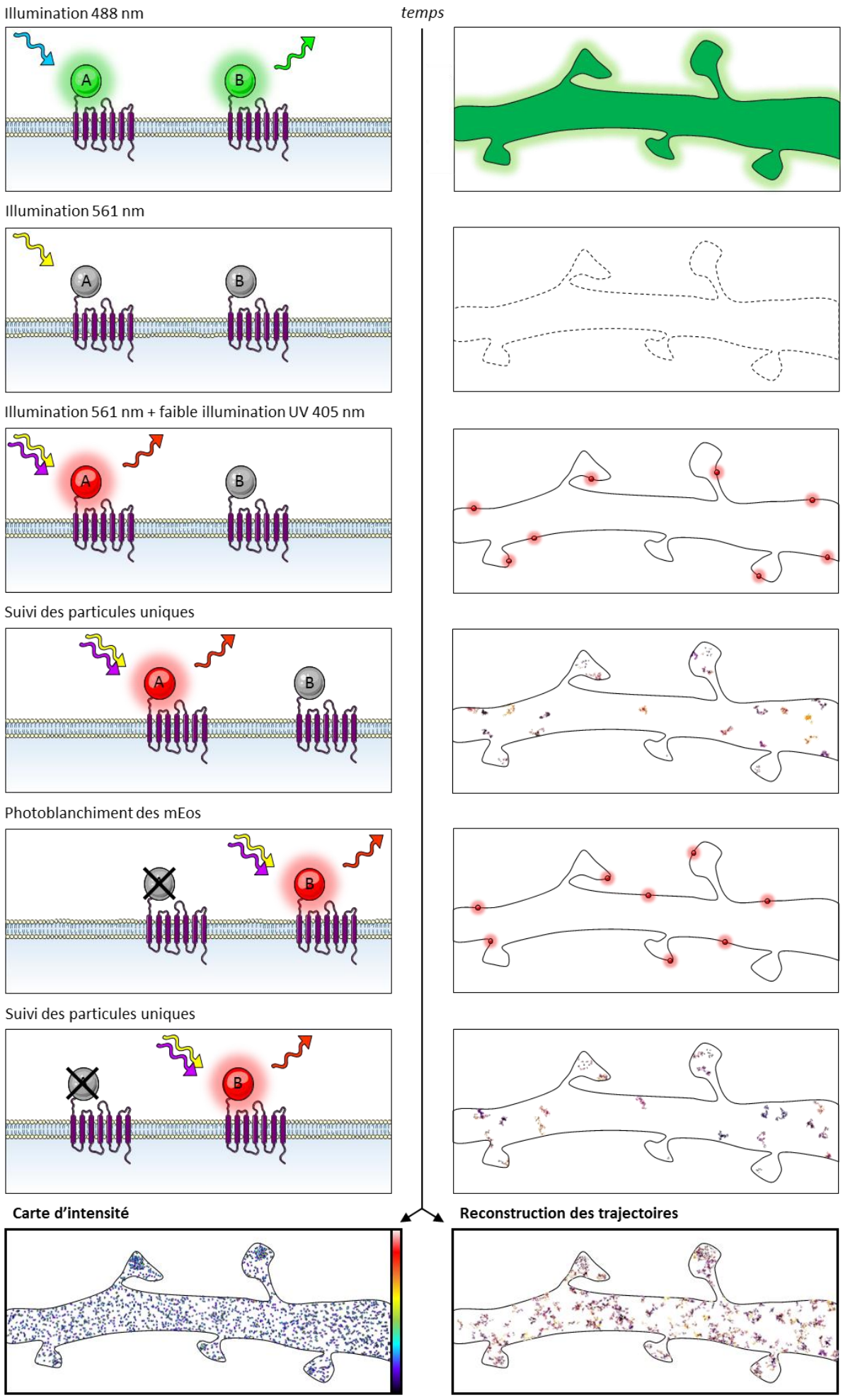


Figure 15. Principe du sptPALM.

Pour appliquer cette technique du PALM, les protéines fluorescentes ont besoin d'être fusionnées génétiquement à la protéine d'intérêt. Cette nécessité de fusion et donc de surexpression de la protéine d'intérêt présente quelques inconvénients : (i) le niveau de surexpression peut modifier l'organisation et la dynamique de la protéine, et (ii) la fonction de la protéine fusionnée au fluorophore peut être affectée. Bien qu'elles soient moins brillantes et photorésistantes que les fluorophores organiques ATTO, les protéines fluorescentes peuvent être utilisées en imagerie en temps réel et en suivi de particule unique (sptPALM) avec une précision de localisation d'environ 60-70 nm. Leurs trajectoires sont cependant plus courtes que celles obtenues en uPAINT avec une durée inférieure à 3 secondes. Elles ont l'avantage de ne pas nécessiter une très haute spécificité et affinité d'un anticorps pour marquer la protéine d'intérêt, ainsi le signal obtenu qui ne dépend pas des propriétés d'interaction entre l'anticorps et sa cible est très spécifique. Enfin, le PALM est la seule méthode pour le suivi de particule unique dans le cas de protéines intracellulaires.

b. Application du sptPALM

Les expériences de sptPALM ont été faites à 37°C dans une chambre ouverte (chambre Ludin, Life Imaging Services, Suisse), remplie avec 1 mL de solution à base d'HEPES nommée Tyrode. Cette solution contient (en mM) : 100 NaCl, 15 D-glucose, 10 HEPES, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$. Son pH est de 7,4 et son osmolarité est ajustée avant chaque expérience avec du NaCl et du D-glucose pour atteindre celle du milieu de culture. La chambre est placée sur un microscope Nikon Ti-Eclipse monté sur une table anti-vibrations (TMC, USA) afin de minimiser les drifts, et équipé d'un objectif TIRF APO 100x 1.49 NA à immersion (huile), et de lasers aux longueurs d'ondes suivantes : 405 nm, 488 nm, 561 nm, 642 nm (Roper Scientific, Evry, France). Un dispositif TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) (Ilas, Roper Scientific, Evry, France) est positionné sur le trajet optique pour modifier l'angle d'illumination. Le signal fluorescent est collecté par une caméra EMCCD (Evolve, Roper Scientific, Evry, France). L'acquisition des images et le contrôle du microscope sont gérés par le logiciel Metamorph (Molecular Devices, USA).

Pour suivre la diffusion des récepteurs mGluR5a, les neurones d'hippocampe dissociés sont transfectés au Calcium Phosphate avec mEos2-mGluR5a à 6-8 jours *in vitro*. Les

expériences ont lieu entre 14 et 16 jours *in vitro*. La première étape consiste à trouver un neurone transfecté, reconnaissable au signal vert de la mEos2 non photo-convertie, avec une excitation à 488 nm. Après avoir sélectionné le segment dendritique d'intérêt, l'expérience de sptPALM consiste à illuminer en plein champ avec le laser 561 nm correspondant à l'excitation de la mEos photo-convertie. A cette longueur d'onde, les mEos non-converties ne sont pas excitées et donc ne photoblanchissent pas. Une sous-population des mEos est ensuite convertie en ajustant l'illumination UV à faible puissance, permettant leur photo-conversion progressive. Une orientation oblique est donnée à l'illumination TIRF afin de détecter le signal des mEos2 seulement à la surface de la cellule. Une acquisition de 6000 images à une fréquence de 50 Hz est faite à l'aide du logiciel Metamorph (Molecular Devices, USA). Le traitement des images est effectué à l'aide de PALMTracer, un module de Metamorph (Molecular Devices, USA) mis en place au laboratoire par Jean-Baptiste Sibarita.

4. dSTORM

a. Principe du dSTORM

L'organisation à l'échelle nanoscopique des récepteurs glutamatergiques a été obtenue avec la technique du dSTORM (direct-Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), permettant de localiser les protéines d'intérêt marquées par immunocytochimie avec des fluorophores capables organiques capables d'atteindre un état électronique triplet T_n (**Figure 16**).

En effet, en utilisant un laser à haute puissance (valeur maximale de 700 mW dans nos conditions expérimentales) et un milieu d'imagerie particulier contenant des thiols, les fluorophores peuvent passer d'un état stable S_0 à un état excité triplet T_n. Grâce à des capteurs d'oxygène, cet état est stabilisé, permettant à un petit nombre de fluorophores de revenir stochastiquement à l'état stable S_0, aboutissant ainsi à une faible proportion de fluorophores émettant de la fluorescence à un moment donné, et limitant le photoblanchiment. Chaque fluorophore a la capacité d'effectuer plusieurs cycles entre un état fluorescent (S_0-S_1-S_0) et un état triplet non-fluorescent (T_n) avant de photoblanchir.

Plusieurs fluorophores peuvent être utilisés pour le dSTORM, cependant le meilleur d'entre eux en termes de résolution est l'Alexa 647. Dans le cas d'expériences de dSTORM multi-couleurs, d'autres fluorophores peuvent être utilisés tels que l'Alexa 561 ou l'Alexa 532, ce dernier étant le plus qualitatif dans nos conditions expérimentales.

Il est cependant important de noter que la technique du dSTORM est incompatible avec des expériences d'imagerie en temps réel à cause de la solution d'imagerie contenant des thiols et des capteurs d'oxygène.

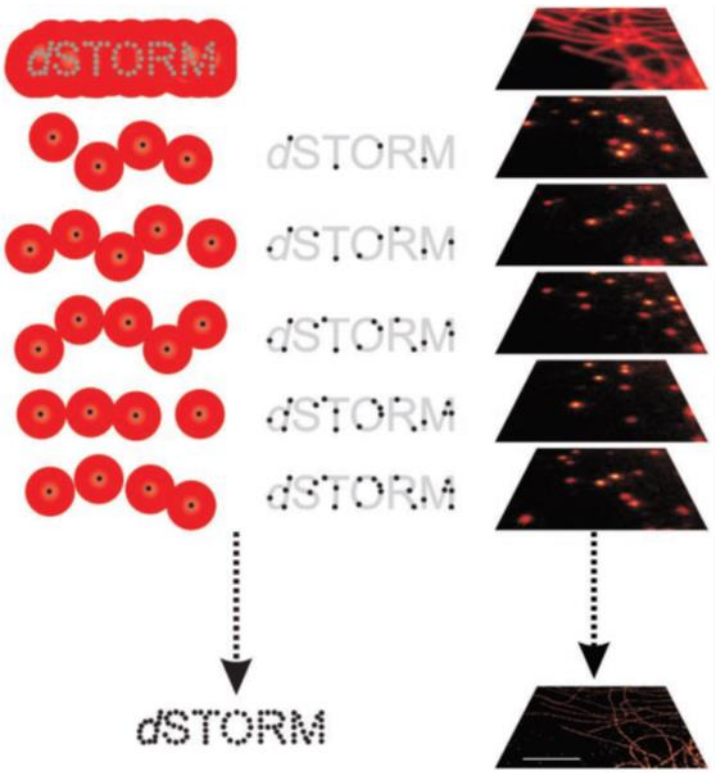


Figure 16. Principe du dSTORM *(d'après Van De Linde et al., 2011).*

b. Application du dSTORM

Les cellules fixées sont observées dans la semaine suivant la réalisation de l'immunocytochimie, comme décrite dans le chapitre IV. Les lamelles de 18 mm de diamètre sont montées dans une chambre (chambre Ludin, Life Imaging Services, Suisse), 600 µL d'une solution d'imagerie sont ajoutés et une lamelle vierge de 18 mm de diamètre est placée à la surface de la solution pour minimiser les échanges d'oxygène durant l'acquisition. La solution

d'imagerie utilisée est celle décrite dans (Van De Linde et al., 2011). Elle est composée de la manière suivante : 1 mL de solution G, 125 µL de solution M et 125 µL de solution E, et le pH est ajusté à 7,8 avec du NaOH.

Ces solutions contiennent :

- Solution G (pour 50 mL) : 45 mL H_2O milliQ, 5 mL glycérine, D-glucose (555 mM)
- Solution M (pour 10 mL – pH ajusté à 8,0 avec du NaOH) : 10 mL H_2O milliQ, MEA-HCl (1 M)
- Solution E (pour 50 mL) : 25 mL glycérine, 22,5 mL H_2O milliQ, KCl (1 M), Tris-HCl (1 M – pH 7,5), 200 µL TCEP, 100 µL catalase, 50 mg glucose oxydase

La chambre est placée sur un microscope LEICA DMi8 monté sur une table anti-vibrations (TMC, USA) afin de minimiser les drifts, et équipé d'un objectif TIRF Leica HCX PL APO 160x 1,43 NA à immersion (huile), et de lasers aux longueurs d'ondes suivantes : 405 nm, 488 nm, 532 nm, 561 nm, 642 nm (Roper Scientific, Evry, France). Un dispositif TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) (Ilas2, Roper Scientific, Evry, France) est positionné sur le trajet optique pour modifier l'angle d'illumination. Le signal fluorescent est collecté par une caméra EMCCD (Evolve, Roper Scientific, Evry, France) (**Figure 17**).

L'acquisition d'images est divisée en deux phases distinctes : (i) une phase de « pompage » et (ii) une phase d' « acquisition ». Dans la phase de « pompage », l'ensemble des molécules Alexa 647 sont placées dans l'état excité triplet T_n à l'aide d'un laser de longueur d'onde 642 nm utilisée à 100% de sa puissance nominale de 700 mW. Lorsque la densité de particules par image est suffisamment faible pour permettre une détection individuelle des particules, cette puissance est abaissée à 70% et l'acquisition débute de manière manuelle (ii). Cette puissance permet de conserver un niveau optimal de molécules activées stochastiquement. L'enregistrement de 40 000 images à une fréquence de 50 Hz est fait à l'aide du logiciel Metamorph (Molecular Devices, USA). Tout au long de l'enregistrement, des billes à fluorescence multisprectrale (Tetraspeck, Invitrogen, USA) fixées à la lamelle et servant de référents fixes permettent de corriger les dérives latérales de la platine. Le traitement des images est effectué à l'aide de PALMTracer, un module de Metamorph (Molecular Devices, USA) mis en place au laboratoire par Jean-Baptiste Sibarita.

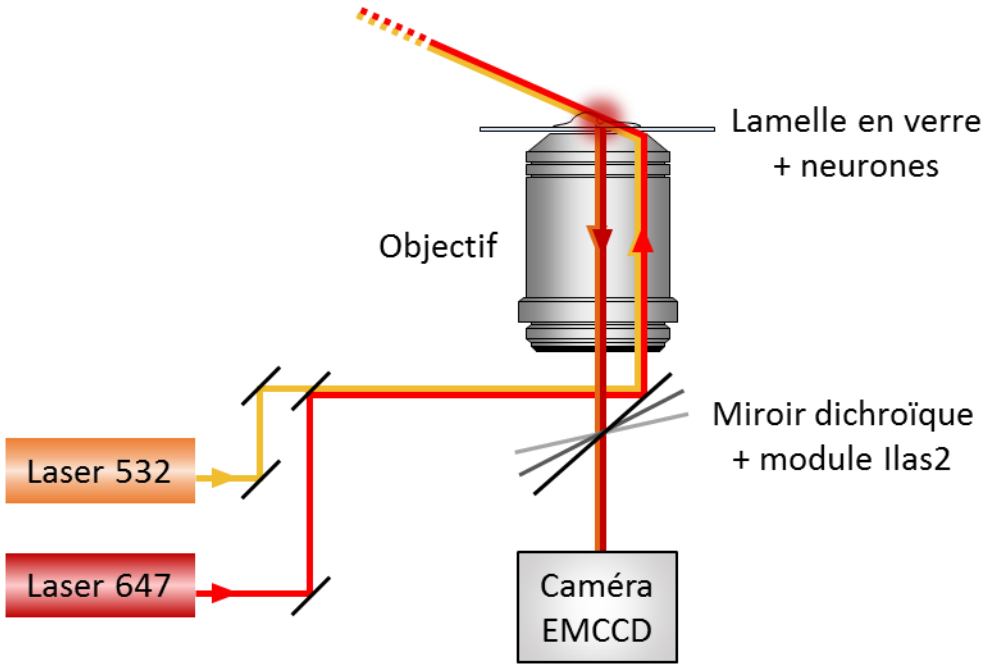


Figure 17. Trajet optique du microscope. *Les lasers 532 nm et 647 nm sont orientés vers l'objectif avec des miroirs. Le module Ilas2 permet de faire varier l'orientation du miroir dichroïque afin que le laser entre dans l'objectif avec un angle permettant une illumination TIRF (microscopie de fluorescence par réflexion totale interne). Les photons émis par les fluorophores excités sont collectés par une caméra EMCCD.*

Le dSTORM a ainsi été extensivement utilisé pour caractériser l'organisation des récepteurs glutamatergiques avec une résolution d'environ 10 nm. Cette résolution a été estimée en déterminant le centroïde des billes à fluorescence multisprectrale, enregistrées avec un ratio signal sur bruit similaire à celui obtenu sur des images de particules uniques.

Les expériences de dSTORM deux-couleurs sont faites sur des neurones marqués et fixés, et sur le même microscope, comme décrit précédemment. Les fluorophores sont imagés séquentiellement : Alexa 647 dans un premier temps puis Alexa 532 dans un second temps. Avant l'acquisition du signal d'Alexa 532, le signal GFP provenant des neurones transfectés est blanchi avec un laser 488 nm, afin de diminuer le bruit de fond observé avec le laser 532 nm. Des billes à fluorescence multisprectrale (Tetraspeck, Invitrogen, USA) fixées à la lamelle et servant de référents fixes permettent de corriger les dérives latérales de la platine.

5. Acquisition et analyse des images de super-résolution

L'enregistrement des détections de molécules uniques est fait avec PALMTracer, un module d'extension du logiciel Metamorph développé par le groupe de Jean-Baptiste Sibarita (Izeddin et al., 2012). Les coordonnées x et y des molécules uniques sont déterminées avec l'analyse par ondelettes et la méthode d'estimation du centroïde. L'analyse par ondelettes consiste à éliminer à la fois le bruit de fond et la fluorescence émise par les corps cellulaires, permettant ainsi d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit pour la fluorescence émise par les fluorophores. Pour la méthode d'estimation du centroïde, dans un premier temps, un seuil d'intensité est choisi pour détecter les signaux de molécules uniques. Lorsque chaque molécule unique est localisée, les coordonnées x et y de leur centroïde sont automatiquement écrites sur un fichier texte. Dans un second temps, en accumulant les dizaines de milliers de points détectés et localisés, une carte d'intensité est créée avec la taille de pixel désirée (25 nm) (**Figure 18**).

Pour analyser les propriétés d'organisation des protéines individuelles mais aussi des clusters de ces protéines, deux méthodes ont été utilisées.

La première approche consiste à détecter les clusters sur l'image de super-résolution avec l'Analyse Morphométrique Intégrée de Metamorph. Après la détection de ces clusters, un ajustement Gaussien est appliqué et l'écart type σ est mesuré, permettant alors de calculer la largeur à mi-hauteur (LMH) du maximum du pic (LMH ≈ 2,355 σ) et de donner la longueur et la largeur des clusters. De plus, l'intensité de ces clusters est mesurée en faisant la somme de l'intensité des pixels qu'ils contiennent. En divisant l'intensité totale des clusters par l'intensité médiane d'une molécule unique, on peut ainsi estimer le nombre de protéines par clusters.

La deuxième méthode nécessite l'utilisation du logiciel SR-Tesseler 2, présenté dans (Levet et al., 2015). Ce logiciel trace des bissectrices entre chaque détection, créant ainsi des polygones (diagrammes de Voronoï) centrés autour des centroïdes des molécules uniques précédemment déterminés avec PALMTracer. Ces polygones sont définis dans un espace Euclidien et fournissent des informations sur la localisation des détections voisines. La densité des détections est mesurée et devient un paramètre utilisé pour identifier des clusters. Ainsi,

après plusieurs étapes de segmentation, ce logiciel permet d'obtenir l'intensité d'émetteurs uniques (qui peuvent être des protéines isolées ou des fluorophores sur la lamelle) mais aussi de quantifier la taille et le contenu des clusters.

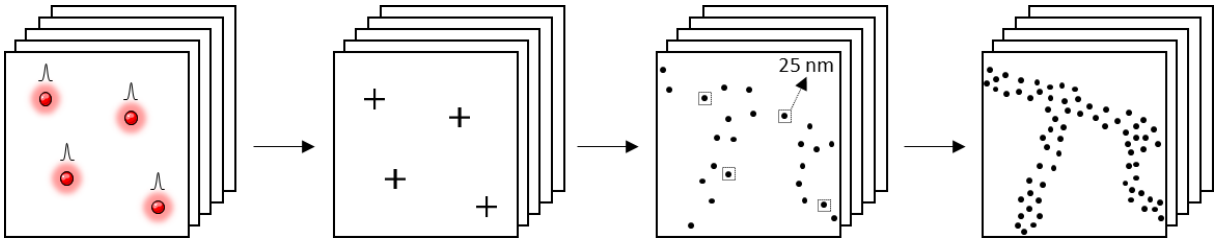


Figure 18. Méthode d'estimation du centroïde d'une molécule unique. *Le signal de fluorescence d'une molécule unique est ajusté par une fonction gaussienne, permettant de déterminer les coordonnées x et y de son centroïde. La carte d'intensité est ensuite construite en accumulant les positions de toutes les molécules uniques détectées lors de l'enregistrement.*

VI. ELECTROPHYSIOLOGIE

Les lamelles sont placées dans une chambre Ludin sur un microscope inversé (Nikon Eclipse Ti). La solution extracellulaire est composée de la manière suivante : NaCl (110 mM), D-glucose (10 mM), HEPES (10 mM), KCl (5,4 mM), $CaCl_2$ (1,8 mM), $MgCl_2$ (800 µM), Picrotoxine (50 µM), Tétrodotoxine (1 µM), le pH est ajusté à 7,4 et l'osmolarité à 245 mOsm/L afin d'être équivalente à l'osmolarité du milieu de culture dans lequel sont cultivés les neurones. Cette solution est équilibrée au minimum 3 heures avant l'expérience dans un incubateur à 36,5°C et 5% de CO_2. Les pipettes de patch sont préparées avec une étireuse horizontale (P-2000, Sutter Instrument) à partir de capillaires de borosilicate (30-0057, Harvard Apparatus) afin d'obtenir une résistance de 4-6 MΩ, et sont remplies d'une solution intracellulaire composée de la manière suivante : K-gluconate (100 mM), HEPES (10 mM), $MgCl_2$ (5 mM), ATP (3 mM), EGTA (1,1 mM), GTP (300 µM), $CaCl_2$ (100 µM), le pH est ajusté à 7,2 et l'osmolarité est ajustée de manière à correspondre à celle de la solution extracellulaire. Tous les produits chimiques proviennent de Sigma-Aldrich, sauf les drogues qui proviennent de Tocris Bioscience.

Les neurones transfectés sont identifiés en épifluorescence grâce à leur signal GFP. Les enregistrements sont faits avec un amplificateur de patch clamp EPC10 fonctionnant avec le logiciel Patchmaster (HEKA Elektronik). Les enregistrements de patch clamp sur cellule entière sont faits à température ambiante et à un potentiel fixe de -70 mV.

L'analyse des miniatures EPSCs est faite avec le logiciel développé par Andrew C. Penn, un script Matlab disponible sur ce lien : http://uk.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/61567-peaker-analysis-toolbox.

RESULTATS

Mon projet de thèse a consisté à étudier la co-organisation des différents récepteurs au glutamate dans des conditions basales et pathologiques. L'idée principale part du rationale où les récepteurs de type AMPA sont alignés avec les sites de libération présynaptiques du glutamate (Tang et al., 2016). La détermination de la localisation des autres récepteurs au glutamate, de type NMDA et mGlu par rapport aux AMPA, permettra à terme, à l'aide de la modélisation et de mesures d'électrophysiologie, de comprendre leur co-activation en regard des sites de libération. Ce paramètre est crucial car les courants NMDA en conditions basales sont difficiles à mesurer dues au blocage par le magnésium à -70 mV. Cela nécessite donc d'enregistrer les courant à +40 mV, ce qui entraine un large bruit issu de l'activité des différents canaux voltage-dépendants rendant difficile l'extraction des propriétés des récepteurs NMDA à la synapse unique (miniatures NMDA). En parallèle, les récepteurs métabotropiques, par définition, ne catalysent pas de courants propres mais activent des voies de transduction pouvant entre autre entrainer l'activation de canaux cibles, cette propriété rend impossible la détermination de l'activité des mGluRs à la synapse unique.

Notre approche expérimentale a donc consisté à déterminer avec la plus grande précision possible la co-organisation moléculaire des trois types de récepteurs post-synaptiques au glutamate, et d'introduire cette organisation dans un modèle synaptique prédictif. Enfin, nous utiliserons ce modèle pour étudier l'effet d'une mutation responsable d'un syndrome autistique chez l'humain afin de comprendre en quoi cette mutation affecte le fonctionnement des récepteurs au glutamate.

Les travaux antérieurs du laboratoire ainsi que de nombreux papiers d'autres laboratoires ont démontré la sensibilité de l'activation des récepteurs à leur localisation précise, c'est-à-dire à la dizaine de nanomètre près, vis-à-vis des sites de libération. L'imagerie classique étant limitée, comme décrit dans l'Introduction et le Matériel et Méthodes, à quelques centaines de nanomètres, mon projet de recherche a nécessité l'affinage des techniques de super-résolution multi-couleurs. Comme vues dans l'Introduction, il existe de nombreuses familles de techniques d'imagerie super-résolutives (particules uniques, STED, SIM). Les techniques de particules uniques, et plus particulièrement le dSTORM, sont celles offrant la meilleure précision de localisation. Je me suis donc, dans un premier temps, penchée sur l'optimisation des techniques de dSTORM deux couleurs. Pour cela, j'ai testé la meilleure

paire de fluorophores, j'ai travaillé à la correction des différentes aberrations chromatiques et drifts pouvant affecter nos précisions de localisation, puis je me suis penchée sur les différentes méthodes d'analyse des images disponibles dans l'institut afin d'en extraire au mieux les résultats souhaités. Ces différentes étapes, m'ayant permis d'améliorer l'utilisation du dSTORM au laboratoire, seront détaillées dans la première partie des résultats. Je décrirai dans une deuxième partie les résultats obtenus concernant cette co-organisation des récepteurs. Enfin, je présenterai dans une troisième partie les résultats obtenus quant à la mise en place du modèle autistique basé sur la variation d'expression de la protéine post-synaptique Shank3 et l'effet de cette mutation sur l'organisation des récepteurs.

I. MISE EN PLACE ET AMELIORATION DU DSTORM 2-COULEURS

Le but initial de ma thèse a consisté à déterminer à l'échelle nanoscopique la co-organisation des récepteurs AMPA, responsables de la réponse synaptique rapide, des récepteurs NMDA, impliqués dans la réponse calcique, et des récepteurs métabotropiques mGluR responsables de l'activation de différentes voies de transduction via l'activation des protéines G. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de dSTORM deux couleurs. Les principes du dSTORM ont été préalablement décrits dans le Matériels et Méthodes, je détaillerai ici les améliorations techniques mises en place au cours de ma thèse en collaboration avec l'équipe de Jean-Baptiste Sibarita. Les trois paramètres sur lesquels j'ai travaillé afin d'optimiser mes expériences de dSTORM deux couleurs sont le choix du deuxième fluorophore à utiliser en parallèle de l'Alexa 647, les anticorps primaires pour marquer spécifiquement les protéines d'intérêt et la solution d'imagerie afin d'avoir un signal de molécule unique hautement qualitatif pour les deux fluorophores. Une fois que les meilleures conditions ont été atteintes pour l'acquisition en elle-même, plusieurs types de correction d'images post-traitement ont été testés afin de compenser les différents types d'aberrations liés à la technique du dSTORM. C'est seulement à la suite de ces différentes corrections que l'analyse de la co-organisation nanoscopique des récepteurs au glutamate à la post-synapse a été réalisée.

1. dSTORM 2-couleurs

a. Tests des fluorophores Alexa 488, Alexa 532 et Alexa 561

Comme expliqué dans le Matériels et Méthodes, le principe du dSTORM consiste à éteindre la totalité de la fluorescence en plaçant les fluorophores dans un état noir (ou excité triplet T_n). Cette étape appelée phase de pompage est un facteur essentiel à la qualité de l'expérience et nécessite une illumination de forte intensité dans un milieu spécifique pour chaque fluorophore (contenant des concentrations variables de β-mercapto-éthanol, d'enzyme antioxydante, à un pH particulier). Théoriquement, même si la vaste majorité des fluorophores organiques a la capacité de passer dans un état triplet, il peut être expérimentalement difficile d'obtenir les conditions idoines pour y arriver. Si les conditions ne

sont pas optimales, la phase de pompage ne permettra pas une extinction complète de la fluorescence, entrainant à la fois un bruit lumineux parasite gênant la détection des molécules uniques, et le photoblanchiment des fluorophores, limitant donc le nombre de molécules émettrices.

La littérature ainsi que notre expérience au laboratoire place l'Alexa 647 comme le fluorophore de référence pour les expériences de dSTORM. Il allie une facilité de pompage (même en absence d'enzyme antioxydante) avec une émission intense en mode molécule unique. De plus, ses spectres d'absorption et d'émission se trouvent dans le rouge lointain étant la gamme du spectre la moins polluée par l'autofluorescence cellulaire. Mon objectif était donc de déterminer le deuxième fluorophore offrant des propriétés photophysiques proches de l'Alexa 647. J'ai testé pour cela 3 autres formes d'Alexa, la 488, la 532 ainsi que la 561.

Dans nos conditions expérimentales, l'Alexa 488 présente une phase de pompage peu efficace, laissant une forte proportion des fluorophores dans un état émetteur et non dans un état noir, ne permettant pas d'obtenir un ratio signal/bruit satisfaisant pour l'imagerie en dSTORM.

L'Alexa 561 a une longueur d'onde d'excitation de 578 nm et une longueur d'onde d'émission de 603 nm, lors de la phase de pompage son passage dans un état triplet est difficile et prend plus de temps que l'Alexa 647 (environ 1 minute), de plus, le nombre de cycles de fluorescence avant son photoblanchiment est relativement faible (ordre de la dizaine, comparé à la centaine de l'Alexa 647). Même si ce fluorophore peut être utilisé en dSTORM, il ne semble pas idéal pour nos expériences.

Enfin, l'Alexa 532 a une longueur d'onde d'excitation de 532 nm et une longueur d'onde d'émission de 554 nm. Lors de la phase de « pompage », il est envoyé dans un état excité triplet T_n en moins d'une minute et passe de l'état stable à triplet une cinquantaine de fois avant le photoblanchiment. En termes de photophysique, ce fluorophore est donc le meilleur candidat pour être utilisé comme deuxième fluorophore en parallèle de l'Alexa 647. Cependant il présente deux défauts, (i) ses propriétés d'excitation proches de celles de la GFP nécessitent de travailler soit sur des cellules non transfectées soit de photoblanchir toute la GFP avant le début des enregistrements en dSTORM. (ii) L'Alexa 532 est faiblement excité à

405 nm limitant l'utilisation des UV pour la déstabilisation de l'Alexa 647 en état triplet (voir Matériels et Méthodes).

L'Alexa 532 ayant un spectre d'émission superposé avec le spectre d'excitation de l'Alexa 647, l'émission de l'Alexa 532 entraine l'excitation de l'Alexa 647 (**Figure 19**). Afin d'éviter le risque d'imager les deux fluorophores en même temps ou de photoblanchir l'Alexa 647 pendant l'acquisition de l'Alexa 635, l'Alexa 647 est imagé en premier.

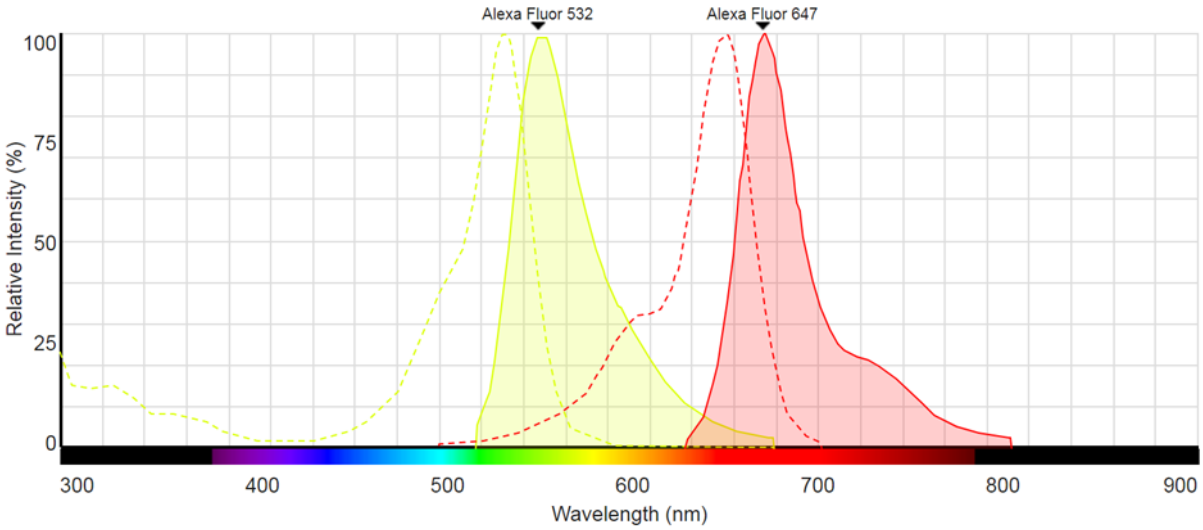


Figure 19. Spectres d'absorption et d'émission de l'Alexa 532 et l'Alexa 647.

Toutes les expériences de dSTORM deux couleurs ont été faites selon le même procédé : une acquisition de 40 000 images, à une fréquence d'acquisition de 33 Hz, de la première protéine marquée avec l'Alexa 647 pendant 20 minutes, une phase de « pré-blanchiment » de 2 minutes pour réduire le bruit de fond et le signal GFP avec un laser à 488 nm, puis une acquisition de 40 000 images de la deuxième protéine marquée avec l'Alexa 532 pendant 20 minutes.

b. Caractérisation des anticorps

La technique du dSTORM nécessite de marquer les protéines d'intérêt avec un anticorps primaire et un anticorps secondaire couplé à un fluorophore. Pour caractériser la nano-organisation individuelle des récepteurs glutamatergiques, il a donc été nécessaire de s'assurer que les anticorps utilisés étaient spécifiques de leur protéine cible.

Les anticorps anti-AMPA et anti-NMDA nous ont été fournis par Eric Gouaux (Portland, USA) et leur spécificité a été testée antérieurement au laboratoire. Les résultats ont montré une très haute affinité de ces anticorps primaires pour la sous-unité GluA2 des récepteurs AMPA et la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA.

L'anticorps anti-mGluR5, n'ayant jamais été utilisé au sein du laboratoire, a été testé sur des cellules COS. Ces cellules ont été transfectées avec le récepteur mGluR5 fusionné à la GFP, puis marquées avec l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 647. La spécificité du marquage a été vérifiée par microscopie à épifluorescence, confirmant que (i) les cellules COS ayant été transfectées avec le récepteur mGluR5 ont été marquées avec l'anticorps primaire, (ii) les cellules non transfectées ne présentent pas de fluorescence supérieure à l'autofluorescence classique dans cette longueur d'onde (**Figure 20**).

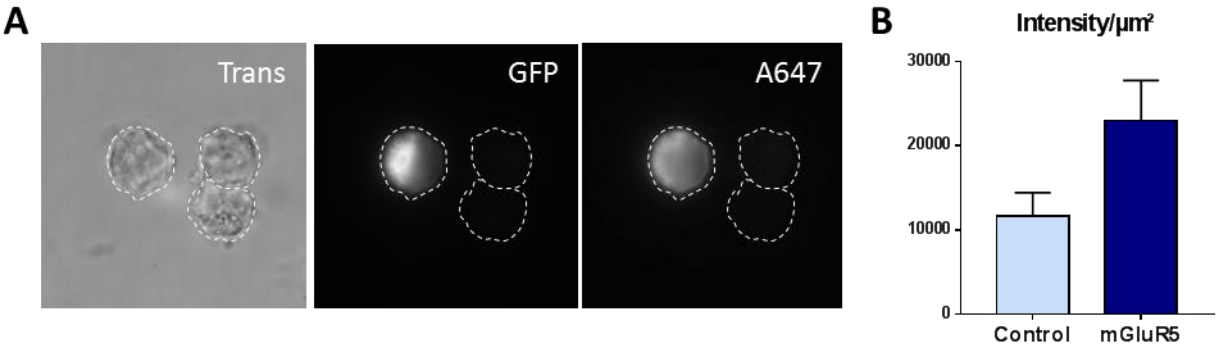


Figure 20. Test de spécificité de l'anticorps primaire anti-mGluR5 sur cellules COS. (A) *Les cellules transfectées avec la construction GFP::mGluR5a sont marquées par l'anticorps primaire anti-mGluR5 et l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 647, et sont visibles avec un laser 647 nm, contrairement aux cellules non-transfectées qui ne sont pas marquées.* ***(B)*** *Les cellules non transfectées ne présentent pas de fluorescence supérieure à l'autofluorescence classique.*

Pour les marquages double couleurs, un choix stratégique a dû être fait afin de déterminer quel fluorophore utiliser pour révéler une protéine ou une autre. Grâce aux travaux précédents de l'équipe au laboratoire, nous connaissons déjà très bien la nano-organisation individuelle des récepteurs AMPA, nous avons désormais seulement besoin de les situer dans la post-synapse afin de décrire leur co-organisation avec un deuxième récepteur. Il est donc plus intéressant, si cela est possible, de marquer les récepteurs AMPA avec l'Alexa 532, et utiliser l'Alexa 647, le meilleur fluorophore, pour marquer les protéines dont on ne connait pas encore la nano-organisation.

Cette stratégie a été appliquée pour le double marquage AMPA-mGluR5. En effet, l'anticorps primaire anti-AMPA provient de la souris, et l'anticorps primaire anti-mGluR5 provient du lapin. Des anticorps secondaires anti-souris couplés à l'Alexa 532 et anti-lapin couplés à l'Alexa 647 ont donc été utilisés afin d'avoir le couple AMPA Alexa 532 – mGluR5 Alexa 647.

Cependant, cette méthode n'a pas pu être appliquée pour le double marquage AMPA-NMDA. En effet, les deux anticorps primaires anti-AMPA et anti-NMDA proviennent de la souris, mais avec une spécificité d'IgG différente. L'anticorps primaire anti-AMPA est spécifique de l'IgG2b, et l'anticorps primaire anti-NMDA est spécifique de l'IgG1. Après avoir étudié les anticorps secondaires anti-souris présentant des spécificités d'IgG différentes disponibles au laboratoire ou dans le commerce, l'unique solution a été d'utiliser un anticorps secondaire anti-souris spécifique de l'IgG2b couplé à l'Alexa 647, et de coupler nous-même au laboratoire un anticorps secondaire anti-souris spécifique de l'IgG1 au fluorophore Alexa 532. Ces associations d'anticorps primaires et secondaires aboutissent ainsi à un co-marquage NMDA Alexa 532 – AMPA Alexa 647. Un marquage immunocytochimique a été réalisé sans anticorps primaire et avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 532, confirmant la spécificité de ce dernier pour l'anticorps primaire anti-NMDA (**Figure 21**). Afin de caractériser l'organisation des NMDA avec la meilleure précision possible, des expériences simple couleur où les récepteurs NMDA sont marqués avec l'Alexa 647 ont préalablement été réalisées.

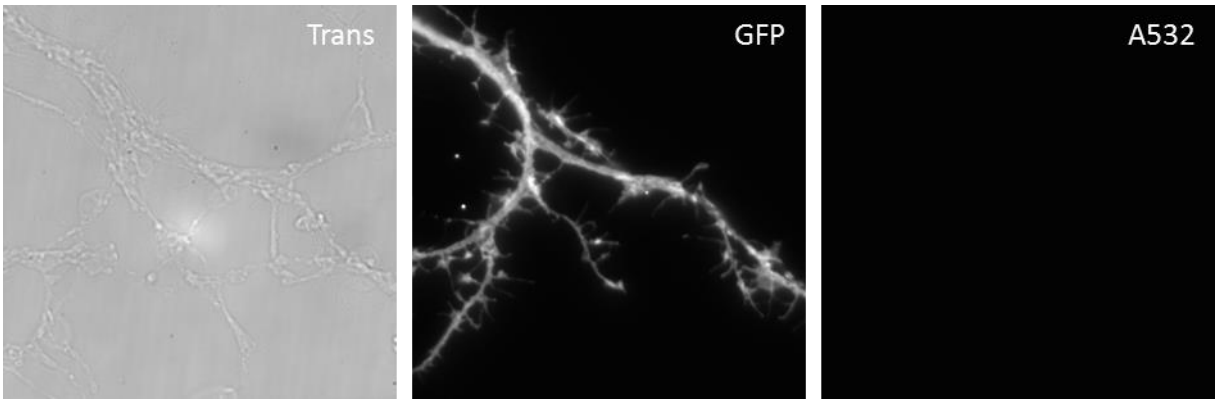


Figure 21. Test de spécificité de l'anticorps secondaire anti-souris spécifique de l'IgG1 et couplé à l'Alexa 532. *Les cellules incubées seulement dans l'anticorps secondaire anti-souris spécifique de l'IgG1 et couplé à l'Alexa 532, sans être marquées par l'anticorps primaire de souris anti-NMDA, ne sont pas visibles avec un laser 532 nm.*

2. Quantification des images de super-résolution

a. Correction des aberrations chromatiques

L'imagerie multi-couleurs induit des aberrations optiques appelées aberrations chromatiques, qui peuvent être longitudinales et latérales.

Les aberrations chromatiques longitudinales sont dues à l'indice de réfraction du matériau composant les lentilles qui varie en fonction de la longueur d'onde de la lumière qui les traverse. C'est ce qu'on appelle la dispersion du verre. La mise au point ne peut pas être effectuée simultanément pour toutes les couleurs du spectre, nous n'observons donc pas une seule distance focale mais une distance focale différente pour chaque longueur d'onde du système optique. Les longueurs d'onde courtes sont ainsi focalisées plus près sur l'axe optique que les grandes longueurs d'onde.

Les aberrations chromatiques latérales sont issues des caractéristiques physiques des objectifs du système optique. Bien que ce soit des objectifs apochromatiques, performants pour corriger les aberrations chromatiques, leur correction n'est pas parfaite, entrainant un décalage en x et en y entre deux longueurs d'onde différentes. De plus, ce décalage latéral n'est pas homogène en fonction de la position dans le champ de vue.

Dans le contexte de la microscopie de super-résolution multi-couleurs, ces anomalies de quelques dizaines de nanomètres doivent impérativement être corrigées avant toute manipulation et interprétation de l'image super-résolue. Pour cela, une image d'une lamelle en verre incubée dans une solution concentrée de billes multispectrales doit être prise dans les deux longueurs d'ondes utilisées pour les expériences de dSTORM double-couleurs. Ces deux images de référence doivent contenir une cinquantaine de billes réparties de manière la plus homogène possible sur le champ d'imagerie. Un programme développé sous Metamorph par Corey Butler dans l'équipe de Jean-Baptiste Sibarita permet un appariement entre les signaux de chaque bille, chacune considérée comme un point de contrôle, et créé une matrice de correction non linéaire. Cette transformation de champ est un polynôme de degré 3 bidimensionnel (en x et en y), s'exprimant de la manière suivante :

$$x' = a_{x,1}x^3 + a_{x,2}y^3 + a_{x,3}x^2y + a_{x,4}xy^2 + a_{x,5}x^2 + a_{x,5}y^2 + a_{x,6}xy + a_{x,7}x + a_{x,8}y + a_{x,9}$$

$$y' = a_{y,1}x^3 + a_{y,2}y^3 + a_{y,3}x^2y + a_{y,4}xy^2 + a_{y,5}x^2 + a_{y,5}y^2 + a_{y,6}xy + a_{y,7}x + a_{y,8}y + a_{y,9}$$

où x' et y' sont les coordonnées x et y transformées, respectivement avec les coefficients $a_{x,n}$ et $a_{y,n}$. Ce polynôme, qui contient dix coefficients différents par dimension, induit une transformation de champ non-linéaire, aboutissant ainsi à des « déformations » inhomogènes de l'image. Le fichier texte ainsi créé est ensuite lu par le logiciel d'analyse des clusters (Tesseler) afin de corriger automatiquement les aberrations d'une couleur par rapport à la deuxième (**Figure 22.A**).

Ces aberrations chromatiques variant au cours du temps, il est essentiel d'imager les billes avant chaque expérience de dSTORM, afin d'obtenir une transformation de champ la plus précise possible. En effet, il a été mesuré qu'avant toute correction de ces aberrations chromatiques, une distance d'environ 130 nm sépare les signaux d'une même bille imagée avec un laser 532 nm et un laser 647 nm (**Figure 22.B**). Si une image de billes a été faite le même jour que l'expérience de dSTORM, la correction des aberrations chromatiques permet de réduire cette distance à une moyenne de 12 nm. Cette valeur est pour le moment incompressible car elle dépend de l'imprécision de la matrice de correction issue du nombre limité de points pour l'ajuster, mais aussi de la précision de pointée pour chacune des couleurs de la bille, de l'inhomogénéité du champ d'illumination, etc. La précision de pointée des molécules individuelles dans nos conditions est de 10 nm pour l'Alexa 647 nm et 15 nm pour

l'Alexa 532 nm. Donc l'aberration chromatique résiduelle après correction est du même ordre de grandeur que notre précision de pointée.

Les aberrations chromatiques étant multifactorielles et non linéaires dans le temps, il est nécessaire d'obtenir quotidiennement une matrice de correction. Dans le cas où l'image de billes a été enregistrée un autre jour, la correction ne permet d'obtenir une distance moyenne entre les deux couleurs que d'environ 50 à 40 nm ce qui est insuffisant dans le cadre de nos travaux.

b. Correction du drift au cours du temps

La technique du dSTORM nécessite d'enregistrer de nombreux signaux de molécules uniques, afin d'atteindre une densité de signal suffisamment importante pour reconstruire une carte d'intensité permettant de quantifier les propriétés d'organisation des protéines d'intérêt. Dans nos conditions expérimentales, le temps d'exposition est de 30 ms et nous enregistrons 40000 images dans chaque longueur d'onde pour chaque cellule. Une expérience de dSTORM dure donc 20 minutes pour imager une cellule dans une longueur d'onde, et 40 minutes pour du dSTORM double-couleurs. Au cours de ce temps, il y a un déplacement directionnel de l'échantillon (appelé drift) dû aux variations de température des composants du microscope ou à des vibrations autour du système d'imagerie. Afin de corriger ce drift, nous incubons chaque lamelle en verre avant l'expérience de dSTORM dans une solution de marqueurs fiduciaux contenant des microsphères et/ou des nanodiamants (**Figures 22.C et 22.D**).

Les microsphères, sont colorées avec quatre colorants fluorescents différents. Ces billes multispectrales affichent quatre pics d'excitation/émission séparés : 360/430 nm (bleu), 505/515 nm (vert), 560/580 nm (orange) et 660/680 nm (rouge lointain).

Les nanodiamants possèdent un centre azote-lacune (NV pour nitrogen-vacancy en anglais), où l'azote est une impureté en substitution du carbone venant se combiner à une lacune (V) sur un site adjacent du cristal. Ce centre azote-lacune produit de la fluorescence, sans jamais clignoter ou photoblanchir, assurant donc un signal intense et durable dans le temps. Chacun de ces deux marqueurs présente des inconvénients, les microsphères tendent à photoblanchir au fur et à mesure de l'enregistrement, entrainant dans certains cas

l'incapacité de détecter la bille pour les dernières séries d'images. Les nanodiamants quant à eux n'émettent que faiblement à 647 nm qui est notre longueur d'onde de prédilection.

Pour conclure, il est donc possible de mesurer le drift au cours du temps en suivant la position x et y de ces deux types de marqueurs fiduciaux. Ce déplacement bidirectionnel étant le même sur tout le champ d'imagerie, il nous est ensuite possible d'appliquer la même correction sur toutes les molécules uniques enregistrées dans chaque longueur d'onde.

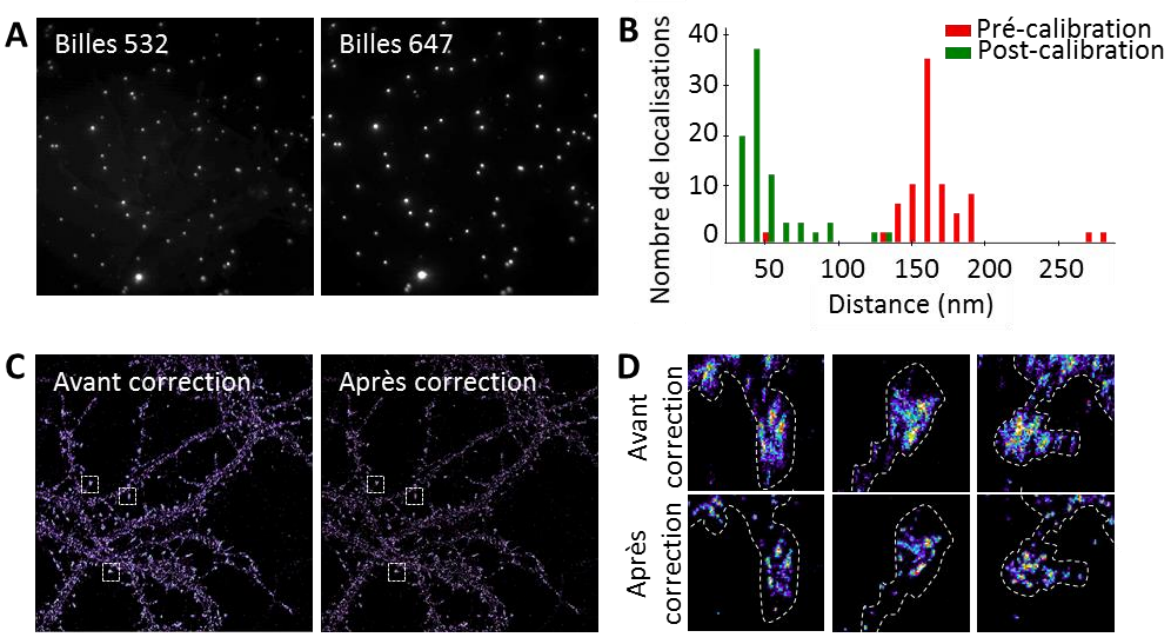


Figure 22. Correction des images super-résolues. (A) *Exemple d'une image de microsphères et nanodiamants prise avec un laser 532 nm et un laser 647 nm.* ***(B)*** *Lorsqu'une microsphère est imagée dans les deux longueurs d'onde, les deux détections sont séparées d'environ 130 nm avant la correction des aberrations chromatiques, et est réduite à environ 10 nm après la correction.* ***(C)*** *Exemple d'une image de dSTORM où les récepteurs AMPA sont marqués avec l'Alexa 647, avant et après la correction du drift au cours du temps.* ***(D)*** *Exemple d'épines dendritiques issues des images de dSTORM avant et après la correction du drift au cours du temps.*

c. Quantification des propriétés des molécules uniques et des clusters de récepteurs

Après avoir corrigé les aberrations chromatiques et les déplacements bidirectionnels au cours du temps, les images de super-résolution peuvent être exploitées pour extraire les propriétés d'organisation des protéines d'intérêt à l'échelle nanométrique. Cette quantification est réalisée en deux temps. La première étape consiste à déterminer les propriétés de blink des molécules individuelles (anticorps ou récepteurs individuel). La seconde étape permet d'extraire une estimation du nombre de récepteurs par clusters et de déterminer les propriétés physiques des clusters.

La première phase de quantification est réalisée grâce au logiciel MetaMorph. Elle consiste à extraire de l'image super-résolue une estimation des propriétés de chaque type de fluorophore (Alexa 532 et Alexa 647). En effet chaque fluorophore présente des propriétés uniques de blink dépendant de la composition du milieu d'enregistrement et de l'intensité de lumière d'excitation.

Afin de déterminer les propriétés moyennes d'émission des anticorps secondaires, qui peuvent être poly-marqués, nous isolons l'ensemble des molécules présentes sur la lamelle de verre. Cela nous permet de déterminer la moyenne du nombre de détections par molécule (**Figures 23.A** et **23.B**). Puis nous isolons les propriétés d'émission des molécules individuelles sur le neurone.

Or nous savons que les récepteurs AMPA sont des tétramères comportant généralement deux sous-unités GluA2, de plus il peut y avoir plus d'un anticorps secondaire qui se fixe sur l'anticorps primaire. Afin d'estimer ce biais, et d'éviter par contre de sélectionner des clusters de récepteurs, nous sélectionnons l'ensemble des molécules présentant une rotondité supérieure à 0,9 et dont le nombre de détections est inférieur à 2 fois la moyenne des anticorps sur le verre additionné de deux fois leur LMH. La médiane des intensités obtenues est alors considérée comme une estimation du nombre de coups émis par un récepteur unique. Il a ainsi été montré que le marquage du récepteur AMPA par le fluorophore Alexa 532 a une médiane de 50 coups et le marquage du récepteur NMDA avec fluorophore Alexa 647 une médiane de 56 coups. Cette valeur est calculée pour chaque image

afin de tenir compte des variations expérimentales journalières (position de la lamelle, localisation du champ d'observation, fluctuation de l'intensité de l'illumination, etc.).

Il est ensuite possible, en utilisant le même seuil de détection, d'estimer le nombre et la densité de protéines individuelles dans le neurone entier, ou seulement dans les épines dendritiques. Pour cela, des régions d'intérêt sont dessinées autour de segments ou d'épines dendritiques, puis l'intensité totale et l'aire de ces régions sont mesurées et divisées par la médiane de l'intensité d'une molécule unique. Nous obtenons ainsi une estimation du nombre et de la densité par μm^2 des protéines individuelles dans chaque région d'intérêt.

L'extraction des propriétés des clusters protéiques est basée sur une première étape de sélection des clusters. Après un seuillage, nous conservons uniquement les clusters présentant une intensité 5 fois supérieure à l'intensité médiane d'un récepteur unique, et une rotondité supérieure à 0,2 (**Figures 23.C à 23.H**). Nous pouvons ainsi mesurer la surface de chaque cluster de protéines, et calculer le nombre de récepteurs par clusters en divisant l'intensité des clusters par la médiane de l'intensité d'une molécule unique.

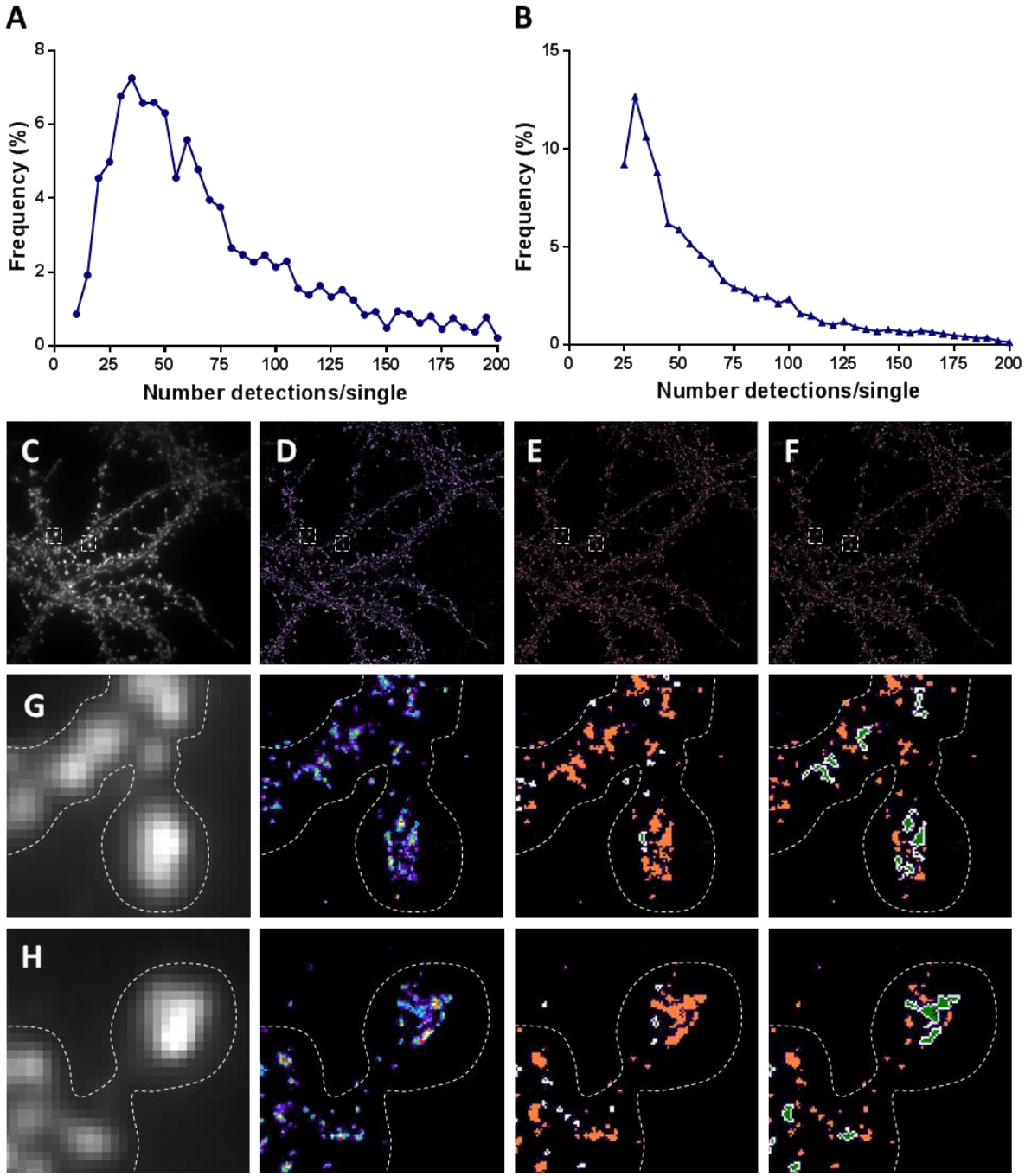


Figure 23. Détection et quantification des propriétés des molécules uniques et des clusters. ***(A)*** *Nombre de détections par molécule individuelles marquées avec l'Alexa 647.* ***(B)*** *Nombre de détections par molécule individuelles marquées avec l'Alexa 532.* ***(C)*** *Image du neurone en épifluorescence où les récepteurs AMPA sont marqués avec le fluorophore Alexa 647.* ***(D)*** *Image de super-résolution obtenue en dSTORM.* ***(E)*** *Image de super-résolution où les récepteurs AMPA individuels sont sélectionnés selon un seuil de détection défini sur MetaMorph.* ***(F)*** *Image de super-résolution où les nanodomaines des récepteurs AMPA sont sélectionnés selon un seuil de détection défini sur MetaMorph.* ***(G)(H)*** *Exemples d'épines dendritiques en épifluorescence, et à partir de l'image super-résolue, différents seuil de détections permettent de sélectionner des récepteurs AMPA individuels ou des nanodomaines (aires vertes entourées de blanc).*

II. CO-ORGANISATION DES RECEPTEURS AU GLUTAMATE A L'ETAT BASAL ET ROLE PHYSIOLOGIQUE

1. Nano-organisation et dynamique des récepteurs AMPA

La nano-organisation et la dynamique des récepteurs AMPA sont extensivement étudiées dans notre équipe depuis de nombreuses années. Leur caractérisation a été possible grâce à différentes techniques de microscopie de super-résolution telles que le dSTORM, le STED, le sptPALM et le uPAINT.

Nair et al., 2013, ont ainsi montré que dans des neurones d'hippocampes vivants et fixés, les récepteurs AMPA sont organisés dans la plupart des synapses sous formes de clusters de 80 nm de diamètre, et non pas de manière homogène. Dans ces nanodomaines, les récepteurs sont immobiles et peuvent y entrer et en sortir par diffusion latérale. Au sein des synapses, ces nanodomaines sont majoritairement stables pendant plusieurs dizaines de minutes.

Dans un premier temps, je me suis intéressée à re-caractériser, avec nos nouveaux outils d'analyse, l'organisation des récepteurs à la synapse. Pour cela, près de 500 synapses ont été imagées en dSTORM, et la distribution des contenus synaptiques a été analysée. Concernant le nombre de récepteurs total par synapse, il apparait que la distribution n'est pas normale mais présente plusieurs maximaux à 60, 120 et 170. Il est intéressant de noter que ce sont des multiples de 60. En regardant plus en détail, les synapses comportant un nombre total de récepteurs supérieur à 100 présentent majoritairement plusieurs nanodomaines. Une des hypothèses est qu'en moyenne, une sous-unité de transmission synaptique (une PSD et quelques récepteurs mobiles) comporte environ 60 récepteurs. Les synapses présentant des multiples de ce nombre doivent comporter 2 (pour 120 récepteurs) et 3 (pour 170 récepteurs) sous-unités de transmission. Cette hypothèse est renforcée par les récents travaux de Matthew B. Dalva démontrant que les grosses synapses peuvent posséder plusieurs PSD faisant face à de multiples sites de libération (Hruska et al., 2018).

Je me suis ensuite concentrée sur les synapses présentant une seule sous-unité de transmission, correspondant à un maximum de 80 récepteurs afin d'étudier la proportion de

récepteurs clustérisés ou isolés. La **Figure 24** représente ces résultats où l'on voit que ces synapses présentent en majorité un domaine principal comportant environ 25 à 30 récepteurs, puis nous retrouvons souvent un deuxième pseudo-domaine d'environ 9 récepteurs, enfin il y a encore une forme de cluster d'environ 5 récepteurs puis entre 10 et 15 récepteurs isolés.

Nous avons aussi déterminé la taille et le contenu des nanodomaines à l'aide du logiciel MetaMorph. A partir des images super-résolues pixélisées, avec une taille de pixel de 25 nm, nous additionnons l'ensemble des détections localisées dans ces pixels. Nous ajustons ensuite les clusters pixélisés par une gaussienne 3D et extrayons la largeur et la longueur à mi-hauteur de l'ajustement. A travers ces analyses, nous obtenons un diamètre moyen des nanodomaines de 97,7 +/- 2,7 nm. De plus, une moyenne de 19,1 +/- 0,6 récepteurs par clusters a été déterminée en divisant l'intensité totale de chaque cluster par la médiane de l'intensité d'une molécule unique.

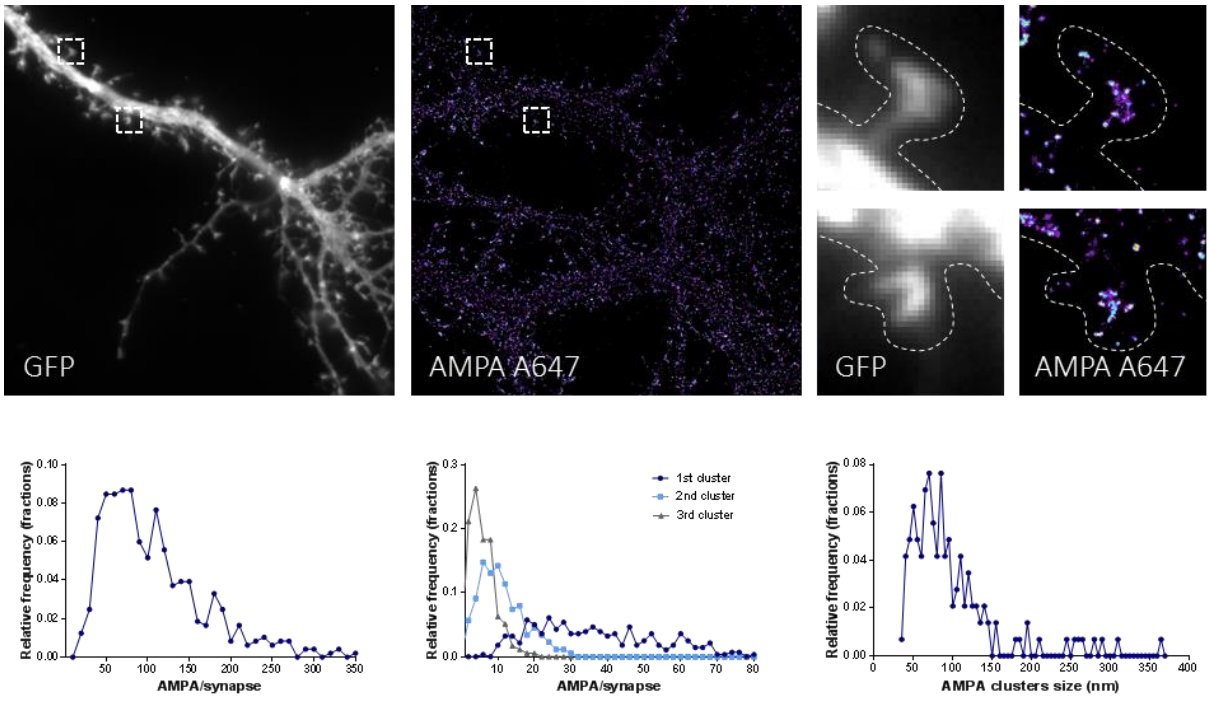


Figure 24. Propriétés d'organisation nanoscopique des récepteurs AMPA. *Les expériences de dSTORM montrent une organisation non-homogène des AMPARs au sein des épines dendritiques, ils sont accumulés dans les synapses sous forme de clusters. On observe une densité de 65,0 ± 1,9 récepteurs par épine dendritique, 19,1 ± 0,55 récepteurs par clusters, et les nanodomaines ont un diamètre de 97,7 ± 2,7 nm.*

Dans un second temps, le uPAINT a également été utilisé afin de suivre la localisation et le mouvement des récepteurs AMPA endogènes localisés à la surface de la membrane plasmique des neurones. À partir de la reconstruction des trajectoires, le déplacement moyen au carré (MSD pour Mean Square Displacement en anglais) est calculé, révélant l'aire qui est explorée par la molécule au cours du temps. Le MSD est utilisé pour extraire le coefficient de diffusion (D), quantifiant la diffusion globale des récepteurs. Les résultats obtenus montrent que les récepteurs AMPA oscillent entre deux comportements : une première fraction est immobile, caractérisée par un log(D) = -2,6, et une seconde fraction est mobile avec un log(D) = -1,2. De plus, les récepteurs mobiles représentent 36,8 +/- 3,2 % de la population totale des récepteurs (**Figure 25**).

Les techniques d'imagerie de super-résolution sur neurones vivants et fixés montrent ainsi qu'environ un tiers de la population des récepteurs AMPA diffuse librement à la surface de la membrane des neurones, alors que les deux tiers de la population qui sont immobiles sont organisés sous forme de nanodomaines d'environ 95 nm de diamètre et contenant une vingtaine de récepteurs.

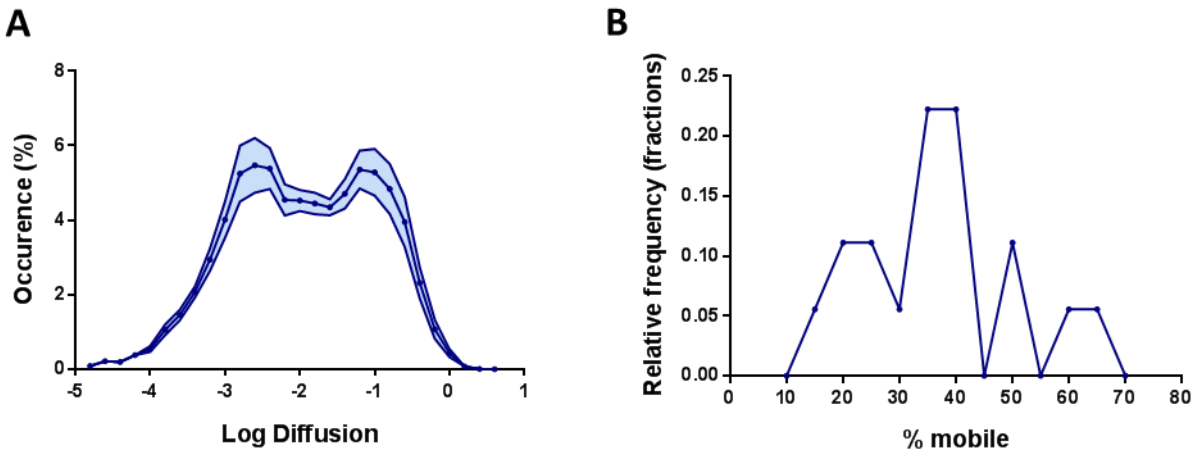


Figure 25. Mobilité des récepteurs AMPA. (A) *Les récepteurs AMPA présentent un comportement mobile (log (D) = -2,6) et immobile (log (D) = -1,2). (B) La proportion moyenne de récepteurs mobiles est de 36,8 ± 3,2 %.*

2. Nano-organisation des récepteurs NMDA

Je me suis ensuite intéressée à la caractérisation de l'organisation nanoscopique des récepteurs NMDA. Comme décrit dans l'introduction, ces récepteurs sont composés de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités GluN2 (A ou B). La distribution super-résolutive des sous-unités 2A et 2B a récemment été publiée (Ladepeche et al., 2013; Kellermayer et al., 2018). Ils révèlent une clusterisation distincte des deux sous-unités dans la synapse. Notre questionnement porte plus quant à lui sur la co-organisation des AMPARs et NMDARs, nous avons donc décidé de caractériser l'organisation de la sous-unité constitutive GluN1.

Pour cela nous avons réalisé des expériences de dSTORM avec les anticorps caractérisés au chapitre I.1.b, et révélés par des anticorps secondaires couplés à l'Alexa 647. Des analyses similaires à celles décrites au chapitre précédent sur les récepteurs AMPA ont été réalisées.

Les images nous révèlent une organisation ponctiforme majoritairement synaptique. Contrairement au marquage des récepteurs AMPA, les récepteurs NMDA semblent moins dispersés dans la synapse et leur nombre semble plus faible. La quantification révèle un nombre moyen d'environ 34,0 +/- 1,2 récepteurs par synapse (**Figure 26**). Une analyse de la distribution par synapse des récepteurs nous montre une distribution à trois pics, l'un autour de 20 récepteurs, les autres autour de 40/45 et 60. Il est difficile de savoir si les deux pics les plus importants sont des artefacts dus à notre échantillonnage limité (227 synapses au total) ou, à l'instar des récepteurs AMPA, la présence de 1, 2 ou 3 sous-unités de la transmission synaptique (équivalentes de différentes PSD par exemple).

Dans tous les cas, si on regarde en détails les plus petites synapses, ayant jusqu'à 40 récepteurs par épines, on observe en moyenne, un seul cluster comportant 17,4 $\pm$ 0,55 récepteurs et d'une taille d'environ 110 nm, puis quelques récepteurs isolés.

Alors que seulement 35 à 45% des AMPAR sont regroupés en cluster, il apparait que les récepteurs NMDA sont plus fortement compactés, à raison de 50% regroupés dans une surface ne couvrant qu'environ 25% de la PSD.

Il est intéressant de voir un tel regroupement des récepteurs NMDA, qui, comme précisé dans l'introduction, présentent une affinité pour le glutamate qui leur permettrait d'être activés plus ou moins n'importe où dans la synapse. Cette organisation spécifique doit avoir

un rôle physiologique qui reste à déterminer. De manière intéressante, vu la relative petite taille des clusters des NMDARs, la question de leur co-organisation avec les clusters des AMPARs est complètement ouverte, ils peuvent soit être distincts soit se superposer partiellement ou entièrement.

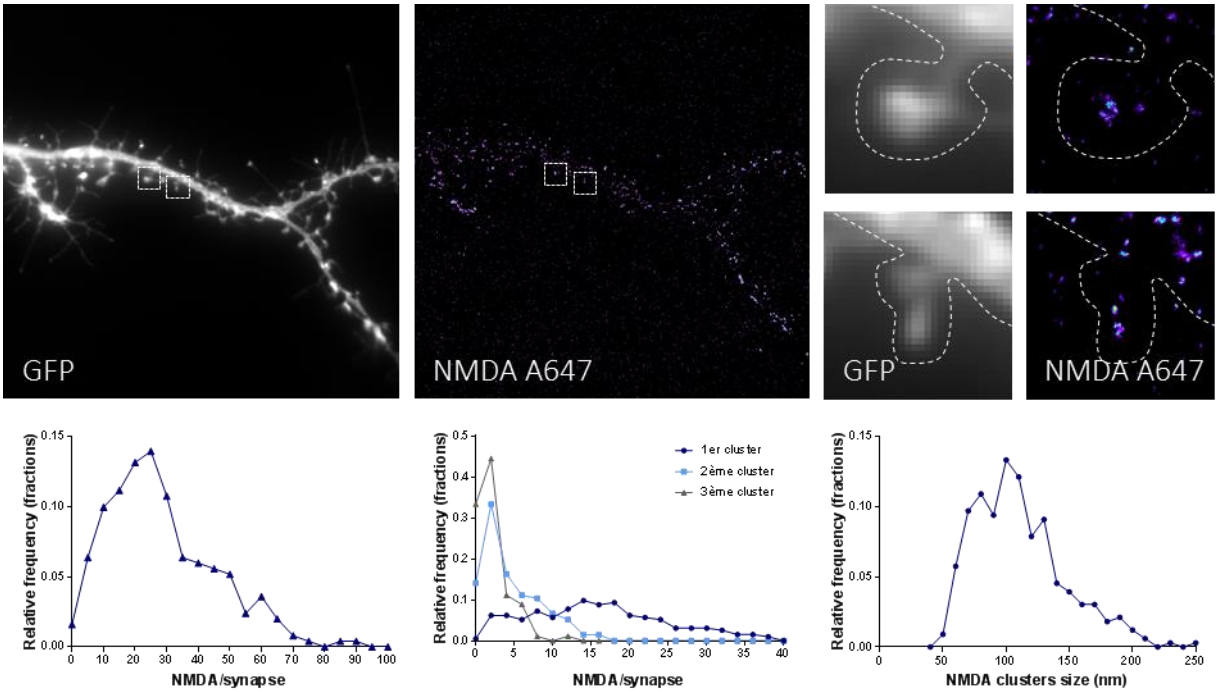


Figure 26. Propriétés d'organisation nanoscopique des récepteurs NMDA. *Les expériences de dSTORM montrent une organisation non-homogène des NMDAR au sein des épines dendritiques, ils sont accumulés dans les synapses sous forme de clusters. On observe une densité de 34,0 ± 3,5 récepteurs par épine dendritique, 17,4 ± 0,55 récepteurs par cluster, et les clusters ont un diamètre de 110 nm.*

3. Nano-organisation et dynamique des récepteurs mGluR5

Nous nous sommes finalement intéressés à l'organisation des récepteurs métabotropiques au glutamate, et plus particulièrement à mGluR5. Nous avons étudié à la fois son organisation et ses propriétés de mobilité.

Nous avons pour cela réalisé des expériences de dSTORM afin de révéler l'organisation de surface des mGluR5. Contrairement aux récepteurs AMPA et NMDA, les mGluR5 présentent une distribution non-clustérisée au sein des épines dendritiques (**Figure 27**). Il n'a pas été observé de zone d'agrégation, de confinement ou d'exclusion totale. Les images de super-résolution montrent une population homogène de récepteurs individuels, avec une quantité moyenne de 27,3 +/- 1,2 récepteurs par épine dendritique.

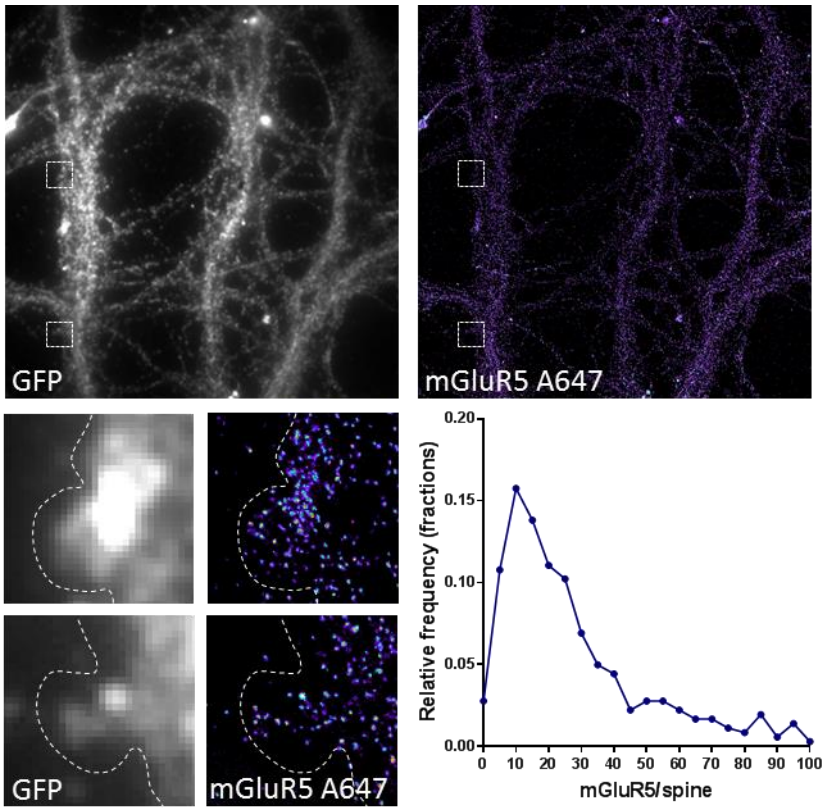


Figure 27. Propriétés d'organisation nanoscopique des récepteurs mGluR5. *Les expériences de dSTORM montrent une organisation homogène de ces récepteurs, sans agrégation au sein des synapses. On observe une densité de 27,3 $\pm$ 1,17 récepteurs par épine dendritique.*

Pour l'étude de leur mobilité, l'anticorps commercial dirigé contre mGluR5 ne présente malheureusement pas une affinité suffisante pour pouvoir réaliser des expériences de uPAINT. La mesure de leur dynamique a donc dû être faite sur des récepteurs surexprimés couplés à la mEos2. Ces expériences montrent des récepteurs mGluR5 très mobiles à la fois sur le dendrite et à la synapse (**Figure 28**). Nous n'observons pas de phase de piégeage des récepteurs comme c'est le cas avec les NMDARs et les AMPARs. Leur coefficient de diffusion moyen est aux alentours de 0,38 $\mu m^2/s$, ce qui correspond aux propriétés de diffusion libre d'une protéine membranaire. Ces résultats concordent avec ceux préalablement publiés dans (Shrivastava et al., 2013) montrant, avec des quantum dots, une grande mobilité des mGluR5 avec une sous-fraction pouvant présenter une immobilisation dans les synapses.

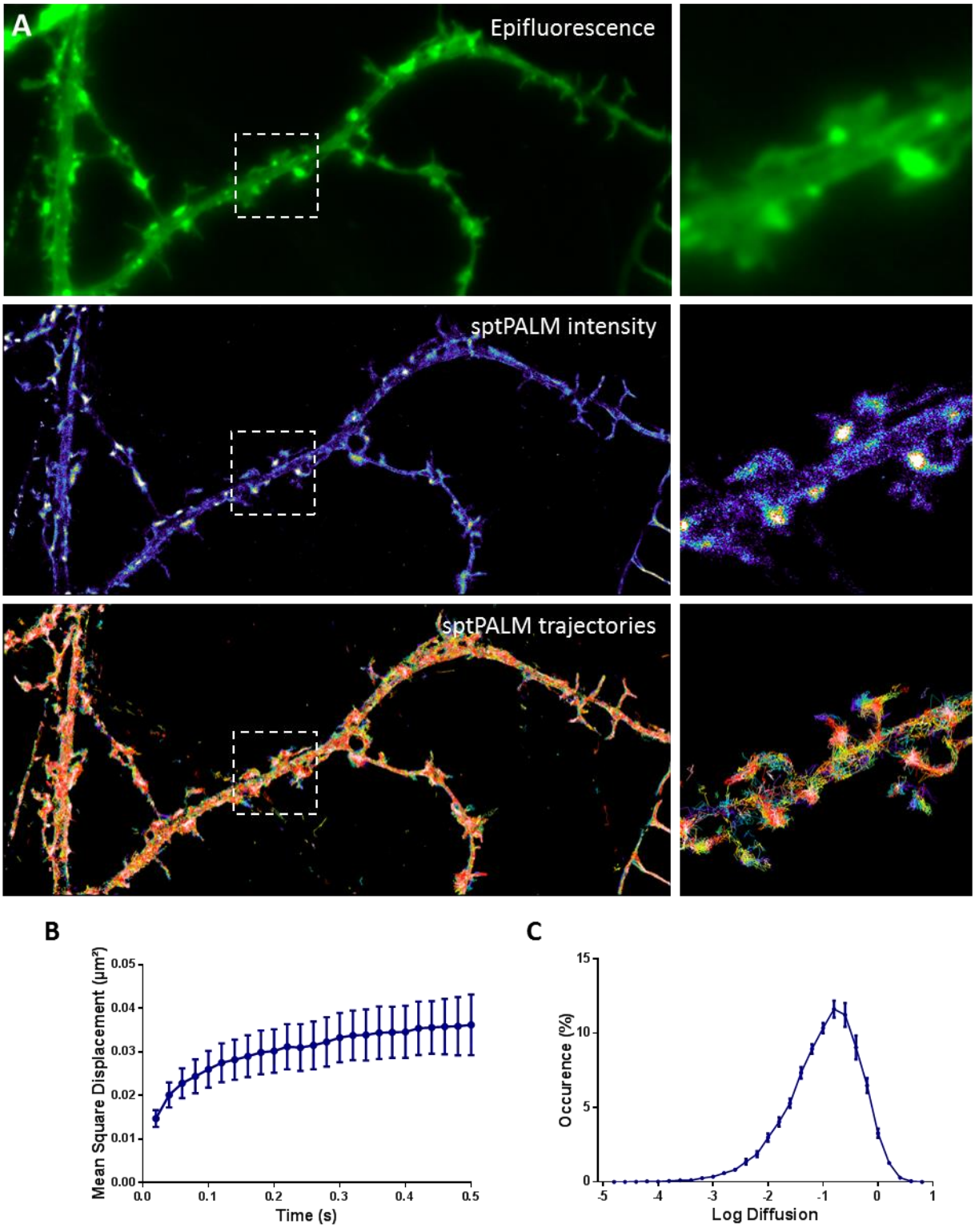


Figure 28. Mobilité des récepteurs mGluR5. (A) *La construction mGluR5-mEos2 nous permet d'observer les neurones en épifluorescence, ainsi que d'obtenir une carte d'intensité du récepteur et une reconstruction des trajectoires.* ***(B)*** *Les expériences de sptPALM nous montrent que les récepteurs mGluR5 ont un MSD (Mean Square Displacement) de 0,38 µm². Cette aire de confinement correspond à un cercle d'environ 500 nm de diamètre.* ***(C)*** *Les récepteurs mGluR5 présentent un comportement très mobile (log (D) = -0,8).*

4. Caractérisation de la précision de co-localisation

Afin de mesurer la distance séparant les clusters des récepteurs AMPA et NMDA, il est nécessaire de caractériser dans un premier temps la précision de co-localisation que nous pouvons atteindre dans nos conditions d'imagerie et d'analyse. Nous avons pour cela choisi de mesurer la distance entre les clusters des sous-unités GluA1 et GluA2 des récepteurs AMPA. Cette distance séparant les deux sous-unités formant le récepteur AMPA correspondra ainsi à la précision de co-localisation maximale que nous pouvons atteindre en prenant en considération les corrections des aberrations chromatiques, des drifts au cours du temps, ainsi que des contraintes telles que l'encombrement spatial des anticorps primaires et secondaires.

Suite au marquage immunocytochimique des deux sous-unités, des expériences de dSTORM 2-couleurs ont été faites sur ces récepteurs, et les images de super-résolution ont été analysées dans un premier temps avec le logiciel MetaMorph afin de corriger les aberrations chromatiques avec des images de microsphères prises le même jour que l'expérience de dSTORM, et dans un second temps avec Tesseler 2 afin de déterminer les distances séparant les clusters des sous-unités GluA1 et GluA2. En effet, dans les précédentes études au laboratoire nous utilisions MetaMorph pour déterminer les tailles et le contenu des clusters, mais cela se faisait sur des images super-résolues pixélisées, avec une taille de pixel de 20 ou 25 nm, dans lesquels nous additionnions l'ensemble des détections localisées dans ces pixels. Nous ajustions ensuite les clusters pixélisés par une gaussienne 3D et donnions la largeur et la longueur à mi-hauteur de l'ajustement. A travers ces analyses, il y avait de nombreuses étapes de compilation des données.

Ces dernières années, nous avons décidé de travailler sur un nouveau système d'analyse des résultats qui présente comme avantage le fait de garder l'ensemble des détections à leur localisation propre, sans les regrouper dans d'artéfactuels pixels. Ce programme, basé sur l'analyse Voronoï, consiste à créer une carte où chaque détection a une aire d'influence (ou cellule) dont la taille dépend de la densité environnante. Plus les densités sont fortes, plus l'aire des cellules est petite. Basé sur cette carte de densité, nous pouvons ensuite aisément sélectionner les différents niveaux d'organisation, dont les clusters, et obtenir ainsi les tailles et surface des domaines avec la meilleure précision.

Techniquement parlant, via l'analyse Voronoï, nous utilisons trois paramètres pour extraire les propriétés des domaines. Le premier paramètre est le facteur de densité moyenne, qui doit être égal à 1 pour les protéines individuelles ou à 5 pour les clusters de récepteurs. On considère ainsi qu'une protéine individuelle doit avoir une densité de signal au moins égale à la moyenne des densités de l'ensemble des détections de l'image. Les clusters quant à eux doivent présenter une densité de signal cinq fois supérieure à celle des récepteurs individuels.

Les deux autres paramètres utilisés sont le nombre minimum et maximum de détections pour considérer que l'objet observé est une protéine seule ou un cluster de protéines. Il a été établi par l'analyse initiale sur MetaMorph qu'une protéine individuelle doit contenir entre 25 et 300 détections. Pour ne sélectionner que les clusters, le nombre minimum de détections requis est égal à cinq fois la médiane de l'intensité d'un récepteur unique, et le nombre maximum de détections a été limité à 30000 détections, afin de ne pas sélectionner les microsphères et nanodiamants qui ont une intensité généralement égale à 40000 détections (correspondant aux 40000 images acquises durant l'enregistrement). L'utilisation de ces différents paramètres et seuils de détection nous permettent ainsi de sélectionner spécifiquement des récepteurs uniques ou clusters de récepteurs.

Nous avons dans un premier temps utilisé comme régions d'intérêt les épines dendritiques entières et effectué les corrections des aberrations chromatiques avec des images de microsphères prises la même semaine ou le même mois que les expériences de dSTORM. Après avoir reconstruit l'image Voronoï, le facteur de densité moyenne utilisé était de 5, le nombre minimum de détections était égal à cinq fois la médiane de l'intensité d'un récepteur unique, et le nombre maximum de détections était limité à 30000 détections. Basée sur ces paramètres, la médiane de la distance séparant les barycentres des clusters des sous-unités GluA1 et GluA2 était de 90 nm.

Cette valeur correspond au diamètre d'un nanodomaine de récepteurs AMPA, et est donc trop imprécise pour déterminer avec certitude une co-organisation. Nous avons donc cherché à améliorer notre méthode d'analyse afin d'augmenter notre précision de co-localisation. Pour cela, nous avons revu deux étapes importantes de notre analyse : (i) corriger les aberrations chromatiques de manière plus précise grâce à des images de microsphères prises le même jour que l'expérience de dSTORM, et non pas la même semaine ou le même mois, et (ii) dessiner des régions d'intérêt au plus proche des contours des clusters de GluA1 et GluA2 co-localisés, et non pas autour des épines dendritiques entières qui peuvent contenir

des clusters des deux sous-unités sans qu'ils soient co-localisés. Grâce à ces améliorations, nous avons pu atteindre une distance présentant un maximum à 50 nm, et une médiane de 64,1 +/- 3,9 nm, améliorant ainsi notre précision de co-localisation de près de 30% (**Figure 29**).

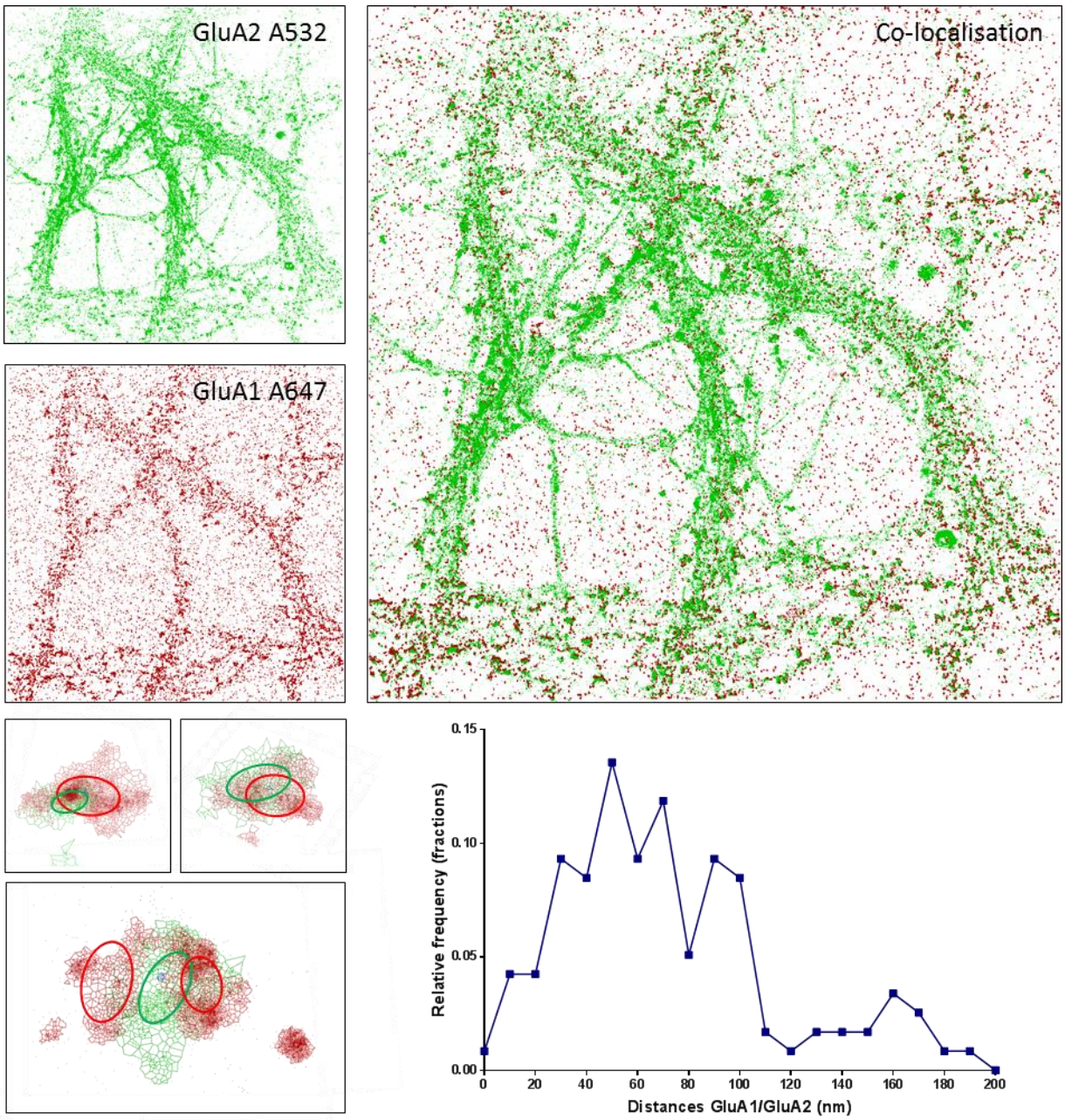


Figure 29. Mesure de la précision de co-localisation. *Les distances sont mesurées entre les barycentres des clusters des sous-unités GluA1 et GluA2 des récepteurs AMPA. La médiane de ces distances est de 64,1 $\pm$ 3,9 nm.*

Après avoir optimisé les corrections optiques et la sélection des clusters, nous nous sommes intéressés à la qualité des détections. Le but était de ne choisir que les détections les plus intenses afin de ne pas créer de bruit dans la localisation de nos clusters en introduisant des détections mal localisées. Nous avons pour cela utilisé un filtre de détection basé sur la qualité de l'ajustement gaussien permettant leur localisation initiale (calcul du Chi^2). Ce paramètre est compris entre 0 et 1, et croît avec la qualité de corrélation entre le signal de fluorescence et la fonction gaussienne. Le seuil du « filtre Chi^2 » a été fixé entre 0,7 et 1, afin d'éliminer toutes les détections de molécules uniques qui ne présentent pas une excellente corrélation avec une fonction gaussienne. Ainsi, 57% des détections d'Alexa 532 (marquant les sous-unités GluA2) et 91% des détections d'Alexa 647 (marquant les sous-unités GluA1) ont été conservées. Cependant, malgré cette sélection de détections de molécules uniques intenses, la distance mesurée entre les sous-unités clusters de GluA1 et GluA2 est restée inchangée, avec une médiane de 64,1 +/- 3,9 nm (**Figure 30**). Ce filtre de détection n'a donc pas été conservé pour la suite des analyses car il n'améliore pas la précision de la co-localisation mais alourdit fortement les analyses.

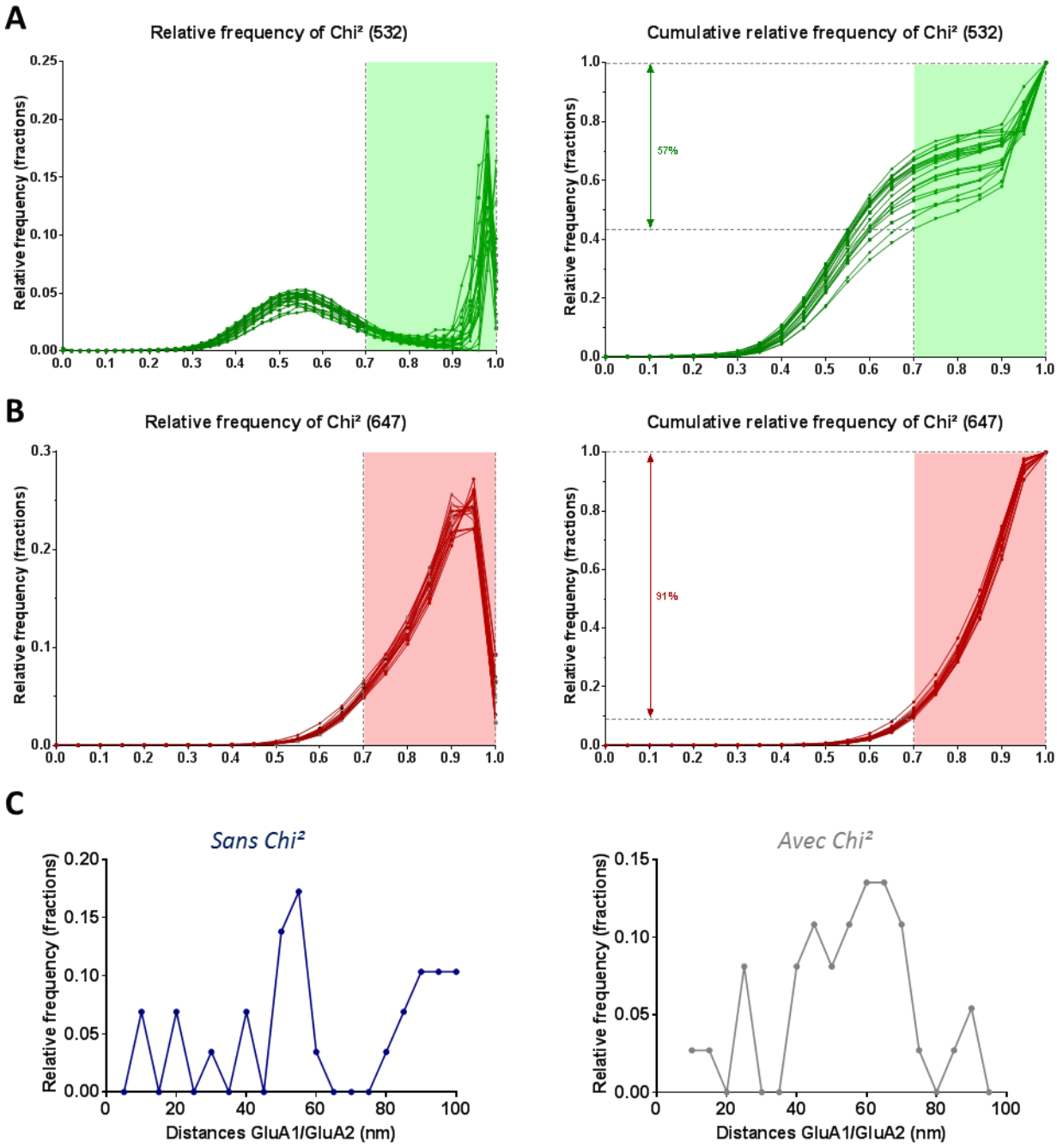


Figure 30. Utilisation du filtre Chi² pour la précision de co-localisation. *Toutes les détections de molécules uniques ayant un coefficient Chi² compris entre 0,7 et 1 ont été conservées, représentant* ***(A)*** *57% des détections d'Alexa 532 et* ***(B)*** *91% des détections d'Alexa 647.* ***(C)*** *L'utilisation de ce filtre n'a pas amélioré la précision de co-localisation des sous-unités GluA1 et GluA2, qui est maintenue à 64 nm.*

5. Mesure des distances entre les clusters des récepteurs AMPA et NMDA

De précédents travaux (Tang et al., 2016; Haas et al., 2018) ont montré qu'il existait un alignement entre la pré- et la post-synapse, où les sites de relargage du glutamate faisaient face aux domaines des récepteurs AMPA, formant des structures appelées « nanocolonnes ». Cependant, il manque encore à cette vue globale de la synapse une caractérisation précise de la position des récepteurs au glutamate les uns par rapport aux autres au sein de la post-synapse. Ainsi, après l'obtention des propriétés d'organisation des récepteurs individuels et des clusters, et une caractérisation de notre précision de co-localisation, nous nous sommes intéressés à la co-organisation des clusters des récepteurs AMPA et NMDA. Ces deux protéines ayant un rôle majeur dans la transmission synaptique glutamatergique, il est essentiel d'avoir une vision plus large de leur nano-organisation, afin de mieux comprendre la place qu'elles occupent au sein de la post-synapse, mais également leurs positions vis-à-vis de la densité post-synaptique et surtout de pouvoir prévoir leur activation respective lors de relargage de glutamate.

Grâce à des expériences de dSTORM 2-couleurs et le système d'analyse décrit ci-dessus, nous avons regardé la co-organisation des récepteurs AMPA et NMDA.

Qualitativement, j'observe souvent une répartition des clusters des AMPARs autour du cluster des NMDARs, un peu en collier de perle. Il est difficile de clairement situer les clusters de NMDARs par rapport à la PSD, il faudrait pour cela déterminer la co-organisation PSD95/NMDAR par exemple. Cependant, nous savons que les sous-clusters de PSD-95, qui tendent à s'aligner avec les nanodomaines des AMPARs sont plutôt sur les pourtours de la PSD (Nair et al., 2013). De plus, certains papiers de microscopie électronique reportent une organisation centrale des récepteurs NMDA.

Quantitativement, cette non-superposition entre les clusters des AMPARs et NMDARs est confirmée par l'analyse. Nous avons ainsi pu mesurer que la distance médiane séparant les barycentres des clusters des récepteurs AMPA et NMDA est de 95,5 +/- 1,5 nm (**Figure 31**). Notre précision de co-organisation, issue du co-marquage GluA1/GluA2 étant de 64,1 +/- 3,9 nm, la distance de 95,5 nm n'est pas en deçà de notre précision de pointée.

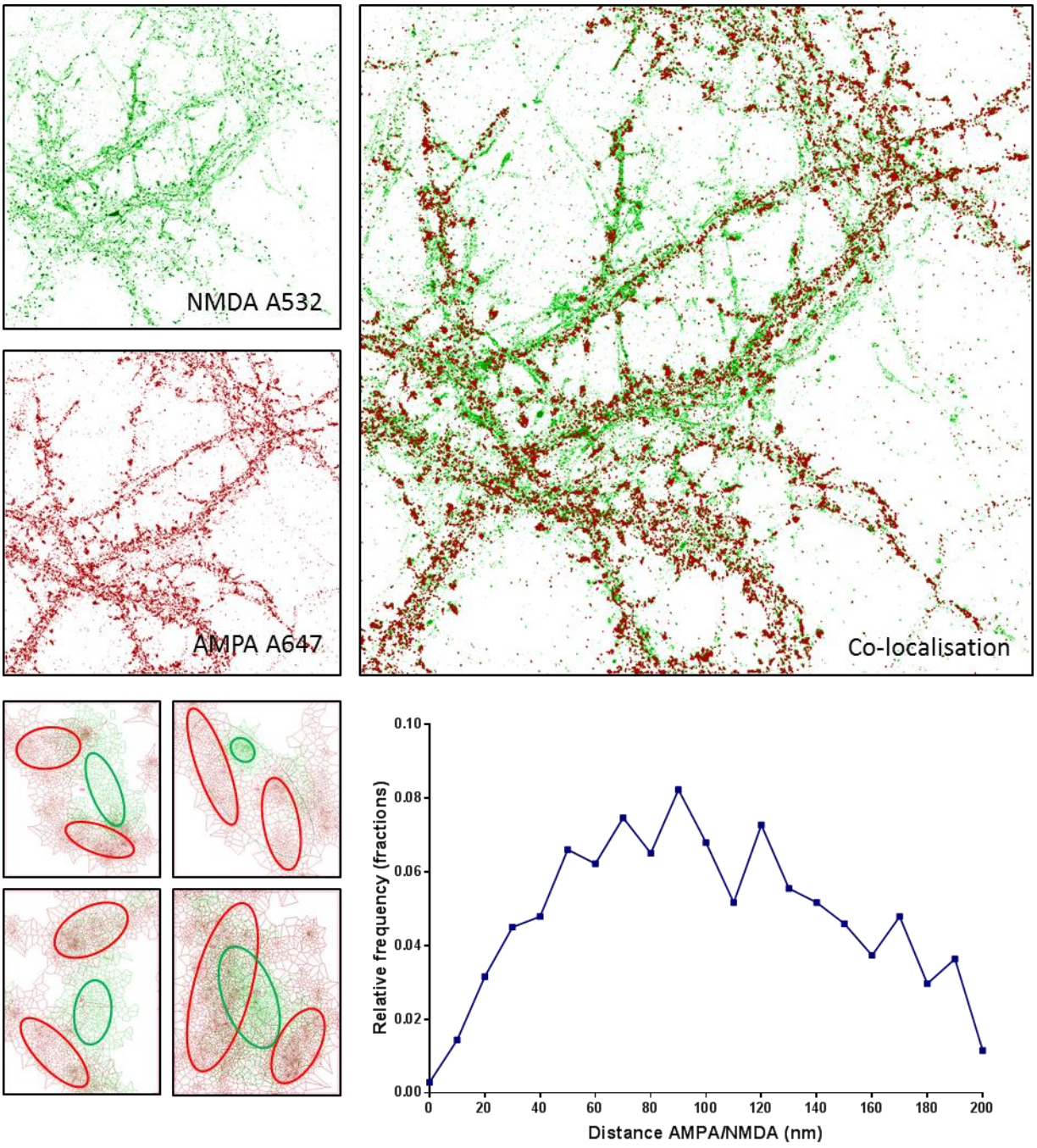


Figure 31. Mesure des distances entre les clusters des récepteurs AMPA et NMDA. *Les distances sont mesurées entre les barycentres des clusters des deux récepteurs au sein des épines dendritiques. La médiane de ces distances est de 95,5 ± 1,5 nm.*

De manière intéressante, la courbe de distribution des distances AMPAR/NMDAR ne suit pas une distribution normale, qui reflèterait une organisation moléculaire prédéfinie (test de normalité : $p < 0,0001$). Cette distribution en cloche, comprise entre 0 et 200 nm, est très étalée. Quelques hypothèses peuvent être postulées :

- Il n'y a presque pas de co-organisation plus proche que 40-50 nm. Cela pourrait s'expliquer par une forme d'exclusion entre les clusters. Nous savons que les nanodomaines de récepteurs AMPA sont très compacts, ils contiennent 20 à 30 récepteurs de 15 nm de diamètre dans un cluster de 80 nm de diamètre. Il est possible que les deux types de clusters ne puissent pas se superposer entièrement pour des raisons stériques.
- Nous pouvons observer une phase quasiment de plateau dans la distribution pour des distances allant de 60 à 150 nm. Cela confirmerait l'analyse de non-normalité, c'est-à-dire que les domaines pourraient se distribuer presque aléatoirement sur la PSD. La mesure des distributions des distances aléatoires de deux domaines devra être modélisée et comparée à la distribution obtenue ici afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse.
- La diminution progressive à partir de 150 nm doit surement être liée à la taille de la PSD. Si on postule sur la taille d'une PSD moyenne d'environ 350 nm, et de clusters d'environ 100 nm de diamètre, leurs barycentres ne peuvent être distants de plus de 150 nm si un des domaines est central.

Ces hypothèses iraient en faveur d'une distribution quasiment aléatoire des domaines les uns par rapport aux autres, seulement restreints par des gènes stériques et la taille de la PSD. Des simulations informatiques doivent être réalisées afin de valider cette hypothèse.

III. CO-ORGANISATION DES RECEPTEURS AU GLUTAMATE DANS UN MODELE PATHOLOGIQUE

Une fois la co-organisation à l'état basal déterminée, je me suis intéressée au rôle physiologique de cette organisation. Pour cela, nous nous sommes intéressés aux perturbations pouvant affecter cette structuration des récepteurs à l'échelle nanométrique. Nous nous sommes naturellement orientés vers les troubles du spectre de l'autisme (TSA) qui pour une grande part d'entre eux semble liée à des perturbations des protéines organisatrices de la synapse (Neuroligin, Neurexin, PSD95, Shank, Homer, etc.).

Une des hypothèses des troubles du spectre de l'autisme basés sur des mutations des protéines d'échafaudage est un manque de maturation des synapses qui pourrait être due à une mauvaise activation des récepteurs au glutamate perméables au calcium de type NMDA et mGluR. Cette activité altérée en réponse au glutamate peut être due soit à des modifications de la composition des complexes des récepteurs (variation de la composition des récepteurs ou des protéines partenaires associées), soit à une redistribution des récepteurs, modifiant leur accessibilité au glutamate.

Afin de tester ces hypothèses, et plus particulièrement la deuxième, je me suis inspirée de l'étude concernant la co-organisation des récepteurs au glutamate à l'état basal afin de le transférer sur un modèle de TSA issu de la sous-expression de la protéine Shank3.

1. Les modèles de troubles du spectre de l'autisme

Les troubles du spectre de l'autisme (TSA) résultent d'anomalies du neurodéveloppement. Ils apparaissent de manière précoce au cours de la petite enfance et persistent à l'âge adulte. Les personnes atteintes d'autisme semblent isolées et ont des réactions sensorielles (auditives, visuelles, cutanées) particulières. Elles présentent des comportements répétitifs (balancements du corps, battements des mains, tournoiements), auto-agressifs (se mordre les mains, se cogner la tête) ou inappropriés (pleurer ou rire sans raison apparente).

Il est désormais établi qu'il s'agit de syndromes d'origine multifactorielle, avec une forte composante génétique. Etre un garçon et présenter des antécédents familiaux sont ainsi deux facteurs de risque reconnus. Cela n'exclut pas l'importance de facteurs environnementaux (neuroinflammation, virus, produits toxiques) durant la grossesse, mais leur nature exacte n'est pas encore connue.

L'imagerie médicale a mis en évidence chez ces personnes des défauts de mise en place et d'organisation de certains réseaux cérébraux spécialisés, dédiés à la communication sociale et à un changement du comportement en fonction de l'environnement. Plusieurs centaines de gènes dont l'altération semble conduire à une plus grande susceptibilité à l'autisme ont été identifiés, et un grand nombre d'entre eux participe à la formation du système nerveux et des connexions synaptiques.

Les gènes liés aux syndromes autistiques présentent une grande variabilité d'expression dans les différentes zones du cerveau. Cela entraîne que même si l'on retrouve certaines constantes phénotypiques, de grandes variabilités en termes d'intensité et la présence de phénotypes spécifiques freinent la caractérisation fine des effets des mutations. Chaque cas est pour ainsi dire unique. Cependant, concernant les mutations affectant le fonctionnement synaptique, il apparaît que les phénotypes soient liés à des défauts de maturation de la synapse, qui peuvent être inversés au moins partiellement par une suractivation chimique des récepteurs mGluR (Bariselli et al., 2016).

2. Rôle de Shank3 dans les troubles du spectre de l'autisme

Parmi les mutations affectant les protéines qui structurent moléculairement la synapse, on retrouve le syndrome délétion 22q13.3, aussi appelé syndrome de Phelan McDermid, qui est dû à la délétion du locus q13.3 du chromosome 22, portant le gène SHANK3. Le syndrome de Phelan McDermid, souvent associé aux troubles du spectre de l'autisme, fut la première pathologie associée au gène SHANK3 identifiée chez des patients (Phelan et al., 2001). Le gène SHANK3 code une protéine agissant comme un « chef d'orchestre » dans l'organisation de la densité postsynaptique. En effet, cette protéine est composée de cinq domaines impliqués dans de nombreuses interactions protéine-protéine : le domaine ankyrine qui contacte l'actine, le domaine SH3, le domaine PDZ qui contacte GKAP (une protéine liée à PSD-95 et ancrant les récepteurs AMPA et NMDA dans la membrane lipidique), la région riche en proline qui se lie à mGluR5 via Homer et le domaine SAM. Cette structure lui confère un rôle central dans le développement, l'organisation moléculaire et le bon fonctionnement de la synapse.

Nous nous sommes ainsi demandé si une pathologie comme les troubles du spectre de l'autisme, liée à des mutations dans des protéines impliquées dans la structuration moléculaire de la synapse, pouvait s'expliquer au moins partiellement par une désorganisation des protéines synaptiques.

Cette partie de mon projet de thèse a donc consisté à comprendre les effets de la modification de l'expression de la protéine Shank3 sur l'organisation des récepteurs glutamatergiques et sur la transmission synaptique. Mon hypothèse de travail est que la mutation des protéines synaptiques menant à un syndrome autistique tend à déstructurer l'organisation, au moins partiellement, des récepteurs au glutamate, menant à un dysfonctionnement ou un manque de maturation synaptique. Afin de tester cette hypothèse, il a été nécessaire de coupler des techniques d'imagerie de super-résolution à de l'électrophysiologie. Dans un premier temps, je me suis concentrée sur l'effet de l'expression d'un shShank3 (construction identique à celle utilisée dans Verpelli et al., 2011) ou la surexpression de Shank3 sur l'organisation et le rôle fonctionnel des récepteurs AMPA, grâce aux techniques du dSTORM, uPAINT et d'électrophysiologie. J'ai ensuite caractérisé l'organisation des récepteurs NMDA et mGluR5 dans ces différentes conditions d'expression de Shank3.

3. Validation du modèle Shank3

Afin de caractériser l'effet que peuvent avoir différents niveaux d'expression de Shank3 sur l'organisation moléculaire de la synapse, la première étape a consisté à valider ce modèle. Des expériences d'électrophysiologie ont été faites dans le but de mesurer l'amplitude, la fréquence, le decay time et le rise time des miniEPSCs des récepteurs AMPA (**Figure 32**). Ces expériences ont été faites dans trois conditions différentes, où les neurones ont été transfectés avec de la GFP soluble (condition contrôle), avec un shShank3 afin de diminuer le taux d'expression de la protéine Shank3 et une dernière condition où Shank3 était surexprimé. La construction d'ADN du shShank3 est la même utilisée que celle validée et utilisée dans l'article de Verpelli et al., 2011.

Les mesures électrophysiologiques révèlent une amplitude (moyenne +/- SEM) des miniEPSCs de 11,5 +/- 0,9 pA en condition contrôle, de 8,3 +/- 0,6 pA avec le shShank3 et de 11,0 +/- 1,3 pA avec la surexpression de Shank3. La différence d'amplitude entre la condition contrôle et le shShank3 est fortement significative ($p = 0,005$). Pour ce qui est de la fréquence, elle est de 5,5 Hz en condition contrôle, 3,2 Hz avec le shShank3 et 7,0 Hz avec la surexpression de Shank3. La différence entre ces trois conditions n'est pas significative. Le rise time des miniEPSCs est égal à 0,5 ms en condition contrôle et à 0,4 ms avec le shShank3 et la surexpression de Shank3. Il n'y a pas de différence significative entre les trois conditions. De la même façon, il n'y a pas de différences au niveau du decay time (4,9 ms, 5,3 ms et 4,1 ms avec respectivement le contrôle, le shShank3 et la surexpression de Shank3).

La construction d'ADN shShank3 a donc pour conséquence de diminuer de 30% l'amplitude des miniEPSCs des récepteurs AMPA, sans pour autant diminuer de manière significative leur fréquence, rise time et decay time. Cela indique une potentielle diminution du nombre de récepteurs AMPA à la synapse ou une désorganisation moléculaire, mais une préservation du nombre de synapses (reflété par la fréquence) et de la composition du complexe des AMPARs (reflété par les cinétiques des courants). Une diminution similaire de l'amplitude des courants miniatures a déjà été observée sur les neurones présentant une diminution ou une suppression de la protéine Shank3 (Verpelli et al., 2011; Shcheglovitov et al., 2013).

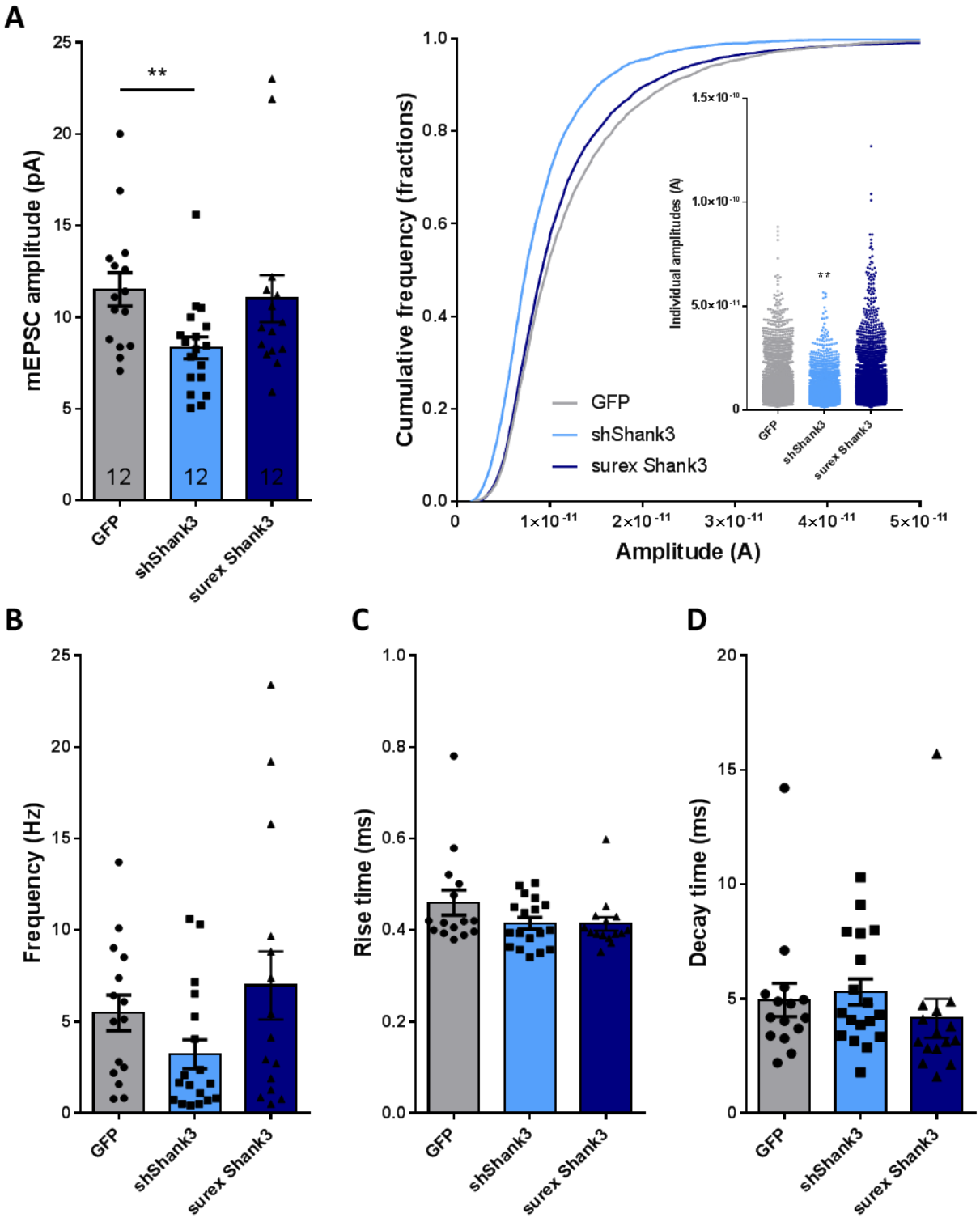


Figure 32. Mesure des courants mEPSCs des récepteurs AMPA. (A) *L'amplitude moyenne est de 11,5 ± 0,9 pA en condition contrôle, 8,3 ± 0,6 pA avec le shShank3 et 11,0 ± 1,3 pA avec Shank3 surexprimé. La différence entre la condition contrôle et le shShank3 est significative (t test : p = 0,0050).* ***(B)*** *La fréquence moyenne est de 5,5 ± 1,0 Hz en condition contrôle, 3,2 ± 0,8 Hz avec le shShank3 et 7,0 ± 1,9 Hz avec Shank3 surexprimé. La différence entre ces trois conditions n'est pas significative (t test : p = 0,0805).* ***(C)*** *Le rise time moyen est 0,5 ± 0,03 ms en condition contrôle, 0,4 ± 0,01 ms avec le shShank3 et 0,4 ± 0,01 avec Shank3 surexprimé. La différence entre ces trois conditions n'est pas significative (t test : p = 0,1235).* ***(D)*** *Le decay time moyen est de 4,9 ± 0,7 ms en condition contrôle, 5,3 ± 0,6 avec le shShank3 et 4,1 ± 0,9 avec Shank3 surexprimé. La différence entre ces trois conditions n'est pas significative (t test : p = 0,7041).*

4. Etude de l'organisation des récepteurs au glutamate dans un modèle d'autisme

a. Nano-organisation des récepteurs AMPA

Nous savons maintenant que les récepteurs AMPA sont organisés en sous-structures fonctionnelles nommées nanodomaines (Fukata et al., 2013; MacGillavry et al., 2013; Nair et al., 2013). Une diminution de l'amplitude de la réponse miniature des AMPARs quand le shShank3 est exprimé peut, au vu de cette structuration moléculaire, être liée à trois phénomènes : (i) une déplétion des nanodomaines en récepteurs AMPA, (ii) un changement de la structure de ces domaines, ou (iii) un désalignement de ces domaines vis-à-vis des sites de libération pré-synaptiques du glutamate comme cela a été observé avec certains mutants de la Neuroligine (Haas et al., 2018).

La caractérisation de l'organisation des récepteurs AMPA à l'échelle nanométrique dans un modèle d'autisme a été réalisée en utilisant les techniques de super-résolution précédemment décrite : un immunomarquage des récepteurs AMPA sur neurones vivants, des expériences de dSTORM sur neurones fixés et une analyse des images de super-résolution avec le logiciel MetaMorph. Ces expériences ont été réalisées dans trois conditions différentes d'expression de la protéine Shank3 : une condition contrôle où seule la GFP soluble est exprimée dans les neurones, une deuxième condition où le shShank3 est exprimé, et une troisième condition où Shank3 est surexprimé.

Dans un premier temps, l'observation des neurones en épifluorescence révèle une modification phénotypique des épines dendritiques en fonction du taux d'expression de Shank3 (**Figure 33**). En effet, l'expression du shShank3 induit chez les épines une forme allongée de type « filopode », semblable à une forme immature de protrusions, alors que la surexpression de Shank3 favorise un développement rapide des épines qui sont très nombreuses, plus larges et arrondies qu'en condition contrôle, de type « mushroom ».

A l'échelle nanométrique, les propriétés d'organisation des récepteurs AMPA dans la condition contrôle sont les mêmes que celles montrées précédemment : une moyenne de

19,1 +/- 0,6 récepteurs par nanodomaine. Ces valeurs restent inchangées avec le shShank3 (23,4 +/- 1,0) ou la surexpression de Shank3 (23,6 +/- 0,9). Ces résultats restent préliminaires, mais s'ils se confirment, il sera intéressant de comprendre comment des synapses ayant des nanodomaines contenant le même nombre de récepteurs peuvent avoir des intensités de miniatures plus faibles. Les seules expériences ayant déjà montré ce phénotype sont celles réalisées sur les mutants de Neuroligine, entrainant un désalignement entre la pré- et la post-synapse.

La comparaison de la taille des nanodomaines quant à elle révèle une augmentation significative lors de la surexpression de Shank3, alors qu'aucune différence n'est observée avec le shShank3.Une augmentation de la taille des domaines sans variation du nombre de récepteurs ou de l'amplitude des courants miniatures ont déjà été observées lors de la surexpression de PSD-95 et/ou de Neuroligine. Il semblerait que cela soit dû à des changements d'organisation assez fins au sein de PSD-95, n'entrainant pas de modifications fonctionnelles.

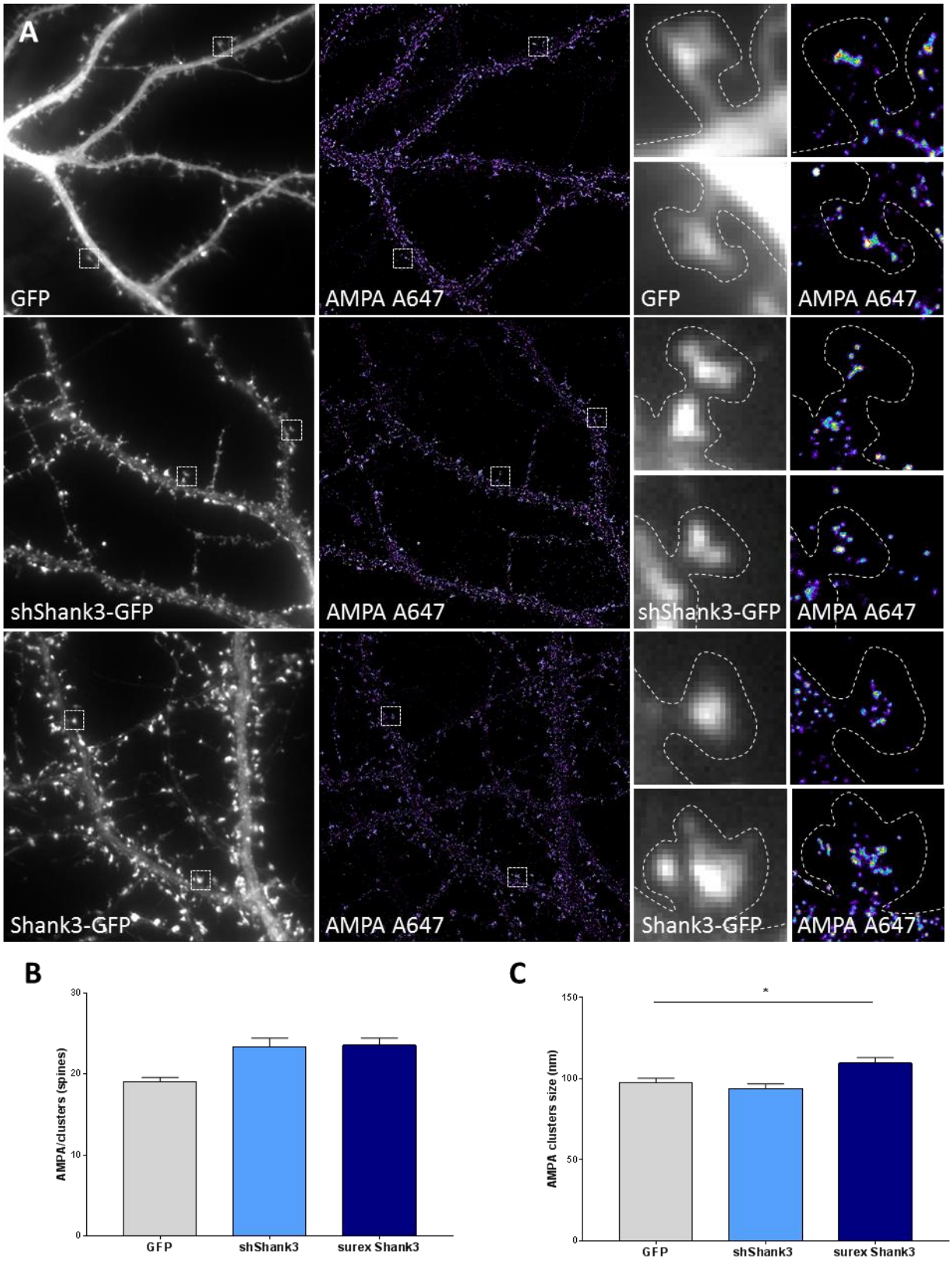


Figure 33. Nano-organisation des récepteurs AMPA dans différentes conditions d'expression de Shank3. (A) *Les expériences de dSTORM montrent une organisation non-homogène des AMPAR au sein des épines dendritiques dans les trois conditions.* ***(B)*** *On observe une moyenne de 19,1 ± 0,6 récepteurs par clusters dans la condition contrôle, 23,4 ± 1,0 pour le shShank3 et 23,6 ± 0,9 quand Shank3 est surexprimé. La différence entre ces conditions n'est pas significative.* ***(C)*** *Les nanodomaines ont un diamètre de 97,7 ± 2,7 nm en condition contrôle, 93,9 ± 3,0 nm avec le shShank3 et 109,5 ± 3,6 nm avec la surexpression de Shank3. La différence entre la condition contrôle et la surexpression de Shank3 est significative (p = 0,0129).*

b. Dynamique des récepteurs AMPA

La mobilité des récepteurs AMPA a également été étudiée grâce à la technique du uPAINT. Les résultats de ces expériences montrent que dans la condition où les neurones expriment le shShank3, la mobilité des récepteurs AMPA n'est pas modifiée, on peut constater que le log(D) est le même qu'en condition contrôle (**Figure 34**). De plus, la proportion de récepteurs mobiles par rapport aux récepteurs immobiles reste inchangée.

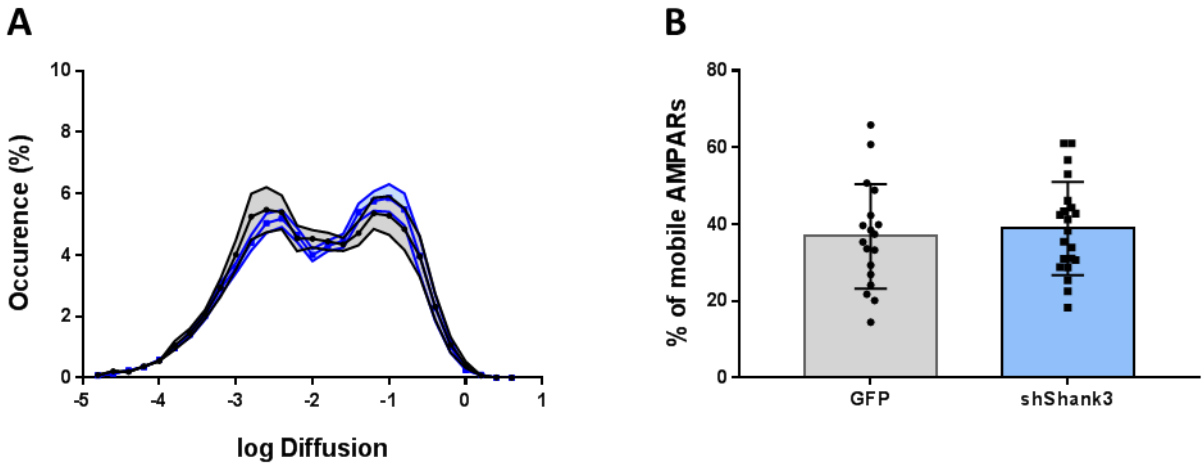


Figure 34. Mobilité des récepteurs AMPA dans différentes conditions d'expression de Shank3. (A) *Les récepteurs AMPA présentent un comportement mobile (log (D) = -2,6) et immobile (log (D) = -1,2) en condition contrôle et avec l'expression de shShank3.* ***(B)*** *La proportion moyenne de récepteurs mobiles est de 36,8 ± 3,2 % en condition contrôle et de 38,9 ± 2,7 % avec l'expression de shShank3. La différence entre ces deux conditions n'est pas significative (t test : p = 0,6255).*

Ces résultats montrent donc que la nano-organisation et la mobilité des récepteurs AMPA ne sont pas drastiquement modifiées par différents taux d'expression de la protéine Shank3. Cependant, l'amplitude de leurs miniEPSCs se voit diminuée dans la condition où le shShank3 est exprimé. Cette diminution d'amplitude des courants, sans remaniement des propriétés des nanodomaines, pourrait être expliquée par un désalignement des récepteurs AMPA vis-à-vis de la présynapse et du site de relargage du glutamate.

c. Nano-organisation des récepteurs NMDA

Les propriétés d'organisation des récepteurs NMDA ont été caractérisées avec le dSTORM dans les trois mêmes conditions que les récepteurs AMPA : les neurones expriment la GFP soluble, le shShank3 ou surexpriment Shank3. L'analyse des images de super-résolution avec le logiciel MetaMorph révèle une modification du nombre de récepteurs NMDA par épine dendritique par rapport à la condition contrôle (**Figure 35**). En effet, il y a en moyenne 33,8 +/- 3,5 récepteurs NMDA par épine dendritique en condition contrôle (ce qui a déjà été observé précédemment), alors qu'on en compte 50,3 +/- 6,1 lorsque le shShank3 est exprimé, et 54,2 +/- 4,2 lorsque Shank3 est surexprimé. Les différences entre la condition contrôle et le shShank3 ($p = 0,0235$) et entre la condition contrôle et la surexpression de Shank3 ($p = 0,0088$) sont significatives.

Ces résultats nous montrent donc qu'une augmentation ou une diminution du taux d'expression de la protéine Shank3 dans les neurones, a pour conséquence d'augmenter le nombre de récepteurs NMDA dans les épines dendritiques. Comme une de nos hypothèses est que l'expression du shShank3 maintient la synapse à un stade immature, je me suis penchée sur la littérature traitant des récepteurs NMDA pendant le développement. Si le switch entre GluN2B et GluN2A est abondamment décrit, je n'ai rien trouvé concernant le nombre de récepteurs et entre autre le nombre de GluN1. Est-il possible que les synapses immatures tendent à sur-accumuler les NMDARs et que la quantité supérieure de sous-unités GluN1 dans notre modèle de troubles du spectre de l'autisme soit due à un retard de développement ? Cette hypothèse devra être étudiée plus en détails.

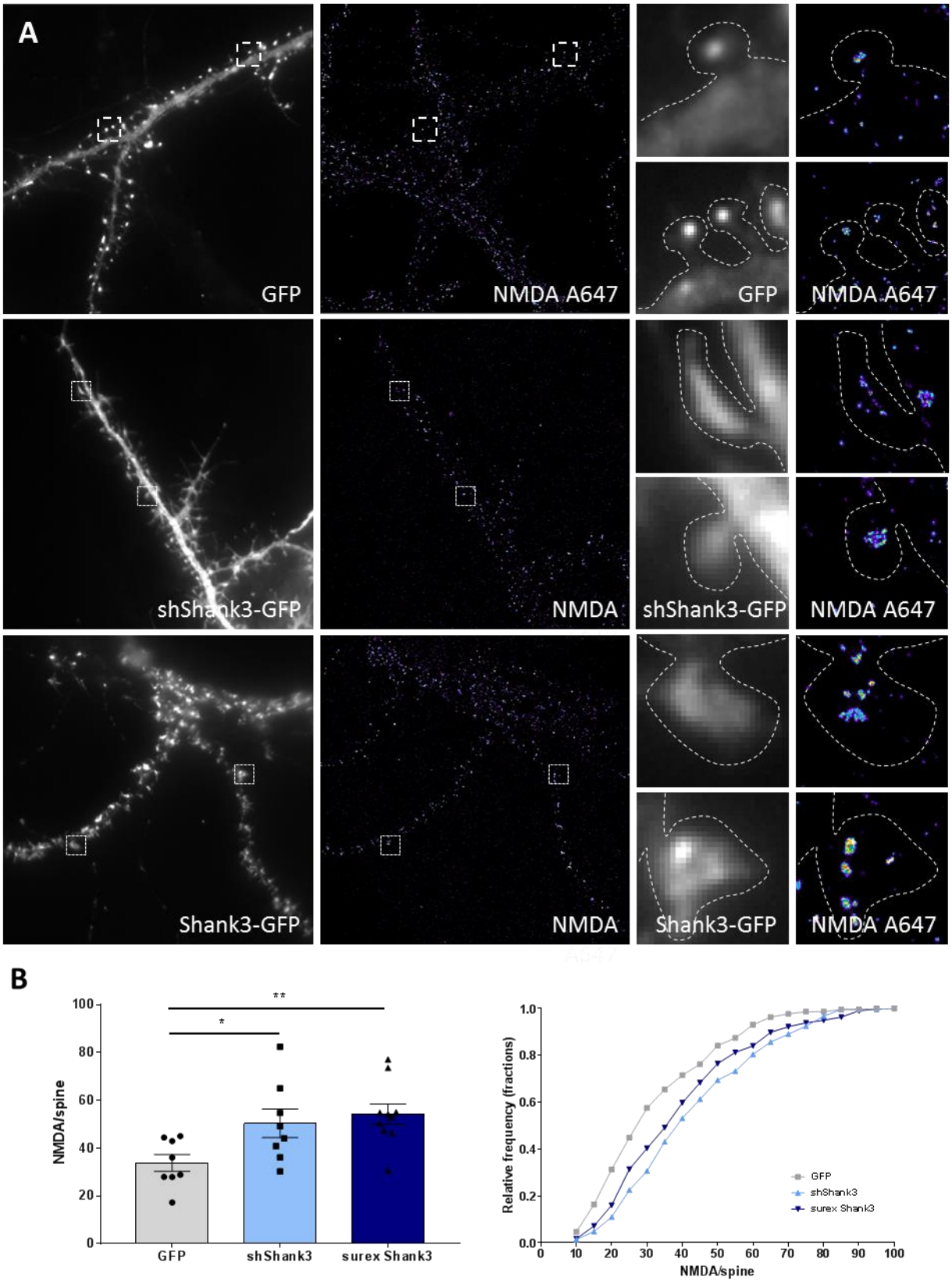


Figure 35. Nano-organisation des récepteurs NMDA dans différentes conditions d'expression de Shank3. (A) *Les expériences de dSTORM montrent une organisation non-homogène des NMDAR au sein des épines dendritiques dans les trois conditions.* ***(B)*** *On observe une moyenne de 34,0 ± 3,5 récepteurs par clusters dans la condition contrôle, 50,3 ± 6,1 pour le shShank3 et 54,2 ± 4,2 quand Shank3 est surexprimé. Les différences entre la condition contrôle et le shShank3 (p = 0,0235) et la surexpression de Shank3 (p = 0,0088) sont significatives.*

d. Nano-organisation des récepteurs mGluR5

De la même manière que les récepteurs AMPA et NMDA, la nano-organisation des récepteurs mGluR5 a été observée dans les trois conditions du taux d'expression de Shank3 avec la technique du dSTORM. Ces expériences nous montrent une diminution du nombre de récepteurs mGluR5 par épine dendritique lorsque le shShank3 est exprimé dans les neurones (**Figure 36**). En effet, on observe une moyenne de 66 récepteurs par épine dendritique en condition contrôle et 43 récepteurs avec le shShank3, ce qui est une différence hautement significative ($p = 0,0001$). Dans la condition où Shank3 est surexprimé, on trouve une moyenne de 60 récepteurs par épine, ce qui est similaire à la condition contrôle.

Ainsi, lorsque le taux d'expression de Shank3 est inférieur à la normale, on observe une augmentation du nombre de récepteurs NMDA et une diminution des mGluR5 au sein des épines dendritiques qui présentent un phénotype en « filopode », alors qu'une surexpression de Shank3 entraine une augmentation du nombre de récepteurs NMDA dans les épines qui ont une morphologie de type « mushroom ».

Cette étude est préliminaire et la co-organisation de ces trois protéines devra être étudiée. De plus, des expériences complémentaires afin de comparer le contenu synaptique des neurones déplétés en Shank3 avec des synapses immatures devront être réalisées afin de tester l'hypothèse de l'immaturité synaptique pour notre modèle de troubles du spectre de l'autisme.

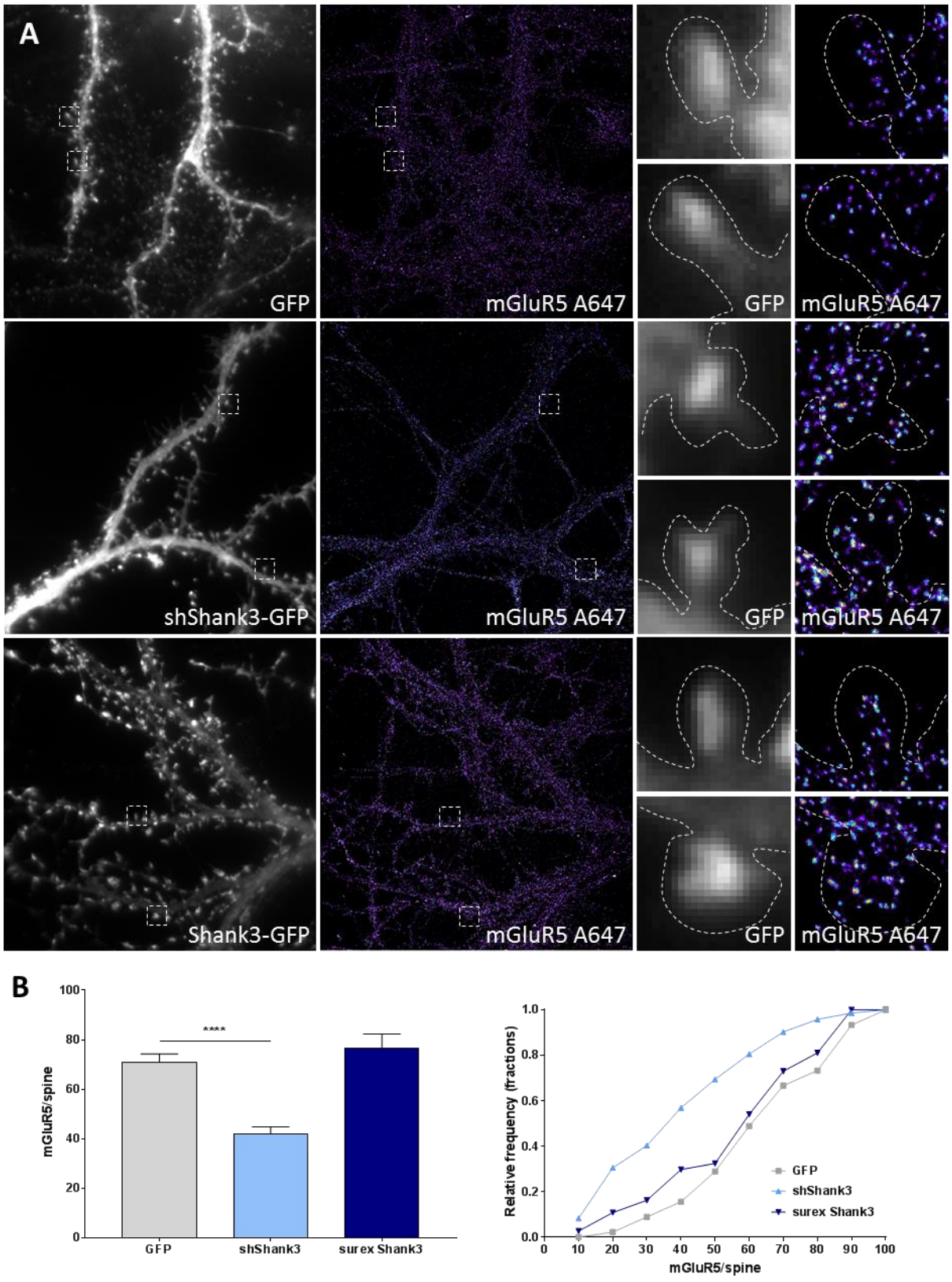


Figure 36. Nano-organisation des récepteurs mGluR5 dans différentes conditions d'expression de Shank3. (A) *Les expériences de dSTORM montrent une organisation homogène des mGluR5 au sein des épines dendritiques dans les trois conditions.* ***(B)*** *On observe une moyenne de 70,9 ± 3,4 récepteurs par épines dans la condition contrôle, 42,0 ± 2,8 pour le shShank3 et 76,5 ± 5,9 quand Shank3 est surexprimé. La différence entre la condition contrôle et le shShank3 est significative (p = 0,0001).*

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de mon projet de thèse, je me suis intéressée à la co-organisation nanoscopique des récepteurs glutamatergiques post-synaptiques. Suite à la propagation d'un potentiel d'action dans un neurone pré-synaptique, l'exocytose des vésicules synaptiques crée un gradient de glutamate dans la fente synaptique. La disponibilité en glutamate n'est alors pas la même pour tous les récepteurs glutamatergiques situés à la surface de la membrane plasmique post-synaptique. Les travaux de Nair et al., 2013, effectués au sein de mon équipe d'accueil, ont permis de caractériser la mobilité et la nano-organisation des récepteurs AMPA à la post-synapse. Les résultats obtenus ont révélé des échanges de récepteurs par simple diffusion entre sites synaptiques et sites extra-synaptiques, ayant un rôle physiologique important dans la fidélité de la transmission synaptique rapide. De plus, il a été démontré une organisation en nanodomaines de 80 nm de diamètre des récepteurs AMPA au niveau de la densité post-synaptique. La combinaison de ces deux phénomènes favorise les variations rapides de la densité de récepteurs présente face aux sites de libération du glutamate et les échanges rapides de récepteurs AMPA entre deux libérations, modulant ainsi la réponse de la post-synapse à une stimulation pré-synaptique.

Cette caractérisation soulève alors la question pour les autres récepteurs glutamatergiques que sont les récepteurs NMDA, ayant une affinité plus importante que les AMPARs pour le glutamate, et les récepteurs mGluRs pour lesquels il est expérimentalement très difficile de mesurer l'activité électrique. De ce fait, étudier la co-organisation des récepteurs AMPA, NMDA et mGluR5 revient à définir leurs propriétés de co-fonctionnement.

Il a été pour cela nécessaire de développer plusieurs outils méthodologiques afin de contourner les limites expérimentales imposées par les techniques utilisées. L'imagerie de super-résolution multi-couleurs induit des phénomènes optiques qui nécessitent d'être corrigés, d'autant plus pour une étude à l'échelle nanométrique. Une des premières difficultés rencontrées a ainsi été de corriger les aberrations chromatiques, phénomène non linéaire et variable au cours du temps. Après avoir optimisé cette étape, l'objectif fut de caractériser la précision de co-localisation qui pouvait être atteinte dans nos conditions expérimentales. Cette caractéristique a été établie en mesurant les distances séparant les clusters des sous-unités GluA1 et GluA2 des récepteurs AMPA, nous permettant de définir une distance correspondant à 100% de co-localisation, propre à nos conditions expérimentales.

Au cours de ma thèse, les progrès technologiques réalisés m'ont permis de localiser à l'état basal les récepteurs AMPA, NMDA et mGluR5, d'une dizaine de nanomètre de large, à quelques dizaines de nanomètres près au sein des synapses. Ainsi, mes résultats reposent essentiellement sur le suivi individuel des récepteurs sur des neurones en culture grâce à deux techniques d'imagerie de super-résolution développées ces dix dernières années : le dSTORM et le uPAINT. Les résultats obtenus nous permettent de coupler des informations sur l'organisation nanoscopique et la mobilité de ces récepteurs, nous apportant une nouvelle vision de l'organisation de la post-synapse excitatrice.

A travers mes travaux de recherche, un schéma général d'organisation différent de celui proposé par les travaux précédents se dessine (**Figure 37**).

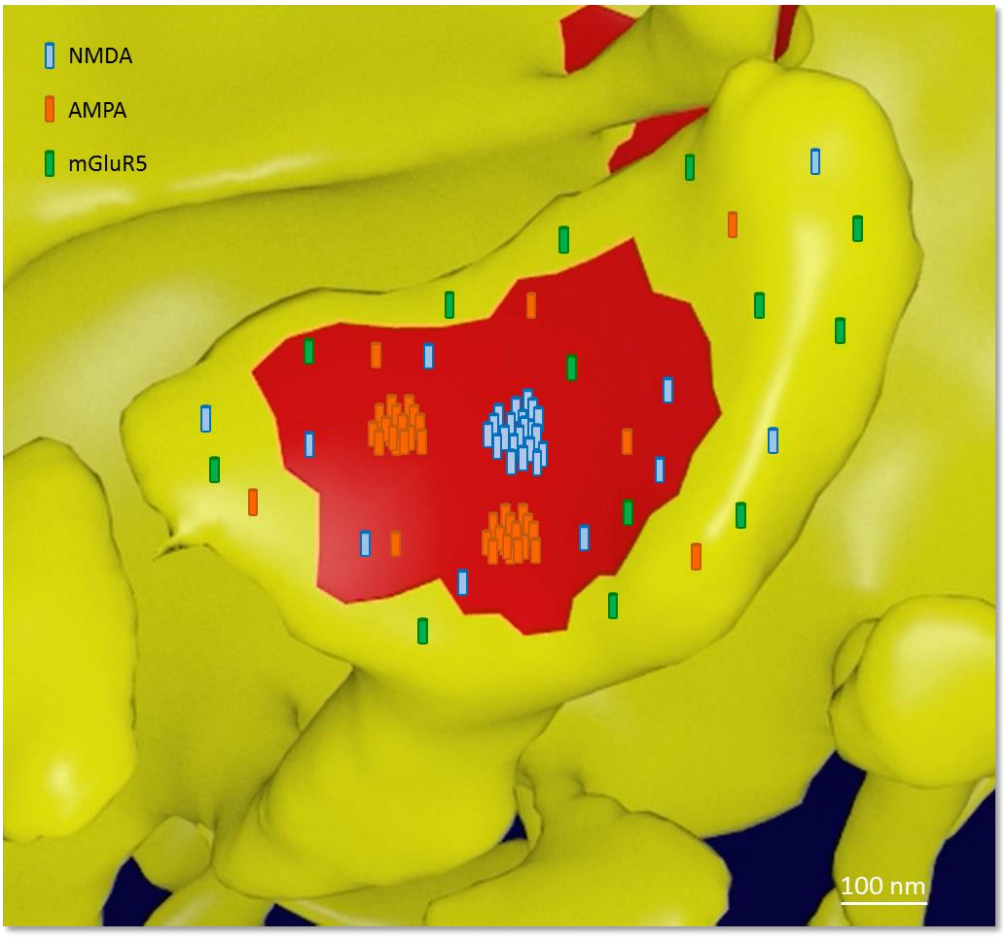


Figure 37. Modèle de synapse glutamatergique. *Les récepteurs NMDA forment des clusters de 15 à 20 récepteurs. Ils ont tendance à être entourés par les récepteurs AMPA, eux aussi accumulés en clusters de 20 à 25 récepteurs, positionnés assez aléatoirement vis-à-vis des clusters de NMDA. Les récepteurs mGluR5 ne sont pas clusterisés et ont tendance à être exclus des zones enrichies en récepteurs AMPA.*

Nous savons depuis quelques années que les AMPARs sont regroupés en clusters co-organisés avec les sites de libération du glutamate. Nous observons en moyenne deux nanodomaines par synapse (un de 25 récepteurs et un de 10 récepteurs environ), signifiant potentiellement plusieurs sites de libération. La co-organisation pré-post-synaptique a été révélée initialement grâce au marquage de PSD-95 et RIM puis des AMPARs et RIM. Le rôle fonctionnel de RIM est, entre autre, de lier les canaux calciques voltage-dépendant à la zone active. Leur zone d'accumulation va donc définir les zones de forte concentration de CaV. Des travaux de microscopie électronique ont démontrés que les localisations des sites de fusion des vésicules étaient enrichies dans une zone d'environ 100 nm autour des zones d'accumulation des CaV, même si des fusions plus distantes sont possibles. Ces expériences montrent qu'il n'y a surement pas un parfait alignement entre les domaines de récepteurs AMPA et les sites de relargage, mais plutôt une co-organisation moléculaire pré-post-synaptique qui tend à augmenter la probabilité de libération du glutamate dans les 50 à 100 nm environnant les clusters d'AMPARs. Des récents travaux de l'équipe ont identifié la Neuroligine avec son partenaire la Neurexine comme un des potentiels liens entre les nanodomaines post-synaptiques et la zone active.

En termes d'efficacité de la transmission synaptique, cet alignement revêt une importance majeure au vu de la relativement faible affinité des AMPARs pour le glutamate. En effet, un désalignement de quelques dizaines de nanomètres de cette organisation affecte notablement l'amplitude de la réponse des AMPARs (Haas et al., 2018). Il est intéressant de noter que la famille protéique permettant le piégeage des AMPARs dans les domaines (TARPs) augmente de manière concomitante leur affinité pour le glutamate, entrainant une optimisation de la fixation et donc de l'activation des AMPARs à l'intérieur du nanodomaine.

Les récepteurs au NMDA, de par leur affinité 100 fois supérieure pour le glutamate, ne sont pas soumis à la même nécessité de clusterisation et de co-organisation avec les sites de libération du glutamate. Il est donc surprenant de voir qu'à l'instar des AMPARs, ils sont regroupés en sous-clusters d'environ 100 nm contenant près de 60% des NMDARs synaptiques. En comparaison, ils sont même plus clusterisés que les récepteurs AMPA. Cela se voit nettement en dSTORM où les AMPARs présentent une distribution diffuse et presque homogène en dehors des clusters alors que la synapse est quasiment vide de NMDARs en

dehors de leurs domaines. Quelles hypothèses fonctionnelles peut-on faire concernant cette organisation nanométrique des NMDARs ?

Tout d'abord, les études de co-organisation avec les AMPARs montrent que les domaines d'AMPARs et de NMDARs ne sont pas co-localisés, même si certains chevauchements sont observables. Cela révèle une différence dans l'organisation moléculaire de ces domaines. Une des hypothèses est que les NMDARs ne se regroupent pas autour des mêmes protéines d'adhésion, et la découverte récente de la famille des LRRTM ainsi que leur localisation assez centrale (Chamma et al., 2016) offre un candidat sérieux à cette organisation des NMDARs. De manière intéressante, des résultats préliminaires obtenus en microscopie électronique, en collaboration avec Shigeki Watanabe, ont démontré une localisation centrale des NMDARs sur la PSD alors que les clusters d'AMPARs semblent plutôt à la périphérie de cette dernière. L'ensemble de ces données nous permet de dresser un schéma général où les NMDARs sont regroupés assez centralement au niveau de la PSD, potentiellement autour des protéines d'adhésion de la famille des LRRTM. Le reste de la PSD, donc plutôt sa périphérie, est décoré par un ou deux clusters d'AMPARs faisant face aux clusters de CaV via l'interaction Neurexine-Neuroligine. Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action, l'entrée de calcium via les CaV crée un gradient local favorisant la fusion des vésicules au glutamate dans la proche périphérie du complexe trans-synaptique AMPAR-Neuroligine-Neurexine-RIM-CaV. Le cluster de NMDARs adjacent aura accès, au vu de son importante affinité, à une quantité suffisante de glutamate pour être significativement activé, nonobstant la disponibilité en co-agoniste et le non-blocage par le Mg^{2+}.

Le rôle physiologique du regroupement des NMDARs est questionnable. En effet, il est possible que le maintien au sein de la synapse d'un pool de NMDARs mobiles puisse permettre une activation similaire des récepteurs. Dans l'introduction, j'ai souligné le rôle des NMDARs dans la structuration de la synapse, via ses interactions avec les protéines de la PSD, l'α-actinine, la CAMKII, etc. De plus, de nombreuses études montrent que les synapses silencieuses ne présentent pas, durant le développement, de courants AMPA mais uniquement des courants NMDA. Nous pouvons imaginer que ce cluster de NMDARs se forme très tôt dans le développement synaptique et sert d'ancre (avec ses protéines d'adhésion associées) à la structuration initiale de la synapse, les récepteurs AMPA ne venant se greffer que plus tardivement autour de ce point source de calcium.

Enfin, mes résultats montrent que les récepteurs mGluR5 étaient fortement mobiles, et peu clusterisés dans la synapse. Cette organisation est en partie contre-intuitive, sachant que les membres de la famille Homer forment l'échafaudage des mGluR5 au même titre que PSD-95 pour les AMPARs, je m'attendais à une structuration compacte des mGluR5 autour de la PSD. Nous devons bémoliser nos conclusions car nos expériences de mobilité portent sur des récepteurs surexprimés, pouvant donc favoriser le pool de récepteurs mobiles. Cependant, les expériences de dSTORM, bien que sur cellules fixées, sont réalisées sur des récepteurs endogènes et révèlent une distribution homogène et éparse des mGluR5, soutenant une absence de structuration de ces derniers au sein de la synapse.

Les mGluR5, de par leur rôle métabotropique, nécessitent peut-être une activation sur l'intégralité de la synapse par le glutamate environnant et non pas une activation fine au sein de la PSD. Afin de comprendre leur rôle précis à l'échelle moléculaire, il faudrait pouvoir suivre le produit de leur activation (sous-unités α, β et γ des protéines G) afin de déterminer la localisation de leur cible (diffuse ou concentrée).

Afin de répondre à ces questions, nous travaillons avec Tom Bartol et Terrence Sejnowski pour construire un modèle informatique prédictif et étudier le rôle de la co-organisation et de la mobilité des différents récepteurs au glutamate sur les cinétiques et l'amplitude de la réponse synaptique.

Cette co-organisation des récepteurs glutamatergiques au sein de la post-synapse permet de délivrer un signal (calcique, électrique, etc.) cohérent et interprétable par l'ensemble des protéines synaptiques afin d'avoir une régulation fine de la physiologie de la synapse. Nous pouvons alors nous demander quel peut être l'impact d'une altération de cette organisation structurale sur le fonctionnement synaptique. Pour répondre à cette question, je me suis intéressée à un modèle de trouble autistique basé sur la variation d'expression de la protéine d'échafaudage Shank3. L'utilisation de ce modèle révèle d'ores-et-déjà des modifications morphologiques des épines dendritiques dépendantes du niveau d'expression de Shank3. En effet, les épines dendritiques présentent un phénotype en « filopode » lorsque Shank3 est réprimé, alors qu'elles présentent une morphologie de type « mushroom » lorsque Shank3 est surexprimé. De plus, les résultats préliminaires des expériences de dSTORM montrent une augmentation de la quantité des récepteurs NMDA et une diminution des récepteurs mGluR5 dans les synapses lorsque l'on diminue le taux d'expression de Shank3.

Concomitamment, une augmentation de l'expression de Shank3 entraine seulement une augmentation de la quantité des NMDARs synaptiques. Il est intéressant de constater que l'organisation des AMPARs reste inchangée pour l'ensemble des deux modèles, alors qu'une diminution significative des courants AMPA est observée lors de la répression de Shank3. Cet effet sur les courants AMPA a déjà été reporté et commenté dans la littérature. Même si les Shankopathies semblent affecter régulièrement la réponse synaptique rapide, ce n'est pas un effet reproductible en fonction des modèles et des synapses (IPSC, souris KO, cellules en culture, etc.), suggérant que la dérégulation des AMPARs n'est pas le facteur majoritaire responsable des syndromes autistiques liés à Shank3, mais peut-être plutôt un effet secondaire issu d'une altération de la physiologie (peut-être la maturation) synaptique.

Suite à ces premiers résultats, il est nécessaire de caractériser la co-organisation des récepteurs au glutamate dans ce modèle, afin de définir précisément l'impact d'une modification structurelle de la PSD sur leur organisation au sein de la synapse mais aussi vis-à-vis de la pré-synapse, afin d'en déduire la désorganisation fonctionnelle induite par ces modèle de troubles autistiques.

Par ailleurs, un des rôles supposés des récepteurs mGluR5 est de favoriser la maturation synaptique. La déplétion des récepteurs mGluR5 synaptiques observée lors de la diminution de l'expression de Shank3 pourrait expliquer l'apparent manque de maturité phénotypique de ces synapses. Afin de valider cette hypothèse, nous pourrions comparer des synapses immatures à des synapses ayant un niveau d'expression de Shank3 anormal, afin de comparer leurs propriétés quant à la composition de la densité post-synaptique et les propriétés d'organisation de leurs récepteurs glutamatergiques. De plus, à l'instar des expériences décrites dans Verpelli et al., 2011, nous pourrions forcer chimiquement l'activation des mGluR5 pour voir si leur suractivation est suffisante pour contrebalancer l'effet de la mutation sur la maturation synaptique. Même si cette étude sur les modèles de troubles du spectre autistique reste préliminaire, elle ouvre néanmoins des pistes de réflexion sur le rôle de la co-organisation et de la co-activation des récepteurs au glutamate dans un modèle autistique.

L'émergence des techniques de super-résolution, nous a donné accès à une nouvelle compréhension du fonctionnement intime de la synapse. Ces travaux se sont initialement focalisés sur le rôle de la nano-organisation des récepteurs AMPA et de sa protéine d'échafaudage principale PSD-95, afin de comprendre comment sa clusterisation et son

positionnement vis-à-vis des zones actives permettaient une optimisation de l'utilisation du glutamate (MacGillavry et al., 2013; Nair et al., 2013; Tang et al., 2016; Haas et al., 2018). A travers mes travaux de thèse, je me suis intéressée au positionnement des deux autres types majoritaires de récepteurs au glutamate, les NMDARs et les mGluRs. Il serait encore prématuré de dresser un schéma général d'activation de ces récepteurs car il reste de nombreuses inconnues, comme (i) la disponibilité des co-agonistes des NMDARs qui peut fortement réguler leur activation, (ii) les cinétiques de déplétion de glutamate autour de la synapse par les transporteurs, qui au vu de la distribution homogène des mGluRs, va déterminer leur niveau d'activation, (iii) la distribution des cibles des mGluRs, etc.

Il est intéressant de noter qu'en laboratoire, certaines réponses « physiologiques » comme la LTD peuvent être induites indifféremment par l'activation chimique soit des NMDARs soit des mGluRs. La large différence d'organisation moléculaire et de dynamique de ces deux types de récepteurs souligne leur incapacité, lors d'une libération physiologique de glutamate, de créer des réponses similaires. La base de mes travaux permettra donc de prédire, via un modèle informatique, les niveaux d'activation des différents récepteurs au glutamate en fonction du profil de décharge de la pré-synapse faisant face et de celles environnantes. Ces prédictions pourront enfin permettre à terme de comprendre l'impact de l'altération de la nano-organisation, lors de pathologies comme l'autisme, sur le fonctionnement synaptique.

BIBLIOGRAPHIE

Ady V, Perroy J, Tricoire L, Piochon C, Dadak S, Chen X, Dusart I, Fagni L, Lambolez B, Levenes C (2014) Type 1 metabotropic glutamate receptors (mGlu 1) trigger the gating of GluD 2 delta glutamate receptors. EMBO Rep 15:103–109.

Ango F, Robbe D, Tu JC, Xiao B, Worley PF, Pin J (2002) Homer-Dependent Cell Surface Expression Type 5 in Neurons. Mol Cell Neurosci 329:323–329.

Aoki C, Venkatesan C, Go C-G, Mong JA, Dawson TM (1994) Cellular and Subcellular localization of NMDA-R1 subunit immunoreactivity in the visual cortex of adult and neonatal rats. J Neurosci 14:5202–5222.

Armstrong N, Jasti J, Beich-frandsen M, Gouaux E (2006) Measurement of Conformational Changes accompanying Desensitization in an Ionotropic Glutamate Receptor. Cell 21:85–97.

Attwell D, Gibb A (2005) NEUROENERGETICS AND THE KINETIC DESIGN OF EXCITATORY SYNAPSES. Nat Rev Neurosci 6.

Banker GA, Cowan WM (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. Brain Res 126:342–397.

Bard L, Groc L (2011) Molecular and Cellular Neuroscience Glutamate receptor dynamics and protein interaction : Lessons from the NMDA receptor. Mol Cell Neurosci 48:298–307.

Bard L, Sainlos M, Bouchet D, Cousins S, Mikasova L, Breillat C, Stephenson FA, Imperiali B, Choquet D, Groc L (2010) Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. Proc Natl Acad Sci 107:19561–19566.

Bariselli S, Tzanoulinou S, Glangetas C, Prévost-Solié C, Pucci L, Viguié J, Bezzi P, O'Connor EC, Georges F, Lüscher C, Bellone C (2016) SHANK3 controls maturation of social reward circuits in the VTA. Nat Neurosci 19:926–934.

Barrow SL, Barrow SL, Constable JRL, Clark E, El-sabeawy F, Mcallister AK, Washbourne P (2009) Neuroligin1 : a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. Neural Dev.

Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. Neuron:719–734.

Bayer KU, Koninck P De, Leonard AS, Hell JW, Schulman H (2001) Learning by prototyping: A case study on explorative prototyping.

Bayer KU, LeBel E, McDonald G, O'Leary H, Schulman H, Koninck P De (2006) Transition from

Reversible to Persistent Binding of CaMKII to Postsynaptic Sites and NR2B. J Neurosci 26:1164–1174.

Bedoukian MA, Weeks AM, Partin KM (2006) Different Domains of the AMPA Receptor Direct Stargazin-mediated Trafficking and Stargazin-mediated Modulation of Kinetics * □. J Biol Chem 281:23908–23921.

Bellone C, Nicoll RA (2007) Rapid Bidirectional Switching of Synaptic NMDA Receptors. Neuron:779–785.

Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF (2006) Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. Science (80-) 313:1642–1645.

Bockaert J, Fagni L, Dumuis A, Marin P (2004) GPCR interacting proteins (GIP). Pharmacol Ther 103:203–221.

Boeckers TM, Winter C, Smalla K, Kreutz MR, Bockmann J, Seidenbecher C, Garner CC, Gundelfinger ED (1999) Proline-Rich Synapse-Associated Proteins ProSAP1 and ProSAP2 Interact with Synaptic Proteins of the SAPAP / GKAP Family. Biochem Biophys Res Commun 252:247–252.

Borgdorff AJ, Choquet D (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. Nature 417:649–653.

Chamma I, Levet F, Sibarita J-B, Sainlos M, Thoumine O (2016) Nanoscale organization of synaptic adhesion proteins revealed by single-molecule localization microscopy. Neurophotonics 3:041810.

Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Bredt DS, Nicoll RA (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. Nature 408.

Chen S, Zhao Y, Shekhar M, Gouaux E, Health O, Biology Q, Health O (2018) Activation and desensitization mechanism of AMPA-receptor-TARP complex by cryo-EM. Cell 170:1234–1246.

Chen X, Nelson CD, Li X, Winters CA, Azzam R, Sousa AA, Leapman RD, Gainer H, Sheng M, Thomas S (2011) PSD-95 is required to sustain the molecular organization of the postsynaptic density. J Neurosci 31:6329–6338.

Colquhoun BYD, Jonas P, Sakmann B (1992) Action of brief pulses of glutamate on AMPA/Kainate receptors in patches from different neurones of rat hippocampal slices. J

Physiol:261–287.

Coombs ID, Cull-Candy SG (2009) Transmembrane AMPA receptor regulatory proteins and AMPA receptor function in the cerebellum. Neuroscience 162:656–665.

Corlew R, Brasier DJ, Feldman DE, Philpot BD (2008) Presynaptic NMDA Receptors: Newly Appreciated Roles in Cortical Synaptic Function and Plasticity. Neuroscientist 14:609–625.

Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of Distinct NMDA Receptor Subtypes at Central Synapses. Sci Signal 2004:re16-re16.

Dadak S, Bouquier N, Goyet E, Fagni L, Levenes C, Perroy J (2017) Neuropharmacology mGlu1 receptor canonical signaling pathway contributes to the opening of the orphan GluD2 receptor. Neuropharmacology 115:92–99.

Doumazane E, Scholler P, Fabre L, Zwier JM, Trinquet E, Pin J-P, Rondard P (2013) Illuminating the activation mechanisms and allosteric properties of metabotropic glutamate receptors. Proc Natl Acad Sci 110:E1416–E1425.

Dupuis JP, Lad L, Mikasova L, Bouchet D (2014) Surface dynamics of GluN 2B-NMDA receptors controls plasticity of maturing glutamate synapses er o. EMBO J 33.

Dzubay JA, Jahr CE (1996) Kinetics of NMDA Channel Opening. J Neurosci 16:4129–4134.

El-husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM (2000) PSD-95 Involvement in Maturation of Excitatory Synapses. Science (80-) 290:1364–1369.

El-husseini AE, Schnell E, Dakoji S, Sweeney N, Zhou Q, Prange O, Gauthier-campbell C, Aguilera-moreno A, Nicoll RA, Bredt DS, Francisco S (2002) Synaptic Strength Regulated by Palmitate Cycling on PSD-95 University of California at San Francisco. Cell 108:849–863.

Elias GM, Funke L, Stein V, Grant SG, Bredt DS, Nicoll RA (2006) Synapse-Specific and Developmentally Regulated Targeting of AMPA Receptors by a Family of MAGUK Scaffolding Proteins. Neuron:307–320.

Engelman HS, MacDermott AB (2004) Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release. Nat Rev Neurosci 5:135–145.

Esteban A, Greger IH (2007) AMPA receptor biogenesis and trafficking. Curr Opin Neurobiol:17:289-297.

Fagni L, Ango F, Perroy J, Bockaert J (2004) Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. Semin Cell Dev Biol 15:289–298.

Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J (2000) Complex interactions between mGluRs , intracellular Ca 2 ⍰ stores and ion channels in neurons. Trends Neurosci 2236.

Feng W, Zhang M (2009) Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. Nat Rev Neurosci 10:87–99.

Ferraguti F, Shigemoto R (2006) Metabotropic glutamate receptors. Cell Tissue Res:483–504.

Francesconi A, Duvoisin RM (1998) Role of the Second and Third Intracellular Loops of Metabotropic Glutamate Receptors in Mediating Dual Signal Transduction Activation * main appeared to be critical for the coupling to phos-. J Biol Chem 273:5615–5624.

Fukata Y, Dimitrov A, Boncompain G, Vielemeyer O, Perez F, Fukata M (2013) Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. J Cell Biol 202:145–161.

Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. Nature 438:185–192.

Giannone G, Hosy E, Levet F, Constals A, Schulze K, Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E, Tampe R, Choquet D, Cognet L (2010) Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. Biophys J 99:1303–1310.

Gladding CM, Raymond LA (2011) Molecular and Cellular Neuroscience Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic / extrasynaptic distribution and function. Mol Cell Neurosci 48:308–320.

Gomeza J, Joly C, Kuhn R, Kno T, Bockaert J, Pin J (1996) The Second Intracellular Loop of Metabotropic Glutamate Receptor 1 Cooperates with the Other Intracellular Domains to Control Coupling to G-proteins *. J Biol Chem 271:2199–2205.

Greger IH, Watson JF, Cull-Candy SG (2017) Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. Neuron 94:713–730.

Groc L, Bard L, Choquet D (2009) Surface trafficking of N-methyl-d-aspartate receptors: Physiological and pathological perspectives. Neuroscience 158:4–18.

Groc L, Choquet D, Stephenson FA, Manzoni OJ, Chavis P (2007) NMDA Receptor Surface Trafficking and Synaptic Subunit Composition Are Developmentally Regulated by the Extracellular Matrix Protein Reelin. J Neurosci 27:10165–10175.

Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D (2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. Nat Neurosci 7:695–696.

Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, Cognet L, Choquet D (2006) NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. Proc Natl Acad Sci 103.

Guhan N, Lu B (2004) Homer – PIKE complex : a novel link between mGluRI and PI 3-kinase. Trends Neurosci 27:11–14.

Gustin RM, Shonesy BC, Robinson SL, Rentz TJ, Anthony J, Ii B, Jalan-sakrikar N, Winder DG, Stanwood GD, Roger J (2011) Loss of Thr286 phosphorylation disrupts synaptic CaMKIIα targeting, NMDAR activity and behavior in pre-adolescent mice. Mol Cell Neurosci 47:286–292.

Haas KT, Compans B, Letellier M, Bartol TM, Grillo-Bosch D, Sejnowski TJ, Sainlos M, Choquet D, Thoumine O, Hosy E (2018) Pre-post synaptic alignment through neuroligin-1 tunes synaptic transmission efficiency. Elife 7:1–22.

Hall RA, Premont RT, Lefkowitz RJ (1999) Hetahelical receptor signaling: Beyond the G protein paradigm. J Cell Biol 145:927–932.

Hansen KB, Yi F, Perszyk RE, Furukawa H, Wollmuth LP, Gibb AJ, Traynelis SF (2018) Structure , function , and allosteric modulation of NMDA receptors. J Gen Physiol 150.

Harris AZ, Pettit DL (2007) Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. J Physiol 584:509–519.

Harris KM, Weinberg RJ, Verrall AW (2012) Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain. Cold Spring Harb Lab Press.

Havlickova M, Blahos J, Brabet I, Liu J, Hruskova B (2003) The Second Intracellular Loop of Metabotropic Glutamate Receptors Recognizes C Termini of G-protein ␣ -Subunits *. J Biol Chem 278:35063–35070.

Hayashi MK, Ames HM, Hayashi Y (2006) Tetrameric Hub Structure of Postsynaptic Scaffolding Protein Homer. J Neurosci 26:8492–8501.

Heine M, Groc L, Frischknecht R, Béïque J, Rumbaugh G, Huganir RL, Cognet L, Choquet D (2008) Surface Mobility of Postsynaptic AMPARs Tunes Synaptic Transmission. Science (80-) 320:201–205.

Henson MA, Roberts AC, Pérez-Otaño I, Philpot BD (2010) Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. Prog Neurobiol 91:23–37.

Hirao K, Hata Y, Ide N, Takeuchi M, Irie M, Yao I, Deguchi M, Toyoda A, Sudhof TC, Takai Y (1998) A Novel Multiple PDZ Domain-containing Molecule Interacting with N -Methyl- D -aspartate Receptors and Neuronal Cell Adhesion Proteins *. J Biol Chem 273:21105–

21110.

Hruska M, Henderson N, Le Marchand SJ, Jafri H, Dalva MB (2018) Synaptic nanomodules underlie the organization and plasticity of spine synapses. Nat Neurosci 21:671–682.

Inamura M, Itakura M, Okamoto H, Hoka S (2006) Differential localization and regulation of stargazin-like protein , g -8 and stargazin in the plasma membrane of hippocampal and cortical neurons. Neurosci Res 55:45–53.

Izeddin I, Boulanger J, Racine V, Specht CG, Kechkar A, Nair D, Triller A, Choquet D, Dahan M, Sibarita JB (2012) Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. Opt Express 20:2081.

Jardin I, Lopez J, Berna-erro A, Salido GM, Rosado JA (2013) Critical Review Homer Proteins in Ca2+ Entry. Int Union Biochem Mol Biol:497–504.

Jingami H, Nakanishi S, Morikawa K (2003) Structure of the metabotropic glutamate receptor. Curr Opin Chem Biol:271–278.

Kaech S, Banker G (2006) Culturing hippocampal neurons. Nat Protoc 1:2406–2415.

Kammermeier PJ (2010) C-terminal deletion of metabotropic glutamate receptor 1 selectively abolishes coupling to G α q. Eur J Pharmacol 627:63–68.

Karakas E, Furukawa H (2014) Crystal structure ofa heterotetrameric NMDA receptor ion channel. Science (80-) 344:992–998.

Kato AS, Gill MB, Yu H, Nisenbaum ES, Bredt DS (2010) TARPs differentially decorate AMPA receptors to specify neuropharmacology. Trends Neurosci 33:241–248.

Kawabe H, Hata Y, Takeuchi M, Ide N, Mizoguchi A, Takai Y (1999) nArgBP2 , a Novel Neural Member of Ponsin / ArgBP2 / Vinexin Family That Interacts with Synapse-associated Protein 90 / Postsynaptic Density-95-associated Protein (SAPAP)*. J Biol Chem 274:30914–30918.

Kellermayer B, Ferreira JS, Dupuis J, Levet F, Grillo-Bosch D, Bard L, Linarès-Loyez J, Bouchet D, Choquet D, Rusakov DA, Bon P, Sibarita J-B, Cognet L, Sainlos M, Carvalho AL, Groc L (2018) Differential Nanoscale Topography and Functional Role of GluN2-NMDA Receptor Subtypes at Glutamatergic Synapses. Neuron:106–119.

Kim E, Naisbitt S, Hsueh Y, Rao A, Rothschild A, Craig AM, Sheng M (1997) GKAP, a Novel Synaptic Protein That Interacts with the Guanylate Kinase-like Domain of the PSD-95/SAP90 Family of Channel Clustering Molecules. J Cell Biol 136:669–678.

Kitano J, Kimura K, Yamazaki Y, Soda T, Shigemoto R, Nakajima Y (2002) Tamalin , a PDZ

Domain-Containing Protein , Links a Protein Complex Formation of Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors and the Guanine Nucleotide Exchange Factor Cytohesins. J Neurosci 22:1280–1289.

Köhr G (2006) NMDA receptor function: Subunit composition versus spatial distribution. Cell Tissue Res 326:439–446.

Korogod N, Petersen CCH, Knott GW (2015) Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation. Elife:1–17.

Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. Nature:971–977.

Kuriu T, Inoue A, Bito H, Sobue K, Okabe S (2006) Differential Control of Postsynaptic Density Scaffolds via Actin-Dependent and -Independent Mechanisms. J Neurosci 26:7693–7706.

Ladepeche L, Dupuis JP, Bouchet D, Doudnikoff E, Yang L, Campagne Y, Bezard E, Hosy E, Groc L (2013) Single-molecule imaging of the functional crosstalk between surface NMDA and dopamine D1 receptors. Proc Natl Acad Sci 110:18005–18010.

Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. Nat Rev Neurosci 8:413–426.

Lee C-H, Lü W, Michel JC, Goehring A, Du J, Song X, Gouaux E (2014) NMDA receptor strcutures reveal subunit arrangement and pore architecture. Nature 511:191–197.

Leonard AS, Bayer K, Merrill MA, Lim IA, Shea MA, Schulman H, Hell JW, Neurosci TN (2002) Regulation of Calcium / Calmodulin-dependent Protein Kinase II Docking to N -Methyl- D -aspartate Receptors by Calcium / Calmodulin and ⌴ -Actinin *. J Biol Chem 277:48441–48448.

Levet F, Hosy E, Kechkar A, Butler C, Beghin A, Choquet D, Sibarita JB (2015) SR-Tesseler: A method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. Nat Methods 12:1065–1071.

Levy JM, Chen X, Reese TS, Nicoll RA (2015) Synaptic Consolidation Normalizes AMPAR Quantal Size following MAGUK Loss. Neuron 87:534–548.

Li JH, Wang YH, Wolfe BB, Krueger KE, Corsi L, Stocca G, Vicini S (1998) Developmental changes in localization of NMDA receptor subunits in primary cultures of cortical neurons. Eur J Neurosci 10:1704–1715.

Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) THE MOLECULAR BASIS OF CaMKII FUNCTION IN

SYNAPTIC AND BEHAVIOURAL MEMORY. Nat Rev Neurosci 3.

Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S (2012) Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. Nat Rev Neurosci.

Lisman JE, Raghavachari S, Tsien RW (2007) The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. Nat Rev Neurosci 8:597–609.

Liu G, Choi S, Tsien RW (1999) Variability of Neurotransmitter Concentration and Nonsaturation of Postsynaptic AMPA Receptors at Synapses in Hippocampal Cultures and Slices. Neuron 17:4143–4150.

Lodge D (2009) Neuropharmacology The history of the pharmacology and cloning of ionotropic glutamate receptors and the development of idiosyncratic nomenclature. Neuropharmacology 56:6–21.

Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Kiihr G, Herb A, Seeburg PH, Wisden W (1993) The rat delta-l and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family IQCK s GFFRHRPaPNA. Fed Eur Biochem Soc 315:318–322.

Low C, Wee KS (2010) New Insights into the Not-So-New NR3 Subunits of N -Methyl- D -aspartate Receptor : Localization , Structure , and Function. Mol Pharmacol 78:1–11.

Lucchesi W, Mizuno K, Giese KP (2011) Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. Brain Res Bull 85:2–8.

Lujan R, Somogyi P (1996) Perisynaptic Location of Metabot ropic GI utamate Receptors mGluR1 and mGluR5 on Dendrites and Dendritic Spines in the Rat Hippocampus. Eur J Neurosci 8:1488–1500.

MacGillavry HD, Song Y, Raghavachari S, Blanpied TA (2013) Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic AMPA receptors. Neuron.

Madry C, Mesic I, Betz H, Laube B (2007) The N-Terminal Domains of both NR1 and NR2 Subunits Determine Allosteric Zn 2 ƨ Inhibition and Glycine Affinity of N -Methyl- D -aspartate Receptors. Mol Pharmacol 72:1535–1544.

Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, Wada K (1995) Functional Comparison of D-Serine and Glycine in Rodents : The Effect on Cloned NMDA Receptors and the Extracellular Concentration. J Neurochem.

Mayer ML (2006) Glutamate receptors at atomic resolution. Nature 440:456–462.

Merrill MA, Chen Y, Strack S, Hell JW (2005) Activity-driven postsynaptic translocation of CaMKII. Trends Pharmacol Sci 26.

Merrill MA, Malik Z, Akyol Z, Bartos JA, Leonard AS, Hudmon A, Shea MA, Hell JW (2007) DISPLACEMENT OF α-ACTININ FROM THE NMDA RECEPTOR NR1 C0 DOMAIN BY Ca2+ /CALMODULIN PROMOTES CAMKII BINDING. Biochemistry 46:8485–8497.

Milstein AD, Nicoll RA (2008) Regulation of AMPA receptor gating and pharmacology by TARP auxiliary subunits. Trends Pharmacol Sci 29:1–13.

Møller TC, Hottin J, Clerté C, Zwier JM, Durroux T, Rondard P, Prézeau L, Royer CA, Pin JP, Margeat E, Kniazeff J (2018) Oligomerization of a G protein-coupled receptor in neurons controlled by its structural dynamics. Sci Rep 8:1–15.

Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. Nature 354.

Muto T, Tsuchiya D, Morikawa K, Jingami H (2007) Structures of the extracellular regions of the group II / III metabotropic glutamate receptors. Proc Natl Acad Sci 104:3759–3764.

Nair D, Hosy E, Petersen JD, Constals A, Giannone G, Choquet D, Sibarita J-B (2013) Super-Resolution Imaging Reveals That AMPA Receptors Inside Synapses Are Dynamically Organized in Nanodomains Regulated by PSD95. J Neurosci 33:13204–13224.

Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M, Hughes H, Hill C, Carolina N (1999) Shank , a Novel Family of Postsynaptic Density Proteins that Binds to the NMDA Receptor / PSD-95 / GKAP Complex and Cortactin University of North Carolina at Chapel Hill. Neuron 23:569–582.

Naisbitt S, Valtschanoff J, Allison DW, Sala C, Kim E, Craig AM, Weinberg RJ, Sheng M (2000) Interaction of the Postsynaptic Density-95 / Guanylate Kinase Domain-Associated Protein Complex with a Light Chain of Myosin-V and Dynein. J Neurosci 20:4524–4534.

Nakagawa T, Futai K, Lashuel HA, Lo I, Okamoto K, Walz T, Hayashi Y, Sheng M (2004) Quaternary Structure , Protein Dynamics , and Synaptic Function of SAP97 Controlled by L27 Domain Interactions. Neuron 44:453–467.

Nakanishi S (1994) Metabotropic Glutamate Receptors : Synaptic Transmission , Modulation , and Plasticity Minireview. Neuron 13:1031–1037.

Nelson CD, Kim MJ, Hsin H, Chen Y, Sheng M (2013) Phosphorylation of Threonine-19 of PSD-95 by GSK-3 $^{N}_{L}$ is Required for PSD-95 Mobilization and Long-Term Depression. J Neurosci 33:12122–12135.

Nicoll RA, Tomita S, Bredt DS (2006) Auxiliary Subunits Assist AMPA-Type. Science (80-):1253–

1257.

Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol:295–322.

Okabe S (2007) Molecular anatomy of the postsynaptic density. Mol Cell Neurosci 34:503–518.

Olofsson L, Felekyan S, Doumazane E, Scholler P, Fabre L, Zwier JM, Rondard P, Seidel CAM, Pin JP, Margeat E (2014) Fine tuning of sub-millisecond conformational dynamics controls metabotropic glutamate receptors agonist efficacy. Nat Commun 5:1–12.

Opazo P, Choquet D (2011) Molecular and Cellular Neuroscience A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors. Mol Cell Neurosci 46:1–8.

Opazo P, Sainlos M, Choquet D (2012) Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. Curr Opin Neurobiol 22:453–460.

Otmakhov N, Carpenter S, Asrican B, Dosemeci A, Reese TS, Lisman J (2004) Persistent Accumulation of Calcium / Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Dendritic Spines after Induction of NMDA Receptor-Dependent Chemical Long-Term Potentiation. J Neurosci 24:9324–9331.

Paoletti P (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. Eur J Neurosci 33:1351–1365.

Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. Nat Rev Neurosci 14:383–400.

Petralia RS, Sans N, Wang Y, Wenthold RJ (2005) Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. Mol Cell Neurosci 29:436–452.

Petralia RS, Wang Y, Hua F, Yi Z, Zhou A, Ge L, Stephenson FA, Wenthold RJ (2010) ORGANIZATION OF NMDA RECEPTORS AT EXTRASYNAPTIC LOCATIONS. Neuroscience 167:37–41.

Phelan MC, Curtis Rogers R, Saul RA, Stapleton GA, Sweet K, McDermid H, Shaw SR, Claytor J, Willis J, Kelly DP (2001) Research review: 22q13 deletion syndrome. Am J Med Genet 101:91–99.

Pin J, Duvoisin RM (1995) The metabotropic glutamate receptors : structure and functions. Neuropharmacology 34.

Pin JP, Bettler B (2016) Organization and functions of mGlu and GABA B receptor complexes. Nature 540:60–68.

Pinheiro PS, Mulle C (2008) Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. Nat Rev Neurosci 9:423–436.

Priestley T, Laughton P, Myers J, Le Bourdellés B, Kerby J, Whiting PJ (1995) Pharmacological Properties of Recombinant Human N-Methyl- Receptors Comprising NR1 a / NR2A and NR1 a / NR2B Subunit Assemblies Expressed in Permanently Transfected Mouse Fibroblast. Am Soc Pharmacol Exp Ther.

Rachline J, Perin-dureau F, Goff A Le, Neyton J, Paoletti P (2005) The Micromolar Zinc-Binding Domain on the NMDA Receptor Subunit NR2B. J Neurosci 25:308–317.

Raghavachari S, Lisman JE (2004) Properties of Quantal Transmission at CA1 Synapses. J Neurophysiol:2456–2467.

Rao A, Kim E, Sheng M, Craig AM (1998) Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. J Neurosci 18:1217–1229.

Raynaud F, Janossy A, Dahl J, Bertaso F, Perroy J, Varrault A, Vidal M, Worley PF, Boeckers TM, Marin P, Fagni L, Homburger V (2013) Shank3-Rich2 Interaction Regulates AMPA Receptor Recycling and Synaptic Long-Term Potentiation. J Neurosci 33:9699–9715.

Robison AJ, Bartlett RK, Bass MA, Colbran RJ (2005) Differential modulation of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II activity by regulated interactions with N-methyl-D-aspartate receptor NR2B subunits and ??-actinin. J Biol Chem 280:39316–39323.

Rodríguez-Moreno A, Banerjee A, Paulsen O (2010) Presynaptic NMDA receptors and spike timing-dependent depression at cortical synapses. Front Synaptic Neurosci 2:1–6.

Romano C, Miller JK, Hyrc K, Dikranian S, Mennerick S, Takeuchi Y, Goldberg MP, Malley KLO, Ophthalmology D, R VSC, Neurobiology CR, Neurology KH (2001) Covalent and Noncovalent Interactions Mediate Metabotropic Glutamate Receptor mGlu 5 Dimerization. Mol Pharmacol 59:46–53.

Romano C, Yang W-L, O'Malley KL (1996) Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Disulfide-linked Dimer *. J Biol Chem 271:28612–28616.

Romorini S (2004) A Functional Role of Postsynaptic Density-95-Guanylate Kinase-Associated Protein Complex in Regulating Shank Assembly and Stability to Synapses. J Neurosci 24:9391–9404.

Rondard P, Liu J, Huang S, Malhaire F, Vol C, Pinault A, Labesse G, Pin J (2006) Coupling of

Agonist Binding to Effector Domain Activation in Metabotropic Glutamate-like Receptors. J Biol Chem 281:24653–24661.

Roussignol G, Ango F, Romorini S, Tu JC, Sala C, Worley PF (2005) Shank Expression Is Sufficient to Induce Functional Dendritic Spine Synapses in Aspiny Neurons. J Neurosci 25:3560–3570.

Sabio G, Arthur JSC, Kuma Y, Peggie M, Carr J, Murray-Tait V, Centeno F, Goedert M, Morrice NA, Cuenda A (2005) p38γ regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. EMBO J 24:1134–1145.

Sager C, Tapken D, Kott S, Hollmann M (2009) Functional modulation of AMPA receptors by transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. Neuroscience 158:45–54.

Sainlos M, Tigaret C, Poujol C, Olivier NB, Bard L, Breillat C, Thiolon K, Choquet D, Imperiali B (2011) Biomimetic divalent ligands for the acute disruption of synaptic AMPAR stabilization. Nat Chem Biol 7:81–91.

Sala C, Pie V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M (2001) Regulation of Dendritic Spine Morphology and Synaptic Function by Shank and Homer. Neuron 31:115–130.

Sala C, Roussignol G, Meldolesi J, Fagni L (2005) Key Role of the Postsynaptic Density Scaffold Proteins Shank and Homer in the Functional Architecture of Ca 2 ƨ Homeostasis at Dendritic Spines in Hippocampal Neurons. J Neurosci 25:4587–4592.

Savtchenko LP, Rusakov DA (2013) Moderate AMPA receptor clustering on the nanoscale can efficiently potentiate synaptic current. Philos Trans R Soc.

Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative Ultrastructural Analysis of Hippocampal Excitatory Synapses. J Comp Neurol 17:5858–5867.

Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Bredt DS, Nicoll RA (2002) Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. Proc Natl Acad Sci:1–2.

Sergé A, Fourgeaud L, Hémar A, Choquet D (2002) Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. J Neurosci 22:3910–3920.

Sharma K, Fong DK, Marie A (2006) Postsynaptic protein mobility in dendritic spines : Long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. Mol Cell Neurosci 31:702–712.

Sharonov A, Hochstrasser RM (2006) Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. Proc Natl Acad Sci 103:18911–18916.

Shcheglovitov A, Shcheglovitova O, Yazawa M, Portmann T, Shu R, Sebastiano V, Krawisz A, Froehlich W, Bernstein JA, Hallmayer JF, Dolmetsch RE (2013) SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. Nature 503:267–271.

Shen K, Meyer T (1999) Dynamic Control of CaMKII Translocation and Localization in Hippocampal Neurons by NMDA Receptor Stimulation. Science (80-) 284:162–167.

Sheng M, Kim E (2011) The Postsynaptic Organization of Synapses. Cold Spring Harb Lab Press:1–20.

Shrivastava AN, Kowalewski JM, Renner M, Bousset L, Koulakoff A, Melki R, Giaume C, Triller A (2013) β-amyloid and ATP-induced diffusional trapping of astrocyte and neuronal metabotropic glutamate type-5 receptors. Glia 61:1673–1686.

Simeone TA, Sanchez RM, Rho JM (2004) Molecular biology and ontogeny of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in the mammalian central nervous system. J Child Neurol 18.

Soren Leonard A, Lim IA, Hemworth DE, Horne MC, Hell JW (1999) Calcium /calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D -aspartate receptor. Proc Natl Acad Sci 96:3239–3244.

Strack S, Colbran RJ (1998) Targeting of Calcium / Calmodulin-dependent Protein Kinase II by the NR2B Subunit of the N -Methyl- D -aspartate Receptor *. J Biol Chem:20689–20693.

Strack S, McNeill RB, Colbran RJ (2000) Mechanism and Regulation of Calcium / Calmodulin-dependent Protein Kinase II Targeting to the NR2B Subunit of the N -Methyl- D -aspartate Receptor *. J Biol Chem 275:23798–23806.

Sugi T, Oyama T, Nakanishi S, Jingami H (2007) Crystal structures of autoinhibitory PDZ domain of Tamalin : implications for metabotropic glutamate receptor trafficking regulation. EMBO J 26:2192–2205.

Sumioka A, Dan Y, Tomita S (2010) TARP phosphorylation regulates synaptic AMPA receptors through lipid bilayers. Neuron 8:4017–4018.

Takahashi K, Tsuchidas K, Tanabe Y, Masu M, Nakanishig S (1993) Role of the Large Extracellular Domain of Metabotropic Glutamate Receptors in Agonist Selectivity Determination *. J Biol Chem 268:19341–19345.

Takeuchi M, Hata Y, Hirao K, Toyoda A, Irie M, Takai Y (1997) SAPAPs : A FAMILY OF PSD-95/SAP90-ASSOCIATED PROTEINS LOCALIZED AT POSTSYNAPTIC DENSITY. J Biol Chem

272:11943–11951.

Tang AH, Chen H, Li TP, Metzbower SR, MacGillavry HD, Blanpied TA (2016) A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. Nature 536:210–214.

Tovar KR, Westbrook GL (2002) Mobile NMDA Receptors at Hippocampal Synapses. Neuron 34:255–264.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain C, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. Pharmacol Rev 264:2753–2757.

Tsuchiya D, Kunishima N, Kamiya N, Jingami H, Morikawa K (2002) Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd 3 . Proc Natl Acad Sci.

Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, Doan A, Aakalu VK, Lanahan AA, Sheng M, Worley PF (1999) Coupling of mGluR / Homer and PSD-95 Complexes by the Shank Family of Postsynaptic Density Proteins. Neuron 23:583–592.

Twomey EC, Yelshanskaya M V, Grassucci RA, Frank J, Sobolevsky AI (2017) Channel opening and gating mechanism in AMPA-subtype glutamate receptors. Nature 15:34–48.

Tzingounis A V, Nicoll RA (2004) Presynaptic NMDA receptors get into the act. Nat Neurosci 7:419–420.

Uchino S, Wada H, Honda S, Nakamura Y, Ondo Y, Uchiyama T, Tsutsumi M, Suzuki E, Hirasawa T, Kohsaka S (2006) Direct interaction of post-synaptic density-95 / Dlg / ZO-1 domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 a -amino- 3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor. J Neurochem:1203–1214.

Vafabakhsh R, Levitz J, Isacoff EY (2015) Conformational dynamics of a class C G-protein-coupled receptor. Nature 524:497–501.

Valtschanoff JG, Weinberg RJ (2001) Laminar Organization of the NMDA Receptor Complex within the Postsynaptic Density. J Neurosci 21:1211–1217.

Van De Linde S, Löschberger A, Klein T, Heidbreder M, Wolter S, Heilemann M, Sauer M (2011) Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. Nat Protoc 6:991–1009.

Verpelli C, Dvoretskova E, Vicidomini C, Rossi F, Chiappalone M, Schoen M, Stefano B Di, Mantegazza R, Broccoli V, Bo TM, Dityatev A, Sala C (2011) Importance of Shank3 Protein in Regulating Metabotropic Glutamate Receptor 5 (mGluR5) Expression and Signaling

at. J Biol Chem 286:34839–34850.

Walker AS, Neves G, Grillo F, Jackson RE, Rigby M, O'Donnell C, Lowe AS, Vizcay-Barrena G, Fleck RA, Burrone J (2017) Distance-dependent gradient in NMDAR-driven spine calcium signals along tapering dendrites. Proc Natl Acad Sci 114:E1986–E1995.

Wang C, Held RG, Chang S, Yang L, Delpire E, Ghosh A, Hall BJ (2011) A Critical Role for GluN2B-Containing NMDA Receptors in Cortical Development and Function. Neuron 72:789–805.

Wang H, Westin L, Nong Y, Birnbaum S, Bendor J, Nestler E, Aperia A, Flajolet M, Greengard P (2009) Norbin is an endogenous regulator of metabotropic glutamate receptor 5 signaling. Science (80-) 326:1554–1557.

Woods GF, Oh WC, Boudewyn LC, Mikula SK, Zito K (2011) Loss of PSD-95 Enrichment is not a Prerequisite for Spine Retraction. J Neurosci 31:12129–12138.

Wu H, Wang C, Gregory KJ (2014) Structure of a Class C GPCR Metabotropic Glutamate Receptor 1 Bound to an Allosteric Modulator. Science (80-) Available at: http://www.sciencemag.org/content/317/5834/94.short%5Cnhttp://www.sciencemag.org/content/317/5834/94.full.pdf.

Yamazaki M, Ohno-Shosaku T, Fukaya M, Kano M, Watanabe M, Sakimura K (2004) A novel action of stargazin as an enhancer of AMPA receptor activity. Neurosci Res 50:369–374.

Yao I, Hata Y, Hirao K, Deguchi M, Ide N, Takeuchi M, Takai Y (1999) Synamon , a Novel Neuronal Protein Interacting with Synapse- associated Protein 90 / Postsynaptic Density-95-associated Protein. J Biol Chem 274:27463–27466.

Zhang JUN, Diamond JS (2006) Distinct Perisynaptic and Synaptic Localization of NMDA and AMPA Receptors on Ganglion Cells. J Comp Neurol 820:810–820.

Zitzer H, Hönck H-H, Bächner D, Richter D, Kreienkamp H-J (1999) Somatostatin Receptor Interacting Protein Defines a Novel Family of Multidomain Proteins Present in Human and Rodent Brain. J Biol Chem 274:32997–33001.