



**HAL**  
open science

# Transport intracellulaire des récepteurs AMPA et régulation par leurs protéines associées

Caroline Bonnet

► **To cite this version:**

Caroline Bonnet. Transport intracellulaire des récepteurs AMPA et régulation par leurs protéines associées. Neurosciences. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0208 . tel-03412706v1

**HAL Id: tel-03412706**

**<https://theses.hal.science/tel-03412706v1>**

Submitted on 3 Nov 2021 (v1), last revised 3 Nov 2021 (v2)

**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.

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 **Caroline BONNET**

**Transport intracellulaire des récepteurs AMPA et régulation  
par leurs protéines associées**

Sous la direction de : Dr. Françoise COUSSEN

Soutenue le 16 Septembre 2021

**Membres du jury :**

|                       |                                  |                     |
|-----------------------|----------------------------------|---------------------|
| Dr. Nathalie SANS     | Directrice de recherche – INSERM | Présidente          |
| Dr. Julie PERROY      | Directrice de recherche – CNRS   | Rapportrice         |
| Dr. Cyril HANUS       | Chargé de recherche – CNRS       | Rapporteur          |
| Dr. Françoise COUSSEN | Directrice de recherche – CNRS   | Directrice de thèse |
| Dr. Éric BOUÉ-GRABOT  | Directeur de recherche – CNRS    | Invité              |



---

## **Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS)**

Université de Bordeaux

CNRS – UMR 5297

Equipe : Dynamique de l'organisation et des fonctions synaptiques

Centre Broca Nouvelle-Aquitaine

146, rue Léo Saignat

33076 Bordeaux

---



## Résumé

L'apprentissage et la mémoire se fondent sur les événements de plasticité synaptique lors desquels le neurone module l'efficacité de la transmission synaptique. Ces événements nécessitent un contrôle spatial et temporel strict du nombre de récepteurs AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate : AMPAR) à la membrane plasmique (MP) post-synaptique et plus particulièrement à la synapse. Ce contrôle est un réel challenge pour les neurones chez lesquels une synapse peut être localisée à des centaines de micromètres du corps cellulaire et du noyau où les gènes sont transcrits. Le trafic et la localisation des AMPAR sont assurés par une coopération complexe entre différents mécanismes : le transport intracellulaire (TI) des récepteurs néosynthétisés jusqu'à la MP, leur diffusion membranaire et stabilisation à la post-synapse ou leur recyclage lors duquel les récepteurs sont endocytés puis réinsérés à la MP ou dégradés. Le TI des récepteurs néosynthétisés concerne tous les récepteurs et est un contributeur important de l'augmentation du nombre de récepteurs à la synapse observée lors de la potentialisation à long terme (Long term potentiation : LTP). Les récepteurs mûrent dans les compartiments de la voie de sécrétion et sont ensuite transportés dans des vésicules jusqu'à la MP. Le TI est très peu étudié car il est composé de petites vésicules rapides de faible contraste, impossibles à distinguer de celles contenant les récepteurs recyclés. Grâce à un outil moléculaire permettant la rétention des AMPAR dans le réticulum endoplasmique combiné à la vidéo-microscopie, notre laboratoire a montré que le TI de GluA1 possède des caractéristiques stables en conditions basales. Ce TI est régulé par la concentration de  $Ca^{2+}$  qui varie après l'induction de la LTP comme lors de la phase tardive où le nombre de vésicules et leur vitesse sont augmentées. Il est également modulé par des mutations ponctuelles au niveau du domaine C-terminal (CTD) des AMPAR.

Notre objectif était d'éclaircir les mécanismes moléculaires qui régissent cette régulation. Les AMPAR possèdent beaucoup d'interacteurs protéiques dont leurs protéines auxiliaires, des protéines transmembranaires qui modulent leurs propriétés et leur trafic. Gamma8, la protéine auxiliaire la plus abondante de l'hippocampe, a un rôle majeur pour l'expression de la LTP. Le TI que nous avons observé dans des neurones de souris Gamma8-KO est diminué par rapport au WT avec un nombre de vésicules et des vitesses diminués alors que le temps passé en pause est augmenté. Nos données suggèrent donc que Gamma8 participe au TI de GluA1.

Les AMPAR interagissent également avec des protéines cytosoliques par le biais de leur CTD. GluA1 possède deux interacteurs cytosoliques connus : 4.1N et SAP97. L'interaction avec 4.1N est régie par deux phosphorylations. 4.1N est impliquée dans l'exocytose des récepteurs en particulier lors de la LTP. SAP97 est impliquée dans la sortie de l'appareil de Golgi et sert d'adaptateur au moteur moléculaire MyoVI. En plus de son rôle dans l'exocytose, nos données suggèrent que 4.1N régule le TI de GluA1 lors de la LTP mais pas en conditions basales. En effet, après l'induction, le TI du mutant S816A S818A qui ne lie pas 4.1N a des vitesses réduites. A l'inverse, SAP97 régule le TI en conditions basales en contrôlant le nombre de vésicules bourgeonnant de l'appareil de Golgi et en modulant la vitesse des vésicules, une régulation qui pourrait être maintenue après l'induction de la LTP.

Les AMPAR majoritaires sont des hétéromères composés des sous-unités GluA1 et GluA2. Le TI de la sous-unité GluA2 que nous avons observé a les mêmes caractéristiques que celui de GluA1. GluA2 est liée à d'autres interacteurs qui pourraient moduler le TI lors de l'activité mais leurs effets restent à déterminer. Nous proposons donc que le TI des AMPAR est très fortement modulé par leurs protéines auxiliaires et les interactions de leur CTD avec des protéines cytosoliques.

**Mots-clefs :** récepteurs AMPA, plasticité synaptique, vidéo-microscopie, transport intracellulaire



## Abstract

Learning and memory rely on synaptic plasticity events during which the neuron modulates the efficiency of synaptic transmission. These events require a strict spatial and temporal control of the number of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors (AMPA) at the post-synaptic plasma membrane (PM), and more importantly at the synapse. This control is a challenge for neurons in which the synapse can be localized hundreds of micrometers away from the cell body and the nucleus where the genes are transcribed. The traffic and localization of AMPAR is ensured by a complex cooperation between different mechanisms: intracellular transport (IT) of neosynthesized receptors to the PM, their diffusion at the PM and stabilization at the post-synapse or their recycling during which receptors are endocytosed and degraded or inserted again at the PM. The IT of neosynthesized receptors is a major contributor in the increase of AMPAR observed at the synapse during long term potentiation (LTP). The receptors mature in the different compartments of the secretory pathway and are transported in vesicles to the PM. The IT is difficult to image as it is composed of fast small vesicles of low contrast and that are impossible to distinguish from those containing recycled receptors. Thanks to a molecular tool allowing the retention of AMPAR in the endoplasmic reticulum combined with video-microscopy, our lab showed that the IT of GluA1 has stable characteristics in basal conditions. This IT is regulated by the Ca<sup>2+</sup> concentration that varies after LTP induction, like in the late phase during which the number of vesicles and their speed are increased. It is also modulated by point-mutations of phosphorylation sites of AMPAR C-terminal domain (CTD).

Our objective was to provide insight in the molecular mechanisms that govern this regulation. AMPAR have many interactors, including auxiliary proteins, membrane proteins that modulate their properties and trafficking. Gamma8, the most abundant auxiliary protein of the hippocampus, has a major role for LTP expression. The IT we observed in Gamma8-KO mice neurons is decreased compared to the WT, both in terms of number of vesicles and speed, while the time they spent in pause is increased. Our data suggest that Gamma8 participates in GluA1 IT.

AMPA also interact with cytosolic proteins via their CTD. GluA1 has two known cytosolic interactors: 4.1N and SAP97. The interaction with 4.1N is governed by two phosphorylations. 4.1N is involved in the exocytosis of the receptor especially during LTP. SAP97 is involved in the exit of the Golgi apparatus and is associated with the molecular motor MyoVI. In addition of its role in exocytosis, our data suggest that 4.1N regulates GluA1 IT during LTP but not in basal conditions. Indeed, after LTP induction, the vesicles containing the S816A S818A mutant that doesn't bind 4.1N show decreased speeds. Conversely, SAP97 regulates the IT in basal conditions by controlling the number of vesicles budding from the Golgi apparatus and by modulating their speed, a regulation that could be maintained after LTP induction.

The most abundant AMPAR are GluA1/GluA2 heteromers. We characterized the IT of the GluA2 subunit and found that it exhibits the same characteristics as GluA1. GluA2 binds other proteins that might regulate the IT during activity, but their effect need to be determined. We propose that the IT of AMPAR is strongly modulated by its auxiliary proteins and cytosolic interactors of its CTD.

**Keywords :** AMPA receptors, synaptic plasticity, video-microscopy, intracellular transport





## Remerciements

*En premier lieu je tiens à remercier les membres de mon jury, les Dr. Julie Perroy, Dr. Cyril Hanus, Dr. Nathalie Sans et Dr. Eric Boué-Grabot d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.*

*Je souhaite remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, Françoise Coussen, dont j'ai le privilège d'être la dernière thésarde. Merci pour votre patience face à mes nombreuses questions et mes doutes. Merci pour votre optimisme qui savait remotiver votre mini-équipe composée de Justine Charpentier, Valeria Pecoraro et moi-même et qui a permis de mener cette thèse à son terme. Merci de votre disponibilité et merci de l'opportunité que vous m'avez offerte de participer à votre projet, d'abord en tant que stagiaire pour mon stage de Master 2 puis pour cette thèse.*

*Un grand merci à Daniel Choquet de m'avoir accueillie dans son équipe. Merci de votre bienveillance et de vos encouragements. Merci pour les nombreuses idées et pistes à explorer que vous avez suggéré tout au long de ce projet. Ces presque cinq années ont été une chance dont je serai toujours reconnaissante.*

*J'étends ces remerciements et toute ma gratitude à toute l'équipe Choquet, présente et passée, pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé dès le premier jour. Grâce à vous, venir travailler au labo fut un plaisir. Merci à tous pour vos suggestions et commentaires sur ce projet. Merci pour les meilleures retraites, BBQ et repas de Noël de l'institut.*

*Je tiens également à remercier toute l'équipe du pôle culture pour leurs beaux neurones et en particulier Emeline Verdier, la reine des dissections, sans qui aucune manip' présente dans ce manuscrit n'aurait été possible. Toute l'équipe du BIC, Christel Poujol, Sébastien Marais et en particulier Fabrice Cordelières et Magali Mondin, pour leur bonne humeur, leur patience face à mes questions et leur assistance pour l'acquisition et l'analyse des données présentées dans ce manuscrit. Merci également à toute l'équipe de biologie moléculaire, en particulier Natacha Retailleau, Nicolas Chevrier et Christelle Breillat pour leurs constructions, leur aide précieuse pour la stratégie et réalisation des différents plasmides et également pour la bonne ambiance qu'ils font régner en salle de BM. Merci à l'équipe administrative et informatique pour leur disponibilité et leur bonne humeur. Et un grand merci également à Rémi Sterling, Justine Gautron et Jordan Girard sans qui le labo ne peut pas fonctionner.*

*Merci aux biochimistes qui ont été particulièrement impliquées dans ce projet. Merci à Sophie Daburon pour ses conseils et ses CRISPR. Je tiens à remercier particulièrement Justine Charpentier. Merci pour la motivation, la rigueur et le travail sérieux que tu as mis au service de ce projet. Surtout, merci pour la ténacité dont tu as fait preuve et pour les nombreuses expériences de biochimie que tu as menées. Merci également pour l'efficacité avec laquelle tu as produit les plasmides dont nous avons besoin. Sur un registre plus personnel, merci pour les pauses cafés et pour le soutien expérimental et psychologique quand la motivation me manquait.*

*Un merci particulier au meilleur bureau de l'institut, le bureau 125 qui m'a vu arriver en janvier 2017. En un peu plus de quatre ans, ce bureau a abrité les dégustations de la team chocolat, d'innombrables petit-déj/goûters, un tableau multilingue ainsi qu'une forêt de plantes qui ne sont malheureusement plus toutes là pour en témoigner. Je souhaite remercier Justine Charpentier, Marie-Lise Jobin, Charlotte Rimbault, et bien sûr Emeline Verdier pour leur soutien, les discussions – rarement scientifiques – et les fous-rires qui ont été particulièrement précieux pour mon moral. A big thank you to all my international office colleagues. Thank you May Bakr for your encouragements and for feeding me chocolate, Angela Getz for the best tacos and horror movie nights, Diogo Neto for understanding the pain of writing this manuscript, Valeria Pecoraro for our long discussions about the future and Virginia Puente for your invaluable positivity.*

*Thank you as well to Lou Bouit, Mélody Labarchède, Konstantina Liouta, Sarah Rahmati, Silvia Sposini, Andrea Toledo and Hanna Zieger for their precious scientific and personal support. A tous, merci pour ces moments partagés au labo et en dehors. Thank you for the International dinners, ski trips, beach trips, bar trips, movie nights and countless homemade dinners. I am very grateful for the memories and the pictures we have to prove it.*

*Pour moi, cette thèse clôture 10 années passées sur les bancs de l'Université de Bordeaux. Je souhaite alors remercier mes anciens camarades de promo Florian Saby, Solal Chauquet, Jordan Girard, Thibault Bittar, Cisto et tous les autres, qui ont rendu ces 10 années inoubliables. J'ai également une pensée pour ceux d'entre eux qui se sont lancés dans la même aventure que moi et qui défendront bientôt. Merci en particulier à Florian et Cisto de leur soutien alcoolisé tout au long de cette thèse.*

*Merci à mes amis non scientifiques (qui ne liront probablement jamais ce manuscrit), et qui m'ont permis de penser à autre chose qu'à la thèse. En particulier, merci à Astrid Romagny pour sa présence depuis 25 ans et pour nos déjeuners réguliers le samedi midi.*

*Le plus grand des merci à Marlon Bas qui me soutiens depuis 8 ans et qui a supporté et contenu le chaos qu'est devenu ma vie pendant la rédaction de ce manuscrit.*

*Pour terminer, je souhaite remercier ma famille et particulièrement mes parents pour leur soutien indéfectible. Merci pour le soutien psychologique, merci pour le soutien financier pendant ces longues études, et un grand merci pour le soutien « logistique », qui m'a souvent permis de grappiller quelques minutes de sommeil en plus. Votre aide a été inestimable et a rendu cette aventure plus facile.*

# Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| Liste des abréviations .....   | 15        |
| Liste des figures .....  | 19        |
| <b>INTRODUCTION .....</b>  | <b>21</b> |
| Introduction générale.....   | 23        |
| <b>Partie 1 : Acteurs et mécanismes responsables de la transmission synaptique excitatrice .....</b> | <b>25</b> |
| <b>A) Description générale de la post-synapse glutamatergique .....</b>                              | <b>25</b> |
| 1 – Les protéines de la membrane plasmique.....  | 26        |
| 2 – Les protéines d'échafaudage de la PSD .....  | 27        |
| 3 – Autres protéines solubles de la PSD.....   | 28        |
| 4 – Les organelles de l'épine dendritique.....   | 28        |
| <b>B) Récepteurs du glutamate .....</b>  | <b>28</b> |
| 1 – Les récepteurs métabotropiques.....  | 29        |
| 2 – Les récepteurs ionotropiques.....  | 29        |
| AMPA .....   | 30        |
| NMDAR .....  | 32        |
| KAÏNATE .....  | 32        |
| <b>C) La plasticité synaptique .....</b>   | <b>33</b> |
| 1 – La plasticité Hebbienne.....   | 34        |
| La potentialisation à long terme (LTP) .....   | 34        |
| La dépression à long terme (LTD).....  | 35        |
| 2 – La plasticité homéostatique .....  | 35        |
| <b>D) Mécanismes de régulation du nombre d'AMPA à la MP .....</b>                                    | <b>36</b> |
| 1 – La diffusion membranaire .....   | 36        |
| 2 – Endocytose et recyclage.....   | 37        |
| 3 – Exocytose .....  | 38        |
| 4 – Trafic des AMPA .....  | 39        |
| <b>Partie 2 : Sécrétion des AMPA .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>A) Le réticulum endoplasmique (RE) .....</b>  | <b>42</b> |
| 1 – Structure du RE .....  | 42        |
| 2 – mRNA et synthèse.....  | 42        |
| 3 – Interaction avec des protéines associées dans le RE .....  | 42        |
| 4 – Glycosylations et contrôle qualité.....  | 43        |
| 5 – Export du RE .....   | 44        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>B) Le compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC)</b> .....                            | <b>45</b> |
| 1 – Structure .....   | 45        |
| 2 – Rôle et fonctions .....   | 45        |
| <b>C) L'appareil de Golgi (AG)</b> .....  | <b>46</b> |
| 1 – Structure .....   | 46        |
| 2 – MPT de l'AG .....   | 46        |
| 3 – Golgi Outposts (GO) .....   | 47        |
| 4 – Sortie de l'AG .....  | 47        |
| <b>D) Transport vésiculaire</b> .....   | <b>47</b> |
| 1 – Structure du cytosquelette .....  | 48        |
| Microtubules .....  | 48        |
| Actine .....  | 50        |
| 2 – Les moteurs moléculaires .....  | 50        |
| Kinésines & dynéines .....  | 50        |
| Myosines .....  | 51        |
| Adressage et régulations des moteurs moléculaires .....                                   | 52        |
| 3 – Les moteurs connus associés aux AMPAR .....   | 53        |
| Les kinésines et dynéines .....   | 53        |
| Les myosines .....  | 54        |
| 4 – Caractéristiques du transport vésiculaire des AMPAR .....                             | 55        |
| <b>E) Exocytose</b> .....   | <b>56</b> |
| 1 – Les protéines SNARE et Rab .....  | 56        |
| 2 – L'exocytose des AMPAR .....   | 59        |
| <b>F) Particularités de la voie de sécrétion dans les neurones</b> .....                  | <b>60</b> |
| 1 – Le « Spine apparatus » .....  | 60        |
| 2 – « Bypass » de l'AG .....  | 60        |
| 3 – Organisation pour une sécrétion locale .....  | 61        |
| <b>Partie 3 : Régulation du TI par les protéines associées aux AMPAR et les MPT</b> ..... | <b>63</b> |
| <b>A) Association avec des protéines auxiliaires</b> .....                                | <b>63</b> |
| 1 – Les protéines de la famille des TARP .....  | 63        |
| 2 – Autres interacteurs .....   | 65        |
| Les protéines cornichon (CNIH) .....  | 65        |
| GSG1L .....   | 66        |
| Les protéines CKAMP .....   | 66        |
| Autres interacteurs .....   | 67        |
| <b>B) Association avec des protéines cytosoliques</b> .....                               | <b>68</b> |
| 1 – 4.1N .....  | 68        |
| 2 – SAP97 .....   | 70        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3 – GRIP1, PICK1, APB .....                                 | 72        |
| 4 – Autres interacteurs.....                                | 73        |
| <b>C) Les MPT des AMPAR .....</b>                           | <b>73</b> |
| 1 – MPT régulant des interactions protéiques .....          | 74        |
| 2 – Phosphorylation des sérines S831 et S845 de GluA1 ..... | 75        |
| 3 – Autres MPT des AMPAR .....                              | 75        |
| <b>D) Influence du CTD des AMPAR sur le trafic .....</b>    | <b>77</b> |
| <b>Objectifs de la thèse .....</b>                          | <b>79</b> |

## **MATERIELS ET MÉTHODES..... 81**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>A) Plasmides et constructions .....</b>                     | <b>83</b> |
| 1 – Système ARIAD.....   | 83        |
| 2 – Constructions moléculaire.....                             | 84        |
| <b>B) Culture neuronale et transfections.....</b>              | <b>85</b> |
| 1 – Cultures primaires de neurones .....                       | 85        |
| 2 – Transfection.....  | 87        |
| <b>C) Biochimie .....</b>                                      | <b>88</b> |
| <b>D) Expériences d'imagerie.....</b>                          | <b>88</b> |
| 1 – Externalisation .....                                      | 88        |
| 2 – Transport .....  | 89        |
| Vidéo-microscopie spinning-disk.....                           | 89        |
| Acquisition vidéos transport .....                             | 89        |
| <b>E) Analyse d'images et statistiques .....</b>               | <b>91</b> |
| 1 – Analyse externalisation .....                              | 91        |
| 2 – Analyse du TI.....   | 91        |
| Analyse manuelle .....   | 91        |
| Automatisation de l'analyse du transport avec Kymobutler ..... | 93        |
| 3 – Statistiques .....   | 95        |

## **RÉSULTATS..... 97**

|  |            |
|--|------------|
| <b>A) Importance du domaine C-terminal pour le transport intracellulaire .....</b> | <b>99</b>  |
| <b>B) SAP97 régule le transport intracellulaire .....</b>                          | <b>101</b> |
| 1 – Régulation du TI par SAP97 en conditions basales .....                         | 101        |
| Diminution du SAP97 endogène .....   | 101        |
| Interaction de GluA1 avec SAP97.....   | 103        |
| 2 – Effet de SAP97 sur le TI après induction de la cLTP.....                       | 104        |

|   |                |
|---|----------------|
| <b>C) 4.1N régule le transport intracellulaire pendant la LTP .....</b> | <b>106</b>     |
| 1 – Régulation de l'exocytose par 4.1N en conditions basales.....       | 106            |
| Diminution du 4.1N endogène .....                                       | 106            |
| Interaction avec 4.1N.....  | 107            |
| 2 – Effet de 4.1N sur le TI après induction de la cLTP .....            | 111            |
| <b>D) Influence d'autres protéines associées à GluA1 .....</b>          | <b>114</b>     |
| 1 – Hétéromérisation avec GluA2 .....                                   | 114            |
| 2 – $\gamma 8$ participe au TI des AMPAR.....                           | 117            |
| <br><b>DISCUSSION.....</b>  | <br><b>119</b> |
| A) Importance du CTD pour le TI des AMPAR néo-synthétisés .....         | 121            |
| B) Régulation du TI par les protéines cytosoliques .....                | 121            |
| C) Transport des hétéromères GluA1/GluA2.....                           | 125            |
| D) Effet des protéines auxiliaires sur le TI des AMPAR.....             | 127            |
| <br><b>Références.....</b>  | <br><b>130</b> |

## Liste des abréviations

**ABP** : AMPAR binding protein

**ADP** : Adénosine triphosphate

**AG** : Appareil de Golgi

**AMPAR** :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors

**ATD** : Amino-terminal domain

**ATP** : Adénosine triphosphate

**BAR** : Bin/amphiphysin/Rvs

**BFA** : Brefeldin A

**CaMKII** : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II

**CASK** : Calmodulin-dependent serine protein kinase

**CIE** : Clathrin independant exocytosis

**CKAMP** : cysteine-knot AMPA receptor modulating protein

**CME** : Clathrin mediated exocytosis

**DIV** : Days *in vitro*

**EC50** : Concentration efficace médiane

**EE** : Early endosome

**ER** : Endosomes de recyclage

**LE** : Late endosome

**cLTP** : Chemical LTP

**CNIH** : Cornichon homolog

**COPI** : COat Protein Complex I

**COPII** : COat Protein Complex II

**CTD** : C-terminal domain

**ERES** : ER exit sites

**ERGIC** : ER-Golgi intermediate compartment

**FA** : FERM adjacent domain



**FKBP12** : FK506-binding protein de 12kDa

**FRAP** : Fluorescence recovery after photobleaching

**GAP** : GTPase-activating protein

**GABA**: Gamma-AminoButyricAcid

**GDF** : GDI displacement factors

**GDI** : GDP dissociation inhibitor

**GKAP** : Guanylate-Kinase-Associated Protein

**GDP** : Guanosine diphosphate

**GFP** : Green Fluorescent protein

**GO** : Golgi outpost

**GRIP** : Glutamate Receptor Interacting Protein

**GSG1L** : germline-specific gene 1-like

**GTP** : Guanosine triphosphate

**GUK** : Guanylate kinase

**HEBS** : HEPES-buffered saline solution

**HFS** : High frequency stimulation

**iGluR** : Récepteurs ionotropiques du glutamate

**KAR** : Récepteurs de type kainate

**KD** : Knock Down

**KI** : Knock In

**KO** : Knock Out

**KB** : KymoButler

**KIF** : Kinesin superfamily protein

**LBD** : Ligand Binding Domain

**LTD** : Long term depression

**LTP** : Long term potentiation

**MAGUK** : Membrane-Associated GUanylate Kinases

**MAP** : Microtubules associated proteins

**mGluR** : Récepteurs métabotropiques du glutamate

**MP** : Membrane plasmique

**MPT** : Modifications post-traductionnelles

**MT** : Microtubules

**NMDAR** : N-Methyl-d-aspartate Receptors

**NSF** : N-ethyl maleimide sensitive factor

**NTD** : N-terminal domain

**PICK1** : Protein interacting with C-kinase

**PKA** : Protéine kinase A

**PKC** : Protéine kinase C

**PP1** : Protein Phosphatase 1

**PP2B** : Protein Phosphatase 2B

**PRRT** : Proline-rich transmembrane proteins

**PS** : Pénicilline-streptomycine

**PSD** : Post-synaptic density

**PSD95** : Postsynaptic density protein 95

**Rab** : Ras-related protein in brain

**RE** : Réticulum endoplasmique

**RNC** : Réseau neuronal convolutif

**RPNR** : Réponse aux protéines non repliées

**SA** : Spine apparatus

**SAB** : Spectrin Actin Binding-domain

**SAP97** : Synapse associated protein 97

**SEP** : Super-ecliptic phluorin

**SH3** : Src-homology 3

**shRNA** : short hairpin RNA

**SNARE** : Soluble NSF-attachment protein (SNAP) receptors

**SNC** : Système nerveux central

**SynDIG** : Synapse differentiation–induced gene proteins

**TARP** : Transmembrane AMPAR Regulatory Protein

**TBS** : Theta-burst stimulation

**TGN** : Trans-Golgi Network

**TI** : Transport intracellulaire

**TMD** : Transmembrane domain

**tSNARE** : Target SNARE

**vSNARE** : Vesicular SNARE

## Liste des figures

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 1</b> : Morphologie des synapses .....  | 23  |
| <b>Figure 2</b> : Image de la PSD obtenue par microscopie électronique.....                         | 25  |
| <b>Figure 3</b> : Organisation moléculaire de la PSD .....  | 26  |
| <b>Figure 4</b> : Structure des récepteurs du glutamate .....                                       | 29  |
| <b>Figure 5</b> : Structure des AMPAR .....   | 31  |
| <b>Figure 6</b> : Diffusion des AMPAR .....   | 36  |
| <b>Figure 7</b> : Endocytose et recyclage des récepteurs .....                                      | 38  |
| <b>Figure 8</b> : Mécanismes régissant le nombre d'AMPAR .....                                      | 39  |
| <b>Figure 9</b> : Organelles de la voie sécrétion.....  | 41  |
| <b>Figure 10</b> : Voie de sécrétion dans les neurones .....  | 41  |
| <b>Figure 11</b> : Assemblage des AMPAR .....   | 43  |
| <b>Figure 12</b> : Structure des microtubules .....   | 49  |
| <b>Figure 13</b> : Organisation du cytosquelette neuronal.....                                      | 50  |
| <b>Figure 14</b> : Structure des filaments d'actine.....  | 50  |
| <b>Figure 15</b> : Les kinésines.....   | 51  |
| <b>Figure 16</b> : Les dynéines .....   | 51  |
| <b>Figure 17</b> : Les myosines .....   | 52  |
| <b>Figure 18</b> : Moteurs moléculaires associés aux vésicule .....                                 | 53  |
| <b>Figure 19</b> : Fonctionnement des protéines Rab .....   | 57  |
| <b>Figure 20</b> : Les protéines Rab impliquées dans le trafic des AMPAR .....                      | 58  |
| <b>Figure 21</b> : L'exocytose par les protéines SNARE .....  | 59  |
| <b>Figure 22</b> : Protéines auxiliaires des AMPAR .....  | 63  |
| <b>Figure 23</b> : Structure des protéines cytosoliques interagissant avec le CTD des AMPAR...69    |     |
| <b>Figure 24</b> : Sites d'interaction des différentes protéines cytosoliques avec les AMPAR.....70 |     |
| <b>Figure 25</b> : MPT et interactions protéiques du CTD des AMPAR .....                            | 74  |
| <b>Figure 26</b> : Système ARIAD.....   | 83  |
| <b>Figure 27</b> : Microscope confocal spinning-disk .....  | 89  |
| <b>Figure 28</b> : Séquence d'acquisition des vidéos du TI.....                                     | 90  |
| <b>Figure 29</b> : Analyse du TI avec KymoToolBox .....   | 92  |
| <b>Figure 30</b> : Automatisation de l'analyse de transport .....                                   | 94  |
| <b>Figure 31</b> : Importance du domaine C-terminal de GluA1 .....                                  | 100 |
| <b>Figure 32</b> : Effet général de SAP97 sur le TI et externalisation de GluA1 en basal.....       | 102 |
| <b>Figure 33</b> : Effet de l'interaction de SAP97 sur le TI de GluA1.....                          | 104 |
| <b>Figure 34</b> : Effet de l'interaction de SAP97 sur le TI après induction de la cLTP.....        | 105 |
| <b>Figure 35</b> : Effet général de 4.1N sur le TI basal de GluA1 .....                             | 108 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figure 36</b> : Effet de l'interaction de 4.1N sur le TI basal.....                           | 109 |
| <b>Figure 37</b> : Effet des phosphorylations S816 et S818 sur le TI basal de GluA1 .....        | 110 |
| <b>Figure 38</b> : Effet général de 4.1N sur le TI après induction de la cLTP .....              | 112 |
| <b>Figure 39</b> : Effet des phosphorylations S816 et S818 sur le TI après induction de cLTP ... | 113 |
| <b>Figure 40</b> : Influence des CTD des récepteurs du glutamate sur le TI basal .....           | 115 |
| <b>Figure 41</b> : Transport de GluA2(R) et des hétéromères .....                                | 116 |
| <b>Figure 42</b> : Effet de $\gamma$ 8 sur le TI basal de GluA1 .....                            | 118 |

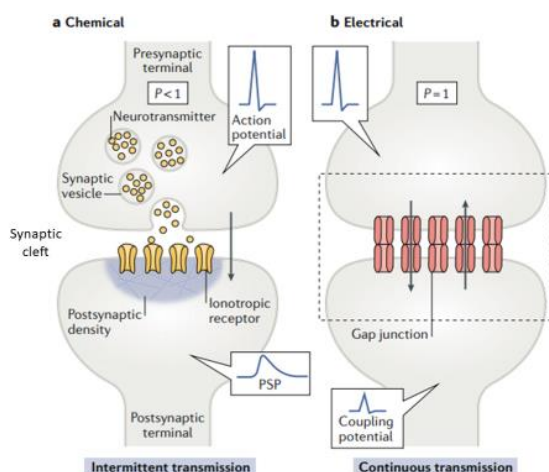
# **INTRODUCTION**



## Introduction générale

Les cellules du système nerveux central (SNC) ont été caractérisées dès la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle par Santiago Ramon y Cajal. Le SNC est composé de deux grands types de cellules. Les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et cellules de Schwann), les plus abondantes, et les cellules en charge de la transmission et du stockage de l'information : les neurones. Il existe plus de 200 types de neurones et le cerveau humain en compte plus de 100 milliards. Les neurones sont composés d'un corps cellulaire (ou soma) duquel émergent deux types de prolongements : un axone et plusieurs dendrites qui leur confèrent une morphologie particulière et très asymétrique. Les neurones s'organisent en réseau et communiquent entre eux au niveau des synapses. Il a été estimé qu'un neurone établit en moyenne 10 000 contacts synaptiques<sup>1</sup>. Une synapse est composée d'un bouton pré-synaptique axonal, d'une fente synaptique et d'une post-synapse localisée sur le neurone suivant. Leur rôle est d'assurer la transmission du signal nerveux d'un neurone à l'autre.

Il existe différents types de synapses (Figure 1). Les synapses électriques, sont des "jonctions communicantes" formées par un accollement des deux membranes plasmiques adjacentes. Elles permettent des échanges cytoplasmiques grâce à des canaux protéiques. Dans le SNC des vertébrés, les synapses chimiques sont majoritaires. Elles permettent la transmission du signal grâce aux neurotransmetteurs, des messagers chimiques. Le potentiel d'action, ou signal nerveux, se propage à travers l'axone jusque dans le bouton pré-synaptique contenant des centaines de vésicules encapsulant les neurotransmetteurs. L'arrivée du potentiel d'action provoque le relargage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs se lient sur des récepteurs post-synaptiques qui, une fois activés, vont générer des courants ioniques et différentes cascades de signalisation permettant la transmission du signal nerveux. Il existe des synapses excitatrices et des synapses inhibitrices en fonction des couples neurotransmetteurs/récepteurs mis en jeu et des mécanismes résultant de leur activation.



**Figure 1 : Morphologie des synapses**

**a** – Dans une synapse chimique la transmission du signal est assurée par un messager chimique (le glutamate pour les synapses glutamateriques). Dans la pré-synapse, un potentiel d'action active les canaux calciques dépendants du voltage qui engendrent l'influx de  $Ca^{2+}$  qui déclenche la fusion des vésicules permettant la libération du glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate active récepteurs post-synaptiques qui permettent l'entrée de cations dans la post-synapse. **b** – Dans une synapse électrique, la transmission du signal est opérée par un accollement de membranes où sont situés des clusters de canaux protéiques permettant une transmission du signal bidirectionnelle. Source : Alcami & Perada, 2019.



Les récepteurs post-synaptiques sont donc la porte d'entrée du signal nerveux, leur localisation à la synapse au bon endroit et au bon moment est cruciale pour le bon fonctionnement du réseau. De nombreux mécanismes sont impliqués dans la régulation de leur localisation, depuis la synthèse des récepteurs, leur assemblage, leur transport vers les compartiments cibles, leur exocytose à la membrane plasmique (MP), leur diffusion membranaire sans compter leur endocytose, tri et recyclage. Parmi ces mécanismes, le transport intracellulaire (TI) des récepteurs, de leur assemblage jusqu'à leur première exocytose à la MP, est une des étapes clé de cette régulation puisqu'il concerne tous les récepteurs participant à la transmission synaptique. La morphologie asymétrique des neurones rend ce mécanisme particulièrement compliqué. Les protéines transmembranaires sécrétées sont transcrites dans le noyau et le neurone doit assurer leur acheminement jusqu'aux synapses parfois situées à des centaines de micromètres du corps cellulaire.

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du SNC. Lorsqu'il est relargué dans la fente synaptique, il se lie aux récepteurs du glutamate métabotropiques ou ionotropiques. Les récepteurs AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate) (AMPA), ionotropiques, sont les principaux contributeurs de la transmission synaptique rapide. De plus, leur nombre est fortement régulé en particulier pendant des événements de plasticité synaptique qui sous-tendent des fonctions cognitives telles que l'apprentissage et la mémoire.

Cette thèse porte sur l'étude du TI des AMPAR néo-synthétisés et leur exocytose à la MP dans des conditions de transmission basale et pendant les événements de plasticité synaptique. Ces récepteurs interagissent avec de nombreuses protéines qui affectent leur présence à la MP et à la synapse, mais leur effet précis sur le TI reste inconnu. Les vésicules participant au TI sont des petits objets rapides présentant peu de contraste ce qui explique pourquoi le TI a très longtemps été difficile à observer. Notre équipe a développé une technique alliant l'utilisation d'outils moléculaires permettant la rétention des récepteurs néo-synthétisés et la vidéo-microscopie confocale « spinning-disk ». Cela nous permet de caractériser le transport des récepteurs néo-synthétisés et de répondre aux questions suivantes : comment le transport est-il régulé en conditions basales ? Comment ce transport est-il modulé durant des événements de plasticité synaptique ? Quelles interactions protéiques régissent et régulent ce transport ?

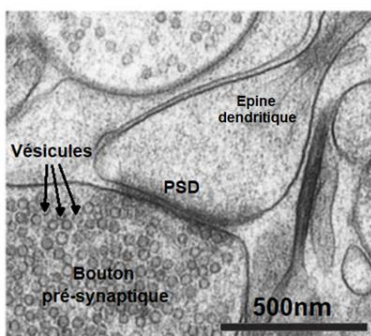
# Partie 1 : Acteurs et mécanismes responsables de la transmission synaptique excitatrice

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principal du SNC. C'est un acide aminé non essentiel synthétisé localement à partir de la glutamine produite par les cellules gliales<sup>2</sup>. Il permet l'activation de deux classes de récepteurs localisés au niveau de la post-synapse glutamatergique : les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR), couplés à des protéines G et les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluR), responsables de la majorité de la transmission synaptique excitatrice.

## A) Description générale de la post-synapse glutamatergique

Les synapses glutamatergiques sont composées d'un bouton pré-synaptique axonal dans lequel sont stockées des centaines de vésicules contenant du glutamate. En réponse à un potentiel d'action, jusqu'à 130 vésicules pré-synaptiques fusionnent au niveau des "zones actives"<sup>3</sup>. Le glutamate est alors libéré dans la fente synaptique et se lie à divers récepteurs à la surface du neurone post-synaptique engendrant une dépolarisation locale, des flux cationiques et des cascades de signalisation assurant la transmission du signal.

Les contacts post-synaptiques peuvent avoir lieu au niveau du corps cellulaire ou d'une dendrite mais la majorité des synapses excitatrices se forment sur des protrusions spécialisées appelées épines dendritiques. Les épines dendritiques sont des protubérances de la dendrite composées d'un cou et d'une tête qui assure le contact synaptique. Elles sont très dynamiques et ont un rôle majeur dans la transmission du signal, les processus d'apprentissage et de mémorisation. Des anomalies dans leur nombre ou leur morphologie sont associées à de nombreux troubles neurologiques tels que la maladie d'Alzheimer ou la schizophrénie<sup>4,5,6</sup>.

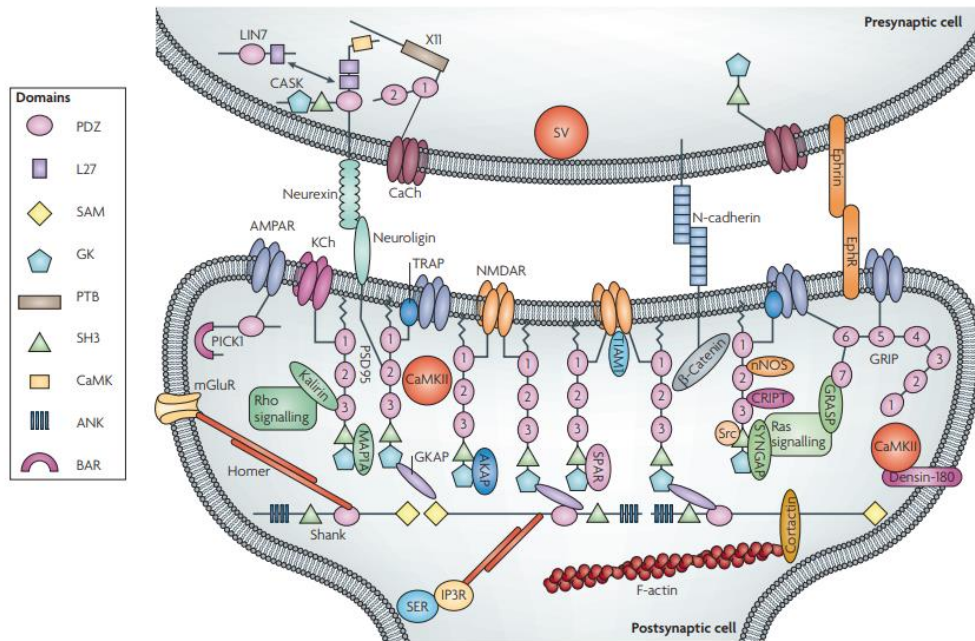


**Figure 2 : Image de la PSD obtenue par microscopie électronique**

Dans la pré-synapse, les vésicules contenant le glutamate sont stockées en attendant un potentiel d'action qui entraînera leur libération dans la fente synaptique. La post-synapse située dans l'épine dendritique est caractérisée par la PSD, une zone dense aux électrons de par sa concentration protéique colossale. Modifié de Dosemeci et al. 2016

Les synapses excitatrices glutamatergiques sont caractérisées par une spécialisation morphologique et fonctionnelle appelée densité post synaptique (Post-Synaptic Density : PSD) (Figure 2). La PSD possède une concentration protéique colossale (jusqu'à 100mg/ml) qui la rend dense aux électrons en microscopie électronique. La taille de la PSD est

proportionnelle au volume de la tête<sup>7</sup>. Elle possède un diamètre compris entre 200 et 800 nm et une épaisseur comprise entre 20 et 40 nm<sup>8</sup>. Elle héberge plus de 1400 protéines<sup>9</sup> nécessaires à la transmission du signal. Elles sont organisées sur plusieurs niveaux entre la MP et le cou et permettent une régulation fine de la transmission synaptique (Figure 3).



**Figure 3 : Organisation moléculaire de la PSD**

Les différentes protéines composant la PSD. Source : Feng & Zhang 2009

## 1 – Les protéines de la membrane plasmique

Les protéines situées au niveau de la MP remplissent plusieurs fonctions. Les protéines d'adhésion synaptique stabilisent les domaines pré- et post-synaptiques. Elles sont piégées à la post-synapse et s'associent à leur partenaire localisé au niveau de la pré-synapse afin d'assurer la jonction entre les deux membranes. Elles participent à l'organisation des différents composants de la synapse pour son maintien et sa modulation lors d'événements de plasticité synaptiques<sup>10</sup>.

Les protéines les plus importantes de la MP de la PSD sont les récepteurs du glutamate, des protéines transmembranaires chargées de transmettre le signal. Parmi eux, les récepteurs ionotropiques (iGluR) assurent l'influx d'ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{K}^+$  de concert avec les canaux ioniques dépendants du voltage de la MP afin d'assurer la dépolarisation nécessaire à la transmission du signal. Ces influx ioniques, particulièrement le  $\text{Ca}^{2+}$  sont critiques pour l'induction des événements de plasticité synaptique. Les AMPAR comptent parmi les protéines les plus dynamiques de la PSD, leur présence à la MP étant très finement régulée. Le relargage du glutamate après un événement de fusion est très localisé et transitoire. Pour une synapse contenant entre 50 et 100 AMPAR, seulement 20-25% seront

activés par une vésicule pré-synaptique<sup>11</sup>. Les AMPAR, qui ont une faible affinité pour le glutamate, doivent alors être très précisément organisés à la synapse et sont rassemblés en clusters aussi appelés « nanodomains » pour faciliter la transmission synaptique. En plus de leur organisation, le nombre d'AMPAR à la synapse est finement régulé lors des événements de plasticité synaptique par divers mécanismes tels que l'exocytose, l'endocytose, le recyclage etc..., mettant en jeu leurs nombreux interacteurs et d'autres protéines de la PSD décrites ci-après.

## 2 – Les protéines d'échafaudage de la PSD

Sous la MP se trouvent de nombreuses protéines d'échafaudage de la famille des kinases guanylate associées à la membrane (Membrane-Associated GUanylate Kinases : MAGUK). Ces protéines ont une structure conservée comprenant une séquence de domaines PDZ. Les domaines PDZ sont des domaines globulaires de 90 acides aminés comprenant 5-6 feuillets  $\beta$  et 2-3 hélices  $\alpha$ . Ils confèrent aux MAGUKs la capacité d'interagir avec de nombreuses protéines de la PSD en liant des motifs généralement situés à l'extrémité du domaine C-terminal (CTD) de ses protéines cibles telles que les récepteurs du glutamate<sup>12</sup>.

Les MAGUK assurent l'intégrité de la PSD en liant les protéines d'adhésion, les récepteurs post-synaptiques et les protéines cytoplasmiques telles que les kinases, phosphatases et GTP-ases impliquées dans les cascades de régulation. PSD95, une protéine très abondante de la PSD<sup>13</sup> (environ 300 copies par PSD<sup>14</sup>) interagit indirectement avec les AMPAR. PSD95 participe à la stabilisation des AMPAR à la PSD et à leur organisation en nanodomains via l'interaction avec stargazine (également appelé  $\gamma 2$ ), une protéine auxiliaire des AMPAR, afin de faciliter la transmission synaptique. Des déficits de PSD95 altèrent la morphologie de l'épine dendritique et sont associés à des problèmes cognitifs, d'apprentissage ou encore à l'autisme<sup>15</sup>. La famille des MAGUKs comprend d'autres protéines interagissant directement avec les AMPAR, tel que SAP97 qui peut s'associer aux récepteurs tôt dans la voie de sécrétion et qui régule leur présence à la MP.

Les protéines Shank ont également un rôle central dans l'organisation de la PSD. Elles participent à la régulation de la morphologie de l'épine dendritique<sup>16</sup> et certaines de leurs mutations sont associées aux troubles du spectre de l'autisme<sup>17</sup>. Ces grandes protéines d'environ 200kDa organisent la PSD en ancrant et liant les autres protéines d'échafaudage. Elles sont situées dans la partie la plus profonde de la PSD et correspondent avec la MP via leur liaison avec PSD95 qui est possible par l'intermédiaire des protéines GKAP<sup>14</sup>. Les protéines Shank interagissent également avec le cytosquelette d'actine, qui module l'établissement et le maintien de la PSD, localisé jusque dans le cou.

### 3 – Autres protéines solubles de la PSD

L'épine dendritique héberge également des protéines kinases et phosphatases telles que PKA, PKC ou CaMKII, la protéine la plus abondante de la PSD<sup>14</sup>. Ces enzymes sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  sont recrutées au niveau de la PSD et participent aux cascades de signalisation responsables de la modulation de la transmission synaptique. Leur recrutement est facilité par la plasticité du cytosquelette d'actine de l'épine, en particulier au niveau du cou qui peut changer de forme et faciliter la diffusion des protéines cytosoliques lors d'événements de plasticité synaptique<sup>18</sup>. Ces différentes enzymes ont pour substrat les différents acteurs de la PSD, dont les récepteurs du glutamate eux-mêmes, et participent entre autre à la régulation du nombre d'AMPA à la MP.

### 4 – Les organelles de l'épine dendritique

L'épine dendritique contient également différents organites qui participent au bon fonctionnement la transmission synaptique. Le système endomembranaire associé à ses machineries protéiques permet l'exocytose ou l'endocytose des récepteurs. Le "spine apparatus", présent dans une minorité de synapses, est une extension du réticulum endoplasmique (RE). Il est impliqué dans les événements de plasticité synaptique et permet la synthèse locale de récepteurs et de diverses kinases participant aux cascades de signalisation telles que CaMKII<sup>19</sup>, facilitant leur intégration rapide à la PSD.

La PSD est donc une structure très dense et très organisée de protéines et d'organites permettant une régulation très fine de la transmission synaptique. Les AMPAR comptent parmi les protéines les plus dynamiques de la PSD. Leur nombre et leur localisation à la synapse est très précisément régulée par différents mécanismes tels que l'exocytose, l'endocytose/recyclage et la diffusion membranaire par le biais des autres acteurs de la PSD. Les mécanismes qui régissent la régulation de la transmission synaptique sont nombreux mais encore mal compris et constituent un domaine de recherche capital pour mieux comprendre les différentes pathologies associées à la synapse glutamatergique telles que la maladie d'Alzheimer, l'autisme, la maladie de Huntington, les troubles obsessionnels compulsifs etc...

## B) Récepteurs du glutamate

Les acteurs principaux de la transmission synaptique sont les récepteurs membranaires. Il existe deux classes de récepteurs du glutamate : les récepteurs métabotropiques (mGluR) et les récepteurs ionotropiques (iGluR) possédant chacun leurs rôles et qui travaillent de concert pour assurer la transmission synaptique.

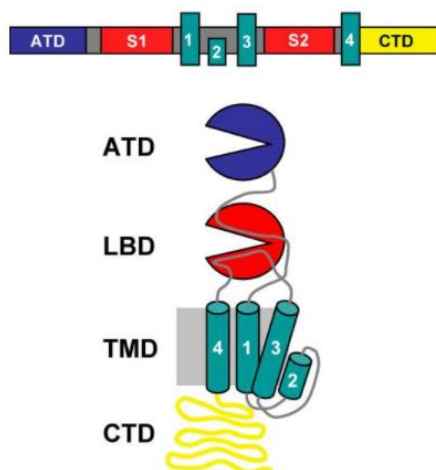
## 1 – Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques ou mGluR sont des dimères composés de sous-unités à 7 fragments transmembranaires couplés à des protéines G (mGluR1-8). Ils sont exprimés dans tous le SNC<sup>20</sup> et sont présents à la fois à la pré-synapse et à la post-synapse où ils sont organisés de manière homogène<sup>11</sup> préférentiellement en périphérie<sup>21</sup>. Les mGluR répondent à des relargages prolongés de glutamate et leur activation entraîne une cascade de signalisation qui permet de moduler l'excitabilité du neurone et la transmission synaptique. Ils sont impliqués dans de nombreux désordres neurologiques tels que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'anxiété, la dépression ou encore la schizophrénie<sup>22</sup>.

## 2 – Les récepteurs ionotropiques

Les iGluR sont responsables de la majorité de la transmission synaptique excitatrice dans le SNC. Ces canaux ioniques, tétramériques, sont activés par le glutamate et permettent l'influx de différents ions tels que  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , et  $\text{Ca}^{2+}$ , selon le récepteur, entraînant la dépolarisation permettant la propagation rapide du signal nerveux d'un neurone à l'autre.

Il existe trois types de iGluR, nommés en fonction de leur agoniste : les récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid (AMPA), les récepteurs N-Méthyl-d-aspartate (NMDAR) et les récepteurs de type kaïnate (KAR). La formation des iGluR nécessite l'assemblage de 4 sous-unités appartenant à la même famille (AMPA, NMDAR, KAR). Ces récepteurs possèdent une topologie homologue (Figure 4) et possèdent des rôles, des localisations et des propriétés électrophysiologiques différentes.



**Figure 4 : Structure des récepteurs du glutamate**

Les iGluR possèdent une structure conservée, chaque sous-unité est composée d'un domaine N-terminal (NTD) extracellulaire, de quatre domaines transmembranaires (TMD) : TMDI, TMDII, TMDIII et TMDIV. Le TMDII n'est que partiel et crée une boucle ré-entrante qui constitue le canal ionique du récepteur. Ces sous-unités comprennent une grande portion extracellulaire qui compose 85% de la protéine pour les AMPAR<sup>23</sup>. Le site de liaison de l'agoniste (Ligand Binding Domain : LBD) est formé de l'interaction de deux domaines extracellulaires, le domaine S1 situé en amont du TMD1 et du domaine S2 qui correspond à la boucle située entre les TMD2 et TMD3. La sous-unité possède également une partie intracellulaire composée des deux boucles connectant le pore aux TMD1 et TMD2 ainsi que d'un domaine C-terminal (CTD) intracellulaire<sup>24</sup>. Source : Wyllie et al. 2013



## AMPAR

Les récepteurs AMPAR sont les principaux contributeurs de la neurotransmission excitatrice rapide dans le SNC<sup>23</sup>. Ils sont composés de 4 sous-unités : GluA1 à GluA4<sup>24</sup> codées par 4 gènes GRIA1 à 4. Chaque sous-unité contient approximativement 900 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 105 kDa<sup>25</sup>. Ces sous-unités s'assemblent pour former des tétramères localisés dans tout le compartiment somato-dendritique. La liaison du glutamate provoque le mouvement des hélices du LBD qui permet l'ouverture du canal ionique perméable aux ions. Si le glutamate n'est pas dissocié assez rapidement comme lors d'une forte stimulation ou d'une libération de glutamate à haute fréquence, le canal ionique se ferme et le récepteur adopte un état désensibilisé<sup>26</sup>. Afin d'assurer une transmission synaptique rapide, il est donc nécessaire d'assurer un constant renouvellement d'AMPAR. Leurs propriétés biophysiques et leur nombre sont très régulés en conditions basales et lors de la plasticité synaptique. Ces propriétés varient en fonction de leur composition et peuvent être régulées par des modifications post-transcriptionnelles, des modifications post-traductionnelles (MPT) ainsi que par leurs nombreux interacteurs.

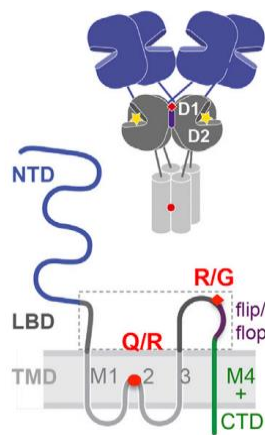
Les sous-unités GluA1, 2 & 3 sont exprimées dans la majorité des neurones du CNS alors que GluA4 est exprimée préférentiellement pendant le développement ou dans des neurones spécifiques du cervelet, certains interneurons, et certains circuits responsables du traitement auditif dans le cerveau mature<sup>27,28-30</sup>. Les sous-unités GluA1 et GluA2 sont les plus abondantes et les plus étudiées dans l'hippocampe.

Dès leur synthèse, ces sous-unités s'assemblent pour former des dimères dans le RE. Les sous-unités n'ont pas la même affinité les unes pour les autres ce qui influence l'assemblage des tétramères. Par exemple, GluA3 a une affinité plus forte pour GluA2 que pour les autres sous-unités. De même GluA1 a une affinité 200 fois plus élevée pour GluA2 que pour lui-même ou les autres sous-unités<sup>31</sup>. Ces dimères s'assemblent à leur tour pour former des homo-tétramères ou des hétéro-tétramères dont la structure a été caractérisée<sup>31-33</sup>.

Les combinaisons qui peuvent former les différentes sous-unités sont sujettes à débat. En effet, les combinaisons GluA1/GluA2, GluA1/GluA1, GluA2/GluA3 sont bien caractérisées, l'existence des AMPAR GluA1/GluA3<sup>34</sup> a été rapportée mais l'existence de la combinaison GluA2/GluA2 est encore débattue<sup>32,31</sup>. De plus, une étude récente sur le cerveau entier a montré par cryo-microscopie électronique qu'il existerait des hétéro-tétramères avec des ratios 3/1 ainsi que des récepteurs composés de 3 ou 4 sous-unités différentes<sup>33</sup>. L'abondance respective des combinaisons n'a jamais été analysée de manière systématique dans les différentes zones du cerveau, mais il est probable qu'elle varie<sup>35</sup>. Très récemment, les combinaisons des AMPAR de l'hippocampe contenant GluA2 ont été quantifiées par cryo-microscopie électronique. GluA1 est présent dans 90% de ces structures et plus de la moitié

des récepteurs sont des hétéromères GluA1/GluA2 (avec un ratio 2/2). Un tiers des récepteurs contiennent deux GluA2, un GluA1 et un GluA3, alors que les hétéromères GluA2/GluA3 représentent moins de 4% des récepteurs<sup>32</sup>.

Les sous-unités possèdent des sites d'épissage alternatif et des sites d'édition au niveau de leur ARNm qui conduit à une grande diversité moléculaire et fonctionnelle (Figure 5). Les sous unités peuvent être la cible d'épissage alternatif flip/flop dans le domaine S2 menant à des changements de conductance et de cinétiques du récepteur<sup>36</sup>. L'édition de l'arginine 764 en glycine (R/G) dans la boucle S2 de GluA2 et GluA4 modifie les cinétiques de re-sensibilisation des AMPAR, la forme G récupérant de la désensibilisation plus rapidement<sup>37</sup>. Cette édition pourrait également favoriser l'association en hétérotétramères en augmentant le temps passé dans le RE<sup>38</sup>.



**Figure 5 : Structure des AMPAR**

Les AMPAR possèdent deux sites d'éditions de son ARNm, le site Q/R localisé dans la boucle ré-entrante et un site R/G localisé dans la boucle extracellulaire. Ils possèdent également un site d'épissage flip ou flop sur cette même boucle. Source : Greger et al 2017

Ces modifications confèrent aux récepteurs des caractéristiques variées qui déterminent leur rôle et potentiellement le moment et l'endroit où ils vont être recrutés. L'une des caractéristiques les plus importantes est la perméabilité du récepteur au  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans les neurones matures, la sous-unité GluA2 est assujettie dans 99% des cas à une édition de son mRNA<sup>39</sup> par l'adénosine désaminase nucléaire ADAR2<sup>40</sup>. Cette enzyme convertit la glutamine à la position 607 en arginine (Q/R). Cette substitution a lieu dans le pore, à l'apex du TMD2 (Figure 5). L'arginine est un acide aminé large et chargé positivement contrairement à la glutamine qui est un petit acide aminé sans charge, ce qui rend le récepteur porteur de la sous-unité GluA2 (R) imperméable au  $\text{Ca}^{2+}$ . Elle a également pour conséquence de retenir le récepteur dans le RE<sup>39</sup>. Cette modification post-transcriptionnelle est particulièrement importante puisqu'un défaut d'édition est lié à de nombreuses pathologies comme la sclérose latérale amyotrophique, l'ischémie, la progression du glioblastome, la maladie d'Alzheimer, l'addiction ou l'épilepsie<sup>41</sup>.



Les récepteurs les plus abondants étant les hétéromères GluA1/GluA2, la majorité des récepteurs de l'hippocampe (CA1) sont donc imperméables au  $\text{Ca}^{2+}$ . Les récepteurs perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ , majoritairement des homomères GluA1, semblent également participer à la transmission synaptique, particulièrement lors de l'induction de la plasticité<sup>35</sup>. Les différentes compositions d'AMPA sont donc recrutées différenciellement en fonction des besoins.

Contrairement aux régions extracellulaires et TM qui présentent une forte homologie entre les sous-unités, les CTD des AMPAR sont intracellulaires et peu homologues<sup>35</sup>. Ces domaines font des cibles parfaites pour assurer la régulation du trafic des récepteurs. Les différentes sous-unités sont classées selon leur CTD : GluA1 et GluA4 possèdent un domaine CTD long et les sous-unités GluA2 et GluA3, un CTD court. Les CTD peuvent également subir un épissage alternatif. La sous-unité GluA2 possède un variant long, appelé GluA2L et GluA4 possède un variant court appelé GluA4S<sup>35</sup>, mais GluA2L et GluA4S restent peu étudiés. Les CTD des AMPAR permettent de nombreuses interactions protéiques et une vingtaine de MPT possibles qui régulent la présence d'AMPA à la MP<sup>35,42</sup>. Ces interactions permettent également la liaison avec différents moteurs moléculaires tels que des kinésines et myosines, et qui font de ce domaine un candidat idéal pour la régulation de la motricité des vésicules acheminant les récepteurs néo-synthétisés jusqu'à la MP.

### NMDAR

Les NMDAR sont composés de différentes sous-unités, GluN1, GluN2A-D et GluN3A-B, codés respectivement par un gène GRIN1, 4 gènes GRIN2 et deux gènes GRIN3<sup>43</sup>. Ils sont présents dans tout le compartiment somato-dendritique. A la synapse, ils forment un cluster unique au centre de la PSD<sup>11</sup>. Leur fonctionnement est plus complexe que celui des autres iGluR. Le pore du récepteur est bloqué par des ions  $\text{Mg}^{2+}$  qui empêchent les influx ioniques. L'activation du récepteur nécessite la liaison de deux glutamates, de deux glycines<sup>44</sup> et le déplacement du blocage  $\text{Mg}^{2+}$  qui a lieu suite à la dépolarisation de la membrane opérée par les AMPAR par exemple<sup>45</sup>. Les NMDAR sont les iGluR les plus perméables aux ions et leur activation rend le récepteur perméable au  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , et  $\text{Ca}^{2+}$ . Ils causent une dépolarisation et une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  à la post-synapse très importante menant à des cascades de signalisations dans le neurone post-synaptique qui modulent à court ou long terme des changements de la force synaptique.

### KAINATE (KAR)

Les KAR sont des homo- ou hétéro-tétramères perméables au  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , formés d'une combinaison de sous-unités GluK1 à GluK5<sup>46</sup>. Ils sont présents dans le compartiment somato-dendritique mais également dans l'axone jusque dans les boutons pré-synaptiques. Ces

iGluRs possèdent également une fonction métabotrope, comme à la pré-synapse où ils contrôlent le relargage de glutamate et de GABA<sup>47,48</sup> et à la post-synapse où ils modulent l'efficacité de la transmission synaptique<sup>49,50,51</sup>. A la post-synapse, ils peuvent réguler la présence des AMPAR à la MP, en recrutant des endosomes de la voie de recyclage pendant des phénomènes de plasticité synaptique<sup>52</sup>.

Les différents iGluR sont complémentaires et travaillent de concert afin d'assurer la transmission synaptique. Fonctionnellement, les AMPAR sont responsables de la dépolarisation initiale rapide<sup>53</sup> grâce à leur cinétiques rapides (de l'ordre de quelques millisecondes). Les récepteurs NMDAR ont une très haute affinité pour le glutamate ( $EC_{50}=0,5-5\mu M$  contre  $EC_{50}=10-100\mu M$  pour les AMPAR), mais ces derniers ne peuvent s'activer que si la MP est dépolarisée. Dans la fente synaptique, le glutamate relargué se lie aux AMPAR, déclenchant l'ouverture de leur canal ionique et un influx de cations. L'activation rapide des AMPAR, en particulier lorsque ces événements synaptiques sont rapprochés, dépolarise le neurone et lève le blocage  $Mg^{2+}$  des NMDAR. Ces derniers ont une cinétique lente (pouvant durer pendant des centaines de millisecondes) et leur activation plus durable permet de générer des influx d'ions importants et d'initier des changements dans la force synaptique<sup>54</sup>. Les KAR quant à eux, semblent intervenir dans des régulations plus fines de la transmission synaptique. Leur contribution semble négligeable sauf dans certaines synapses spécifiques de la fibre moussue dans les neurones pyramidaux de CA3<sup>54</sup>, même s'il a été montré qu'ils sont capables de produire la dépolarisation initiale nécessaire à la LTP en l'absence des AMPAR<sup>55</sup>.

### **C) La plasticité synaptique**

L'efficacité de la transmission synaptique est modulable et repose sur (1) la fréquence des potentiels d'action et la quantité de glutamate libéré, (2) la concentration en glutamate dans la fente synaptique qui est régulée par les astrocytes et (3) le nombre et l'efficacité des récepteurs post-synaptiques.

La plasticité synaptique correspond à des changements durables de l'efficacité de la transmission synaptique induits par l'activité de la synapse, afin de s'adapter à un stimulus spécifique. Cette modulation de la transmission synaptique permet d'encoder l'information et est à la base des mécanismes de mémorisation et d'apprentissage. Elle comprend la modulation de l'efficacité de la transmission synaptique des synapses déjà existantes, mais aussi la génération ou l'élimination de synapses<sup>56</sup>.

La plasticité synaptique englobe plusieurs phénomènes qui permettent au neurone de réguler de manière bidirectionnelle l'efficacité de la transmission synaptique. La plasticité Hebbienne, qui tire son nom de la théorie de Hebb formulée en 1949<sup>57</sup> stipule que lorsque deux neurones s'activent de manière répétée, l'efficacité de la transmission entre ces deux neurones est augmentée. La plasticité Hebbienne inclut d'une part la potentialisation à long terme (Long term potentiation ; LTP) qui facilite la transmission synaptique et d'autre part la dépression à long terme (Long Term Depression ; LTD), qui diminue l'efficacité de la transmission synaptique<sup>58,59</sup>. Afin de compenser la plasticité Hebbienne, il existe également la plasticité homéostatique qui permet d'assurer la stabilité du réseau neuronal.

## 1 – La plasticité Hebbienne

### La potentialisation à long terme (LTP)

La LTP est un mécanisme par lequel la transmission synaptique est renforcée de manière durable, de 10 secondes à plusieurs heures dans l'hippocampe selon les protocoles utilisés<sup>60,61,62</sup>. La forme de LTP la plus étudiée est dépendante des NMDAR mais les KAR et mGluR sont également capables d'induire la LTP<sup>63,64,65,66</sup>, de même que les AMPAR perméables au calcium<sup>67</sup>.

La LTP est causée par un stimulus à haute fréquence (100Hz) qui entraîne le relargage du glutamate contenu dans les vésicules pré-synaptiques. Le glutamate se lie aux AMPAR, entraînant un influx d'ions qui va dépolariser la membrane post-synaptique. La dépolarisation lève le blocage  $Mg^{2+}$  des NMDAR<sup>68,69,45</sup> qui, suite à leur liaison avec le glutamate et la glycine, permettent une entrée massive de  $Ca^{2+}$  au niveau de la post-synapse. La dépolarisation permet également l'activation de canaux  $Ca^{2+}$  sensibles au potentiel<sup>70</sup>, engendrant une dépolarisation encore plus importante. L'augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$  au niveau de la post-synapse active différentes kinases telles que la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) et la protéine kinase calmoduline dépendante (CaMKII), activée par la calmoduline liée au  $Ca^{2+}$  qui vont permettre l'expression de la LTP<sup>71</sup>.

La LTP est caractérisée par une augmentation du nombre d'AMPAR à la synapse<sup>72,73,74,75,76</sup> et s'accompagne de changements structurels comprenant l'augmentation de la taille de l'épine dendritique<sup>77</sup> ainsi que le développement de nouvelles synapses<sup>78,79</sup>. Le recrutement et maintien des AMPAR est un phénomène finement régulé dans lequel l'implication de plus de 100 protéines a été documentée<sup>80</sup>. Cette régulation s'opère par différents mécanismes : l'exocytose des AMPAR nouvellement synthétisés acheminés via la voie de sécrétion<sup>81</sup> ou synthétisés localement<sup>82</sup>, l'exocytose des AMPAR recyclés et leur stabilisation à la synapse. Ces mécanismes sont régulés par les différentes phosphorylations

opérées par les protéines kinases activées lors de la LTP, en particulier au niveau du CTD des AMPAR<sup>35</sup> ainsi que par le biais de leurs différents interacteurs.

### La dépression à long terme (LTD)

La LTD est caractérisée par la diminution de la transmission synaptique à long terme. *In vivo*, elle est causée par des activation à basse fréquence (entre 1 et 3 Hz) pendant 10 à 15 minutes<sup>58,83</sup>.

Il existe deux grandes formes de LTD, la LTD hétéro-synaptique, qui se produit dans les synapses inactives et la LTD homo-synaptique qui nécessite une activation de la synapse. La LTD homo-synaptique inclut la dé-potentialisation d'une synapse préalablement potentialisée et la LTD *de novo* qui se produit dans des synapses en condition basales.

La forme de LTD la plus étudiée repose sur l'activation des NMDAR, bien que l'activation des mGluR puisse aussi être à l'origine de la LTD<sup>84</sup>. La LTD est induite par une entrée plus lente et plus faible de  $Ca^{2+}$  que lors de la LTP<sup>85</sup> entraînant l'activation de PP2B (calcineurine) et PP1 qui catalysent la déphosphorylation des sites précédemment phosphorylés par PKA et PKC<sup>86,87</sup>. La LTD est caractérisée par une diminution du nombre d'AMPAR synaptiques accompagnés par une diminution du volume de la tête de l'épine dendritique<sup>88</sup>. Différents mécanismes participent à la diminution du nombre d'AMPAR observé lors de la LTD tels que la diffusion des récepteurs et/ou leur endocytose. Ces mécanismes sont régulés par les dé-phosphorylations opérées sur le CTD des AMPAR et des interactions protéiques qui promeuvent leur élimination de la synapse ou qui diminue leur conductance<sup>87,89-92</sup>.

## 2 – La plasticité homéostatique

La plasticité homéostatique a pour rôle de compenser la plasticité Hebbienne<sup>93</sup> qui pourrait mener à une augmentation incontrôlée de la transmission synaptique après l'induction de la LTP<sup>94</sup> et à des pathologies<sup>95,96</sup>. La plasticité homéostatique fonctionne selon deux modes d'action<sup>97</sup>. D'une part, le seuil d'induction de la plasticité synaptique peut être modulé par les activités neuronales passées. Par exemple, une période de forte activité va élever le seuil d'induction de la LTP et favoriser la LTD et inversement<sup>97</sup>. L'autre mécanisme s'appelle le « synaptic scaling » et altère directement les synapses. Dans cette forme de plasticité, une inactivité prolongée va promouvoir « l'upscaling » des synapses excitatrices alors qu'une activité prolongée va promouvoir le « downscaling » pour maintenir le réseau<sup>97</sup>. Le « synaptic scaling » repose également sur la modulation du nombre d'AMPAR post-synaptiques<sup>98</sup>.

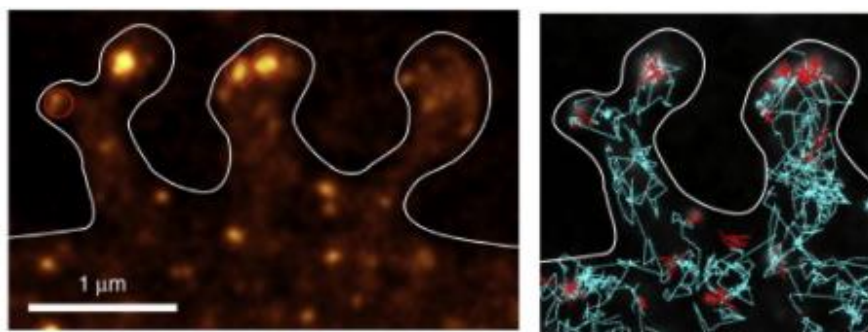
L'activité engendre divers phénomènes de plasticité synaptique modulant bi-directionnellement le nombre de AMPAR à la synapse, en l'augmentant lors de la LTP et en le diminuant lors de la LTD. La régulation du nombre de récepteurs à la synapse est donc cruciale pour ajuster l'efficacité de la transmission synaptique et assurer l'encodage et le stockage de l'information.

## D) Mécanismes de régulation du nombre d'AMPAR à la MP

Le neurone assure la répartition spatiale et temporelle des AMPAR en fonction des besoins grâce à différents mécanismes : (1) la diffusion des récepteurs de la MP afin de moduler leur localisation (synaptique/extra-synaptique), (2) l'endocytose des récepteurs présents à la MP (3) l'exocytose de récepteurs recyclés ou néo-synthétisés.

### 1 – La diffusion membranaire

Les AMPAR diffusent latéralement dans la MP et peuvent échanger entre les sites extra-synaptiques et synaptiques où ils sont enrichis<sup>99</sup>. Leur nombre est proportionnel au volume de la tête, qui peut contenir plus de 140 AMPAR<sup>100</sup>. A la post-synapse, les AMPAR sont confinés en nanodomains<sup>99,101,102,103</sup> d'environ 80nm de diamètre<sup>104</sup> (Figure 6). Une épine dendritique compte entre 1 et 3 nanodomains et chacun peut contenir 20 à 25 AMPAR<sup>105,104,106-108</sup>. Le rôle du confinement des AMPAR en nanodomains serait de faciliter la transmission synaptique en alignant les récepteurs avec les zones de relargage du glutamate<sup>109</sup>.



**Figure 6 : Diffusion des AMPAR**

Les AMPAR ne sont pas organisés de manière homogène à la synapse, comme en témoignent leur distribution observée par microscopie sptPALM (image gauche). Ils diffusent dans la MP et sont piégés dans des clusters à la synapse et présentent des trajectoires plus confinées dues au piégeage des récepteurs par les protéines d'échafaudage de la PSD (image droite). Source : Hosy et al. 2014

Les AMPAR sont confinés grâce à leurs interactions avec les protéines d'échafaudage à domaine PDZ de la PSD<sup>110</sup>. L'ancrage des AMPAR à la synapse est assuré par le CTD de  $\gamma 2$  ou stargazine une protéine auxiliaire des AMPAR appartenant à la famille des TARP

(Transmembrane AMPAR Regulatory Protein).  $\gamma 2$  lie PSD95 qui ancre le récepteur à la PSD<sup>111</sup>. Cette interaction est régulée par l'activité et plus particulièrement par la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>99,103</sup>. Lors de la LTP, l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  active CaMKII qui phosphoryle le CTD de  $\gamma 2$ , favorisant l'interaction avec PSD95 et la stabilisation du complexe à la synapse, permettant la potentiation<sup>112-115</sup>. A l'inverse, lors de la LTD dépendante des NMDAR,  $\gamma 2$  est dé-phosphorylée ce qui abolit son interaction avec PSD95 lui permettant de diffuser hors de la synapse. La diffusion est aussi favorisée pour les AMPAR désensibilisés qui deviennent plus mobiles afin d'assurer leur renouvellement pour une transmission synaptique rapide<sup>116,117</sup>. D'autres protéines assurant la stabilisation des AMPAR à la synapse ont été identifiées telles que Shisa6<sup>118,118</sup> ou d'autres protéines de la famille des TARP<sup>119,120</sup> dont  $\gamma 8$  bien que son rôle soit plus controversé<sup>121,122</sup>.

Cette modulation de l'affinité des AMPAR pour les protéines de la PSD s'inscrit dans la théorie « récepteur centrique » de la plasticité synaptique. Cette théorie postule que les AMPAR, et plus précisément leur CTD ainsi que leurs protéines auxiliaires sont le substrat de nombreuses MPT et interactions protéiques qui régulent leur nombre à la synapse<sup>123</sup>. Il existe également une théorie dite « PSD-centrique » qui postule que c'est le nombre de points d'ancrage disponibles qui est modulé<sup>124</sup>. Ces deux théories, et l'importance du CTD des AMPAR seront discutés dans la troisième partie. De plus, l'hypothèse selon laquelle la LTP serait due à une amélioration de l'alignement entre les zones actives pré-synaptiques et les nanodomains est également investiguée<sup>117</sup>.

## 2 – Endocytose et recyclage

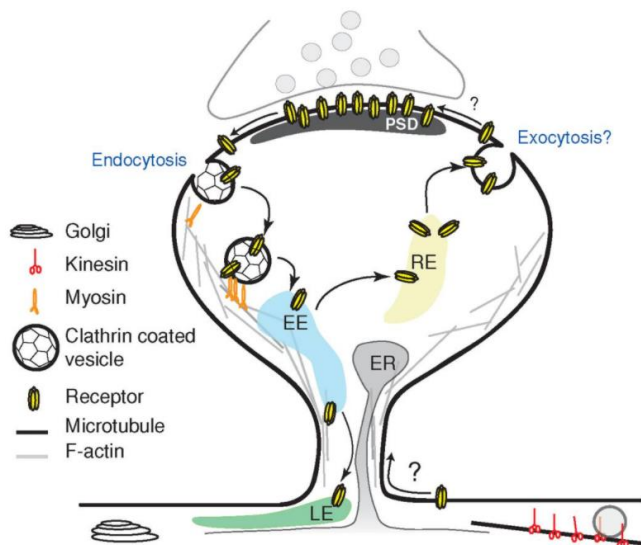
Les AMPAR de la MP peuvent être endocytés puis dégradés ou recyclés grâce au système endomembranaire<sup>125</sup>. Ces événements de recyclage peuvent être constitutifs ou impliqués dans les phénomènes de plasticité. Des déficits de ce mécanisme ou de ses acteurs ont d'ailleurs été corrélés avec des maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer<sup>126</sup>.

Les récepteurs localisés à la synapse diffusent sur la membrane et sont internalisés au niveau des « endocytic zones » entourant la PSD<sup>127</sup>. Le cargo est internalisé par endocytose, une invagination de la membrane. Il existe différents modes d'endocytose, telles que la pinocytose, la phagocytose, la CIE (clathrin independent endocytosis)<sup>125,128</sup>, et la CME (Clathrin mediated endocytosis), la plus étudiée<sup>129</sup>. Lors de la CME, la clathrine et AP2 permettent la formation d'un feuillet de clathrine sur la face intérieure de la MP<sup>130</sup> qui initie l'invagination de la membrane, et qui sera scindée par la dynamine, une GTPase, afin de former les vésicules intracellulaires. La majorité des AMPAR semblent endocytés suivant la



voie dépendante de la clathrine et de la dynamine, bien que de la CIE constitutive ait été observée<sup>131,132</sup>.

Le système endomembranaire est constitué de différents compartiments incluant les early/sorting endosomes (EE), endosomes de recyclage (ER), late endosomes (LE), et lysosomes qui se distinguent entre autres par leurs marqueurs moléculaires, ou leur pH, qui s'acidifie graduellement<sup>132</sup> (Figure 7). Les récepteurs endocytés peuvent suivre plusieurs voies. La plupart des cargos vont fusionner avec les EE dans lequel un triage complexe a lieu, mettant en jeu différentes protéines résidentes des différents compartiments<sup>133</sup>. De là, les protéines peuvent être acheminées via des « multivesicular bodies » (MVB) jusqu'aux LE et lysosomes pour être dégradées, ou bien jusqu'au réseau trans-Golgien (Trans-Golgi Network : TGN). Les récepteurs peuvent également être dissociés de leurs ligands et ré-exocytés à la MP directement ou via les RE<sup>134,135</sup>. Ces différentes voies ont des cinétiques différentes : le recyclage direct depuis les EE est rapide et retourne le cargo au site de leur endocytose alors que le recyclage depuis les RE est lent et exocytose généralement le cargo à un autre endroit de la cellule<sup>136</sup>.



**Figure 7 : Endocytose et recyclage des récepteurs**

Les AMPAR sont internalisés au niveau des zones d'endocytose autour de la PSD. Les récepteurs endocytés sont envoyés vers les EE et sont triés vers les LE pour la dégradation ou vers les ER pour être réinsérés à la MP. Source : Kennedy & Ehlers 2006

Les AMPAR sont le substrat de nombreuses MPT et interactions protéiques qui régulent leur endocytose, tels que PICK1 (protein interacting with C-kinase) ou NSF qui lie GluA2<sup>132</sup> et qui seront décrites dans la troisième partie.

### 3 – Exocytose

L'exocytose des AMPAR peut concerner des récepteurs recyclés qui ont préalablement été endocytés ou bien les récepteurs néo-synthétisés. L'exocytose requiert la fusion de deux bicouches lipidiques, un processus énergétiquement défavorable qui doit être catalysé par différentes protéines.

Les plus étudiées sont des protéines de fusion appelés les SNARE (Soluble NSF-attachment protein (SNAP) receptors)<sup>137-139</sup>. Cette superfamille comprend plus de 60 membres qui s'associent pour former un complexe permettant de juxtaposer la membrane de la vésicule avec la MP et de fournir l'énergie nécessaire à leur fusion<sup>140-142</sup>. L'utilisation de neurotoxines qui clivent les SNARE ont pour effet de bloquer l'exocytose et empêchent l'induction de la LTP<sup>143</sup>. L'exocytose est donc un mécanisme participant aux phénomènes de plasticité.

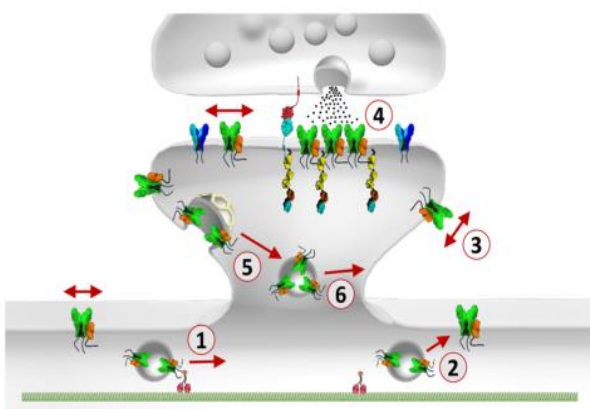
Grâce à SEP (Super Ecliptic phluorin), l'exocytose des AMPAR a pu être observée dans les dendrites<sup>144,145</sup> et occasionnellement dans les épines dendritiques<sup>146,147,148,149</sup>. Cependant, les localisations préférentielles de ces événements n'ont pas été déterminées.

Les protéines SNARE impliquées dans l'exocytose des AMPAR seront détaillées dans la partie 2. Diverses interactions protéiques et MPT des AMPAR semblent participer à leur exocytose ou la favoriser. En particulier, GluA1 interagit avec la protéine cytosolique 4.1N qui promeut l'exocytose du récepteur. Cette interaction protéique sera détaillée dans la partie 3.

#### 4 – Trafic des AMPAR

Ces trois mécanismes fonctionnent conjointement afin d'acheminer les « bons » AMPAR au bon endroit au bon moment. L'équilibre entre ces différents mécanismes (Figure 8) est modulé par l'activité et dépend des protocoles utilisés pour l'induction des phénomènes de plasticité.

Les récepteurs préférentiellement recrutés lors de la transmission basale ou pendant la LTP/LTD sont encore débattus et semblent varier en fonction de la zone du cerveau, de l'âge et du protocole de plasticité appliqué<sup>35</sup>. Comprendre l'interaction et l'équilibre complexe de ces différentes voies de régulation est un enjeu majeur pour comprendre transmission synaptique et les phénomènes de plasticité synaptique.



**Figure 8 : Mécanismes régissant le nombre d'AMPA**

Différents mécanismes travaillent conjointement et régissent le nombre d'AMPA à la MP. **1&2** – Les AMPAR néo-synthétisés sont transportés dans des vésicules sur le cytosquelette du neurone et sont ensuite exocytés. **3** – Les AMPAR de la MP diffusent dans la MP. **4** – Ils sont piégés à la PSD et forment des nanodomains qu'ils peuvent quitter lorsque leur affinité pour les protéines d'échaffaudage de la PSD est abolie. **5** – Les récepteurs diffusent vers les zones d'endocytose où les AMPAR sont internalisés. **6** – Les AMPAR sont ensuite triés, ou retenus dans des vésicules intracellulaires et peuvent être recyclés et ré-exocytés vers la MP. Source : Choquet 2018



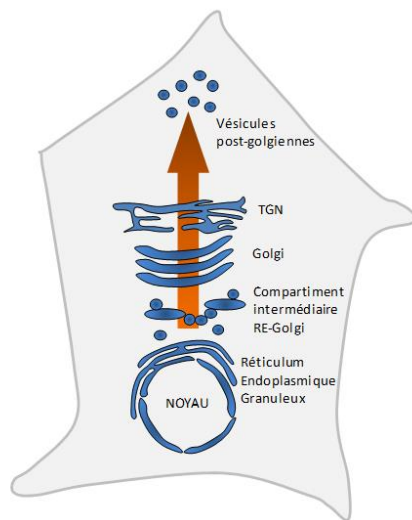
En conditions basales, ces différents mécanismes semblent se compenser. Contrairement à l'exocytose de GluA1 qui est dépendante de l'activité, l'exocytose de GluA2 est majoritairement constitutive<sup>150</sup>.

Lors de la LTD, les AMPAR perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  (GluA1/GluA1) sont recrutés de manière transitoire à la synapse<sup>151</sup>. Ces récepteurs sont ensuite dé-phosphorylés par les phosphatases activées lors de la LTD<sup>151</sup>, entraînant leur retrait de la synapse par diffusion et peuvent ensuite être endocytés.

Lors de l'induction de la LTP, les AMPAR atteignent la synapse par diffusion où ils sont piégés dans les nanodomains<sup>148</sup>. En effet, si le blocage de l'exocytose empêche l'expression de la LTP<sup>143</sup>, la potentialisation à court terme n'est pas abolie<sup>152</sup>, suggérant que les premiers AMPAR mobilisés sont recrutés par diffusion. Cependant, la LTP entraîne une augmentation du nombre d'événements d'exocytose<sup>144</sup> qui remplissent les réserves des AMPAR extra-synaptiques recrutés plus tard pour assurer le maintien de la potentiation<sup>153</sup>. Les AMPAR préférentiellement recrutés lors de la LTP sont sujet à débat. D'anciens modèles suggèrent que les AMPAR à CTD long comme les homomères de GluA1 sont péri-synaptique et sont recrutés à la synapse de manière transitoire juste après l'induction de la LTP<sup>154-157</sup> (bien que d'autres études le réfutent<sup>158,159</sup>) après quoi ils seraient graduellement remplacés par les AMPAR à CTD courts (GluA2/GluA3)<sup>35,160</sup>.

Il existerait donc deux voies pour l'exocytose, (1) une voie constitutive pour les récepteurs contenant les sous-unités GluA2 qui cyclent continuellement entre les réserves intracellulaires et la synapse, et (2) une voie dépendante de l'activité concernant les récepteurs contenant GluA1 qui sont insérés pour l'induction de la plasticité. En revanche, la part des récepteurs néo-synthétisés ou recyclés qui prennent part à la transmission synaptique basale et aux événements de plasticité synaptiques restent mal connus. Il a été estimé que les récepteurs recyclés sont un réservoir important d'AMPAR pendant l'activité<sup>146,161</sup> et qu'environ 50% des événements d'exocytoses proviennent des RE<sup>150</sup>. La contribution des récepteurs néo-synthétisés et la régulation dont ils sont l'objet sont souvent négligés de par la difficulté qu'il existe à étudier le TI. En effet, les vésicules contenant les AMPAR néo-synthétisés sont de petits objets rapides de faible contraste impossibles à distinguer des récepteurs recyclés. Grâce à un outil moléculaire permettant la rétention des protéines néo-synthétisées dans le RE, Hangen et al<sup>81</sup> sont parvenus à observer le TI et présence à la MP des récepteurs néo-synthétisés exclusivement. Les AMPAR néo-synthétisés possèdent un TI très régulé, et sont recrutés à la MP en conditions basale et lors de la LTP, mais les mécanismes qui régissent ces modulations sont encore mal connus.

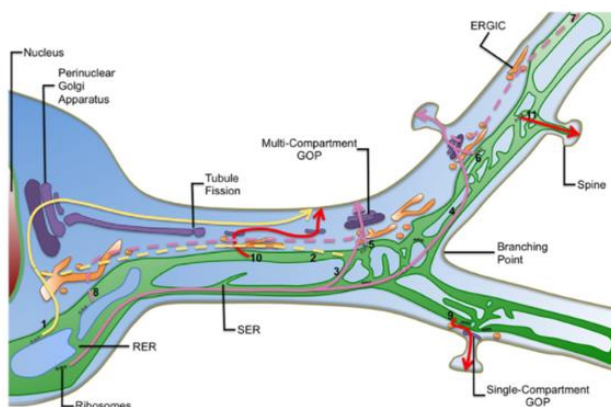
## Partie 2 : Sécrétion des AMPAR



**Figure 9 : Organelles de la voie sécrétion**

Les protéines destinées à la MP sont synthétisées sur le RE puis transitent par le compartiment intermédiaire RE-Golgi, l'AG, le TGN et les vésicules post-golgiennes afin d'être intégrées à la MP. Source : C. Renancio, Etude du trafic vésiculaire des récepteurs glutamatergiques de type AMPA : caractérisation d'une nouvelle protéine auxiliaire, thèse, 2013, Université de Bordeaux

Le TI des récepteurs néo-synthétisés est un processus capital puisque qu'il concerne tous les AMPAR qui participent à la transmission synaptique. Avant d'être intégrés à la MP, les récepteurs néo-synthétisés doivent naviguer et mûrir à travers un système endomembranaire complexe dans lequel ils rencontreront divers interacteurs moléculaires qui influenceront leur devenir. La protéine est synthétisée, repliée et subit des MPT telles que des greffes de lipides, d'oses etc. dans une succession de compartiments subcellulaires : le RE, le compartiment intermédiaire RE-Golgi (ER-Golgi Intermediate Compartment : ERGIC), l'appareil de Golgi (AG) et divers types de vésicules (Figure 9). Les récepteurs néo-synthétisés peuvent emprunter différentes voies, plus ou moins directe jusqu'à la MP et qui seront décrites dans cette partie (Figure 10). L'utilisation d'un système de rétention des protéines dans le RE a montré que GluA1 a besoin de 30 minutes à 1 heure pour voyager à travers la voie de sécrétion et atteindre la MP<sup>81</sup>. Cependant, une autre étude utilisant des constructions similaires rapporte des durées plus longues (entre 2 et 8 heures)<sup>162</sup>.



**Figure 10 : Voie de sécrétion dans les neurones**

Il existe plusieurs voies pour la sécrétion des protéines membranaires. La sécrétion dite canonique (flèche jaune), où les protéines sont synthétisées dans le RE, passent dans l'AG et circulent dans des vésicules sur de longues distances le long du cytosquelette avant d'être insérées à la MP. Les récepteurs peuvent également court-circuiter l'AG somatique au profit des Golgi Outposts (GO) (flèche rose pleine). Mais les AMPAR semblent également pouvoir s'affranchir d'un passage dans l'AG somatique ou GO via le spine apparatus (flèche rouge) situé dans les épines dendritiques, ou via une voie de sécrétion entre le ERGIC et les ER. Source : Valenzuela & Perez, 2015

## A) Le réticulum endoplasmique (RE)

### 1 – Structure du RE

Le RE est une organelle très étendue et dynamique. Il est présent dans tout le compartiment somato-dendritique. Il est constitué d'un réseau de membranes contigu à la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. Cette membrane sépare l'espace luminal du RE et le cytosol en formant des citernes et des tubules d'un diamètre variant de 30 à 50nm<sup>163</sup>. Il est subdivisé en deux sous-compartiments à la composition lipidique et protéique différente : le RE rugueux qui arbore les ribosomes qui assurent la traduction des protéines et le RE lisse.

### 2 – mRNA et synthèse

Dans les neurones, la synthèse des protéines est modulée par l'activité et est nécessaire pour les événements de plasticité synaptique<sup>164</sup>. La blockade augmente la synthèse de GluA1 mais pas de GluA2<sup>165</sup>. La synthèse des sous-unités AMPA est également augmentée 3 heures après la LTP. Cette régulation est levée par des inhibiteurs de PKA<sup>166</sup>. Lorsque la synthèse est bloquée, l'induction de la LTP entraîne une décroissance progressive du nombre de récepteurs à la MP, jusqu'à atteindre le niveau basal après 2 heures<sup>167</sup>. La synthèse des AMPAR est également nécessaire pour certaines formes de LTD<sup>168</sup>. Les récepteurs néo-synthétisés sont donc des contributeurs importants pour le maintien d'événements de plasticité synaptique et leur synthèse est régulée par ces événements.

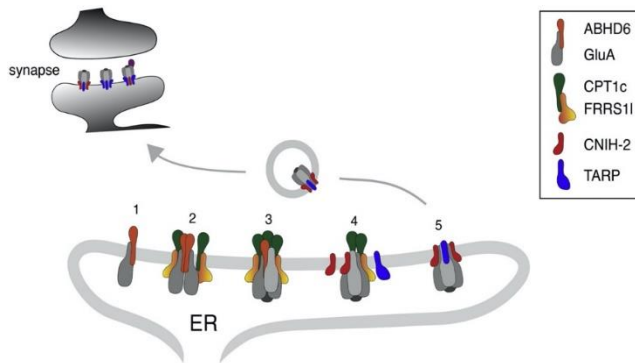
Même avant leur synthèse, les AMPAR sont assujettis à des modifications qui moduleront leurs propriétés. Leur ARNm peut être le substrat d'éditions, telles que l'édition Q/R et R/G de GluA2 ou l'édition de la cassette flip/flop décrites dans la partie 1. L'ARNm est ensuite traduit, le peptide signal clivé et la protéine est intégrée à la membrane du RE.

### 3 – Interaction avec des protéines associées dans le RE

Des analyses protéomiques ont révélé que les AMPAR possèdent de nombreux interacteurs dès leur synthèse dans le RE, tels que ABDH6, porcupine (PORCN), FRRS1L et CPT1c<sup>169</sup>. L'assemblage des AMPAR a été comparé à une ligne de production au cours de laquelle ils interagissent avec différentes protéines afin de former les tétramères (Figure 11). Certaines de ces protéines associées restent cantonnées dans le RE tels que CPT1c, ABDH6 ou PORCN et ne se retrouvent jamais à la MP, alors que d'autres protéines comme les TARP et les protéines CNIH voyagent avec le récepteur à travers la voie de sécrétion jusqu'à la MP<sup>170</sup>.

La sous-unité GluA monomérique interagit avec ABHD6 ou porcupine (PORCN) dans le RE. Ces associations sont stables, protégeant la sous-unité de la voie de dégradation<sup>171</sup> et

l'empêchant de se dimériser avec d'autres sous-unités<sup>170</sup>. L'interaction du complexe ABHD6-GluA avec le complexe FRRS1I-CPT1c induit la dimérisation des GluA. Les dimères s'assemblent en tétramères liés avec jusqu'à 4 complexes FRRS1I-CPT1c<sup>170</sup>. A cette étape, ABHD6 est dissociée du complexe pour permettre la formation du pore du récepteur. Les complexes FRRS1I-CPT1c se dissocient et sont remplacés par les protéines de la famille de CNIH et des TARP pour former un complexe qui constitue un récepteur fonctionnel, prêt à être exporté du RE.



**Figure 11 : Assemblage des AMPAR**

**(1)** La sous-unité s'associe avec ABHD6, **(2)** FRRS1I-CPT1c promeuvent la dimérisation **(3)** formation des tétramères et dissociation des ABDH6 **(4)** FRRS1I-CPT1c se dissocient et CNIH-2 et/ou les TARP s'associent aux AMPAR, **(5)** les AMPAR matures sont prêts à l'export. Source : Schwenk et al. 2019

Ces différentes protéines sont particulièrement importantes. En effet, lorsque leur expression est inhibée ou qu'elles sont surexprimées, le nombre de récepteurs à la MP est affecté, entraînant différentes pathologies<sup>170</sup>. Il est cependant important de noter que ces différentes interactions n'apparaissent pas être obligatoires pour assurer l'assemblage des récepteurs qui peut être rendu possible grâce l'interaction de leurs NTD et leurs TMD<sup>170</sup>. C'est le cas par exemple dans des expériences de surexpression des AMPAR où les GluA sont accumulés dans le RE puis exportés sans avoir besoin d'interagir avec ABDH6 par exemple<sup>170</sup>.

#### 4 – Glycosylations et contrôle qualité

Plus de 75% des protéines sécrétées sont N-glycosylées<sup>173</sup>. Cette modification est particulièrement prévalente dans le SNC<sup>174</sup> et régule la fonction des protéines<sup>175</sup>, mais aussi leur stabilité et leur repliement<sup>176,177</sup>. La protéine néo-synthétisée subit la greffe d'un précurseur riche en mannose au niveau de séquences consensus suivi de cycles de glycosylation/dé-glycosylation qui promeuvent l'interaction avec des chaperonnes telles que BiP et calnexin jusqu'à ce que la protéine soit correctement repliée<sup>39</sup>.

Chaque sous-unité des AMPAR contient entre 4 et 6 sites consensus (N-X-S/T) sur leur domaine extracellulaire<sup>178</sup>. Ces glycosylations influencent les propriétés des AMPAR comme leur désensibilisation<sup>173</sup> mais aussi leur trafic. En effet, sans NTD, l'abondance des AMPAR à la MP est réduite<sup>179</sup>. Ces glycosylations sont nécessaires pour l'export et semblent réguler la cadence de sortie du RE<sup>180</sup>. De nombreux sites de glycosylations, si mutés, empêchent l'acheminement jusqu'à la MP. Par exemple, les souris mutantes ne possédant

pas l'épitope HNK-1 (Human Natural Killer-1) en N413 ont des problèmes d'apprentissage et de mémoire de même qu'une LTP réduite dans la région CA1 de l'hippocampe<sup>181</sup>. Les glycosylations pourraient également influencer le devenir des récepteurs en accélérant leur dégradation dans les lysosomes<sup>178</sup> ou en permettant au récepteur d'interagir avec d'autres protéines. Cela semble être le cas pour la glycosylation sur l'acide aminé N413 de GluA2 qui promeut l'interaction avec la N-cadhérine ayant pour effet d'augmenter la présence de GluA2 à la MP<sup>182</sup>.

Les glycosylations servent au contrôle qualité de la protéine néo-synthétisée. Une autre étape du contrôle qualité des AMPAR est de vérifier leur liaison du glutamate et perméabilité ionique : les récepteurs qui ne peuvent pas lier le glutamate ou qui sont imperméables voient leur présence à la surface diminuée à la synapse et sont retenus dans le RE<sup>183</sup>. Si la protéine ne parvient pas à se replier correctement, ou si elle est non fonctionnelle, elle sera dégradée dans les protéasomes en suivant la voie ERAD (ER associated protein degradation), dont les mécanismes sont encore mal compris<sup>171,184</sup>. L'accumulation des protéines mal repliées, qui peut être létale pour la cellule, entraîne la « réponse aux protéines non repliées » (RPNR). Elle consiste en une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans le repliement, l'export et la destruction de protéines anormales tout en inhibant la synthèse protéique afin de diminuer le flux de nouvelles protéines et permettre à la cellule de dégrader les protéines mal-repliées<sup>185</sup>.

## 5 – Export du RE

Les modalités de la sortie des AMPAR du RE n'est pas encore clairement établie. La protéine qui a le plus d'influence sur la sortie des AMPAR du RE est CNIH2<sup>170</sup>. Les protéines cornichon pourraient interagir avec Sec23/24 qui initie la formation des vésicules COPII (COat Protein Complex II) dans lesquelles les récepteurs sont exportées.  $\gamma 2$  favorise également l'export : chez les souris stargazer ( $\gamma 2$ -KO), la RPNR est déclenchée, signifiant que  $\gamma 2$  participe à l'export<sup>186</sup>.  $\gamma 2$  est également capable de lever la rétention des formes flop dans le RE<sup>187</sup>. De même en l'absence de  $\gamma 8$  (souris  $\gamma 8$ -KO), la TARP la plus abondante dans l'hippocampe, les récepteurs sont retenus intracellulairement<sup>122</sup>.

Certaines éditions des sous-unités favorisent également leur rétention dans le RE, comme pour le variant « flop » alors que le variant « flip » est correctement envoyé à la MP<sup>187</sup>. La sous-unité GluA2 (R), la plus abondante, est retenue dans le RE par un mécanisme inconnu. Sa sortie semble promue par le relargage de  $Ca^{2+}$  provenant du RE, permettant l'activation de CaMKII associé à PICK1, un interacteur du CTD de GluA2 et dont l'activité permet au récepteur de continuer son trafic jusqu'à la MP<sup>188</sup>. Cette rétention, en allongeant le temps passé dans le RE pourrait servir à promouvoir l'hétéromérisation des récepteurs qui est

plus favorable<sup>189</sup>. La protéine cytosolique SAP97, associée à GluA1 pourrait également réguler la sortie du RE<sup>190</sup>, mais aucun mécanisme n'a été clairement mis en évidence jusqu'à présent.

Les complexes AMPAR néo-synthétisés qui ont passé le contrôle qualité et qui sont prêts à être exportés sont rassemblés au niveau des sites de sortie (ER Exit Sites : ERES) desquels bourgeonnent des vésicules COPII. Ces vésicules fusionnent avec un compartiment en amont de l'AG, le ERGIC situé entre 300 et 500nm des ERES<sup>191</sup>.

## **B) Le compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC)**

### **1 – Structure**

Le ERGIC est un système tubulo-vésiculaire servant au triage et au trafic bi-directionnel des lipides et des protéines entre le RE et l'AG<sup>173</sup>. Il est présent dans tout le compartiment somato-dendritique<sup>173</sup>. Sa structure et son statut d'organelle stable reste encore débattu. Il a été initialement considéré comme un transporteur transitoire, généré par la fusion de vésicules COPII et appartenant soit au RE, soit à l'AG. Cependant il existe des preuves que le ERGIC soit une structure stationnaire. Il n'est pas affecté par le traitement à la brefeldin A (BFA) et lors de la mitose, alors que le RE se transforme pour former des citernes périnucléaires épaisses et que l'AG se dissocie transitoirement, les structures du ERGIC restent intactes. Il semble donc être une organelle à part entière, indépendante des deux autres compartiments. Le modèle actuel du ERGIC le décrit comme un réseau interconnecté composé de vacuoles stationnaires avec lesquelles fusionnent des tubules dynamiques chargés de transporter les cargos<sup>192</sup>.

### **2 – Rôle et fonctions**

Le rôle du ERGIC est multiple. Il sert d'étape intermédiaire entre le RE et l'AG où il reçoit entre autres les protéines néo-synthétisées contenues dans les vésicules COPII provenant du RE. Il semble également participer au contrôle qualité et repliage des protéines et permet de ramener les protéines mal repliées ou mal assemblées vers le RE<sup>192</sup> afin que seules les protéines matures atteignent l'AG.

Le ERGIC reçoit également les vésicules COPI provenant de l'AG, permettant le recyclage de différentes molécules telles que les lipides et les protéines vers le RE<sup>192</sup>. Les vésicules COPI ont longtemps été considérées comme le pendant rétrograde des vésicules COPII, afin d'assurer le transport rétrograde des protéines et de compenser la perte de membrane aux ERES due au bourgeonnement des vésicules. Mais les vésicules COPI pourraient également se charger du transfert antérograde entre le ERGIC et l'AG<sup>192</sup>.

Les AMPAR transitent par le ERGIC. Leur trafic a été étudié par sécrétion contrôlée, permettant une sortie du RE synchronisée et les récepteurs colocalisent avec les marqueurs du ERGIC (ERGIC53 et p58)<sup>162</sup>. Cette colocalisation est maximale 50 à 60 minutes après la sortie du RE et décroît à mesure que GluA1 progresse à travers la voie de sécrétion. Cette organelle est également très impliquée dans une forme de sécrétion qui s'affranchit d'un passage dans l'AG et qui sera décrite dans cette partie.

## **C) L'appareil de Golgi (AG)**

### **1 – Structure**

Découvert par Camillo Golgi en 1898, l'AG est une organelle constituée de citernes aplaties d'un diamètre compris entre 0,5 et 1 µm. Ces citernes forment plusieurs compartiments fonctionnellement distincts que les protéines néo-synthétisées traversent, et qui possèdent des populations enzymatiques différentes. Le cis-Golgi, le plus proche du RE sert à trier les protéines afin de les renvoyer vers le RE ou de les faire progresser à travers l'AG. Les protéines néo-synthétisées atteignent alors les citernes médianes puis le TGN qui trie les protéines pour les répartir dans différents types de vésicules destinées à l'export vers les lysosomes ou vers la MP. Il reçoit également les cargos transportés de manière rétrograde provenant du système endomembranaire de la voie d'endocytose<sup>193</sup>.

### **2 – MPT de l'AG**

Les protéines qui arrivent dans l'AG sont le substrat de mannosidases et de diverses glycosyltransférases qui donnent naissance à des séquences glucidiques diverses et complexes. Ces MPT sont souvent utilisées comme marqueurs du passage des protéines dans l'AG. Dans le cas des AMPAR, celui-ci est sujet à débat, et sera discuté à la fin de cette partie. Par exemple, dans le cortex frontal de rat<sup>194</sup>, une faible portion de GluA2 est sensible à endoH, une glycosidase permettant le clivage des oligosaccharides complexes de l'AG. La majorité du GluA2 y est insensible, ce qui semble confirmer que la majorité du GluA2 transite par l'AG. Cependant, toujours en utilisant endoH, d'autres groupes trouvent des proportions très différentes (et qui seront discutées plus loin), suggérant que la majorité des AMPAR ne transitent pas par l'AG.

Dans l'AG, les AMPAR peuvent également être le substrat de palmitoylations, correspondant à la liaison thioester d'un palmitate sur un résidu cystéine cytosolique. Les AMPAR peuvent être palmitoylés sur deux résidus cystéine conservés, un immédiatement après le TM2 et l'autre juste après le TM4. Le premier est très proche du site d'édition Q/R et a lieu dans l'AG. Elle est assurée par l'enzyme GODZ et promeut l'accumulation du récepteur



dans l'AG<sup>195</sup> réduisant l'expression des AMPAR à la MP<sup>196</sup>. Leur dé-palmitoylation pourrait ainsi être un signal pour libérer les AMPAR de l'AG.

### 3 – Golgi Outposts (GO)

Dans les neurones, l'AG est localisé dans le soma, obligeant théoriquement les protéines synthétisées dans les dendrites à voyager rétrogradement vers le soma afin de mûrir dans l'AG. Il existe cependant des structures appelées Golgi outposts (GO), issues de la fission de long tubules qui émergent de l'AG somatique. Leur caractérisation et leur détection est rendue difficile par le fait qu'ils ne possèdent pas tous les marqueurs classiques de l'AG<sup>173</sup>, mais des études *in vitro* et *in vivo* semblent indiquer que 20% des neurones d'hippocampe possèdent des GO dans au moins une de leurs dendrites<sup>173</sup>. Globalement, on les retrouve dans 5% des dendrites, préférentiellement dans la dendrite apicale sur le segment proximal (<30µm du corps cellulaire)<sup>173</sup>. Chez la drosophile, ils sont localisés au niveau des embranchements dendritiques<sup>197</sup>. Beaucoup de questions restent à éclaircir en ce qui concerne les GO. Il n'existe pas de données sur le pourcentage des AMPAR qui empruntent les GO, ni sur les MPT dont ils pourraient être l'objet.

### 4 – Sortie de l'AG

Les récepteurs membranaires néo-synthétisés sont rassemblés et triés dans des micro-domaines du TGN. Ce triage est réalisé entre autres grâce à des interactions entre des protéines adaptatrices cytosoliques et les motifs cytoplasmiques des protéines membranaires sécrétées ou de leurs protéines associées<sup>198</sup>.

Les différentes protéines qui transitent par l'AG peuvent donc être triés et sortir dans des vésicules différentes. Par exemple, les AMPAR et les récepteurs GABA intègrent des vésicules différentes avant d'être exocytées à la MP<sup>198</sup>. En revanche, il reste à établir si les différentes combinaisons d'AMPA telles que les homomères GluA1 et les hétéromères GluA1/GluA2 peuvent être transportées dans les mêmes vésicules. Les mécanismes exacts qui régissent la sortie des AMPAR de l'AG restent mal compris. L'interaction de  $\gamma 2$  avec nPIST, une protéine enrichie dans le AG et la PSD pourrait participer à la sortie des AMPAR du compartiment<sup>199</sup>. De même que certaines interactions protéiques ou MPT des AMPAR qui seront détaillées dans la partie 3.

## D) Transport vésiculaire

Dans les cellules polarisées comme les neurones, l'adressage des protéines est critique pour établir et maintenir la différenciation morphologique et fonctionnelle des différents compartiments. Il existe plusieurs mécanismes d'adressages pour assurer la polarité : (1) un



adressage sélectif par des mécanismes de tri lors de la biosynthèse de la protéine pour la ségréger et l'envoyer vers la MP cible (2) la transcytose, déjà observée dans les neurones pour la transferrine<sup>200</sup>, les plgR (polymeric immunoglobulin receptors)<sup>201</sup>, ou les neurotrophines<sup>202</sup> et lors de laquelle les protéines sont exocytées dans un compartiment pour ensuite être endocytées et transportées vers le compartiment cible, et (3) des mécanismes différentiels d'exocytose, d'endocytose, de recyclage et de dégradation en fonction des compartiments.

Dans les neurones, un triage des cargos est effectué au niveau du segment initial de l'axone qui empêche les cargos somato-dendritiques d'être transportés dans l'axone<sup>203</sup>. Différents motifs impliqués dans l'adressage dendritique ont été identifiés tels que le motif YXXΦ chez les récepteurs LDL (low-density lipoprotein)<sup>204</sup> et du récepteur de la transferrine<sup>204,205</sup> ainsi qu'un motif di-leucine du domaine cytosolique d'un canal potassium (Shal K<sup>+</sup>)<sup>206</sup>, des transporteurs de glycine<sup>207</sup>, des récepteurs à l'acétylcholine nicotinique<sup>208</sup> et des récepteurs à la sérotonine 5-HT1AR<sup>209</sup>. Un motif d'adressage dendritique a aussi été mis en évidence dans le CTD proximal de GluA1 et permet d'adresser un cargo axonal dans les dendrites, mais sa délétion n'empêche pas l'adressage somato-dendritique du GluA1 mutant<sup>210</sup>. Cependant de nombreuses protéines ne possèdent pas de motifs connus et d'autres mécanismes pourraient être impliqués. De même, la façon dont sont triés les cargos au sein des dendrites et qui déterminent jusqu'où les cargos sont transportés, ainsi qu'où ils sont exocytés reste à déterminer.

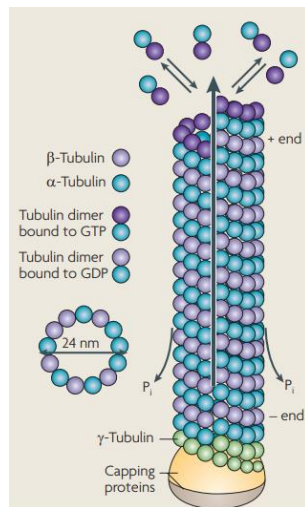
Les protéines néo-synthétisées sont transportées dans des vésicules le long du cytosquelette de la cellule par des moteurs moléculaires. Le cytosquelette est composé de microtubules (MT) et de filaments d'actine. Il sert à la fois à assurer l'architecture du neurone et à acheminer les organites et les cargos dans les différents compartiments du neurone. Les maladies neurodégénératives sont souvent associées avec une diminution de la masse du cytosquelette dans les axones et les dendrites ou à un changement de leur stabilité, comme dans le cas de la sclérose latérale amyotrophique, la paraplégie spastique familiale ou encore la maladie de Parkinson<sup>211</sup>.

## 1 – Structure du cytosquelette

### Microtubules

Les microtubules (MT) sont des polymères de tubuline présents dans tout le neurone. Ils ont parfois été observés dans les épines dendritiques, dans lesquels ils peuvent être recrutés en réponse à l'activité<sup>212,213</sup> (Figure 12). Dans les neurones matures, les MT se dissocient des centrosomes et forment un réseau constitué de MT de différentes longueurs, de moins d'un micromètre à plusieurs centaines de micromètres<sup>211</sup>. Les MT sont organisés en

« bundles » parallèles. Dans l'axone, ils sont orientés uniformément avec leur extrémité « plus » dirigée à l'opposé du soma, alors qu'ils ne sont pas orientés dans les dendrites (Figure 13), soulevant la question de l'adressage des cargos dans ce compartiment.

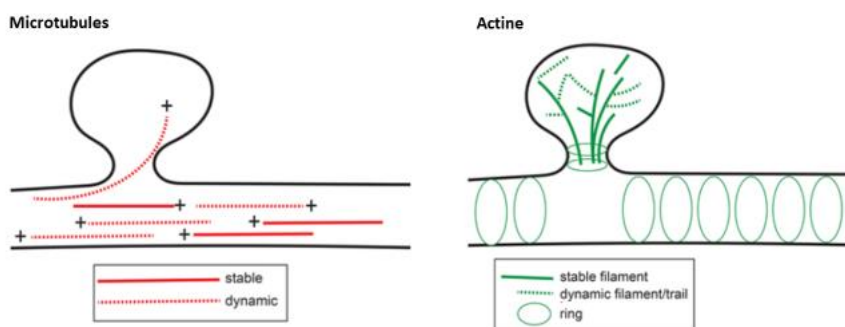


**Figure 12 : Structure des microtubules**

Les microtubules sont des polymères cylindriques rigides de 25nm de diamètre composés d' $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline. Ces deux molécules ont la même structure tri-dimensionnelle et s'associent pour former des microtubules polarisés ( $\beta$ -tubuline à l'extrémité « plus » et  $\alpha$ -tubuline à l'extrémité « moins »). Source : Kaur et al. 2014

Les MT sont classés en fonction de leur stabilité<sup>211</sup>. Les MT labiles étant soumis à un renouvellement rapide, possèdent peu de MPT. A l'inverse les MT stables sont riches en tubuline acétylée et dé-tyrosinée et les plus stables, dits « stables au froid » sont riches en tubuline poly-aminée qui leur confèrent cette propriété. Dans les dendrites ils sont enrichis en tyrosination, acétylation et glutamylations à chaînes courtes, contrairement à ceux des axones qui sont riches en glutamylations à longues chaînes, polyaminations et qui sont dé-tyrosinées<sup>214</sup>. Ces MPT semblent être spécifiques à l'orientation des MT dans les neurones, par exemple, les MT stables dont l'extrémité moins est distale sont acétylés et les MT dynamiques à l'extrémité plus distale sont tyrosinés.

Ces MPT modulent l'affinité des différents moteurs pour les microtubules et participerait à réguler l'adressage des cargos<sup>215</sup>, bien que les mécanismes qui régulent ces MPT et organisent le TI soient mal compris.

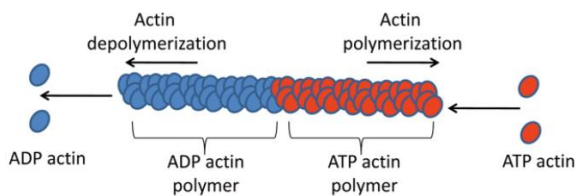


**Figure 13 : Organisation du cytosquelette neuronal**

Dans les dendrites, les microtubules ne possèdent pas d'orientation particulière et peuvent occasionnellement être présents dans les épines dendritiques. Les filaments d'actine sont présents dans les dendrites sous forme d'anneaux, et sont enrichis dans les épines dendritiques. Source : Nirschl et al., 2017

## Actine

Les filaments d'actine sont issus de la polymérisation de monomères d'actine (Figure 14). Ils peuvent être associés à plus d'une centaine de protéines accessoires différentes qui contrôlent la formation des filaments. A l'échelle nanoscopique, l'organisation du cytosquelette d'actine dans les dendrites est très dynamique et « patchy ». Les épines dendritiques sont très riches en actine. Le cytosquelette d'actine de l'épine peut être modulé par l'activité<sup>216</sup> et lorsqu'il est aboli, la diffusion des récepteurs, leur endocytose et exocytose est affectée<sup>217</sup>. Le transport sur le cytosquelette d'actine est considéré plus local que le transport sur les microtubules compte tenu de l'organisation du réseau (Figure 13). Cependant il existe des réseaux organisés de filaments d'actine<sup>218</sup> qui pourraient rendre possible un transport plus longue distance. De nombreuses myosines sont d'ailleurs impliquées dans le transport antérograde de protéines membranaires<sup>219</sup>.



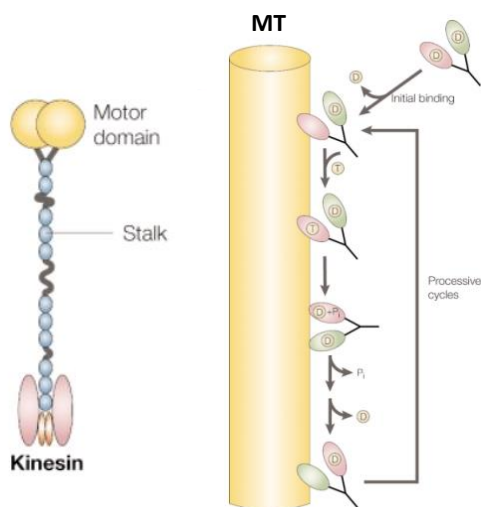
**Figure 14 : Structure des filaments d'actine**

Les filaments d'actine ont un diamètre de 7nm et sont formés par la polymérisation de monomères d'actine qui forment une double hélice polarisée possédant une extrémité pointue et une extrémité barbée. Source : Street & Brian, 2011

## 2 – Les moteurs moléculaires

Les moteurs moléculaires sont des protéines générant une force motrice en hydrolysant l'ATP. Il en existe plusieurs grandes familles : les kinésines et dynéines sont associées aux MT<sup>220</sup> et les myosines qui sont associées aux filaments d'actine<sup>221</sup>.

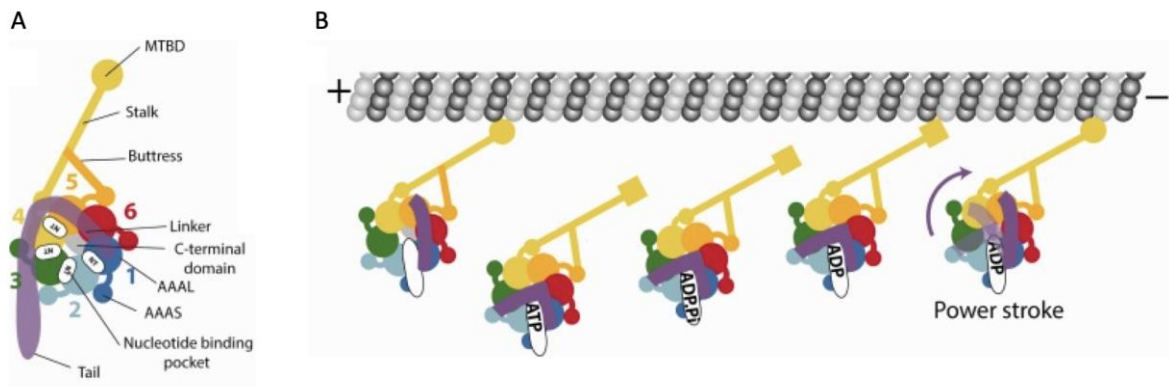
### Kinésines & dynéines



**Figure 15 : Les kinésines**

Il existe 15 familles de kinésines de kinesin-1 à kinesin-14B<sup>220</sup> qui peuvent exercer plusieurs fonctions dont le transport de cargos le long des microtubules. Elles sont composées d'un domaine moteur et d'une queue comprenant un domaine super hélice qui peut leur permettre de se dimériser. Elles possèdent également un site de liaison au cargo par leur queue ou par le biais de chaînes légères. Les kinésines mentionnées dans ce manuscrit appartiennent au groupe des kinesin-1 (KIF5), kinesin-2 (KIF17) et kinesin-3 (KIF1 et KIF13). Elles possèdent un domaine moteur N-terminal et sont dirigées vers l'extrémité « plus » des microtubules. Les têtes des domaines moteurs sont coordonnées et permettent aux kinésines de « marcher » sur les MT sans s'en dissocier. Source : Hirokawa et al., 2009 et Woehlke & Schliwa, 2000.

Les kinésines (KIF) (Figure 15) constituent une superfamille de protéines possédant des rôles variés, allant de la modulation du cytosquelette, à la division cellulaire, au transport d'organelle ou au transport de cargo<sup>220</sup>. Leur morphologie et fonctionnement particulier leur permettent de « marcher » sur les MT afin de transporter les vésicules à destination. Les queues des kinésines, qui leur permettent de lier leur cargo, ont des séquences variées qui reflètent la diversité des cargos qu'elles doivent transporter. Elles peuvent interagir directement avec leur cargo ou passer par l'intermédiaire de protéines adaptatrices<sup>220</sup>.



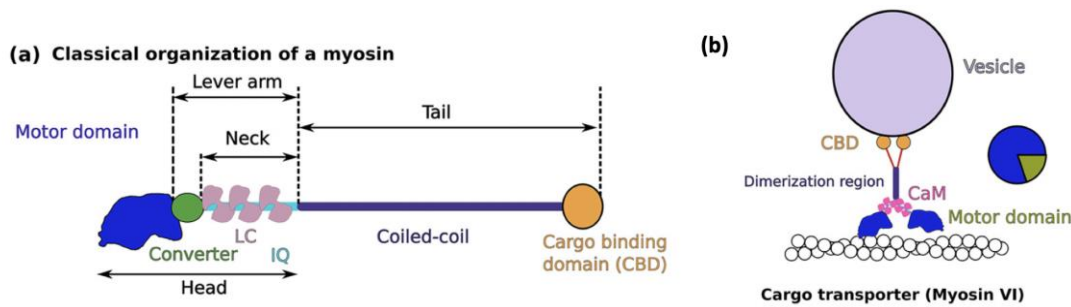
**Figure 16 : Les dynéines**

**A-** Les dynéines possèdent plusieurs isoformes, dont dynéine-1 qui est responsable de la plupart des déplacements vers l'extrémité « moins » des microtubules. Elles sont composées de nombreuses chaînes protéiques et peuvent atteindre un poids moléculaire de 1.8MDa. Elles possèdent trois chaînes lourdes et de nombreuses chaînes accessoires. Le CTD des chaînes lourdes composent le moteur qui contient un anneau de 6 domaines AAA+ (AAAL large+small AAAS) duquel émergent entre autres un stalk qui contient le site de liaison aux microtubules. **B-** Contrairement aux kinésines qui « marchent » sur les microtubules, les dynéines se déplacent par « power stroke » en changeant la conformation du linker qui se plie et se remet droit. Source : Schmidt & Carter 2016

Les dynéines (Figure 16) sont également des protéines motrices associées aux MT. Ce sont des protéines gigantesques, à la structure beaucoup plus complexe que les kinésines. Seulement deux dynéines cytosoliques ont été identifiées et des mutations de ce moteur sont liées à diverses maladies neurologiques<sup>222</sup>.

### Myosines

Les myosines sont des moteurs moléculaires qui évoluent sur les filaments d'actine (Figure 17). Chez les humains il en existe 40 divisées en 12 classes en fonction de leur architecture. Les myosines qui assurent le transport des cargos font partie du groupe des myosines non-conventionnelles. Elles ont une morphologie analogue aux kinésines et sont composées de trois domaines principaux, une tête motrice de 80kDa, d'un cou de longueur variable et d'une queue aux séquences et structures diverses<sup>221</sup>. Elles peuvent se déplacer vers l'extrémité plus qui les emmène vers la périphérie du neurone ou vers l'extrémité moins qui permettent le transport des vésicules d'endocytose loin de la MP<sup>223</sup>.



**Figure 17 : Les myosines**

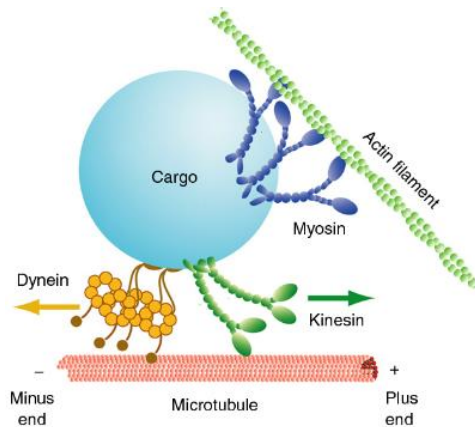
Il existe différentes classes de myosines qui possèdent toutes différentes fonctions. Contrairement aux myosines conventionnelles qui forment des filaments, certaines myosines non conventionnelles peuvent participer au transport de cargos le long des filaments d'actine<sup>219</sup>. **(a)** Leur domaine moteur contient un domaine de liaison avec l'actine et un site qui lie et hydrolyse l'ATP pour générer le mouvement. Du domaine moteur émerge un bras de longueur variable, une queue également de longueur variable et un site de liaison des cargos. Certaines, comme MyoV et MyoVI se dimérisent pour transporter leurs cargos. Source : Robert-Paganin et al. 2019

### Adressage et régulations des moteurs moléculaires

Les neurones sont des cellules très asymétriques. L'adressage des cargos est donc une problématique majeure pour trier les cargos destinés à l'axone des cargos destinés aux dendrites. Les kinésines sont dirigées vers l'extrémité « plus » des MT alors que les dynéines sont dirigées vers l'extrémité « moins », or dans les dendrites les MT ne sont pas orientés. Une même vésicule interagit avec plusieurs moteurs (Figure 18). Les vésicules effectuent de légères rotations, ce qui permet aux différents moteurs associés à la vésicule d'interagir avec les MT<sup>224</sup>. Le mouvement des vésicules résulte donc d'une compétition entre les différents moteurs sur des « rails » non orientés.

Différents mécanismes semblent régir le TI et l'adressage des cargos. Les moteurs peuvent également être la cible d'interactions protéiques qui empêchent leur association avec les MT<sup>225</sup>. Aussi, certains moteurs moléculaires ont des affinités particulières pour les MT possédant certaines modifications. Cela permettrait d'orienter le transport dans les dendrites et d'envoyer le cargo au bon endroit au bon moment. Par exemple, les kinesines-1 ont une affinité pour les MT riches en tubuline dé-tyrosinée et acétylée alors que les kinesin-5 et 13 sont associés à des MT à la tubuline tyrosinée<sup>211</sup>. Les MT sont également associées à des protéines appelées MAP (MT Associated Proteins) qui pourraient participer à l'adressage. Par exemple, MAP2<sup>226</sup> ou SEPT9 qui est uniquement présent dans les dendrites participe à la ségrégation des cargos dendritiques et axonaux transportés respectivement par KIF1 et KIF5<sup>215</sup>. Il est intéressant de noter que le moteur KIF5 est associé aux AMPAR qui sont exclusivement dendritiques or il arrive à être trié et envoyé préférentiellement dans l'axone, suggérant que le cargo et ses protéines associées doivent jouer un rôle dans l'adressage.





**Figure 18 : Moteurs moléculaires associés aux vésicule**

Une même vésicule peut être associée à plusieurs moteurs, et le trafic de ces vésicules résulte donc d'un « tir à la corde » entre les différents moteurs. Source : Shubeita & Gross, 2012

L'activité régule également l'activité des moteurs et pourrait promouvoir l'échange du cargo entre les kinésines assurant le transport sur de longues distances et le transport local vers les sites d'exocytoses assurés par les myosines. En effet, les moteurs moléculaires sont sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ . C'est le cas par exemple pour KIF5 chez *C.elegans*<sup>227</sup> ou pour KIF17, un moteur associé aux NMDAR et qui est le substrat d'une phosphorylation en S1029 par CaMKII qui a pour effet de décharger le moteur de son cargo<sup>228,229,230</sup>.

Pour les myosines, l'effet semblerait inversé et l'activité semble promouvoir l'interaction avec le cargo suite à un changement conformationnel<sup>221,231</sup> induit par CaM bien que d'autres expériences le contredisent<sup>221</sup>. Cependant, bien que le  $\text{Ca}^{2+}$  lève l'auto-inhibition de MyoV, le fait qu'il promeuve le transport en lui-même est toujours débattu. C'est également le cas pour myoVI<sup>232</sup> chez laquelle le  $\text{Ca}^{2+}$  compromet la coordination entre les deux têtes<sup>233</sup>.

### 3 – Les moteurs connus associés aux AMPAR

#### Les kinésines et dynéines

Différents moteurs associés aux récepteurs du glutamate ont été identifiés. Par exemple, KIF5 régule la présence du récepteur métabotrope du glutamate mGlu1 à la MP par le biais de l'adaptateur SNAP23<sup>234</sup>. Le moteur KIF17 a été associé au transport des vésicules contenant les NMDAR<sup>228,235,236</sup>.

Par électrophysiologie, il a été déterminé que la transmission synaptique médiée par les AMPAR est dépendante des kinésines et dynéines<sup>237</sup>. Le moteur le mieux caractérisé est KIF5 appartenant au sous-groupe kinesin-1. Il en existe 3 sous-types KIF5A, B et C<sup>238</sup> possédant des domaines moteurs très similaires. Grâce à son CTD, GluA2 interagit avec GRIP1 qui interagit *in vivo* avec KIF5B<sup>239</sup>. La surexpression d'une forme dominante négative de KIF5 réduit la quantité de GRIP1 et GluA2 à la synapse chez la souris, suggérant que le complexe KIF5-GRIP1 transporte les AMPAR<sup>239</sup>. L'isoforme KIF5C est également important pour l'expression de GluA2 à la MP, ces vésicules sont également positives pour la N-cadhérine (une protéine d'adhésion) permettant peut être une régulation de la localisation

synaptique du récepteur<sup>240</sup>. Chez *C. elegans*, KIF5 régule la présence à la synapse des hétéromères GLR-1/GLR-2 alors que les homomères de GLR-1 ne sont pas affectés<sup>241</sup>. La dissociation de GRIP1 et KIF5 est critique pour l'exocytose des AMPAR et est régulée par la phosphorylation de T956 de GRIP1, opérée par Akt1<sup>242</sup>.

KIF13, un membre du sous-groupe kinesin-3 a été identifié chez *C. elegans* dans lequel le moteur régule le trafic de GLR-1 dans le « ventral nerve cord », modulant le comportement locomoteur de *C. elegans*<sup>243</sup>. Très récemment, KIF13A a été identifié comme moteur moléculaire assurant le transport des AMPAR chez les rongeurs<sup>244</sup>. Il lie les AMPAR par le biais de la protéine adaptatrice centaurin- $\alpha$ 1. Ce moteur s'est révélé nécessaire au transport des AMPAR jusqu'à la synapse pendant l'induction de la LTP.

KIF1A, bien qu'il n'y ait pas de preuves directes, pourrait également être impliqué dans le TI des AMPAR. En effet, ce moteur ferait partie d'un complexe AMPAR grâce à son interaction directe avec liprin- $\alpha$  qui interagit avec GRIP1 via son CTD<sup>245,246</sup>. L'expression d'un mutant liprin qui ne peut pas lier GRIP1 bloque l'adressage synaptique des AMPAR. GRIP1 est donc capable de lier plusieurs moteurs<sup>246</sup>.

### Les myosines

Plusieurs myosines qui participent au trafic des AMPAR ont été identifiées. MyoV est une myosine dirigée vers l'extrémité plus des filaments. Aucune interaction directe avec les AMPAR n'a été identifiée mais par biochimie il a été montré que MyoVb interagit avec les ER via le complexe Rab11-FIP2<sup>247</sup> de manière dépendante du Ca<sup>2+</sup>. Le moteur promeut l'entrée des ER dans les épines dendritiques en réponse à l'induction de la cLTP. En utilisant SEP-GluA1 et par électrophysiologie, les auteurs ont rapporté que l'accumulation des AMPAR nécessite également ces protéines en réponse à la cLTP dans les neurones CA1 de l'hippocampe<sup>247</sup>. Lorsqu'un mutant MyoVb qui ne permet pas l'interaction avec Rab11 est exprimé, la localisation des AMPAR à la MP est affectée même en conditions basales<sup>248</sup>.

MyoVI est dirigée vers l'extrémité moins des filaments et s'associe aux AMPAR grâce à la protéine adaptatrice SAP97<sup>249,250</sup>. Ce moteur semble avoir un double rôle dans le trafic des AMPAR. D'une part il semble impliqué dans l'endocytose des AMPAR<sup>251</sup> mais il est aussi impliqué dans leur trafic vers la MP. En effet, un fragment du CTD de MyoVI qui empêche l'association MyoVI-SAP97 dans les neurones provoque une expression des AMPAR réduite à la surface<sup>252</sup>. Le TI antérograde de ces moteurs n'a jamais été observé et rien n'indique si ces moteurs sont impliqués dans le TI des récepteurs néo-synthétisés ou recyclés.

## 4 – Caractéristiques du transport vésiculaire des AMPAR

Dans notre laboratoire, le transport vésiculaire de GluA1 a été caractérisé par vidéo-microscopie grâce à un système de sécrétion contrôlée. C'est un transport dirigé rapide et linéaire qui possède des caractéristiques très stables et reproductibles<sup>81</sup>.

En conditions basales, les vésicules contenant GluA1 néo-synthétisé sont transportées de manière antérograde et rétrograde le long des dendrites afin de distribuer rapidement les AMPAR dans tout le compartiment somato-dendritique. Les vésicules possèdent une vitesse d'environ 1,5 $\mu\text{m/s}$  dans les deux sens suggérant que les mêmes moteurs sont impliqués dans les deux directions. Des vitesses beaucoup plus lentes (50 à 150 fois plus lentes) ont été précédemment mesurées pour des vésicules contenant GluA1 et GluA2, sans doute à cause des limitations des méthodes d'imagerie<sup>165</sup>. Plus récemment, des vésicules contenant GluA2 ont été mesurées à des vitesses de 1 $\mu\text{m/s}$ <sup>253</sup> et de 1,6 $\mu\text{m/s}$  pour des vésicules contenant GLR-1 dans *C. elegans*<sup>227</sup>.

Le TI est étudié par vidéo-microscopie après photoblanchiment d'une portion de dendrite. Les vésicules contenant GluA1 néo-synthétisé sont au nombre de 10 à 15/20 $\mu\text{m}^2/\text{min}$  en moyenne. Les vésicules passent la majorité de leur temps en transport antérograde, suivi par le transport rétrograde et passent environ 30% du temps en pause. Des pauses de ce type ont également été observées chez *C. elegans* et se produisent préférentiellement proche des épines.

Les protocoles de cLTP induisent une modulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Pendant l'induction, la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  est fortement augmentée pour se normaliser après 1h. Cette concentration est corrélée avec une modulation biphasique du TI. Lors de la phase d'induction (0-5min), les vésicules sont ralenties et le temps passé en pause augmente, afin peut-être de permettre l'exocytose des AMPAR. Occasionnellement, le signal des vésicules en pause disparaît, même si l'exocytose n'a pas été visualisée directement lors de ces expériences. Lors de la seconde phase de la cLTP (après 20 minutes), des vagues de  $\text{Ca}^{2+}$  plus rares et de plus faible amplitude sont détectées. Le nombre de vésicules transportant GluA1 et leur vitesse antérograde sont augmentés. Cela pourrait être dû au changement des moteurs assurant le trafic, ou à une modulation de leurs propriétés. L'activité régule également le TI à travers les MPT des AMPAR. Les phosphorylations des S831 et S845 sur le CTD de GluA1 sont corrélées à la cLTP. Les phosphomutants ont un nombre de vésicules et une vitesse antérograde augmentés, rappelant les caractéristiques observées lors de la LTP. Ces récepteurs sont préférentiellement localisés au bout des dendrites<sup>81</sup>. Le TI peut donc être modulé par les MPT du CTD des sous-unités des AMPAR.



Le TI de GluA1 est donc un mécanisme très régulé, caractéristique du transport le long des MT. Il est très stable et reproductible en conditions basales et modulé de façon biphasique lors de la LTP. Lors de la phase tardive, le TI de GluA1 est régulé par la phosphorylation des sérines du CTD de GluA1. Les CTD des AMPAR sont le substrat d'autres MPT et interactions protéiques importantes pour la localisation des récepteurs à la MP. C'est le cas par exemple pour 4.1N dont l'association avec GluA1 est corrélée à la LTP et est importante pour l'exocytose des AMPAR. Une autre protéine cytosolique d'intérêt est SAP97 qui est associée aux moteurs. Ces interactions ont-elles un rôle dans le TI et pourraient-elles participer à sa modulation ? La modulation du TI des AMPAR est-elle due à un recrutement différentiel des moteurs ? Ce recrutement est-il opéré par les interacteurs de leur CTD ? Est-il spécifique de la composition des AMPAR ?

## E) Exocytose

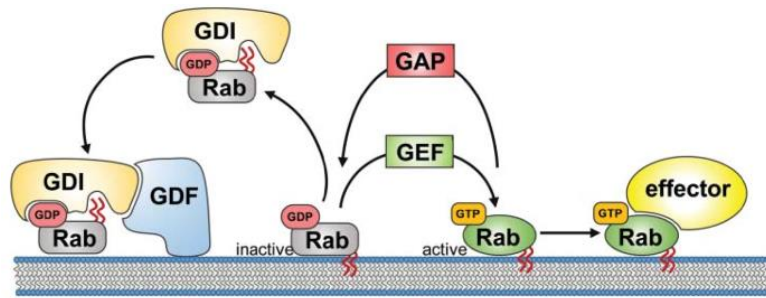
La sécrétion d'une protéine membranaire se termine lors de l'exocytose. La fusion entre différents compartiments implique plusieurs familles de protéines, telles que les SNARE et les Rab.

### 1 – Les protéines SNARE et Rab

Les protéines Rab et SNARE sont impliquées dans les événements de fusion membranaires, que ce soit avec la MP ou entre les compartiments.

Les protéines responsables de la fusion membranaire sont les protéines SNARE (Soluble NSF-attachment protein (SNAP) receptors), une famille de 60 protéines comprises entre 20 et 30kDa. La plupart de ces protéines sont des protéines membranaires intégrales qui sont ancrées à la membrane via leur CTD. Ces protéines sont constituées d'un motif en hélice  $\alpha$  amphiphatiques qui permet la liaison des protéines SNARE entre elles<sup>139</sup>. Différentes SNARE impliquées dans le trafic des AMPAR ont été identifiées et seront discutées dans la partie suivante.

Afin de fusionner, les vésicules doivent reconnaître leur membrane cible à l'aide des protéines Rab, de petites protéines monomérique liées à la GTP recrutées au niveau de la membrane des vésicules et des « Rab effectors », qui peuvent être des protéines diverses (protéines motrices, kinases, phosphatases, facteurs d'ancrage, adaptateurs de triage etc), présentes dans la membrane cible<sup>254</sup> (Figure 19).



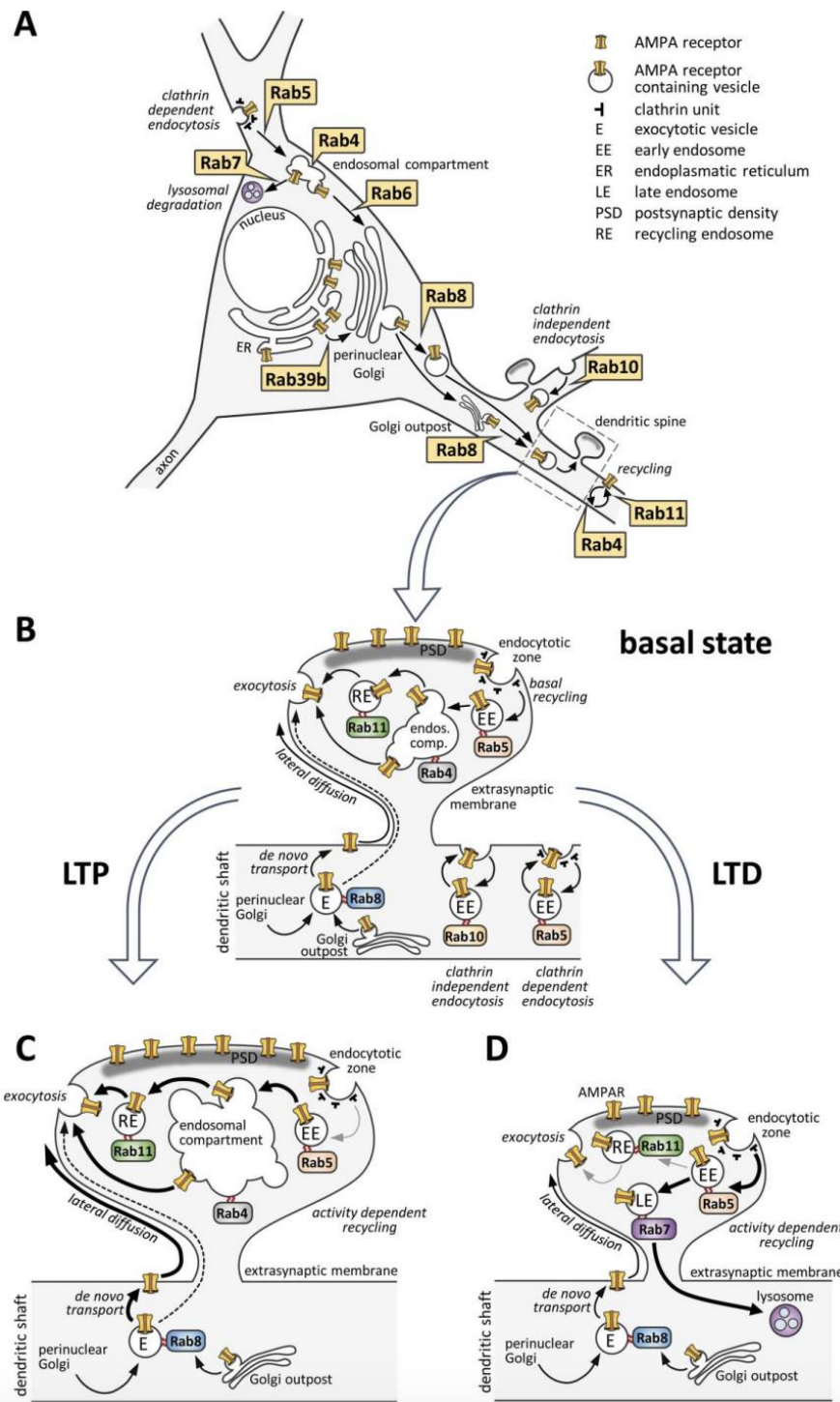
**Figure 19 : Fonctionnement des protéines Rab**

Les Rab sont de petites protéines monomériques liées à GTP. Elles sont recrutées au niveau de la membrane des vésicules après la prénylation de leur CTD et grâce aux GDI (GDP dissociation inhibitor), qui interagissent avec les GDFs (GDI displacement factors) de la membrane cible, après quoi le GDI est relargué dans le cytosol. Les Rab sont activés par un GEF (guanine nucleotide exchange factor) qui catalyse l'échange du GDP en GTP. Les Rab lient alors des « Rab effectors » présents dans la membrane cible afin d'ancrer la vésicule, permettant de rapprocher les membranes afin que les SNARE assurent la fusion. Après la fusion, les Rab sont inactivées par hydrolyse du GTP en GDP opérée par GAP (GTPase-activating protein). Le Rab-GDP est ensuite relargué de la membrane par un GDI et se prépare pour nouveau cycle. Source : Hausser & Schlett 2019

De nombreux Rab ont été identifiés dans le trafic des AMPAR, en conditions basales et lors d'événements de plasticité synaptique (Figure 20). Ces protéines et leurs protéines associées (Figure 19) sont impliqués dans de nombreuses pathologies telles que la maladie de Parkinson<sup>255</sup>, la maladie de Huntington<sup>256</sup>, la maladie d'Alzheimer<sup>257</sup>, la sclérose latérale amyotrophique<sup>258</sup>, la maladie Charcot-Marie-Tooth de type 2B<sup>259</sup> etc.

Différents Rab sont impliqués dans le transport antérograde des AMPAR. Rab39B régule la sortie du RE vers l'AG<sup>260</sup>. Il interagit avec la protéine PICK1 qui est nécessaire pour le transport de GluA2 vers l'AG. Plus loin dans la voie de sécrétion, Rab8 est localisé proche de la MP post-synaptique et dans le TGN<sup>254</sup> et semble impliqué dans la translocation entre le TGN et la MP<sup>261,262</sup>, en conditions basales et pendant l'activité<sup>198,261</sup>. Des événements d'insertion opérés via Rab8 ont été observés dans les épines dendritiques<sup>261,263</sup> et ils semblent nécessaires pour l'expression de la LTP<sup>261,262</sup>.

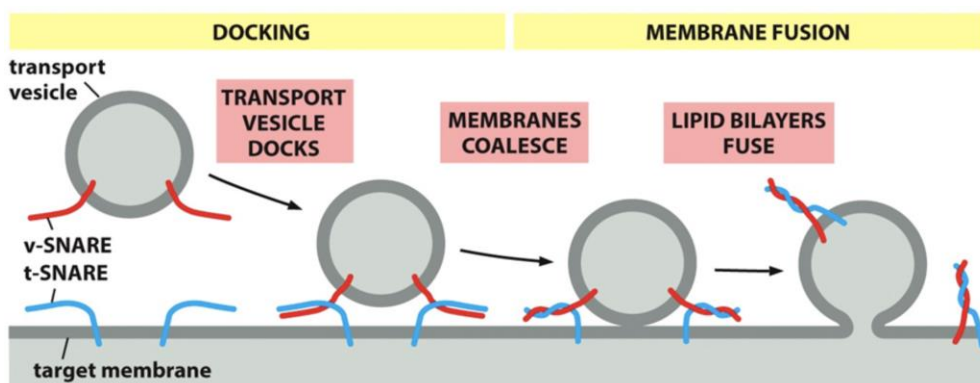
Des Rab impliqués dans le recyclage des AMPAR ont également été identifiés. Rab5, avec l'aide de RIN1, son effecteur<sup>264,265</sup> est impliqué dans la CME et dirige les AMPAR internalisés vers les EEs<sup>264</sup>. Chez *C. elegans*, les AMPAR sont recyclés grâce à Rab10 durant la CIE<sup>266</sup>. Rab11 est localisé dans les ER et il régule le recyclage continu des GluA1 endocytés en conjonction avec MyoVb<sup>247</sup> et l'adaptateur FIP2<sup>247</sup> pendant la LTP<sup>161,261</sup> et la LTD<sup>267</sup>. Rab7 est impliqué dans le trafic entre les LE et les lysosomes<sup>254</sup>, une voie que peu d'AMPAR empruntent parce qu'ils sont préférentiellement ré-exocytés<sup>268</sup>. Ce Rab s'avère important pour l'expression de la LTD<sup>267</sup>. Egalement, Rab6 est associé à l'AG et participe également au trafic des AMPAR séquestrés par le rétromère vers l'AG chez *C. elegans*<sup>269,270</sup>. Rab4 pourrait également participer au recyclage de GluA2<sup>198</sup>.



**Figure 20 : Les protéines Rab impliquées dans le trafic des AMPAR**

Récapitulatif des différents Rab impliqués dans le trafic des AMPAR en conditions basales et lors de la LTP et LTD. Source : Hausser & Schlett 2019

## 2 – L'exocytose des AMPAR



**Figure 21 : L'exocytose par les protéines SNARE**

L'exocytose est opérée par les protéines SNARE. La formation d'un complexe SNARE nécessite l'appariement de 2 vesicular-SNARE (v-SNARE) et 2 ou 3 target-SNARE (t-SNARE). Ces protéines forment ce qu'on appelle un complexe trans-SNARE qui va rapprocher les deux membranes et fournir l'énergie nécessaire à la fusion. Source : Essential Cell Biology, 4th edition

Les protéines SNARE permettent l'exocytose des AMPAR (Figure 21). La vitesse d'exocytose des AMPAR après l'induction de la LTP apparaît plus lente que celle des vésicules pré-synaptiques et dure des dizaines de secondes ou minutes<sup>136</sup>. Les lieux exacts de l'exocytose des AMPAR restent mal définis et on ignore s'ils varient en fonction des récepteurs néo-synthétisés ou recyclés.

Différentes protéines du complexe SNARE régulant l'exocytose des AMPAR ont été identifiées. VAMP2, le vSNARE le plus abondant du cerveau<sup>271</sup> contribue au trafic des AMPAR de manière constitutive et dépendant de l'activité<sup>272</sup>. Il est associé avec des vésicules contenant GluA1 au niveau de la post-synapse et il a été suggéré qu'il est nécessaire pour l'exocytose des AMPAR pendant la LTP<sup>273</sup>.

Les syntaxines (Stx) sont de petites protéines transmembranaires qui interagissent avec les SNARE. Stx-3 est présent dans les axones et les dendrites, et son interaction avec complexin a été proposée pour contrôler l'exocytose des AMPAR pendant la LTP<sup>273</sup>. A la post-synapse, Stx-4 définit un micro-domaine pour l'exocytose des ER contenant des AMPAR<sup>146</sup>. Le KO de Stx-4 induit une diminution de la transmission synaptique basale due à la réduction des AMPAR et des NMDAR dans les cultures de neurones d'hippocampes. Les animaux KO pour Stx-4 ont une LTP déficiente et des problèmes d'apprentissage<sup>274</sup>.

SNAP-47 a également été identifié comme faisant partie du complexe assurant l'insertion des AMPAR pendant la LTP<sup>272</sup>. Cependant, le complexe SNARE impliqué dans l'insertion constitutive des AMPAR n'a pas été établi. D'autres protéines ont été impliquées dans l'exocytose des AMPAR. C'est le cas par exemple de 4.1N qui lie le CTD de GluA1, mais son rôle dans ce mécanisme n'est pas défini.

## F) Particularités de la voie de sécrétion dans les neurones

Les neurones sont des cellules très étendues, qui nécessitent un adressage précis dans le temps et dans l'espace. Pour s'affranchir de cette régulation complexe, les neurones et leur RE présent dans tout le compartiment dendritique, permettent une synthèse et un export local des AMPAR, directement à la synapse grâce au « spine apparatus », ou en court-circuitant l'AG situé dans le soma.

### 1 – Le « Spine apparatus »

Le RE peut former des protrusions dans certaines épines dendritiques où il constitue une forme de RE spécialisé appelé Spine Apparatus (SA), composé de saccules de RE lisse empilées<sup>275-278</sup>. Il a été observé dans 48% des épines matures, préférentiellement dans les épines les plus grandes<sup>275</sup>. Cette structure semble cibler les épines lors d'activité synaptique intense pour réguler la force synaptique<sup>279</sup>. Les AMPAR et NMDAR ont été identifiés dans le SA<sup>275</sup>. Chez la souris, la délétion de la synaptopodine qui fait le lien avec le cytosquelette d'actine empêche la formation du SA et entraîne des déficits de la LTP et de la mémoire spatiale<sup>280,281</sup>. Ces résultats ont été corroborés par plusieurs études qui lui ont découvert un rôle important dans la régulation des phénomènes de plasticité synaptique<sup>282-284</sup> et qui confère à la synthèse locale des récepteurs par le SA un rôle important, bien que la proportion de récepteurs concernés reste inconnue.

### 2 – « Bypass » de l'AG

Les AMPAR peuvent être synthétisés et s'assembler à plusieurs dizaines de micromètres du soma dans lequel se trouve l'AG. De plus, la plupart des dendrites ne possèdent pas de GO. Cela pose la question de savoir comment s'organise spatialement le trafic des récepteurs et si les protéines néo-synthétisées doivent voyager de manière rétrograde vers le soma afin de mûrir dans l'AG.

Certaines protéines neuronales, telles que les AMPAR ne voient pas leur présence à la MP affectée par la BFA qui dissocie l'AG<sup>285</sup>. L'étude des glycosylations a également permis de mettre en évidence ce phénomène : les AMPAR qui ne transitent pas par l'AG possèdent des N-glycans riches en mannose acquis dans le RE. Cela suggère que les AMPAR néo-synthétisés peuvent atteindre la MP via une voie de sécrétion qui court-circuite l'AG. Par biochimie, il a été estimé que 80% du GluA1 et 40% du GluA2 présent à la MP ne transite pas par l'AG<sup>162</sup>.

### 3 – Organisation pour une sécrétion locale

De nombreuses études ont révélé que les dendrites possèdent une organisation propice à la synthèse locale et l'export rapide des protéines. Les AMPAR peuvent être synthétisés dans les dendrites, comme en témoigne les mRNA de GluA1 et GluA2 qui y ont été identifiés<sup>286</sup>.

Le RE somato-dendritique est organisé pour la synthèse locale<sup>173</sup>. Par exemple, les ribosomes, abondants au niveau du soma, sont également détectés dans les dendrites proximales<sup>287,275,288</sup> et sous la base des épines dendritiques<sup>289</sup>. De plus, le RE possède des zones morphologiquement plus complexes qui limitent la diffusion des protéines néo-synthétisées aux embranchements dendritiques ou près des synapses<sup>288</sup> pour promouvoir le rassemblement des protéines, en limitant leur diffusion et faciliter leur export du RE<sup>162,288</sup>. Au niveau de ces « hot spots », les ribosomes sont plus nombreux, de même que les ERES<sup>290</sup> qui sont corrélés avec les clusters de ERGIC<sup>162,288</sup>. Cette morphologie particulière du RE est régie par l'interaction avec les moteurs moléculaires qui favorisent une morphologie peu complexe du RE<sup>288</sup> et qui peut être régulée par les mGluR qui modifient le réseau de MT<sup>288</sup>.

Le RE est donc compartimentalisé pour favoriser la production locale des récepteurs qui peuvent être acheminés jusqu'à la MP sans passer par l'AG. Il a été montré que les AMPAR s'accumulent dans les ER avant d'atteindre la MP<sup>162</sup>, même après un traitement BFA. Les récepteurs pourraient transiter du RE jusqu'aux ER via le ERGIC, très proche. Dans cette même étude, deux autres cargos ont été étudiés (VSV-G et neuroligin1), pour lesquels la présence à la MP était abolie dans ces conditions<sup>162</sup>, confirmant que cette voie est spécifique à certains cargos. L'endroit où les AMPAR sortent du RE détermine vraisemblablement quelle voie ils vont emprunter. Par photoconversion et à l'aide d'un système de rétention dans le RE, Bowen et al. ont pu prouver que le trafic dendritique et somatique sont indépendants. GluA1 libéré dans les dendrites est alors envoyé vers les ERGIC locaux et très peu dans l'AG somatique. A l'inverse, GluA1 libéré dans le soma transite par l'AG somatique et s'accumule peu dans les ERGIC dendritiques.

Cependant, cette voie indépendante de l'AG n'est pas suffisante pour maintenir la LTP, puisqu'après l'induction, la potentiation des neurones traités à la BFA voient leur potentiation décliner<sup>291</sup>. Le trafic des AMPAR par l'AG apparait donc important. Cependant de nombreuses questions restent à élucider. Y-a-t-il une composition particulière du complexe AMPAR empruntant préférentiellement cette voie ? Quels effets les différents motifs de glycosylation engendrés par ces deux voies de sécrétion ont sur les propriétés des récepteurs ? Les récepteurs empruntant les différentes voies sont-ils soumis à des régulations différentes ? Cela change-t-il le moment auquel ces récepteurs sont recrutés ?



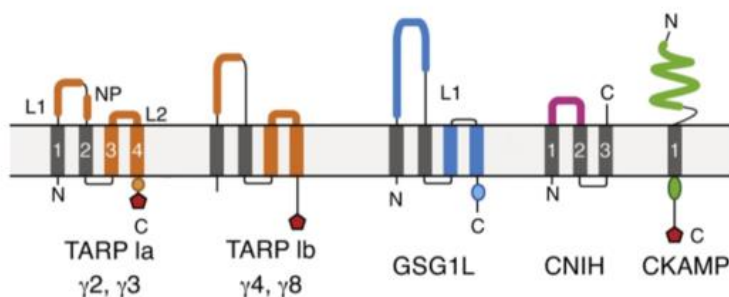


## Partie 3 : Régulation du TI par les protéines associées aux AMPAR et les MPT

Les AMPAR néo-synthétisés interagissent avec un grand nombre de partenaires, depuis l'édition de leur ARNm jusqu'à leur exocytose. Ces interacteurs peuvent être transmembranaires ou cytoplasmiques. Ces derniers interagissent avec les CTD du récepteur. Les AMPAR sont également le substrat de MPT, dont certaines régissent ces interactions. Ces interactions protéiques et MPT participent directement ou indirectement à la régulation des propriétés physiologiques des AMPAR ou/et de leur trafic. Cependant, leurs effets sur le TI sont difficiles à étudier et restent mal compris.

### A) Association avec des protéines auxiliaires

Dès leur synthèse, les AMPAR sont associés avec de nombreuses protéines transmembranaires, décrites dans la partie 2. Ils se lient également à des protéines dites auxiliaires. Une protéine auxiliaire est une protéine transmembranaire formant un complexe stable, directement liée aux AMPAR à la PM et qui modulent les propriétés physiologiques des récepteurs et leur trafic<sup>110</sup>. Les protéines auxiliaires des AMPAR comprennent notamment les TARP (Transmembrane AMPAR Regulatory Proteins) qui sont les mieux caractérisées, GSG1L (germ cell-specific gene 1-like protein), les protéines cornichon (CNIH) et les protéines de la famille CKAMP (Shisa/cysteine-knot AMPA receptor modulating protein) (Figure 22).



**Figure 22 : Protéines auxiliaires des AMPAR**

Structure des différentes protéines auxiliaires des AMPAR. Source : Eibl & Plested 2018

### 1 – Les protéines de la famille des TARP

Les TARP comprennent 8 membres : CACNG 1 ou  $\gamma$ 1 à CACNG8 ou  $\gamma$ 8. Les TARP sont des protéines composées de 4 TMD et d'un CTD cytosolique basique contenant un site d'interaction avec les protéines à domaine PDZ<sup>292</sup>. En ce qui concerne les AMPAR,  $\gamma$ 2 (stargazine) et  $\gamma$ 8 sont les plus étudiées. Elles s'associent avec des AMPAR tétramériques<sup>186</sup> selon une stœchiométrie variable<sup>32,293</sup>, bien que le ratio 2 TARP/récepteur soit le plus prévalent.



$\gamma 2$  est exprimé de manière ubiquitaire dans le SNC, mais il est particulièrement exprimé dans le cervelet<sup>294</sup> alors que  $\gamma 8$  est préférentiellement exprimé dans l'hippocampe<sup>295</sup>. Ces deux protéines jouent un rôle majeur pour la transmission synaptique. Elles sont situées autour du canal ionique et altèrent les propriétés du pore<sup>296</sup>, modulant les propriétés biophysiques des récepteurs, en ralentissant significativement la désactivation des AMPAR et les cinétiques de désensibilisations<sup>297</sup> et dépendent de l'édition Q/R<sup>298</sup>.

Les TARP modulent également le trafic des récepteurs, en particulier grâce à leur CTD<sup>299,300</sup> qui possède un domaine de liaison aux protéines à domaine PDZ. Par exemple,  $\gamma 2$  est nécessaire pour le ciblage des récepteurs à la PSD et est associée à un phénotype pathologique. Les souris mutantes « stargazer », à la mutation nulle pour stargazine<sup>294</sup> ont des crises d'épilepsies soudaines et de l'ataxie<sup>294</sup>. Chez les souris stargazer, la présence des AMPAR à la MP est réduite dans le cervelet (où stargazine est la TARP la plus exprimée)<sup>301</sup>. En revanche, la transmission synaptique n'est pas affectée dans l'hippocampe où  $\gamma 8$  est la TARP la plus abondante<sup>301</sup>. Les souris  $\gamma 8$ -KO, bien qu'elles ne présentent pas de problèmes anatomiques ou comportementaux apparents<sup>122</sup>, présentent une réduction de 85% des AMPAR dans l'hippocampe.

$\gamma 2$  et  $\gamma 8$  régulent donc la présence des AMPAR à la MP. Ils présentent une localisation membranaire spécifique :  $\gamma 2$  est synaptique alors que  $\gamma 8$  est plus largement extra-synaptique<sup>292</sup>. Comme détaillé dans la Partie 1,  $\gamma 2$  module la transmission synaptique en régulant bi-directionnellement la diffusion membranaire des récepteurs via leur ancrage à la PSD. L'activité synaptique entraîne la phosphorylation du CTD de  $\gamma 2$  permettant son interaction avec PSD95. Ces phosphorylations sont réalisées par PKA<sup>302,303</sup>, PKC ou CaMKII<sup>112</sup> lors de la LTP dépendante des NMDAR. Ceci facilite le piégeage du récepteur à la synapse<sup>115</sup>. A l'inverse, lors de la LTD dépendante des NMDAR,  $\gamma 2$  est dé-phosphorylée par PP1 ce qui abolit son interaction avec PSD95.  $\gamma 2$  est aussi impliquée dans l'endocytose dépendante des NMDAR<sup>304</sup>. Lorsqu'elle est dé-phosphorylée, elle interagit avec AP-2 déclenchant ainsi la CME et le trafic des AMPAR des EE aux LE et lysosomes<sup>304</sup>. Le rôle de  $\gamma 2$  dans le recyclage pourrait aussi être induit par la désensibilisation du récepteur. La désensibilisation entraînerait la dissociation du complexe  $\gamma 2$ -AMPAR, après quoi les AMPAR seraient internalisés<sup>299</sup>. Une autre étude montre cependant que les AMPAR quittent la synapse seulement par diffusion, sans internalisation<sup>116</sup>. Ces différents mécanismes pourraient coexister et réguler le trafic des récepteurs possédant différentes conformations après la désensibilisation<sup>292</sup>.

$\gamma 8$  module également le trafic des AMPAR : le KO de  $\gamma 8$  diminue le nombre d'AMPAR extra-synaptiques, affectant la transmission synaptique basale et la LTP<sup>305</sup>, mais n'a pas d'effet sur la LTD<sup>122</sup>. A l'inverse, la surexpression de  $\gamma 8$  augmente le nombre d'AMPAR à la

MP<sup>292</sup>.  $\gamma 8$  pourrait également moduler la diffusion du récepteur. Tout comme  $\gamma 2$ ,  $\gamma 8$  interagit *in vivo* avec PSD95 et PSD93<sup>306</sup>. Cependant son rôle dans l'ancrage des récepteurs à la PSD est débattu. En effet, son CTD est le substrat de phosphorylations (S277, S281) et les souris phospho-déficientes ont une LTP affectée<sup>307</sup>. Cependant des souris knock-in (KI) pour  $\gamma 8$  dont le site d'interaction PDZ a été tronqué ont une LTP normale<sup>121</sup>. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par la redondance des TARP qui pourraient compenser l'absence de  $\gamma 8$ .

Le rôle de  $\gamma 2$  et  $\gamma 8$  dans le TI des AMPAR reste à éclaircir. De même, leur impact sur les complexes AMPAR néo-synthétisés spécifiquement n'a pas été caractérisé. Ces protéines possèdent des domaines intracellulaires peu homologues<sup>303</sup>, et ces divergences pourraient expliquer les différences des mécanismes de recrutement qu'elles subissent.  $\gamma 2$  et  $\gamma 8$  sont des candidates prometteuses pour la régulation du TI.  $\gamma 2$  semble être impliquée dans le trafic depuis l'AG jusqu'à la PM<sup>294,308</sup> et pourrait aussi servir de chaperonne pour assurer le bon repliement des AMPAR, restant associée avec les AMPAR après le RE<sup>186</sup>. Dans l'hippocampe,  $\gamma 8$  est la TARP prédominante, capable de restaurer la transmission synaptique en l'absence de  $\gamma 2$ . Elle est associée aux AMPAR dès le RE<sup>170</sup> et sa N-glycosylation est essentielle pour le trafic du complexe jusqu'à la MP<sup>309</sup>.  $\gamma 8$  accompagne donc le récepteur dès le début de la voie de sécrétion et jusqu'à la MP. De plus, elle est importante pour l'expression de la LTP<sup>122</sup>, lors de laquelle le TI est modulé. Cela fait d'elle une bonne candidate pour la régulation du TI observée par Hangen et al. On peut émettre l'hypothèse que  $\gamma 8$  permettrait la liaison directe ou indirecte avec des moteurs moléculaires grâce à son CTD cytosolique.

## 2 – Autres interacteurs

Les AMPAR possèdent d'autres protéines auxiliaires telles que les CNIH, GSG1L, CKAMP, ou SynDIG.

### Les protéines cornichon (CNIH)

Il existe 4 protéines de la famille des CNIH : CNIH1-4. Les protéines CNIH sont des protéines auxiliaires possédant 3 TMD qui lient la majorité des AMPAR dans le SNC des rats, encore plus que les TARP<sup>292</sup>. Seuls CNIH2 et 3 sont des protéines auxiliaires des AMPAR<sup>310</sup>, mais leurs rôles respectifs restent encore à établir.

Dans les complexes AMPAR, CNIH2 partage les mêmes sites d'interaction que  $\gamma 8$  et ces deux protéines sont retrouvées dans les mêmes complexes<sup>32</sup> avec un ratio 2/2 préférentiellement<sup>32</sup>.

Comme les TARP, les CNIH régulent le trafic des récepteurs ainsi que leurs propriétés. Elles modulent la physiologie des récepteurs en ralentissant la désactivation et la

désensibilisation du récepteur, promouvant une configuration ouverte<sup>310</sup>. Elles régulent aussi le trafic et le nombre d'AMPA à la MP<sup>311,312</sup>. Elles interviennent tôt dans la voie de sécrétion. Dans les cellules HeLa, la surexpression de CNIH2 modifie les motifs de glycosylation de GluA2, signifiant qu'il participe également à la maturation des AMPAR dans le RE<sup>313</sup>. Dans les souris KO pour CNIH2-3, les récepteurs immatures sont retenus dans le RE et ne peuvent pas transloquer vers l'AG, diminuant la présence des AMPAR à la MP (principalement les hétéromères GluA1/GluA2) et affectant la transmission synaptique basale et la LTP<sup>314</sup>. A l'inverse, la surexpression de CNIH augmente la présence des AMPAR à la MP<sup>292</sup>. La proportion des CNIH qui atteignent la MP est débattue, mais il semblerait que CNIH n'atteigne la MP qu'en présence de  $\gamma 8$ <sup>292</sup>. De plus, tout comme les TARP, les CNIH peuvent également être le substrat de MPT qui pourraient complexifier leur rôle et leur fonction dans la régulation du trafic des récepteurs<sup>292</sup>.

### GSG1L

GSG1L est une protéine qui possède une structure similaire aux protéines TARP<sup>315</sup>. Elle module les propriétés des AMPAR et accélère la désactivation et désensibilisation, réduisant la contribution des AMPAR à la synapse<sup>316</sup>. GSG1L régule négativement la présence du récepteur à la MP en diminuant son transport jusqu'à la MP et en promouvant l'endocytose<sup>316</sup>. Ces régulations opérées par GSG1L sont critiques car chez la souris KO, la LTP est augmentée à cause de la quantité d'AMPA accumulés dans les réserves extrasynaptiques<sup>316</sup>. Cette régulation par GSG1L semble s'opérer par le biais de CNIH2, puisqu'un KO de CNIH2 l'abolit<sup>316</sup>. Les différentes combinaisons de protéines auxiliaires qui intègrent les complexes AMPAR permettent donc des régulations croisées.

### Les protéines CKAMP

Les protéines Shisa constituent une famille de protéines d'échafaudages constituées d'un NTD riche en cystéine et d'un CTD contenant un site d'interaction PDZ<sup>317</sup>. Il existe CKAMP39 ou Shisa8, CKAMP44 ou Shisa9, CKAMP52 ou Shisa6 et CKAMP59 ou Shisa7<sup>318</sup>, toutes étant exprimées dans l'hippocampe. Ces protéines affectent également les propriétés des AMPAR et sont impliquées dans l'ancrage des récepteurs à la PSD.

Dans cette famille, Shisa9 est la protéine la plus étudiée. Elle est présente dans les complexes AMPAR/ $\gamma 8$ , particulièrement dans le gyrus dentelé<sup>292</sup>. Elle module les propriétés du récepteur et ralentit la re-sensibilisation<sup>319</sup>. Shisa9 régule également la présence des AMPAR à la synapse et dans les réserves extra-synaptiques, mais n'affecte pas la LTP<sup>2</sup>. Son rôle s'opère vraisemblablement via son site d'interaction PDZ qui lui permet d'interagir avec de nombreuses protéines telles que SAP97, PICK1/GRIP1<sup>320,321</sup> et particulièrement PSD95 à la PSD pour stabiliser les AMPAR<sup>292</sup>.

Shisa6 fait également partie des complexes AMPAR- $\gamma$ 8<sup>118</sup>. Elle module les propriétés du récepteur en empêchant la désensibilisation complète, favorisant l'état actif des récepteurs et en diminuant le temps nécessaire pour la récupération de la désensibilisation<sup>118</sup>. Tout comme Shisa9, elle est présente à la PSD où elle interagit avec PSD95 grâce à son CTD pour y piéger les récepteurs<sup>118</sup>.

Shisa7, également enrichie à la PSD, interagit également avec les AMPAR<sup>322</sup>. Elle est présente dans les mêmes complexes que Shisa6<sup>322</sup> et affecte aussi la re-sensibilisation du récepteur<sup>322</sup>. Elle lie également PSD95 et pourrait participer au recrutement des complexes pendant la LTP<sup>322</sup>.

### Autres interacteurs

Les AMPAR peuvent également être associés à différentes protéines SynDIG (synapse differentiation-induced gene proteins) et PRRT (proline-rich transmembrane proteins), des protéines à 1 TMD.

SynDIG1 interagit avec les AMPAR synaptiques et extrasynaptiques<sup>323</sup>. Sa localisation synaptique est régulée par l'activité via une palmitoylation<sup>324</sup>, mais elle ne semble pas affecter la présence et la distribution des AMPAR à la surface ni leurs propriétés<sup>325</sup> et serait plutôt impliquée dans la synaptogénèse<sup>325,326</sup>.

PRRT1 ou SynDIG4 est présente dans les complexes AMPAR<sup>318</sup>, particulièrement dans les neurones CA1 de l'hippocampe<sup>32</sup>. Elle est localisée principalement dans les zones extra-synaptiques et module les propriétés du récepteur en ralentissant la désensibilisation des homomères GluA1 mais pas des hétéromères GluA1/GluA2<sup>327</sup>. Elle régule également le trafic du récepteur : dans l'hippocampe les neurones KO pour SynDIG4 présentent des niveaux à la MP de GluA1 et GluA2 réduits sans affecter la transmission basale<sup>328</sup>. Elle pourrait stabiliser préférentiellement les GluA1 phosphorylés en S845<sup>328</sup>, mais les mécanismes exacts restent à éclaircir. Dans les tranches d'hippocampe provenant de souris SynDIG4/PRRT1 KO, les protocoles de LTP connus pour engendrer l'insertion d'AMPAR perméables au Ca<sup>2+</sup> (homomères GluA1) ne sont pas mis en évidence<sup>327</sup>. De même, la LTD dépendante des NMDAR entraînant temporairement l'insertion des AMPAR perméables au Ca<sup>2+</sup> à la synapse est abolie dans l'hippocampe ces souris<sup>328</sup>. SynDIG4, bien qu'elle soit décelée dans des complexes contenant GluA2<sup>32</sup>, semble donc opérer un rôle important sur les AMPAR perméables au Ca<sup>2+</sup> et pourrait servir à maintenir des réserves extra-synaptiques recrutées lors d'événements de plasticité synaptique<sup>292</sup>.

PRRT2 a également été identifiée dans les complexes AMPAR<sup>315</sup>, mais n'est retrouvée à la PSD qu'à des niveaux très faibles<sup>329</sup>. Elle module la présence des AMPAR à la PM

lorsqu'ils sont exprimés dans les cellules hétérologues<sup>330</sup>. Toutefois, son rôle sur le trafic des AMPAR dans les neurones ou la modulation de leurs propriétés physiologiques reste à établir.

Les AMPAR forment des complexes avec de nombreuses protéines auxiliaires, dont certaines restent peut-être à découvrir. Ces nombreuses protéines peuvent s'associer en une multitude de complexes de stœchiométries variables. L'influence des protéines auxiliaires est capitale puisqu'elles modulent les propriétés des AMPAR, générant une grande variété de complexes aux propriétés diverses. Ces protéines modulent également le trafic des complexes, permettant sans doute un recrutement précis des complexes en fonction de leurs propriétés. Les protéines auxiliaires ont des rôles variés dans le trafic des AMPAR, que ce soit pour la stabilisation à la MP, l'endocytose et potentiellement pour le TI des récepteurs. Bien qu'aucun moteur moléculaire ne leur ait été attribué à ce jour, certaines semblent accompagner les AMPAR dès le début de la voie de sécrétion. Leurs domaines intracellulaires pourraient permettre des associations avec des moteurs divers qui permettraient un recrutement précis des complexes en fonction des besoins.

## **B) Association avec des protéines cytosoliques**

Les AMPAR interagissent également avec des protéines solubles, au niveau de leur CTD, un domaine peu homologue entre les sous-unités du récepteur et qui permet des interactions différentes. Ces interactions telles que 4.1N ou SAP97 pour GluA1 et GRIP1, PICK1, ou NSF pour GluA2 régulent le trafic du récepteur.

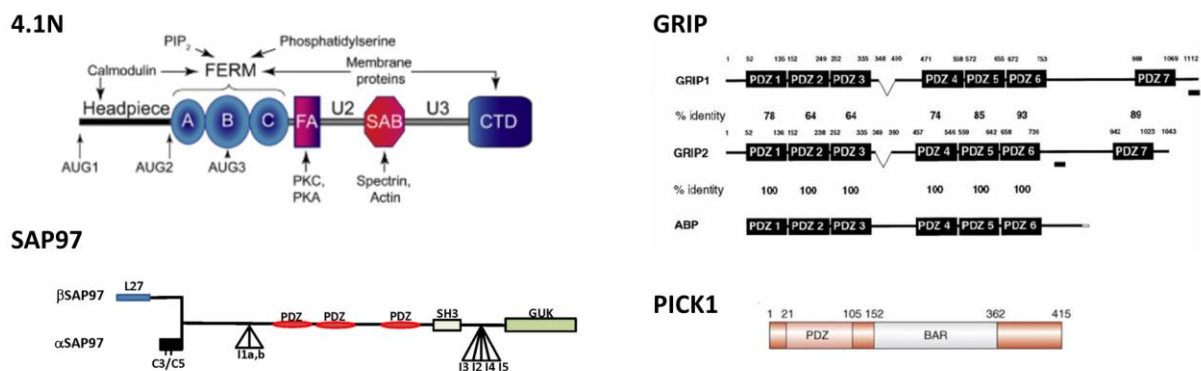
### **1 – 4.1N**

4.1N est codée par le gène EPB41L1 situé sur le chromosome 20<sup>331</sup> et subit un épissage alternatif important<sup>332</sup> engendrant une grande variété d'isoformes (Figure 23). Dans le cerveau, l'isoforme prédominant possède un poids moléculaire d'environ 135kDa<sup>331</sup>.

Les NMDAR lient 4.1B alors que GluA1 interagit avec 4.1N et 4.1G et GluA3 avec 4.1N<sup>332</sup>. Le CTD de 4.1N lie le CTD de GluA1, juste après le TMD4 (Figure 24). Cette interaction nécessite la dé-palmitoylation de la cystéine C811 de GluA1 qui engendre la phosphorylation des sérines S816 et S818 par PKC<sup>145</sup>. Ces phosphorylations permettent alors l'interaction avec 4.1N<sup>145</sup>. Les mutants de GluA1 ne possédant pas le site d'interaction pour 4.1N ont une présence de GluA1 à la MP réduite. De même, lors de la surexpression du CTD de 4.1N ou 4.1G, la localisation de GluA1 à la MP est diminuée<sup>87,145</sup>.

4.1N pourrait contribuer à la localisation de GluA1 à la MP grâce à plusieurs phénomènes. D'abord, les protéines 4.1 pourraient participer à l'organisation de

l'actine/spectrine<sup>87</sup>, et contribuer à la stabilisation/ancrage de GluA1 à la MP. Aussi, 4.1N a un rôle avéré pour l'exocytose des AMPAR. Lorsque l'interaction avec 4.1N est abolie (mutant S816A, S818A), la présence de GluA1 à la MP est diminuée de 20% par rapport au WT. A l'inverse le mutant S816D, S818D est augmenté de 20% par rapport au WT<sup>145</sup>. Des événements d'exocytose de SEP-GluA1 ont été observés au niveau du corps cellulaire et des dendrites. En cas de surexpression de 4.1N, le nombre d'événements par minute est augmenté et à l'inverse en cas de KD de 4.1N il est diminué. Pour le mutant S816A, S818A, moins de 2 événements d'exocytose par minute ont été observés contre plus de 12 pour le mutant S816D, S818D<sup>145</sup>.

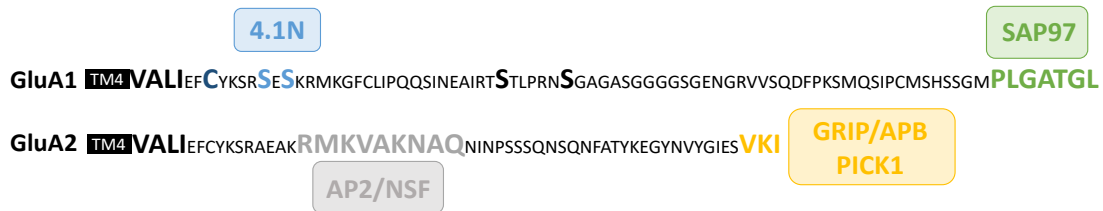


**Figure 23 : Structure des protéines cytosoliques interagissant avec le CTD des AMPAR**

**4.1N** est composée d'une « headpiece » aussi appelée U1 en N-terminal, un domaine FERM à trois lobes, un domaine adjacent au FERM (FERM adjacent domain : FA), contenant des sites de phosphorylations, un domaine U2 suivi d'un domaine SAB (Spectrin Actin Binding-domain), un domaine U3 et un CTD qui assure sa liaison avec des iGluRs. Les domaines U1, U2 et U3 ont des fonctions peu connues et sont soumis à des épissages alternatifs<sup>280</sup>. Source : Baines et al. 2014 **SAP97** est composé d'un NTD soumis à un épissage alternatif qui donne naissance aux isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ . L'isoforme  $\alpha$  possède des sites de palmitoylation (sur les cystéines C3 et C5) et l'isoforme  $\beta$  possède un domaine L27. SAP97 possède également des séquences soumises à un épissage alternatif I1a et I1b, suivis de 3 domaines PDZ, un domaine SH3 suivi d'autres séquences épissées (I3 à I5) et d'un domaine guanylate kinase (GUK). Source : Fourie et al. 2014 Les protéines **GRIP** sont des protéines possédant plusieurs domaines PDZ. GRIP1 et GRIP2 sont très homologues et ABP est un variant court à qui il manque une séquence NTD et le septième domaine PDZ. Les domaines de GRIP1 et 2 situés entre les domaines PDZ 2 et 3 peuvent être épissés. Source : Dong et al. 1999 **PICK1** est composé d'un domaine PDZ et d'un domaine BAR. Source : Dev & Henley 2012

L'interaction entre GluA1 et 4.1N est particulièrement importante lors de la LTP. La part de récepteurs phosphorylés au niveau de la S818, qui permet l'interaction, est augmentée lors de la LTP<sup>333</sup>. De plus, lorsqu'on diminue la quantité de 4.1N endogène, la LTP n'est pas maintenue<sup>145</sup>. La mutation de la S818 qui prévient l'interaction avec 4.1N a le même effet<sup>333</sup>. Bien que son mode d'action soit inconnu, cette interaction permettrait donc l'exocytose lors de l'activité afin de fournir un nombre d'AMPA suffisant à la MP pour alimenter la synapse lors de la LTP.

L'interaction de 4.1N avec GluA1 a lieu avant l'arrivée du récepteur à la MP, mais la localisation cellulaire de cette interaction est inconnue. On peut émettre l'hypothèse que cette interaction protéique, qui agit déjà sur l'exocytose en particulier lors de la LTP, se produit en amont du TI des récepteurs dans les vésicules. Dans ces conditions, 4.1N pourrait servir d'adaptateur pour un moteur moléculaire assurant le transport des complexes. Cette interaction étant favorisée lors de la LTP, elle pourrait alors expliquer la modulation du TI observé par Hangen et al.



**Figure 24 : Sites d'interaction des différentes protéines cytosoliques avec les AMPAR**

Séquences du CTD des AMPAR et séquences impliquées dans l'interaction de GluA1 avec 4.1N et SAP97 et dans l'interaction de GluA2 avec AP2/NSF et GRIP/APB/PICK1.

## 2 – SAP97

SAP97 (97kDa) appartient à la famille des MAGUK et lie uniquement la sous-unité GluA1. Sur GluA1 l'interaction est rendue possible grâce à une séquence Serine-Serine-Glycine et à un site d'interaction PDZ de type 1 situés au bout du CTD<sup>249,334</sup> (Figure 24). Cette interaction est particulièrement importante et est altérée dans la maladie d'Alzheimer et la schizophrénie<sup>335,336</sup>. Comme les autres protéines de la famille MAGUK, SAP97 possède trois domaines PDZ, un domaine SH3 (Src-homology 3) et un CTD guanylate kinase (GUK) inactif (Figure 23). SAP97 existe sous la forme de deux isoformes :  $\alpha$ -SAP97 et  $\beta$ -SAP97. Leur différence repose sur la présence en N-terminal d'un domaine L27 pour le variant  $\beta$ -SAP97, qui confère à la protéine une conformation peu compacte<sup>337</sup>. A l'inverse  $\alpha$ -SAP97 contient un NTD alternatif qui possède des cystéines palmitoylables (C3 et C5).

SAP97 est exprimée dans tout le cerveau<sup>338</sup> et est enrichie à la synapse. La surexpression de chaque isoforme augmente le nombre d'AMPAR à la MP<sup>340</sup>. La protéine  $\alpha$ -SAP97 est présente à la PSD et en augmente la taille et par conséquent le nombre de points d'ancrage disponibles pour les AMPAR. Cette localisation synaptique pourrait être régie par l'interaction de SAP97 avec PSD95<sup>341</sup>. A l'inverse,  $\beta$ -SAP97 est présente dans les régions pérисynaptiques<sup>342</sup> et pourrait conférer à SAP97 un rôle dans l'endocytose des récepteurs grâce à son interaction avec le moteur MyoVI décrit précédemment. En régulant la localisation synaptique des AMPAR, SAP97 influence donc la plasticité synaptique. La surexpression des deux isoformes abolit la LTP et augmente la LTD<sup>343</sup>. La surexpression de  $\alpha$ -SAP97



augmenterait la quantité d'AMPA synaptiques sans stimulation, empêchant une potentiation supplémentaire après l'induction. La surexpression de  $\beta$ -SAP97, à l'inverse, dirige les AMPAR et NMDAR dans les régions péri-synaptiques ce qui préviendrait l'induction de la LTP.

SAP97 est impliquée dans le TI de diverses protéines. Elle participe au TI des sous-unités NR1 et NR2B (NMDAR) qui court-circuitent l'AG au profit des GO<sup>236</sup>. L'interaction des NMDAR et de SAP97 est modulée par la phosphorylation de la S232 de SAP97 opérée par CaMKII et qui abolit la liaison avec le moteur<sup>344</sup>. Les vésicules du TI de NR1 et NR2B contiennent KIF17 qui assure le transport, ainsi que SAP97 et CASK (calmodulin-dependent serine protein kinase)<sup>236</sup>. CASK et SAP97 peuvent se multimériser grâce à leurs domaines L-27<sup>345</sup>. Cette liaison régule la conformation de la SAP97, alors stabilisée dans une conformation « étendue »<sup>346</sup> qui s'associe préférentiellement avec les NMDAR. A l'inverse, GluA1 possède une affinité pour une conformation plus compacte de SAP97<sup>346</sup>.

SAP97 est également impliqué dans le TI de GluA1. L'interaction de SAP97 avec GluA1 a lieu dès le RE ou l'AG<sup>190</sup>. En effet, le KD du SAP97 endogène entraîne l'accumulation de GluA1 dans l'AG somatique<sup>236</sup>. SAP97 participe également au transport antérograde des AMPAR grâce à son interaction directe avec MyoVI<sup>250</sup>. L'abolition de l'interaction SAP97-MyoVI mène à une diminution des AMPAR à la MP et à la synapse<sup>252</sup>. *In vitro*, il a également été montré que SAP97 interagit avec le moteur moléculaire KIF1B<sup>347</sup>. SAP97 est donc une protéine connue pour lier de nombreux moteurs et pourrait participer au TI longue distance observé par Hangen et al.

SAP97 possède également de nombreux interacteurs et est assujettie à des MPT qui régulent le trafic des AMPAR. Les variants I3 et I5 de SAP97 interagissent avec AKAP79/150 qui interagit avec PKA et PP2B, ce qui confère à SAP97 un rôle régulateur de la phosphorylation de GluA1 sur la sérine S845<sup>348</sup>. SAP97 peut aussi être phosphorylée sur la S39 par CaMKII et cette MPT est nécessaire au recrutement de SAP97 à la synapse<sup>349</sup> et empêche son interaction avec AKAP79/AKAP150<sup>350</sup>. De plus, le variant I3 de  $\beta$ -SAP97 possède un site d'interaction pour 4.1N qui lui-même interagit avec le cytosquelette d'actine, ce qui pourrait contribuer à l'ancrage du récepteur à la MP<sup>415</sup>.

SAP97 est associé aux AMPAR tôt dans la voie de sécrétion et participe au TI en facilitant la sortie de l'AG. Cette protéine est directement impliquée dans le TI des AMPAR, puisqu'elle sert d'adaptateur entre GluA1 et le moteur moléculaire MyoVI. Bien que le transport sur les filaments d'actine soit généralement considéré comme du transport « local », on peut se poser la question de savoir si le TI observé par Hangen et al. comprend des vésicules transportées par MyoVI par le biais de SAP97. De plus, compte tenu de l'importance de SAP97



pour l'expression des événements de plasticité synaptique, en modulant le nombre d'AMPAR à la MP, il serait intéressant d'étudier son effet sur le TI de GluA1 lors de la LTP. SAP97 et MyoVI sont-elles impliquées dans le TI longue distance observé par Hangen et al. en conditions basales ? Durant la LTP ? SAP97 est une protéine adaptatrice bien caractérisée pourrait-elle servir d'adaptateur pour une autre protéine motrice ?

### 3 – GRIP1, PICK1, APB

GluA2 interagit via le site d'interaction PDZ de son CTD avec les protéines GRIP1/2 et PICK1<sup>351</sup> (Figure 23 et 24). Ces interactions, conservées chez GluA3, sont régulées par des MPT du CTD de GluA2 : la phosphorylation de la tyrosine Y876 augmente la liaison avec GRIP1<sup>352</sup> alors qu'elle est inhibée par celle de la sérine S880 qui promeut l'interaction avec PICK1<sup>353-355</sup>.

Ces deux protéines ont un rôle complémentaire dans la régulation du trafic des AMPAR. Les protéines GRIP (Glutamate Receptor Interacting Protein) comprennent plusieurs membres : GRIP1 (comprenant 5 isoformes : GRIP1a-e), GRIP2 et ABP (AMPAR binding protein), un variant court de GRIP2<sup>292</sup>. En plus de sa liaison avec le moteur KIF5 qui assure le TI des AMPAR, GRIP1 s'est vu attribuer plusieurs rôles. Certaines études suggèrent qu'il promeut l'exocytose et la stabilisation des AMPAR à la PSD<sup>351, 353, 354, 356</sup>. Son interaction avec GluA2 est d'ailleurs plus forte durant la LTP<sup>352</sup>. D'autres études rapportent qu'il promeut la rétention intracellulaire des AMPAR<sup>352</sup> et empêche leur réinsertion, un rôle également proposé pour GRIP2<sup>357</sup>. Les protéines GRIP semblent donc réguler deux réservoirs d'AMPAR : les récepteurs membranaires et les récepteurs intracellulaires qui fonctionnent de concert afin d'alimenter la synapse<sup>352</sup>. Cependant, la façon dont GRIP1 parvient à réguler à la fois ces deux réservoirs n'est pas déterminée et pourrait dépendre du protocole de plasticité synaptique utilisé.

PICK1, à l'inverse, est impliquée dans l'endocytose des AMPAR et est nécessaire à l'expression de la LTD<sup>358-362</sup>. Elle contient 1 domaine PDZ qui lie GluA2 de manière dépendante du Ca<sup>2+</sup><sup>363, 364</sup> et un domaine BAR (Bin/amphiphysin/Rvs). Ces domaines lient les membranes recourbées et chargées négativement, ce qui pourraient participer au recrutement des récepteurs vers les sites d'endocytose<sup>365, 366</sup>. PICK1 recrute PKC $\alpha$  activée au niveau de l'épine dendritique permettant la phosphorylation de la S880 du CTD de GluA2 entraînant la dissociation de GRIP1, rendant possible l'interaction avec PICK1. Cette dissociation promeut la diffusion du récepteur qui précède son internalisation<sup>361, 365</sup>. PICK1 promeut ensuite l'endocytose en interagissant directement avec la protéine adaptatrice AP2<sup>367</sup>. Mais tout comme pour les protéines GRIP, le rôle de PICK1 pourrait être double, elle pourrait aussi assurer la rétention des AMPAR intracellulaires pour prévenir leur réinsertion<sup>368-371</sup>. PICK1

serait importante après l'induction de la LTP, séquestrant les AMPAR contenant GluA2 dans les endosomes et permettant ainsi aux AMPAR perméable au  $\text{Ca}^{2+}$  d'être incorporés à la synapse<sup>372</sup>.

PICK1 et GRIP1 semblent donc complémentaires et opèrent de concert afin de réguler le nombre d'AMPAR à la synapse. Leurs rôles sont toujours investigués et sont encore complexifiés par leurs MPT qui régulent leur fonction<sup>292</sup> ou leur localisation comme les protéines GRIP qui sont adressées à la synapse via une palmitoylation<sup>373,374</sup>. De plus, ces protéines possèdent de nombreux interacteurs associés à diverses pathologies telles que l'autisme, la maladie d'Alzheimer ou la schizophrénie<sup>292</sup>.

#### 4 – Autres interacteurs

NSF (N-ethyl maleimide sensitive factor) est une ATPase appartenant à la machinerie SNARE qui assure l'exocytose de GluA2<sup>150,375</sup>. Lorsque NSF est N-nitrosylé<sup>376</sup>, il lie GluA2 sur son CTD, proche du TM4<sup>377</sup> (Figure 24), et module la présence du récepteur à la MP. La surexpression de NSF augmente la présence des récepteurs à la MP, et à l'inverse, son knock down (KD) la diminue<sup>378</sup>. L'interaction avec NSF promeut l'incorporation des AMPAR à la synapse spécifiquement<sup>379</sup>. Cet effet est observable pour GluA2<sup>379</sup>, mais également pour GluA3 lorsque le site d'interaction avec NSF est ajouté à son CTD<sup>380</sup>. Cette interaction semble également prévenir l'endocytose des AMPAR en inhibant l'interaction de GluA2 avec PICK1<sup>381</sup> et en masquant le site d'interaction avec AP2<sup>382</sup>.

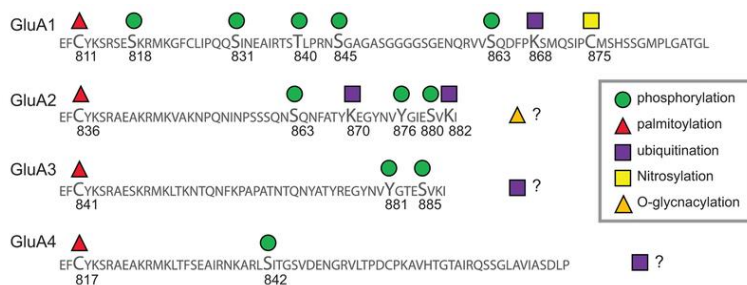
Les AMPAR possèdent de nombreux interacteurs cytosoliques, qui sont spécifiques à chacune des sous-unités. Ils participent aux différents mécanismes du trafic des récepteurs tels que la diffusion membranaire, la rétention intracellulaire, l'endocytose et le TI. Certaines, telles que GRIP1 et SAP97 ont d'ailleurs été identifiées comme des protéines adaptatrices permettant de faire le lien entre des moteurs moléculaires et les complexes d'AMPAR. On peut imaginer que d'autres de ces protéines cytosoliques servent de protéines adaptatrices, et que d'autres restent encore à découvrir. Parmi les interacteurs connus, certains tels que 4.1N sont associés à la plasticité synaptique et pourraient réguler le TI dans ces conditions afin de moduler le nombre de récepteurs recrutés à la MP.

### C) Les MPT des AMPAR

Les AMPAR sont le substrat de nombreuses MPT qui régulent leurs propriétés ou leur nombre à la MP. Par exemple, GODZ, une enzyme résidente de l'AG, palmitoyle un site conservé situé sur le TMD2 permettant de retenir les récepteurs dans l'AG. Bien que les mécanismes soient inconnus, la dé-palmitoylation semble nécessaire pour le trafic des

AMPA jusqu'à la MP<sup>196</sup>. Cependant les MPT ont généralement lieu sur les domaines intracellulaires. Certaines, comme par exemple la phosphorylation sur la sérine S579 de GluA1 par la Casein Kinase 2, située sur la première boucle intracellulaire, promeut la présence du récepteur à la MP<sup>383</sup>. A l'inverse, la phosphorylation de S567 par CaMKII est favorisée pendant la LTD et diminue le nombre de récepteurs synaptiques<sup>384,385</sup>. Cette phosphorylation, associée à celle de la S831 favorisent l'internalisation déclenchée par l'activation des récepteurs P2X<sup>386</sup>.

Mais la plupart des MPT sont localisées sur le CTD des AMPAR (Figure 25). Ces MPT comprennent des phosphorylations, palmitoylations, ubiquitinations, ou S-nitrosylations. Les MPT de GluA1 et GluA2 sont les mieux caractérisées avec 9 MPT identifiées pour GluA1 augmentant considérablement la diversité des récepteurs.



**Figure 25 : MPT et interactions protéiques du CTD des AMPAR**

Séquence protéiques des différentes sous-unités des AMPAR et leurs MPT associées. Source : Diering & Huganir, 2018

## 1 – MPT régulant des interactions protéiques

Les MPT peuvent réguler les interactions avec les protéines cytosoliques. C'est le cas par exemple de la palmitoylation, une greffe réversible via une liaison thioester d'un palmitate, sur la cystéine C811 de GluA1, conservée chez toutes les sous-unités (GluA1 C811, GluA2 C836, GluA3 C841, GluA4 C817)<sup>35</sup>. La dé-palmitoylation de GluA1, facilitée par le glutamate, promeut la phosphorylation des sérines S816 et S818 médiée par PKC<sup>145</sup>. Ces phosphorylations, facilitées pendant la LTP, augmentent l'interaction avec 4.1N et favorisent la présence des AMPAR à la MP<sup>145</sup>. La phosphorylation de la S818 semble être la plus importante puisqu'elle promeut, à elle seule, l'incorporation synaptique de GluA1<sup>333</sup>.

Sur GluA2, la phosphorylation de la S880 empêche l'interaction avec GRIP1/2 et promeut l'interaction de GluA2 avec PICK1 qui déstabilise GluA2 à la PSD et promeut l'endocytose de GluA2<sup>354</sup>. Cette phosphorylation, et les interactions protéiques qu'elle permet sont nécessaires pour l'expression de la LTD<sup>355,353</sup>. D'autres MPT qui influencent l'interaction de GluA2 avec les protéines PICK1/GRIP seront détaillées ci-après.

## 2 – Phosphorylation des sérines S831 et S845 de GluA1

Certaines MPT influencent les propriétés ou le trafic des AMPAR sans interactions identifiées. Les phosphorylations sont les MPT les plus communes et les plus étudiées sur le CTD des AMPAR. Plusieurs sites ont été identifiés mais les plus étudiés sont ceux des S831 et S845 situées sur le CTD de GluA1. Ces phosphorylations sont associées à la LTP<sup>35</sup> et peuvent avoir lieu indépendamment l'une de l'autre. La phosphorylation de S831 est opérée par CaMKII/PKC<sup>35</sup> et a pour conséquence d'augmenter la conductance du récepteur et de promouvoir sa localisation à la PSD<sup>387</sup>. La phosphorylation S845, opérée par PKA<sup>388</sup>, augmente la probabilité que le récepteur soit en conformation « ouverte » et promeut la rétention/stabilisation du récepteur à la MP en augmentant l'insertion de GluA1 et en limitant l'endocytose<sup>89,389,390</sup>.

En culture, en conditions basales, 15-20% de GluA1 sont phosphorylés sur ces sites, avec une fraction très faible qui est doublement phosphorylée. La proportion des récepteurs phosphorylés peut être augmentée en stimulant PKC/PKA (50% des sous-unités phosphorylées). *In vivo*, un environnement enrichissant des souris augmente la phosphorylation des AMPAR<sup>387</sup>.

Dans la région CA1 de l'hippocampe, les double mutants S831A et S845A ont une LTP diminuée<sup>91</sup> alors que les mutations simples n'affectent pas la LTP<sup>391</sup>. Ces mutations semblent avoir un rôle synergique pour l'expression de la LTP<sup>391</sup> : la phosphorylation de S845 permet de stabiliser les récepteurs à la MP, et la phosphorylation de S831 permet la localisation des récepteurs à la PSD<sup>389,392,393</sup>. Ces phosphorylations participent également à la LTD. En effet, les double mutants S831A et S845A n'expriment pas de LTD<sup>91</sup>. De même, la mutation simple S845A élimine la LTD<sup>91,391</sup>. Cependant, la déphosphorylation de S845, opérée par la calcineurine est critique pour la LTD, semblant indiquer que l'induction de la LTD nécessite la phosphorylation de S845 par PKA puis sa déphosphorylation<sup>151</sup>.

## 3 – Autres MPT des AMPAR

De nombreuses autres MPT influencent le trafic des AMPAR, en conditions basales et lors d'événements de plasticité synaptique. Sur le CTD de GluA1, une S-nitrosylation en C875 promeut la phosphorylation de S831 et promeut l'endocytose en liant AP2<sup>394</sup>. Cette MPT augmente également la conductance<sup>394</sup>. *In vitro*, la sérine S863 est phosphorylée par PAK3 favorisant la présence du récepteur à la MP<sup>395</sup>. Pendant la LTD, GluA1 est dé-phosphorylé sur la T840 par PP1/PP2A<sup>396</sup> ce qui réduit la conductance du récepteur<sup>397</sup>.

Sur le CTD de GluA2, les MPT participent généralement à la régulation de la LTD. Y876, située proche du domaine PDZ qui lie GRIP1/2 et PICK1, est la cible de tyrosine kinases

de la famille Src<sup>398</sup>. Elle est phosphorylée en réponse au glutamate ce qui inhibe la phosphorylation de S880 et l'interaction de GluA2 avec GRIP1/2<sup>398,399</sup>. La déphosphorylation du site Y876, opérée par PTPMEG est nécessaire pour la phosphorylation de S880 qui promeut l'interaction avec PICK1. La déphosphorylation Y876 est nécessaire à l'expression de la LTD dans le cervelet<sup>399</sup> et pourrait promouvoir l'endocytose de GluA2 lors de la LTD dépendante des mGluRs dans l'hippocampe<sup>35</sup>.

Sur GluA2, d'autres MPT ont été mises à jour telles que la phosphorylation de la sérine S863 qui a été peu étudiée<sup>35</sup>. Aussi, même si le site reste inconnu, GluA2 peut également subir la greffe réversible d'un  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAcylation) qui sont recrutés lors d'une forme de LTD dépendante des NMDAR induite par l'inhibition des O-GlcNAcase<sup>400</sup>.

Les MPT de GluA3 et GluA4 ont été beaucoup moins étudiées et peu ont été identifiées. GluA3 possède les mêmes sites de phosphorylations que GluA2 (GluA2 Y876 et S880, GluA3 Y881 et S885). Tout comme GluA2, GluA3 possède un cluster de tyrosines (3 chez GluA2 et 4 chez GluA3), mais leur effet n'a pas été investigué. GluA4 est phosphorylé en S842 par PKA, ce qui a pour effet de promouvoir le trafic jusqu'à la synapse<sup>393</sup>.

Les AMPAR peuvent également être ubiquitinylés<sup>35</sup>, comme en K868 pour GluA1 ou K870/K882 pour GluA2, en réponse à l'activité<sup>401</sup>. GluA3 est également ubiquitinylé mais le site exact n'est pas connu<sup>35</sup>. Le rôle de l'ubiquitylation des AMPAR est sujet à débat, en particulier leur possible rôle dans la facilitation de l'endocytose<sup>402</sup>. En revanche, leur rôle dans le tri vers les LE pour envoyer les AMPAR à la dégradation dans les lysosomes est établi<sup>402</sup>. Cependant le rôle de l'ubiquitylation durant la LTD n'a pas été investigué.

Les AMPAR sont, particulièrement sur leur CTD, le substrat de nombreuses MPT. Celles-ci peuvent réguler le trafic et les propriétés du récepteur, parfois par le biais des interactions protéiques qu'elles permettent. Il a été montré par Hangen et al. que des mutations ponctuelles sur des sites de phosphorylations du CTD des AMPAR peuvent modifier le TI. Les neurones transfectés avec le double mutant GluA1 S831D et S845D ont un nombre de vésicules et une vitesse antérograde augmentées, rappelant certaines caractéristiques de transport observés lors de la LTP. Ces mutations promeuvent également l'exocytose des récepteurs au niveau des dendrites distales. Les MPT du CTD de GluA1 régulent donc son TI, mais les mécanismes impliqués sont inconnus<sup>81</sup>. Ces phosphorylations pourraient par exemple permettre des interactions protéiques différentes qui réguleraient le TI en permettant la liaison à différents moteurs. En plus de S831 S845, de nombreuses autres MPT sont possibles sur le CTD des AMPAR et leur effet sur le TI reste à déterminer.

## D) Influence du CTD des AMPAR sur le trafic

Le rôle du CTD dans le trafic des AMPAR et dans la plasticité synaptique a été largement débattu<sup>55,123,124</sup>. Zhou et al.<sup>123</sup> ont généré plusieurs lignées de souris pour lesquelles les CTD de GluA1 et GluA2 ont été échangés. Chez ces lignées, la transmission basale n'est pas affectée. En revanche, les souris ne possédant pas le CTD de GluA1 (souris GluA1CTA2-KI) n'expriment pas de LTP dépendante des NMDAR. A l'inverse les souris sans le CTD de GluA2 (souris GluA2CTA1-KI) possèdent une LTP augmentée mais n'expriment pas de LTD dépendante des NMDAR. Chez le double mutant pour lesquels les CTD sont tous deux présents mais échangés entre GluA1 et GluA2 (GluA1CTA2, GluA2CTA1-KI), la LTP et la LTD sont normales, signifiant que la seule présence du CTD de GluA1 est nécessaire à la LTP et le CTD de GluA2 à la LTD. Ces résultats s'inscrivent dans le modèle dit « récepteur-centrique » qui postule que le récepteur est la cible de régulation et modifications modulant son trafic et permettant ou non son recrutement. D'autres preuves en faveur de ce modèle existent, telles que les S831 et S845 dont les phosphorylations sont importantes pour l'induction de la LTP et de la LTD. La mutation de ces deux sites génèrent d'ailleurs des phénotypes pathologiques<sup>91</sup>.

A l'inverse, une étude plus récente<sup>124</sup> n'est pas parvenue à reproduire les résultats de Zhou et al. Les mêmes lignées ne présentent aucune déficience de leur transmission basale, LTP ou LTD. Les auteurs proposent alors un modèle dit « PSD-centrique » pour expliquer les différences de recrutements opérés lors des événements de plasticité. Dans ce modèle, le recrutement n'est pas opéré par le récepteur mais par la création/disparition de nouveaux points d'ancrage en réponse à l'activité, modulant l'accessibilité des récepteurs à la PSD<sup>124</sup>.

Ces résultats contradictoires ont été réconciliés par Liu et al.<sup>403</sup>. L'importance du CTD des AMPAR, particulièrement celui de GluA1, dans les phénomènes de plasticité semble dépendre de l'âge des souris utilisées et du protocole utilisé. En effet, chez les souris GluA1CTA2-KI, la stimulation à haute fréquence (HFS) ne permet pas l'expression de la LTP, à la fois chez les souris juvéniles (13-15 jours) et chez les jeunes adultes (5-6 semaines). En revanche, lorsqu'un autre protocole d'induction tel que le theta-burst (TBS) est utilisé, l'induction de la LTP chez les souris au CTD échangé ne donne pas les mêmes résultats : la LTP est abolie chez les jeunes, mais pas chez les adultes<sup>403</sup>. On observe un phénomène similaire chez les souris GluA1-KO, qui n'expriment la LTP qu'avec certains protocoles<sup>403</sup>.

L'induction de la LTP par un protocole TBS n'est pas affecté par des inhibiteurs de la synthèse protéique dans les souris WT. Cependant, chez les souris GluA1CTA2-KI, la LTP induite par un protocole TBS est abolie par ces inhibiteurs<sup>403</sup>. L'hypothèse de Liu et al. est que le protocole TBS déclenche la LTP par le biais de deux voies : une voie nécessitant la synthèse

protéique pour assurer un influx de nouveaux récepteurs et une autre voie indépendante de la synthèse, qui pourrait dépendre du CTD de GluA1. En effet, ces voies semblent pouvoir se compenser lorsque la LTP est induite par TBS. Mais lorsque le CTD n'assure plus le recrutement, la synthèse de nouvelles protéines compense et augmente le nombre de récepteurs produits pour assurer la potentiation. Chez les souris ne possédant pas le CTD de GluA1 et traitées avec des inhibiteurs de la synthèse protéique, les deux voies sont abolies, ce qui abolit la LTP.

Les phénomènes de plasticité sont donc éminemment complexes et la façon dont les récepteurs sont recrutés varie en fonction des protocoles. L'influence du CTD n'a pas été testé pour tous les protocoles d'induction de la LTP, mais elle apparaît varier. Le CTD de GluA1 semble important pour l'induction de la LTP par HFS, à tout âge et pour l'induction par TBS chez les souris juvéniles. Il est intéressant de remarquer que même le protocole TBS qui parvient à induire la LTP chez l'adulte en l'absence du CTD de GluA1 repose néanmoins sur la synthèse de récepteurs qui doivent être acheminés jusqu'à la MP. Le TI des récepteurs néo-synthétisés est donc un contributeur important pour les phénomènes de plasticité et est régulé par l'activité. Comme le laisse entrevoir les résultats de Hangen et al., le TI peut être modulé par des mutations ponctuelles du CTD de GluA1. Il permet de nombreuses interactions protéiques capitales pour la transmission synaptique ainsi que de nombreuses MPT associées pour certaines à des phénotypes pathologiques. Cependant leur influence sur le TI n'a pas été caractérisée. Dans notre laboratoire, un système de rétention des protéines néo-synthétisées associée à de la vidéo-microscopie spinning-disk a été développé et déjà utilisé par Hangen et al. Ces méthodes nous permettront de déterminer le rôle du CTD et de ces interactions en conditions basales et lors de la LTP pendant laquelle le transport est augmenté.



## Objectifs de la thèse

Les phénomènes de plasticité synaptique sous-tendent la mémoire et les phénomènes d'apprentissage. Ceux-ci reposent sur un contrôle fin de la localisation et du nombre de récepteurs AMPAR à la MP. Ce contrôle est opéré par le biais de différents mécanismes dont le TI des AMPAR néo-synthétisés, qui concerne tous les récepteurs et est un contributeur important pour l'augmentation du nombre de récepteurs à la MP observé lors de la LTP<sup>81</sup>.

Le TI de GluA1 a déjà été caractérisé par Hangen et al. Il est stable et ses caractéristiques sont augmentées lors de la LTP. Cependant les mécanismes et acteurs responsables de cette modulation restent à définir. Les AMPAR possèdent des séquences intracellulaires variées, en particulier leur CTD qui est le substrat de nombreuses MPT et interactions protéiques. Notre laboratoire a montré que des mutations ponctuelles sur le CTD de GluA1 peuvent moduler les caractéristiques de son TI, mais l'effet des autres MPT et de ses interacteurs protéiques n'a pas été élucidé.

**1** – Lors de ma thèse, je me suis intéressée aux deux interacteurs cytosoliques connus et spécifiques de GluA1 : 4.1N et SAP97. 4.1N facilite l'exocytose des AMPAR, en particulier lors de la LTP, mais son potentiel effet sur le TI reste à définir. SAP97 accompagne GluA1 dès le début de la voie de sécrétion. C'est un adaptateur connu qui fait le lien entre GluA1 et le moteur moléculaire MyoVI. SAP97 participe-t-il au transport longue distance observé dans les dendrites par Hangen et al. ? Quel est l'effet de ces deux protéines et de leurs interactions sur le TI de GluA1 en conditions basales ? Lors de la LTP ? Ces expériences permettront également de confirmer l'importance du CTD pour le TI, déjà entrevu dans le papier Hangen et al., afin de caractériser l'importance des CTD des AMPAR pour les événements de plasticité.

**2** – Les AMPAR les plus abondants de l'hippocampe sont les hétéromères GluA1/GluA2. Cette association apporte via le CTD de GluA2 de nombreuses autres MPT et interactions protéiques supplémentaires qui pourraient potentiellement réguler le TI. Quelles sont les caractéristiques de transport de GluA2 ? Quelle est l'influence de son CTD sur le TI des hétéromères ? Les homomères GluA1 et hétéromères GluA1/GluA2 sont-ils transportés dans les mêmes vésicules ? Ces vésicules sont-elles soumises aux mêmes régulations ?

**3** – Les AMPAR sont transportés sous-forme de complexe protéiques, associés à leurs protéines auxiliaires. Les TARP sont les protéines auxiliaires les plus étudiées et  $\gamma 8$  est la TARP la plus abondante de l'hippocampe.  $\gamma 8$  module la présence des AMPAR à la MP et est impliquée dans les phénomènes de plasticité. Les TARP, et  $\gamma 8$  en particulier, sont-elles



impliquées dans le TI des AMPAR ? Participent-elles à la régulation du TI observé par Hangen et al. pendant la LTP ?

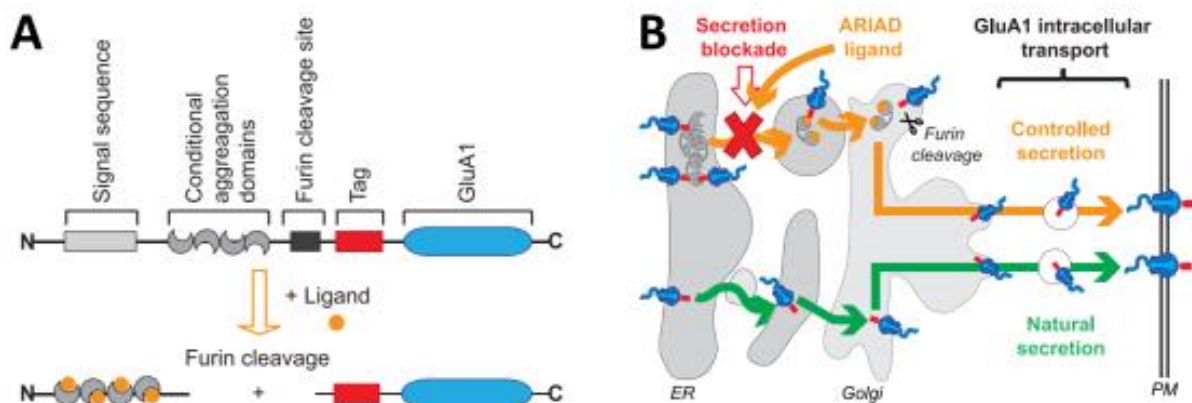
# **MATERIELS ET MÉTHODES**



## A) Plasmides et constructions

### 1 – Système ARIAD

L'étude du TI des récepteurs néo-synthétisés est difficile lorsqu'un plasmide classique, exprimant la protéine d'intérêt étiquetée, est utilisé. En effet, les vésicules qui transportent ces constructions sont impossibles à distinguer des vésicules transportant les récepteurs recyclés, qui pourraient être soumises à des modalités de transport et des régulations différentes. De plus, ces vésicules sont de petits objets rapides dont l'intensité est faible. Afin d'observer uniquement les récepteurs néo-synthétisés et d'obtenir un meilleur ratio signal sur bruit, nous utilisons un système d'expression appelé ARIAD. Les protéines sous-clonées dans ce vecteur s'accumulent dans le RE dès leur synthèse grâce à des domaines d'agrégation. Ce système nous permet alors de contrôler la sécrétion des protéines d'intérêt en déclenchant leur désagrégation et sortie du RE à la demande<sup>81</sup>. Cette méthode permet également d'obtenir un meilleur ratio signal sur bruit des vésicules imagées<sup>81</sup>.



**Figure 26 : Système ARIAD**

**A** – Protéine encodée par le plasmide ARIAD : un peptide signal suivi des domaines d'agrégation, d'un site furine, puis de la protéine d'intérêt étiquetée. **B** – Sécrétion naturelle (flèche verte) et sécrétion contrôlée (flèche orange) possible grâce au système ARIAD après l'ajout du ligand qui lève le blocage de la sécrétion (rouge) et l'accumulation dans le RE afin de permettre la sécrétion de la protéine d'intérêt jusqu'à la MP. Source : Hangen et al 2018

Les plasmides « ARIAD » (Figure 26) codent pour un peptide signal, permettant l'intégration de la protéine d'intérêt dans le RE, suivi par 4 tandems de FKBP12 (FK506-binding protein de 12kDa), des domaines d'agrégation conditionnels qui se multimérisent menant à la formation de larges agrégats de la protéine d'intérêt, la piégeant dès sa synthèse dans le RE par encombrement stérique. Ces domaines d'agrégation sont suivis d'un site de clivage par la furine, une endopeptidase enrichie dans l'AG puis de la protéine d'intérêt étiquetée. L'ajout du ligand AP21998 (D/D solubilizer, Ozyme) qui a une très forte affinité pour les domaines FKBP12 (1 molécule de ligand/domaine,  $k_d=1nM$ ) permet la dissociation des agrégats en

quelques minutes. Les protéines individuelles sont alors libérées et peuvent s'assembler (dans le cas de protéines multimériques), et être exportées à travers la voie de sécrétion<sup>404,405</sup>. Dans l'AG, la furine clive la construction ARIAD en deux : d'un côté les domaines d'agrégation et de l'autre la protéine d'intérêt étiquetée qui pourra être transportée dans des vésicules jusqu'à la MP.

Cependant, de nombreuses méthodes de rétention des protéines néo-synthétisées ont été développées. Certaines méthodes reposent sur des changements de température pour déclencher le relargage des protéines du RE<sup>406,407,408</sup>, ce qui peut perturber leur progression à travers la voie de sécrétion. Il existe également le système RUSH (Retention using selective hook) dans lequel la protéine d'intérêt est étiquetée avec un peptide liant la streptavidine. Des protéines résidentes du compartiment d'intérêt (KDEL pour le RE par exemple) sont étiquetées avec la streptavidine et retiennent la protéine d'intérêt dans le compartiment jusqu'à l'ajout de biotine<sup>409</sup>. Cette technique a l'inconvénient de nécessiter l'expression de deux constructions étiquetées.

Le TI de GluA1 néo-synthétisé a déjà été caractérisé dans notre laboratoire par Hangen et al. à l'aide du système ARIAD. Les temps d'expression optimaux des plasmides ont été déterminés, de même que la cinétique d'externalisation du récepteur qui nous permet d'observer le TI dans les meilleures conditions. Les expériences réalisées pour ce manuscrit reprennent les mêmes conditions et sont décrites ci-après.

## 2 – Constructions moléculaire

Les plasmides « ARIAD » que nous avons utilisé ont été obtenus à partir d'un plasmide original (pC4S1-FM4-FCS-hGH ou pARIAD-hGH) fourni par la compagnie ARIAD Pharmaceuticals Inc suivant le protocole décrit dans Hangen et al. 2018. Dans ce plasmide, les différents mutants de la sous-unité GluA1 (NCBI Reference Sequence: NM\_031608.1), décrits ci-après, ont été sous-clonés ainsi que la sous-unité GluA2 (R). Les mutants de GluA1 ont été générés par PCR dans notre laboratoire, sauf pour les mutants AA et DD (mutés sur les sérines S816 et S818) qui nous ont été donnés par le laboratoire de Richard Huguinir, ainsi que le mutant CTA2, un mutant de GluA1 dont le CTD est remplacé par celui de GluA2 (édité : R) et qui nous a été donné par le laboratoire du Dr. Eric Boué-Grabot. Ces protéines d'intérêt sont étiquetées avec les protéines fluorescentes GFP ou TdTomato pour les expériences d'externalisation et de transport respectivement. Ces plasmides ont été utilisés pour toutes les expériences en conditions basales.

Pour les expériences de cLTP qui sont réalisées sur des neurones plus matures (DIV17-19), les constructions d'intérêt étiquetées et ont été sous-clonés dans des vecteurs à l'expression inductible par les tétracyclines (appelés vecteurs inductibles dans ce manuscrit). Ces vecteurs

permettent une durée d'expression modulable par l'addition de tétracycline dans le milieu de culture, afin de réduire la toxicité de l'accumulation des constructions dans le RE sur des temps longs. Ces vecteurs doivent être transfectés en présence d'un plasmide transactivateur. L'expression est permise par l'ajout de doxycycline dans le milieu de culture.

Pour les expériences nécessitant le knock-down (KD) de certaines protéines, nous avons utilisé des « short hairpin RNA » (shRNA) sous-clonés dans des vecteurs au rapporteur GFP. Le shRNA-contrôle (scramble) et shRNA contre 4.1N ont été donnés par le laboratoire de Richard Huganir :

- **sh4.1N** : GGGATGAAGATGTCGATCATTCAAGAGATGATCGACATCTTCATCCC (sens)
- **scramble** : GATCCCCGCGCGCTTTGTAGGATTCGTTCAAGAGACGAATCCTACAAAGCGCGCTTTTTT (sens)

Un scramble et shRNA contre SAP97 ont également été utilisés :

- **shSAP97** : GATATCCAGGAGCATAAAT (sens)
- **scramble** : CCCGCGCGCTTTGTAGGATTCGTTCAAGAGACGAATCCTACAAAGCGCGCTTTT (sens)

## B) Culture neuronale et transfections

### 1 – Cultures primaires de neurones

Sauf indiqué, les expériences de microscopie ont été réalisées sur des cultures primaires de neurones d'hippocampe de rat. Ces cultures ont été préparées selon la méthode « Banker ». Elles sont issues d'embryons au stade E18 de rat Sprague-Dawley tous sexes confondus comme décrit dans Kaech and Banker, 2006<sup>410</sup>.

Les lamelles de verre (diamètre 18mm, Mariefield) sur lesquelles les neurones sont étalés sont préalablement nettoyées et décorées de plots de paraffine. Celles-ci ainsi que les boîtes de cultures sont incubées pendant une nuit dans une solution de poly-L-lysine (1 mg/ml diluée dans du tampon borate) afin de faciliter l'adhésion des cellules. Les cerveaux sont extraits et les hippocampes sont récoltés dans du HBSS contenant de la pénicilline-streptomycine (PS) dilués dans un tampon HEPES. Les hippocampes sont incubés dans une solution de trypsine-EDTA/PS/HEPES à 37°C pendant 15 minutes et rincés deux fois avec du HBSS à 37°C. Les cellules sont dissociées manuellement à l'aide d'une pipette pasteur coatée avec du sérum de cheval. Le nombre de cellules est compté sur une lame de Malassez. Le

tapis glial, également préparé à partir d'hippocampes dissociés, est étalé entre 20 000 et 40 000 cellules par boîte de pétri (diamètre 60mm) et cultivé dans du MEM (Fisher Scientific) supplémenté (glucose (4,5g/L), 2mM de L-glutamine, 10% de sérum de cheval (Invitrogen)) pendant 14 jours. Le milieu est remplacé par du milieu Neurobasal Plus supplémenté (B27 Plus (Gibco), 0,5mM GlutaMAX (Gibco)). Les neurones sont déposés sur les lamelles de verre à une densité de 300 000 cellules par boîte (contenant 4 lamelles de 18mm de diamètre), dans du milieu Neurobasal contenant 10% de sérum de cheval. Cette densité élevée permet d'obtenir une bonne probabilité de transfection pour les vecteurs ARIAD qui sont volumineux (>10kpb). Après 2 heures, elles sont retournées dans les boîtes 60mm contenant le tapis glial vieux de 14 jours. Les cultures sont maintenues à 36,6°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après 3 jours *in vitro* (days in vitro : DIV), 5µM d'Ara-C est ajouté pour stopper la prolifération des cellules gliales. Les neurones sont maintenus dans ce milieu pour les expériences en conditions basales. Pour les expériences de cLTP le milieu est progressivement changé pour du BrainPhys (1X NeuroCult SM1 Neuronal supplement) à partir de DIV8 afin d'assurer la maturation des neurones et l'efficacité des protocoles de cLTP.

Pour les cultures de neurones de souris  $\gamma 8$ -KO et  $\gamma 8$ -WT, les lamelles sont incubées dans une solution de poly-D-lysine (30µg/ml) et incubées à 37°C sur la nuit. Les lamelles sont rincées deux fois avec de l'eau milli-Q et séchées sous PSM pendant une journée. Dans chaque boîte, 4ml de laminine (Sigma) diluée à 2µg/ml dans du PBS 1X est ajoutée. Les boîtes sont placées dans l'incubateur pendant une nuit. La laminine est rincée deux fois avec de l'eau milli-Q stérile et est remplacée par du PBS 1X. Le milieu des boîtes de glies est remplacé par 5ml de Neurobasal A complet (ThermoFischer). Les cultures de souris sont issues de souriceaux  $\gamma 8$ -WT ou  $\gamma 8$ -KO prélevés juste après la naissance (P0). Les cerveaux sont disséqués et les hippocampes sont transférés dans des tubes contenant 12ml d'Hibernate A (BrainBits) sur de la glace. Le milieu est remplacé par 2ml d'une solution de papaine (Hibernate A, 200mM L-Cystein (Sigma), Papain (Sigma P3125)) et laissé à incuber pendant 20 minutes à 37°C. La solution de papaine est remplacée par une solution d'inactivation (Hibernate A, 1,8mM CaCl<sub>2</sub>, Trypsin inhibitor 2,5mg/ml (Sigma T2011), BSA 2,5mg/ml (Sigma A8806)) pendant 5 minutes à 37°C. Cette solution est remplacée par 5ml d'une solution d'Hibernate A contenant 1,8mM de CaCl<sub>2</sub>. Après agitation et décantation des hippocampes, 1,5ml de milieu est enlevé et les neurones sont dissociés et comptés comme décrit précédemment. Les cellules sont alors étalées à une densité de 600 000 neurones par boîte. Après 20 à 30 minutes, le milieu est remplacé par du milieu Neurobasal A supplémenté comme décrit précédemment. Après deux heures, les lamelles sont transférées dans les boîtes contenant les glies.

Pour les expériences de biochimie, les neurones d'hippocampe de rat et cellules gliales sont étalés dans des plaques 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puit, préalablement traitées avec de la poly-L-lysine. La moitié du milieu est remplacé tous les sept jours (Neurobasal Plus (Gibco), B27 Plus (Gibco), 0,5mM GlutaMAX (Gibco)).

## 2 – Transfection

Pour toutes les expériences, les neurones sont transfectés à DIV8 avec les différents plasmides en utilisant un protocole de transfection au phosphate de calcium. Ce protocole permet la formation d'un précipité de phosphate de calcium et d'ADNc qui se lie à la surface des cellules et est incorporé à l'intérieur de la cellule par endocytose. L'ADNc est mélangé avec du TE (5mM Tris-HCl, pH 7.5) et une solution de phosphate de calcium (2.5M CaCl<sub>2</sub> dans 10mM d'HEPES pH 7.2). Ce mélange est ajouté au goutte à goutte dans une solution de HEBS (HEPES-buffered saline solution : 274mM NaCl, 10mM KCl, 1,4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11mM Glucose, 42mM HEPES, pH=7.2) afin de former le précipité. Les lamelles sont incubées dans une plaque 12 puits (200µl de milieu de culture, 50µl d'acide kynurénique (Sigma, 10mM dans du milieu Neurobasal)). Le précipité HEBS/ADN/Calcium-Phosphate/TE est ajouté sur les lamelles au goutte à goutte. Les neurones sont incubés à 37°C pendant 1h30. Les cellules sont rincées avec une solution de milieu Neurobasal Plus et d'acide kynurénique (2mM), et incubées à 37°C pendant 15 minutes. Les lamelles sont retournées dans leur boîtes d'origine.

Pour les expériences d'externalisation en conditions basales, les cellules sont transfectées à DIV8 avec un plasmide ARIAD-GFP-GluA1 WT ou mutant à 1,5 µg/lamelle. 1ml de milieu Neurobasal supplémenté comme décrit précédemment est équilibré et ajouté à DIV8 et à DIV11. L'immunocytochimie est réalisée à DIV14-15 soit 6 à 8 jours après la transfection.

Pour le transport en condition basales, les cellules sont transfectées avec ARIAD-TdTomato-GluA1 WT ou mutant à 1µg/lamelle et co-transfectées avec un plasmide codant pour de la GFP-transférine (0,2µg/lamelle) qui sert de contrôle positif pour le transport. TdTomato est utilisé comme étiquette dans ces expériences car il permet d'obtenir un meilleur ratio signal sur bruit des vésicules. Les expériences de transport ont lieu à DIV13-14.

Pour les expériences de cLTP, les neurones sont transfectés avec un plasmide inductible contenant ARIAD-GFP ou ARIAD-TdTomato-GluA1 WT ou mutant (0,7µg/lamelle) et le plasmide transactivateur (0,5µg/lamelle) pour les expériences d'externalisation et de transport respectivement. L'expression des constructions est initiée par de l'ajout de doxycycline dans le milieu de culture (0.2mg/ml). Les expériences sont réalisées 36 à 48h après l'induction des protéines d'intérêt.



Les shRNA sont co-transfectés à 0.5µg/lamelle pour les expériences en conditions basales et à 0.25µg/lamelle pour les expériences de cLTP.

## **C) Biochimie**

Les effets des sh ont été quantifiés par biochimie. Ces expériences ont été réalisées dans des neurones d'hippocampe de rat en culture ou dans des cellules COS-7. Les cellules sont infectés à DIV8 avec le sh4.1N, shSAP97 ou leurs contrôles respectifs. Après extraction (tampon de lyse : 50mM HEPES pH=7.3, 0,5mM EDTA, 4mM EGTA, 150mM NaCl, 1% Triton x100 et 10µg/ml d'anti-protéases (Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, Pefabloc, Mg132), les échantillons sont dénaturés (Tampon Laemmli 4x (BioRad), β-mercapto-ethanol (Sigma)) et chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont chargés sur un gel tris-glycine/SDS 4-15% (Biorad). Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires anti-4.1N (BD biosciences, référence : 611836), anti-SAP97 (Neuromab référence : 75-030), et anti-β-actine (Sigma, référence : A5316) selon les conditions puis avec un anticorps secondaire couplé à un fluorophore (Li-Cor, référence : 926-32210). Les membranes sont révélées par fluorescence avec le Odyssey CLX (Li-Cor).

## **D) Expériences d'imagerie**

### **1 – Externalisation**

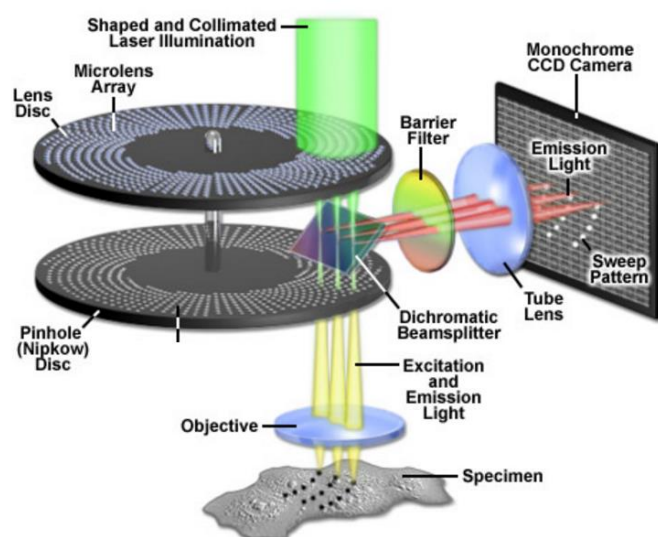
La présence des AMPAR néo-synthétisés à la MP est quantifiée par immunocytochimie sur neurones vivants après plusieurs temps d'incubation dans le ligand, afin de caractériser leur cinétique d'externalisation. Les neurones sont incubés dans du 2mM de D/D solubilizer (Ozyme) pendant 30, 45, 60, 90 ou 120 minutes. 10 minutes avant la fixation, les cellules sont incubées à 37°C avec un anticorps anti-GFP (Sigma Aldrich, référence : 11814460001) ou anti-DsRed (Ozyme référence : 632496) dilués au 1/1000<sup>e</sup>. Les neurones sont ensuite fixés dans du paraformaldéhyde-sucrose (PFA) à 4%. Après rinçage, les lamelles sont incubées dans du NH<sub>4</sub>Cl (50mM) pour neutraliser le PFA libre, puis bloquées pendant 45 minutes dans une solution PBS 1X et 1% BSA. Les lamelles sont ensuite incubées avec des anticorps secondaires (ThermoFischer Scientific A10037) et montées sur des lames de verre dans du milieu de montage Fluoromount-G (Lonza).

Les images ont été acquises avec un microscope à épifluorescence (Widefield upright Leica DM5000) avec une source lumineuse LED (Leica Microsystems), un objectif à immersion à huile 40X et une caméra sCMOS (Hamamatsu Flash 4.0 V2).

## 2 – Transport

### Vidéo-microscopie spinning-disk

Les vidéos des vésicules contenant les AMPAR néo-synthétisés étiquetés sont acquises avec un microscope confocal spinning-disk (Figure 27). La microscopie confocale est une technique de microscopie qui permet d'exciter l'échantillon un point à la fois en filtrant la fluorescence émanant des plans en z hors du focus grâce à un pinhole, ce qui permet de limiter le bruit de fond. Les microscopes confocal spinning-disk ont plusieurs pinholes perforés sur un disque, qui permettent l'acquisition de plusieurs points en même temps. Les pinholes sont arrangés selon un motif qui assure qu'après une rotation complète du disque, tous les points de l'échantillon ont été imagés. La microscopie confocale spinning-disk permet une meilleure résolution temporelle que la microscopie confocale parce qu'il permet l'acquisition de plusieurs points à la fois. Cette technique nous permet d'atteindre une résolution temporelle de 100ms dans nos expériences.



**Figure 27 : Microscope confocal spinning-disk**

Le laser d'illumination est focalisé par une lentille et passe à travers le pinhole pour exciter l'échantillon. La fluorescence émise passe à travers le pinhole pour être collectée par une caméra, pendant que la fluorescence émanant des autres plans est bloquée par le disque. Après une rotation du disque tous les points de l'échantillon ont été acquis. Source : Zeiss

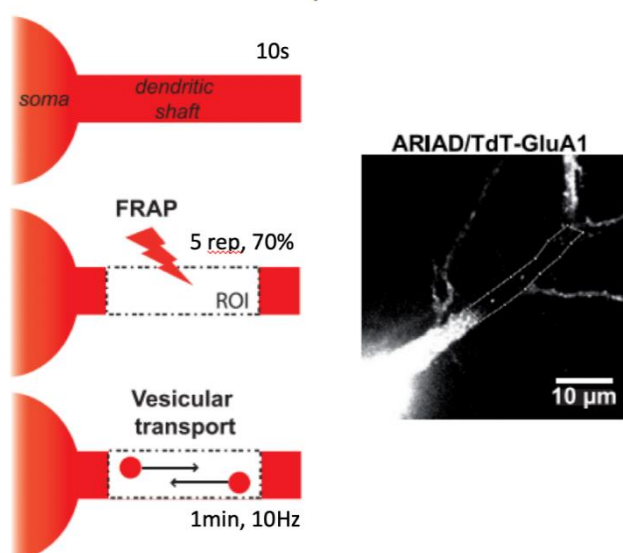
Les AMPAR néo-synthétisés exprimés avec le système « ARIAD » sont accumulés dans le RE qui est présent dans tout le compartiment somato-dendritique. Lors de l'acquisition, qui sera décrite ci-après, nous utilisons la technique FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) qui permet d'éteindre les photophores présents dans la zone d'intérêt afin d'augmenter le ratio signal sur bruit des vésicules et de faciliter l'analyse du transport.

### Acquisition vidéos transport

Les vidéos du TI sont acquises sur le microscope inversé DMI6000B (Leica) du Bordeaux Imaging Center. Ce microscope est équipé d'un système confocal spinning-disk (Yokogawa CSU-X1, banc laser : 491 nm, 561 nm), d'une caméra EMCCD (Photometrics Quantem 512), et d'un objectif à immersion à huile HCX PL Apo 100X 1.4 NA. Le microscope

est piloté par le logiciel Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). L'acquisition est facilitée par l'utilisation de journaux d'acquisition développés par Fabrice Cordelières. L'acquisition des images a lieu à 37°C dans une chambre Life Imaging Services. Les expériences de FRAP ont été réalisées avec un système de scanner de FRAP (Roper Scientific, Evry, France) à 491 nm ou 561 nm.

Les lamelles sont montées dans une chambre « Ludin » avec 1ml de milieu tyrode à l'osmolarité correspondante au milieu de culture (Pour les expériences en conditions basales : 15mM glucose, 100mM NaCl, 5mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES pour une osmolarité à 247mosm/l et pour les expériences de cLTP : 25mM Glucose, 20mM HEPES, 150mM NaCl, 3.5mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub> pour un tyrode à 304 mosm/l) et montées sur le microscope inversé. 2µM de ligand sont ajoutés au tyrode pour libérer les constructions d'intérêt du RE.



**Figure 28 : Séquence d'acquisition des vidéos du TI**

Toutes les vidéos du TI (conditions basales, cLTP, deux couleurs) sont acquises selon la même séquence d'acquisition : lors des 10 premières secondes, 10 images de 100ms d'exposition sont enregistrées. La portion de dendrite proximale sélectionnée (~60µm<sup>2</sup>) est photoblanchie lors de 5 répétitions à 70% du laser. Le transport est ensuite immédiatement enregistré pendant 1 minute à 1Hz (300 images à 100ms d'exposition). Source : modifié de Hangen et al 2018.

Toutes les vidéos sont acquises selon la séquence d'acquisition suivante décrite dans la Figure 28 avec une illumination à 488nm et/ou 561nm, et un objectif X100.

En conditions basales, la fenêtre d'acquisition de nos vésicules d'intérêt a été déterminée par Hangen et al. entre 30 et 60 minutes après addition du ligand, au moment où les premiers GluA1 néo-synthétisés sont détectés à la MP, mais avant sa saturation. Dans certaines conditions, après l'acquisition du TI des AMPAR en conditions basales, nous réalisons l'acquisition du TI de GFP-transferrine (illumination 488nm) pour confirmer la bonne santé des cellules et le bon fonctionnement de la machinerie de transport.

Pour les expériences utilisant les shRNA, une image est acquise dans le vert (illumination 488nm) juste avant l'acquisition de la vidéo pour confirmer la transfection (rapporteur GFP). Pour chaque lamelle 4-10 cellules sont imagées.

Pour nos expériences de transport lors de la LTP nous avons utilisé un protocole d'induction de la cLTP (chemical LTP). La cLTP peut être induite chez les neurones en culture dans un milieu sans  $Mg^{2+}$  pour lever le blocage des NMDAR, supplémenté en glycine (leur co-agoniste) et en bicuculline, un antagoniste des GABAR. Dans nos expériences, le tampon tyrode décrit précédemment est incubé pendant 20 minutes dans la chambre « Ludin » et est remplacé par un tampon tyrode sans  $Mg^{2+}$  (25mM glucose, 20mM HEPES, 150mM NaCl, 3.5mM KCl, 2mM  $CaCl_2$ , 200 $\mu$ M glycine, 20 $\mu$ M bicuculline) pendant 4 minutes pour induire la cLTP. Le tyrode original est alors remis dans la chambre « Ludin ». Les vidéos sont acquises 25-50 minutes après l'induction de la cLTP en utilisant les mêmes paramètres d'acquisition que pour les expériences réalisées en conditions basales.

Pour les expériences sur le transport des hétéromères, nous avons fait l'acquisition de vidéo en deux couleurs simultanément. Ces expériences ont été réalisées en conditions basales sur le même microscope à l'aide d'une seconde caméra EMCCD (Photometrics Quantem 512) et en suivant la même séquence d'acquisition que précédemment.

## **E) Analyse d'images et statistiques**

### **1 – Analyse externalisation**

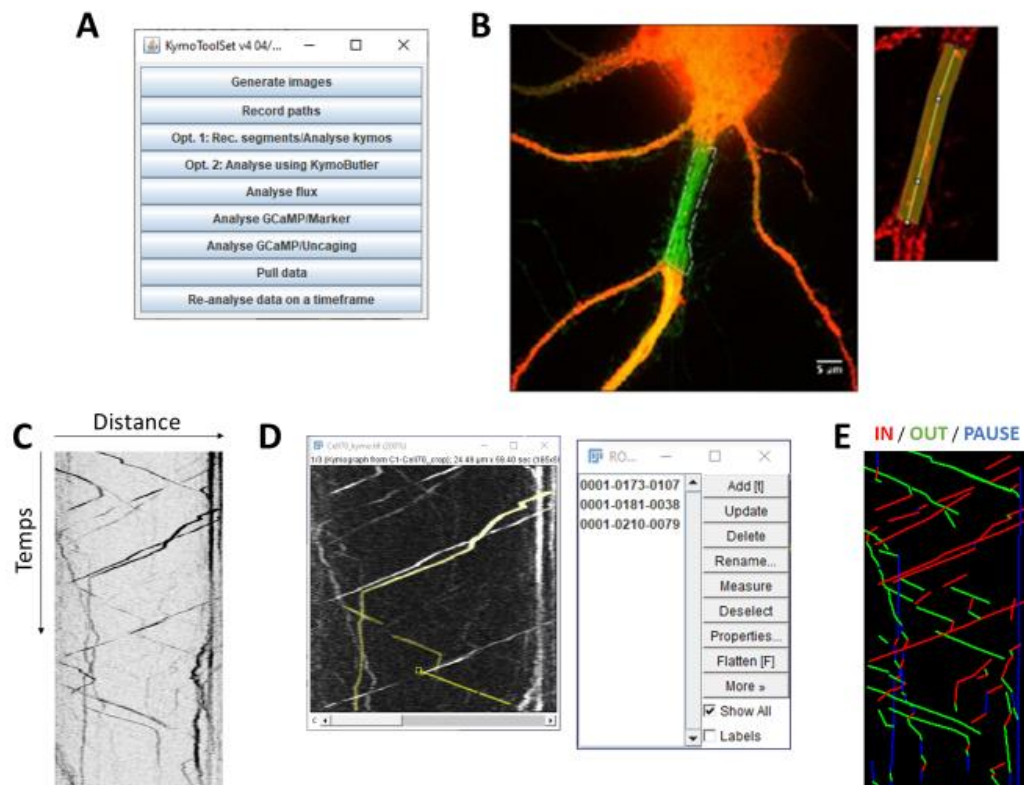
Les images sont analysées avec ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012). Pour chaque neurone analysé, deux ROI sont dessinées manuellement à l'aide du signal GFP : une portion de dendrite proximale et une portion de dendrite distale. Dans chaque zone, l'intensité moyenne à laquelle on soustrait l'intensité moyenne du fond est calculée. L'intensité des différentes conditions est normalisée sur l'intensité moyenne de la condition contrôle.

### **2 – Analyse du TI**

#### **Analyse manuelle**

Après la visualisation des événements de TI, s'est posé la question de l'analyse et de la caractérisation du transport. L'utilisation du « particle tracking » est impossible à cause de la difficulté à identifier les nombreuses vésicules et les faire correspondre entre les différentes images de la vidéo, en particulier à cause de leur faible ratio signal sur bruit et de leur trajectoire qui peut entrer et sortir du focus.

Nous avons alors généré des kymographes avec KymoToolBox, un plugin ImageJ développé par F. Cordelières (Figure 29). Un kymographe est une représentation de la distance par rapport au temps qui est générée à partir d'une vidéo afin de caractériser un transport dirigé. La trajectoire d'une vésicule apparaît sous la forme d'une ligne continue composée de segments de pente variable. Chaque ligne ininterrompue représente une vésicule, se déplaçant vers le bout des dendrites quand elle se dirige vers la droite, vers le corps cellulaire quand elle se dirige vers la gauche, ou en pause lorsqu'elle est verticale.



**Figure 29 : Analyse du TI avec KymoToolBox**

**A** – L'interface de KymoToolBox, un plugin ImageJ qui permet l'analyse du TI par le biais de kymographes. **B** – Un segment d'épaisseur variable est tracé le long de la dendrite, au niveau de la zone photoblanchie, depuis le corps cellulaire jusqu'à la partie distale de la dendrite. **C** – L'intensité maximum des pixels situés dans la sélection est projetée sur le segment central pour toutes les images de la vidéo. Cette étape génère un segment par image, qui sont « entassés » sur l'axe des y et génère le kymographe. **D** – L'utilisateur trace ensuite manuellement et sauve les différents segments de trajet des vésicules. KymoToolBox génère ensuite un tableur Excel contenant les données extraites des différents tracés, leur nombre, la vitesse des vésicules correspondantes, le pourcentage du temps passé IN (vers le corps cellulaire), OUT (vers les dendrites distales) ou en PAUSE, le temps passé en vidéo etc. **E** – Segments tracés correspondant au kymographe (C) et colorés en fonction de leur état (IN/OUT/PAUSE).

Des segments sont tracés manuellement par l'opérateur sur le kymographe. La pente des différents segments permet de calculer la vitesse des vésicules grâce aux paramètres précédemment fournis à KymoToolBox (taille de pixel, résolution temporelle). Tous les segments d'une vitesse inférieure à  $0,1 \mu\text{m/s}$  sont considérés comme des pauses (segments

verticaux). Cette analyse nous permet de mesurer le nombre de vésicules par minute pour  $20\mu\text{m}^2$  de dendrite, la vitesse moyenne des vésicules pour une cellule, la fréquence distribution des vitesses pour chaque cellule, le pourcentage du temps qu'une vésicule passe : en pause, à se déplacer du corps cellulaire vers le bout des dendrites (OUT) ou à se déplacer des dendrites vers le corps cellulaire (IN).

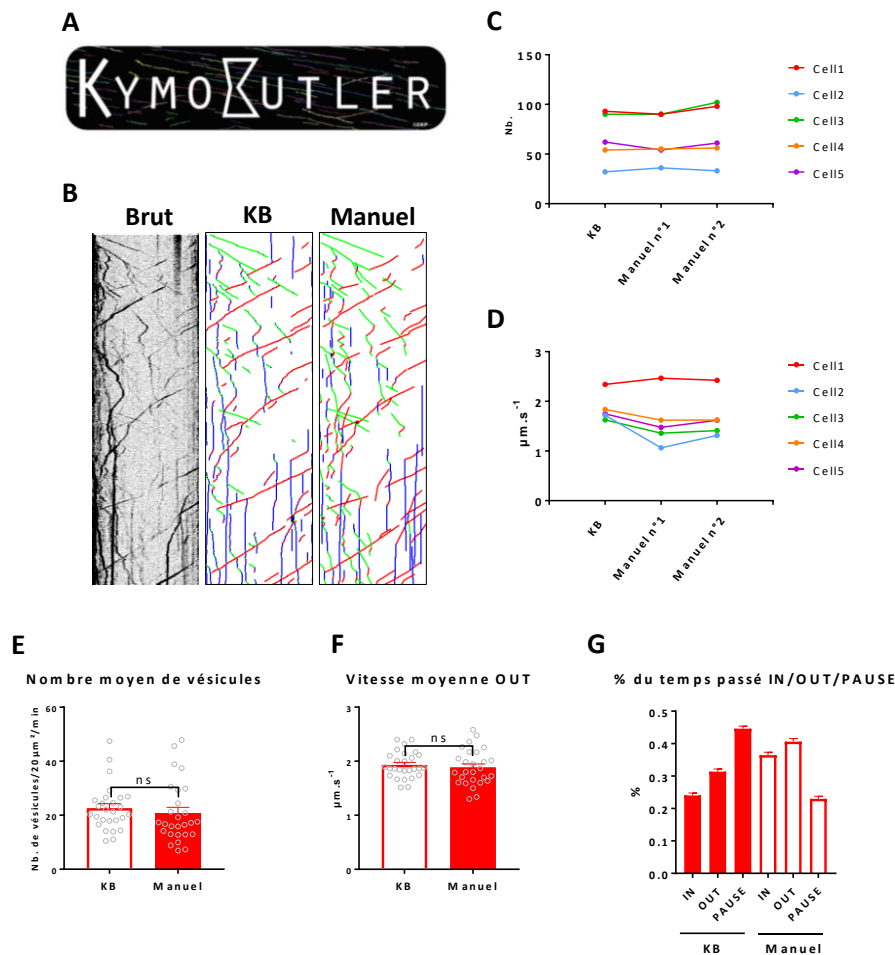
### Automatisation de l'analyse du transport avec Kymobutler

L'analyse des kymographes est un processus long et subjectif/variable puisque l'analyse repose entièrement sur les segments tracés par l'opérateur. La solution pour s'affranchir de ce biais est l'automatisation de l'analyse. Il existe des algorithmes capables de tracer les kymographes et qui parviennent à produire des résultats acceptables sur des images avec un ratio signal sur bruit élevé<sup>411,412</sup>. Les images obtenues sur des cellules vivantes sont sujettes à l'autofluorescence, à la limitation du temps d'exposition pour limiter la phototoxicité et à des intensités faibles. Les algorithmes qui tracent les kymographes performant mal et nécessitent la correction manuelle des erreurs et l'ajout de traces non détectées<sup>413</sup>.

Les approches basées sur l'intelligence artificielle sont plus avantageuses : moins variables/biaisées que les opérateurs humains ; permettent l'analyse de très grands sets de données en peu de temps et ont des performances plus proches des opérateurs humains que les algorithmes traditionnels. Nous avons collaboré avec Maximilian AH Jakobs et Andrea Dimitracopoulos de l'Université de Cambridge afin de développer un réseau neuronal convolutif (RNC) sur lequel est basé Kymobutler (Figure 30A), un logiciel qui permet d'extraire les vésicules du fond et de tracer les segments<sup>413</sup>. Nous avons fourni des kymographes bruts et tracés manuellement afin d'entraîner et de mesurer les performances de KymoButler. Dans un premier temps le RNC s'entraîne sur un set de données, sur lequel il apprend à interpréter les images sans à priori. Le RNC utilise le kymographe brut et y applique des matrices de convolutions de toutes les formes et tailles, de manière stochastique, afin de séparer le signal du fond. Une image  $I$  est obtenue, où chaque pixel possède une valeur correspondant à la probabilité  $p$  de faire partie d'un trajet de vésicule. Un seuil  $t$  est alors déterminé afin de différencier les pixels appartenant à une trace et un pixel appartenant au fond pour créer une image binaire. Cette image binaire est alors itérativement « amincie » jusqu'à obtenir des traces d'une largeur d'un pixel. Le RNC détermine les matrices, les étapes de convolution, déconvolution et le seuil en comparant les traces obtenues avec KymoButler aux traces obtenues sur les mêmes kymographes par l'opérateur. Le but est alors de trouver les étapes permettant de générer les traces les plus proches possible de celles tracées par l'opérateur. Ensuite le set de données de validation composé de kymographes sur lequel KymoButler n'a pas été entraîné est utilisé pour quantifier la performance du RNC. La similarité entre les deux tracés est comparée à l'aide d'un score allant de 0 (avec aucun pixel positif en commun) avec



1 (100% de pixels positifs en commun). KymoButler fait preuve d'une précision plus importante que le tracé manuel et est capable de reconnaître des traces omises par erreur, à cause du faible ratio signal sur bruit. Le score maximal obtenu est alors de 0,7. KymoButler a également été confrontés à des kymographes provenant d'autres projets. Le RNC a été capable de reconnaître les traces sans avoir besoin de ré-entraînement en modulant seulement le seuil  $t$ .



**Figure 30 : Automatisation de l'analyse de transport**

**A-** Logo de Kymobutler **B-** Kymographe du transport de ARIAD-TdTomato-GluA1 WT brut, puis tracé par Kymobutler (KB), puis manuellement 2 fois de manière indépendante. **C-** Nombre de vésicules tracé sur 5 kymographes, par KB, puis tracé manuellement 2 fois indépendamment. **D-** Vitesse anterograde (OUT) des vésicules de 5 cellules, par KB, et deux fois manuellement indépendamment. **E-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 par  $20\mu\text{m}^2$  par minute pour un set de neurones de souris WT, analysé par KB et manuellement. **F-** Vitesse des segments OUT pour le même set de neurones, analysé par KB et manuellement. Les figures E, F et G sont représentées et analysées selon le protocole décrit dans la sous-partie 3 – Statistiques.

L'utilisation de KymoButler est simple, l'opérateur doit seulement de déterminer le seuil  $t$ , qui dépend du ratio signal sur bruit, de l'application et des conditions dans lesquelles les images ont été acquises. Lors de l'utilisation d'un seuil bas ( $t=0,01$ ), de nombreux artefacts sont rapportés comme le rabotage de traces parallèles, alors que pour un seuil haut ( $t=0,5$ ),

les traces générées sont trop courtes<sup>413</sup>. Le seuil optimal a été déterminé à  $t=0,2$  et c'est celui que nous avons utilisé dans nos analyses impliquant Kymobutler.

Après le développement de KymoButler, nous avons pu le tester sur nos kymographes (Figure 30B). Kymobutler a été intégré à l'interface de KymoToolBox et permet un gain de temps considérable et une analyse plus précise et moins biaisée des kymographes. Nous avons tracé manuellement, à deux reprises, des kymographes issus de neurones transfectés avec ARIAD-TdTomato-GluA1. Le traçage manuel des kymographes n'est pas parfaitement reproductible. En effet, le nombre de vésicules tracées sur le même kymographe peut varier entre deux analyses manuelles différentes (Figure 30C), à cause par exemple d'une trace omise par erreur ou par le raboutage ou non de deux segments. De même pour la vitesse moyenne des vésicules d'un kymographe (Figure 30D) qui présente une légère variabilité entre les deux analyses manuelles, expliquée par le fait que la vitesse est calculée grâce à la pente des segments et que le décalage d'un pixel entre les deux analyses va modifier la vitesse d'un segment. Cette différence intra-opérateur est cependant très faible et n'a que peu d'influence sur l'analyse d'un set entier.

En effet, lorsqu'on utilise KymoButler sur un set de kymographes, on voit qu'on obtient des moyennes similaires à celles obtenues par un opérateur humain en termes de nombre de vésicules ( $p=0,1004$ ) (Figure 30E) et en termes de vitesse ( $p=0,3242$ ) (Figure 30F). La seule différence observée est le pourcentage de temps passé IN, OUT ou en PAUSE (Figure 30G) et qui est due à la façon dont les kymographes sont tracés. Là où l'opérateur va tracer un segment lissé, Kymobutler trace une multitude de petits segments suivant parfaitement le chemin de la vésicule (Figure 30B). Cela a pour conséquence d'affecter le temps passé IN, OUT et en PAUSE en augmentant ce dernier paramètre (Figure 30G) par rapport à l'analyse manuelle. Il est cependant important de noter que deux conditions qui présentent une différence significative pour le pourcentage de temps passé en PAUSE après l'analyse manuelle présente une différence similaire après l'analyse par KymoButler (data not shown). A des fins de cohérence avec le papier Hangen et al., bien que KymoButler ait une performance égale à un opérateur humain et offre un gain de temps exceptionnel, nous avons décidé de quantifier nos kymographes manuellement. Les kymographes issus des cultures de souris seront eux analysés grâce à KymoButler.

### 3 – Statistiques

Tous les graphiques sont représentés par leur moyenne +/- SEM. Pour l'analyse statistique, le logiciel Graphpad Prism 8 a été utilisé. Le test Mann-Whitney a été réalisé pour tester la différence statistique entre deux échantillons indépendants. Pour comparer la différence statistique de plus de deux échantillons indépendants, le test Kruskal-Wallis a été



utilisé. Les astérisques représentent la significativité de l'analyse :  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) et  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).

# RÉSULTATS

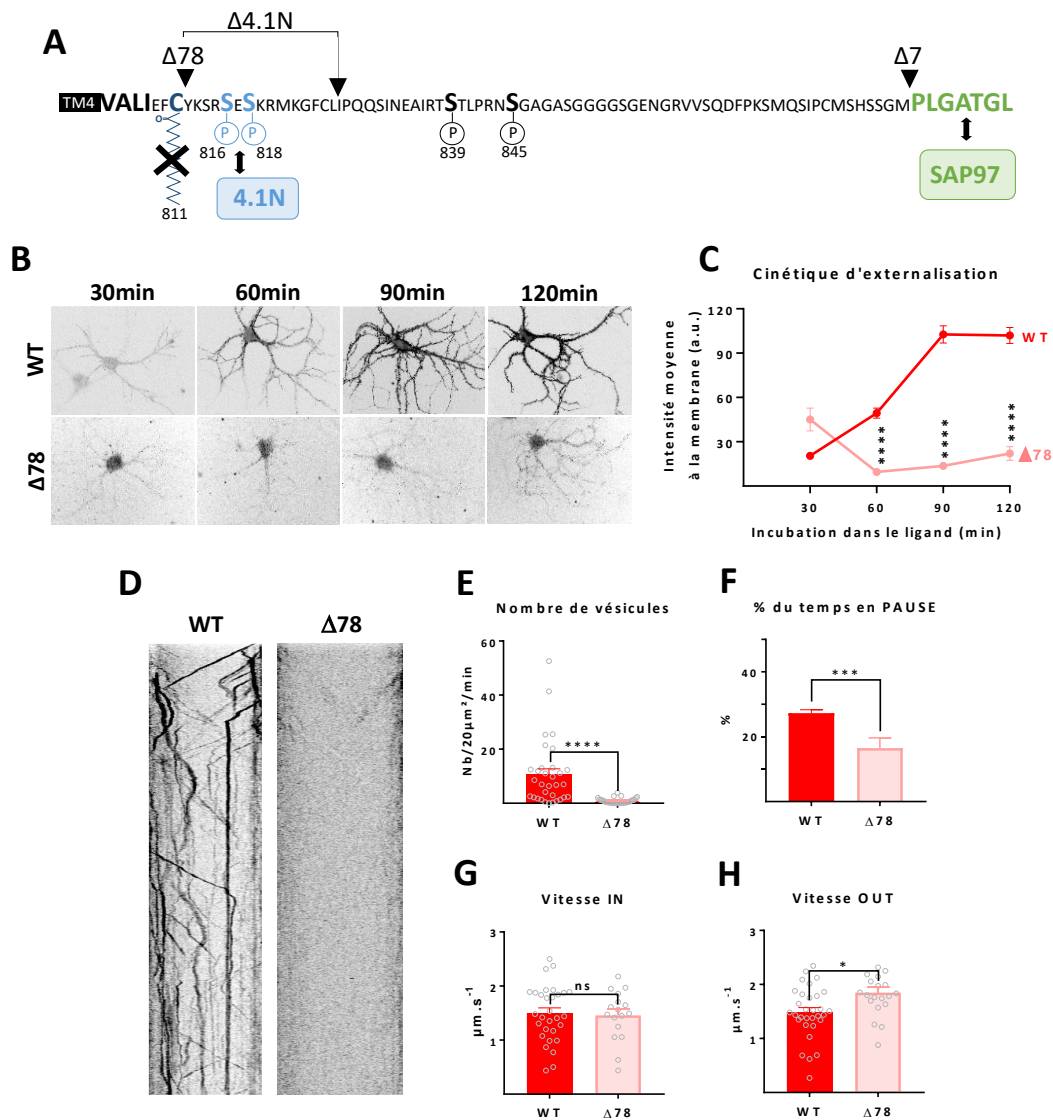


Le TI des sous-unités GluA1 néo-synthétisées exprimées grâce à l'outil ARIAD a déjà été caractérisé dans notre laboratoire dans des neurones d'hippocampe de rat en culture<sup>81</sup>. Les caractéristiques du transport de GluA1 sont très stables et reproductibles. En conditions basales, GluA1 néo-synthétisé arrive progressivement à la MP après 30 minutes d'incubation dans le ligand et atteint un plateau à partir d'une heure. Les vésicules contenant GluA1 néo-synthétisé ont une vitesse d'environ 1,5µm/s dans les sens rétrogrades (IN) et antérogrades (OUT). Ces vésicules passent la majorité de leur temps OUT et passent environ 30% du temps en pause. Le TI de GluA1 est modulé par la concentration de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. 25 minutes après induction de la cLTP, le nombre de vésicules transportant GluA1 et leur vitesse antérograde sont augmentés. Le CTD des AMPAR est le substrat de nombreuses MPT. Les phosphorylations de S831 et S845, caractéristiques de la LTP, régulent le TI et augmentent le nombre de vésicules observées ainsi que leur vitesse OUT. Ces récepteurs phosphorylés sont préférentiellement localisés à la MP au bout des dendrites<sup>81</sup>. Le but de cette thèse est de caractériser l'importance du CTD des AMPAR et de leurs divers interacteurs afin de mettre à jour les mécanismes de la régulation de leur TI.

## **A) Importance du domaine C-terminal pour le transport intracellulaire**

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier le rôle du CTD de GluA1 sur le TI des sous-unités GluA1 néo-synthétisées (Figure 31).

A ces fins, nous avons généré un mutant de GluA1 ( $\Delta 78$ ) pour lequel ce domaine a été tronqué de ses 78 derniers acides aminés laissant seulement 3 acides aminés après le TM4 (Figure 31A). Nous avons transfecté les constructions ARIAD-GFP-GluA1 WT ou ARIAD-GFP-GluA1  $\Delta 78$  dans des cellules d'hippocampe de rat en culture. Nous avons réalisé un immunomarquage anti-GFP sur cellules vivantes après différents temps d'incubation dans le ligand (Figure 31B). L'intensité du marquage des récepteurs externalisés à la MP a été quantifiée sur les dendrites proximales et distales. La quantification des images a révélé une absence quasi-totale d'externalisation pour le mutant  $\Delta 78$  (intensité moyenne (a.u.) à 30min : WT=20,44 +/- 2,14, n=45 ;  $\Delta 78$ =45,02 +/- 7,76, n=20, N=4 ; p<0,0001 ; à 60min : WT=19,39 +/- 3,42, n=35 ;  $\Delta 78$ =9,54 +/- 1,95, n=34, N=4 ; p<0,0001 ; à 90min : WT=102,70 +/- 5,83, n=42 ;  $\Delta 78$ =13,64 +/- 1,70, n=30, N=4 ; p<0,0001 ; à 120min : WT=102 +/- 5,37, n=38 ;  $\Delta 78$ =22,02 +/- 4,59, n=39, N=4 ; p<0,0001) (Figure 31C). Dans nos conditions d'expérience, le CTD GluA1 est donc nécessaire pour son export à la MP.



**Figure 31 : Importance du domaine C-terminal de GluA1**

**A-** Schéma du domaine C-terminal de GluA1 (82 acides aminés), représentant les différentes modifications post traductionnelles et les sites d'interactions protéiques connus. **B-** Sur cellules vivantes, marquage de GFP-GluA1 WT ou  $\Delta 78$  présent à la MP après 30, 60, 90 et 120 minutes d'incubation dans le ligand. **C-** Quantification de l'intensité du marquage à la MP. **D-** Tracés manuels des kymographes obtenus à partir des vidéos (1min) du TI de ARIAD-TdTomato-GluA1 WT et  $\Delta 78$  réalisés entre 30 et 60 minutes après addition du ligand. **E-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 WT ou  $\Delta 78$  par  $20\mu\text{m}^2$  par minute. Comme pour les prochains graphiques, seules les cellules montrant un transport pour la GFP-transferrine ont été incluses. **F-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **G-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **H-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT.

Pour analyser si ce domaine avait un rôle dès son export du RE/AG, nous avons étudié les caractéristiques du TI en exprimant ARIAD-TdTomato-GluA1 WT ou  $\Delta 78$ . Le mutant  $\Delta 78$  présente un nombre de vésicules très faible (nombre de vésicules/ $20\mu\text{m}^2$ /min : WT=10,61 +/- 2,13, n=32 ;  $\Delta 78$ =0,85 +/- 0,17, n=33, N=3 ;  $p < 0,0001$ ) (Figure 31D, E). Cette quasi-absence de transport n'est pas due à la santé des cellules ou à une toxicité de la construction puisque notre contrôle GFP-transferrine trafique normalement (data not shown). Compte tenu du faible

nombre d'événements de transport, 10 fois moins que le WT, il est difficile d'interpréter les quantifications des vitesses moyennes des vésicules, même si leur vitesse OUT apparaît modifiée (Figure 31G, H). Aussi, les kymographes issus des vidéos de transport du mutant  $\Delta 78$  possèdent des segments très courts présentant peu de pauses (% du temps : WT=27 +/- 1 ; shSAP97=16 +/- 3 ; p=0,0001) (Figure 31D).

Le TI et par conséquent l'externalisation de GluA1 est donc largement dépendant de son CTD. Il apparaît permettre sa sortie du RE ou de l'AG. De plus, le peu de vésicules contenant le mutant  $\Delta 78$  qui sont transportées ont des caractéristiques altérées.

## **B) SAP97 régule le transport intracellulaire**

Le CTD des AMPAR possède de nombreux sites d'interactions protéiques. En particulier, il a été montré que SAP97 s'associe directement à GluA1 dès le RE<sup>190</sup> et permettrait son transport jusqu'à la MP grâce à son rôle d'adaptateur pour le moteur moléculaire MyoVI<sup>250</sup>. Cependant ces études ont été réalisées par biochimie et par colocalisation sur des cellules fixées et l'effet régulateur de SAP97 sur le TI longue distance de GluA1 reste inconnu.

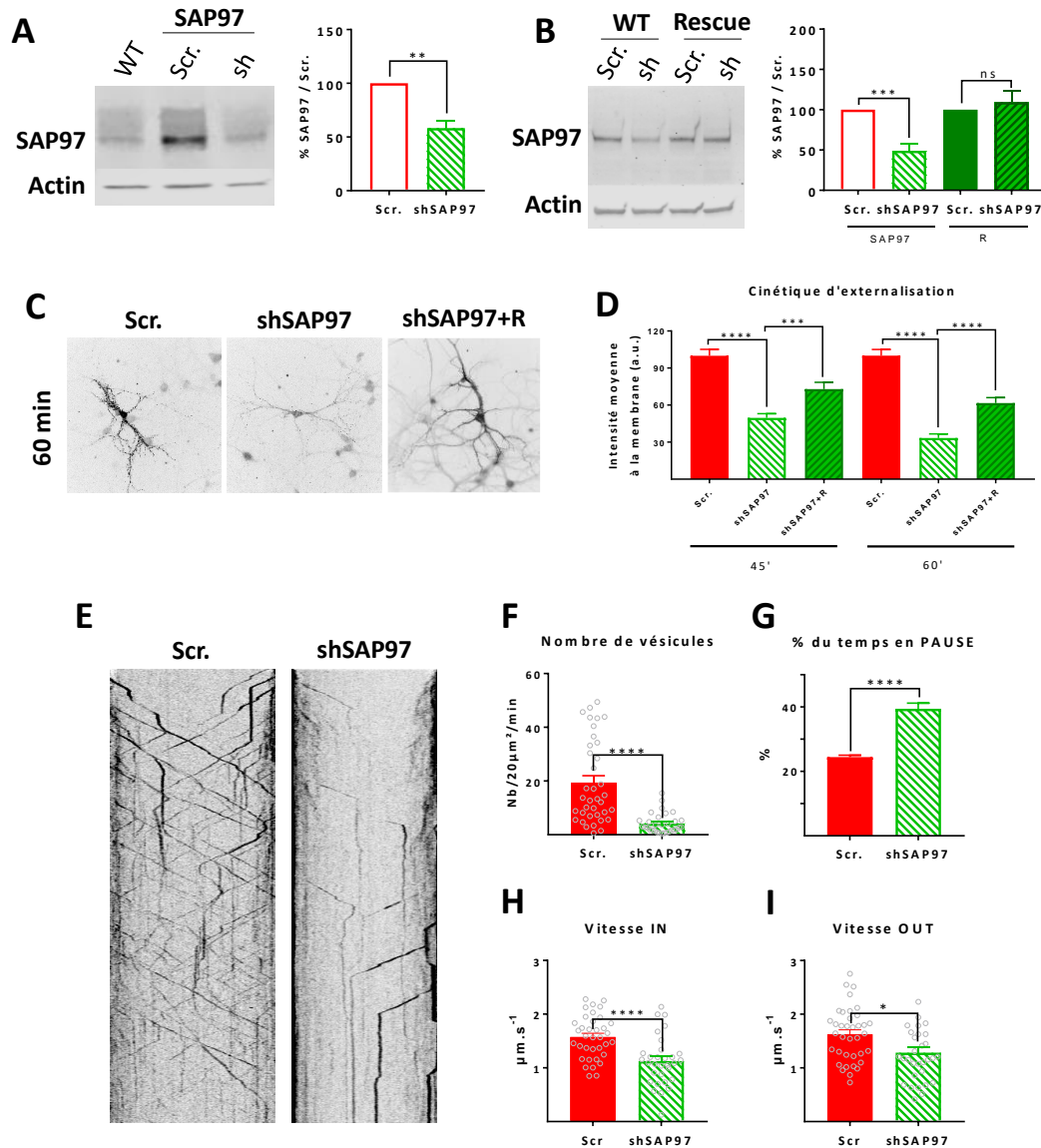
### **1 – Régulation du TI par SAP97 en conditions basales**

#### **Diminution du SAP97 endogène**

Nous avons diminué l'expression de SAP97 à l'aide d'un shRNA donné par le laboratoire du Pr. Richard Huganir<sup>414</sup> (Figure 32). Nous avons exprimé le sh contrôle (Scramble, Scr.) ou le shSAP97 dans des neurones d'hippocampe en culture et analysé par Western Blot l'expression de SAP97. L'expression du sh diminue la quantité de SAP97 par rapport au Scr. (% du contrôle : Scr.=100 ; shSAP97=58,26 +/- 7,31, n=4) (Figure 32A). Pour confirmer la spécificité du shRNA nous avons exprimé SAP97 (WT), ou le SAP97 insensible au sh (SAP97 rescue, R) dans des cellules COS-7, co-transfectées avec le shSAP97 ou Scr. L'expression du shSAP97 diminue l'expression de SAP97 WT mais n'affecte pas le SAP97 R (% du contrôle : Scr.+SAP97=100 ; shSAP97+SAP97=49,01 +/- 0,08, n=6 ; Scr.+R=100 ; shSAP97+R=109,4 +/-13,56, n=5) (Figure 32B).

Le shSAP97 diminuant l'expression de la protéine de façon significative, nous avons analysé l'impact de SAP97 sur l'externalisation de GluA1 néo-synthétisé. Nous avons exprimé ARIAD-GFP-GluA1 avec le shSAP97 ou Scr. et réalisé un immunomarquage sur cellules vivantes après 45 et 60 minutes d'incubation dans le ligand (Figure 32C). Le knock down (KD) de SAP97 diminue l'externalisation de GluA1 à la MP (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.), à 45min : Scr.=100 +/- 5,17, n=49 ; shSAP97=49,64 +/- 3,41, n=46 ; p<0,0001 ; à 60min : Scr.=100 +/- 5,06, n=55 ; shSAP97=33,33 +/- 3,29, n=57, N=4 ; p<0,0001), alors

que l'expression du SAP97 (R) la restaure partiellement (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.), à 45min : shSAP97+R=72,91 +/- 5,58, n=35 ; p=0,0006 ; à 60min : shSAP97+R=61,69 +/- 4,32, n=31, N=4 ; p<0,0001) (Figure 32D).



**Figure 32 : Effet général de SAP97 sur le TI et l'externalisation de GluA1 en condition basale**

**A-** Western Blot réalisé sur des neurones WT ou transfectés avec le shRNA contre SAP97 (shSAP97) ou le contrôle (Scr.) et quantification du SAP97 endogène. **B-** Western Blot et quantification de SAP97 réalisée sur des cellules COS-7 transfectées avec SAP97 WT (SAP97) ou SAP97 rescue (R) et co-transfectées avec shSAP97 ou Scr. **C-** Sur cellules vivantes transfectées avec shSAP97 ou Scr. +/- R et ARIAD-GFP-GluA1 WT, marquage de GFP-GluA1 présent à la MP après 45 et 60 minutes d'incubation dans le ligand. **D-** Quantification de l'intensité du marquage à la MP. **E-** Tracés manuels des kymographes obtenus à partir des vidéos (1min) du TI de ARIAD-TdTomato-GluA1 WT avec co-transfection du shSAP97 ou Scr. réalisées entre 30 et 60 minutes après addition du ligand. **F-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 WT par 20 μm² par minute. Les cellules ne présentant aucune vésicule ont été exclues. **G-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **H-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **I-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT.

Nous avons alors quantifié le TI en co-transfectant ARIAD-TdTomato-GluA1 WT avec shSAP97 ou Scr. Comme on pouvait s'y attendre, le KD de SAP97 a pour effet de diminuer drastiquement le nombre de vésicules (Nombre de vésicules/20 $\mu$ m<sup>2</sup>/min : Scr.=19,45 +/- 2,55, n=37 ; shSAP97=4,2 +/- 0,66, n=31, N=3 ; p<0,0001) (Figure 32E,F). Le temps de pause des vésicules est augmenté quand l'expression de SAP97 est diminuée (% du temps : Scr.=24 +/- 0,5 ; shSAP97=39 +/- 2 ; p<0,0001) (Figure 32G). De même, leur vitesse est réduite par rapport au Scr. ( $\mu$ m/s : IN : Scr.=1,58 +/- 0,07, n=36 ; shSAP97=1,13 +/- 0,08 ; p<0,0001 ; OUT : Scr. :1,63 +/- 0,08 ; shSAP97=1,28 +/- 0,10 ; p=0,006) (Figure 32H,I).

Dans nos expériences, en conditions de transmission basale, SAP97 participe la sortie de l'AG. En son absence, les quelques vésicules qui parviennent à être transportées ont une vitesse faible et passent plus de temps en pause que dans les conditions normales. Ces caractéristiques du transport vésiculaires diminué expliquent la présence diminuée de GluA1 à la MP par rapport au contrôle. Nous avons donc décidé d'analyser comment la liaison de SAP97 et GluA1 affecte le transport.

### Interaction de GluA1 avec SAP97

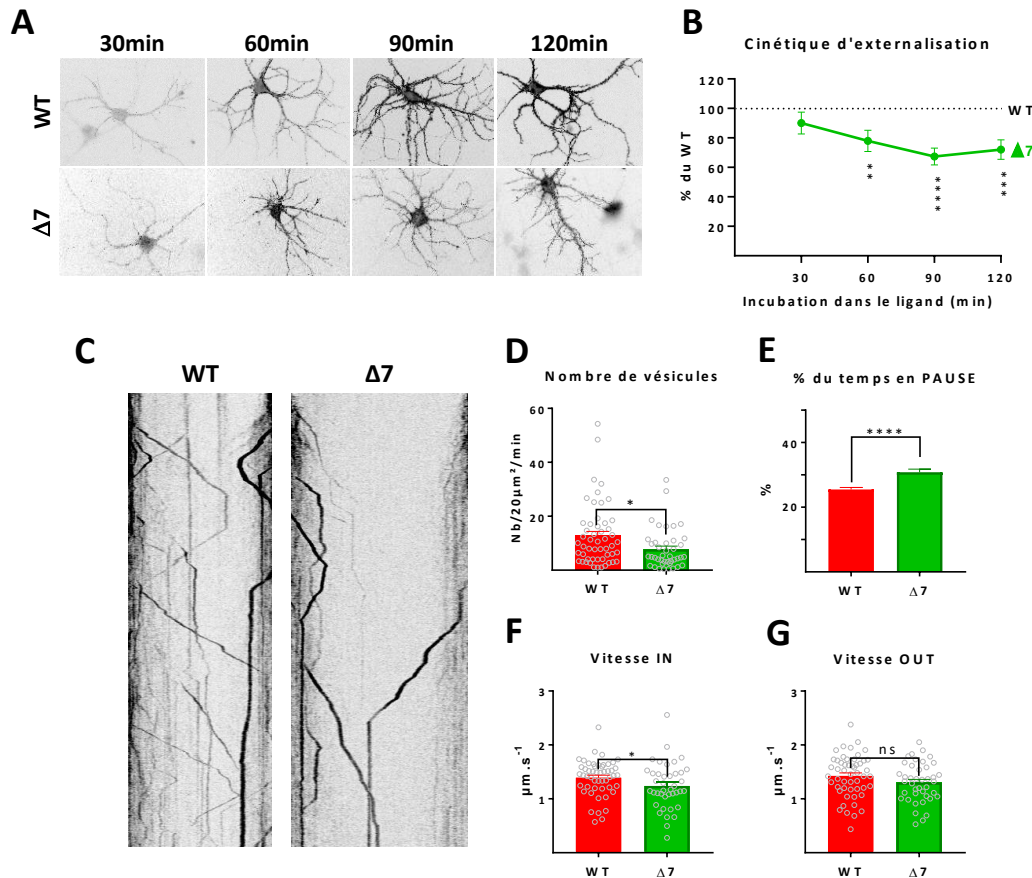
GluA1 lie SAP97 grâce à son site d'interaction PDZ situé à l'extrémité de son CTD<sup>249</sup>. Nous avons donc généré le mutant  $\Delta$ 7 (Figure 31A), mutant pour lequel les 7 derniers acides aminés ont été tronqués, empêchant son interaction avec SAP97. L'expression de ce mutant permet donc d'analyser l'impact de l'interaction GluA1-SAP97 sur le TI et l'externalisation des récepteurs néo-synthétisés (Figure 33).

Nous avons étudié la présence à la MP du mutant  $\Delta$ 7 en fonction du temps d'incubation dans le ligand (Figure 33A-B). L'intensité du marquage du mutant à la MP est normalisée pour chaque temps sur celle du WT. Sa présence à la MP est diminuée d'environ 30% par rapport au WT à partir de 60 minutes d'incubation dans le ligand (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.) : à 30min WT=100 +/- 4.3, n=81 ;  $\Delta$ 7=90 +/- 7, n=29 ; p=0.1683 ; à 60min : WT=100 +/- 3.9, n=92 ;  $\Delta$ 7=78 +/- 7, n=42 ; p=0.0015 ; à 90min : WT=100 +/- 5.7, n=43 ;  $\Delta$ 7=67 +/- 6, n=42 ; p<0.0001 ; à 120min : WT=100 +/- 3.8, n=84 ;  $\Delta$ 7=72 +/- 7, n=45, N=4 ; p=0.0001) (Figure 33B).

Pour déterminer si le nombre de récepteurs néo-synthétisés externalisés est dû à une exocytose inhibée ou à un TI modifié, nous avons analysé les caractéristiques du TI du mutant  $\Delta$ 7 par rapport au WT (Figure 33C-G). L'abolition de l'interaction avec SAP97 diminue le nombre de vésicules par rapport au GluA1 WT (nombre de vésicules/20 $\mu$ m<sup>2</sup>/min : WT=12,79 +/- 1,6, n=52 ;  $\Delta$ 7=7,75 +/- 1,16, n=41, N=5 ; p=0,0168) (Figure 33C, D). Les vésicules contenant  $\Delta$ 7 passent plus de temps en PAUSE que celles contenant le GluA1 WT (% du temps : WT=25 +/- 0,6 ;  $\Delta$ 7=36 +/- 1 ; p<0,0001) (Figure 33E) et ont des vitesses moyennes



significativement diminuées IN ( $\mu\text{m/s}$  : WT=1,39 +/- 0,05 ;  $\Delta 7$ =1,24 +/- 0,07 ;  $p=0,0249$ ) (Figure 33F) et diminuées mais pas significativement OUT ( $\mu\text{m/s}$  : WT=1,42 +/- 0,05 ;  $\Delta 7$ =1,30 +/- 0,06 ;  $p=0,1069$ ) (Figure 33G).



**Figure 33 : Effet de l'interaction de SAP97 sur le TI de GluA1**

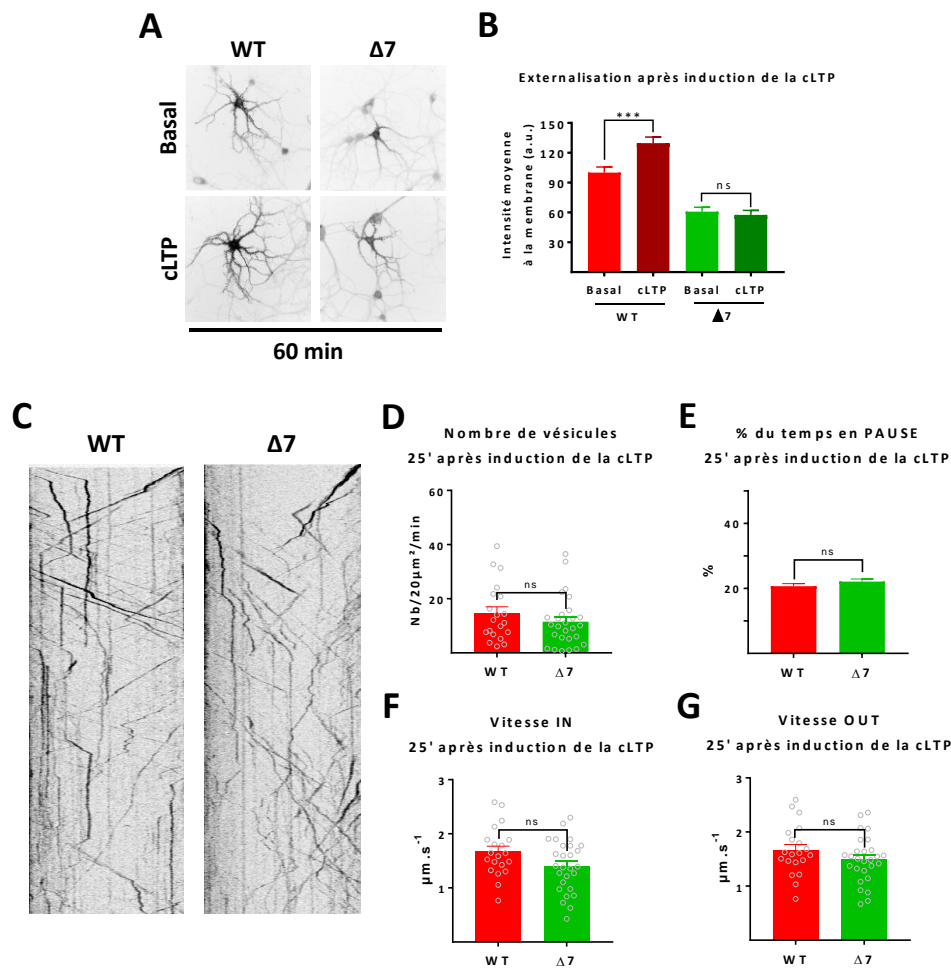
**A-** Sur cellules vivantes transfectées avec ARIAD-GFP-GluA1 WT ou  $\Delta 7$ , marquage de GFP-GluA1 présent à la MP après 30, 60, 90 et 120 minutes d'incubation dans le ligand. **B-** Quantification de l'intensité du marquage à la MP en pourcentage du WT. **C-** Tracés manuels des kymographes obtenus à partir des vidéos (1min) du TI de ARIAD-TdTomato-GluA1 WT ou  $\Delta 7$  réalisées entre 30 et 60 minutes après addition du ligand. **D-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 WT ou  $\Delta 7$  par 20 $\mu\text{m}^2$  par minute. Les cellules ne présentant aucune vésicule ont été exclues. **E-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **F-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **G-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT.

SAP97 possède donc un rôle régulateur sur le TI en conditions basales. Le TI de GluA1 étant régulé après induction de la cLTP, nous avons donc décidé d'analyser son rôle lors d'événements de plasticité synaptique, afin de déterminer s'il contribue à cette régulation.

## 2 – Effet de SAP97 sur le TI après induction de la cLTP

SAP97 contrôle la distribution des récepteurs et a un effet régulateur sur la plasticité synaptique. Cette protéine possède plusieurs isoformes :  $\alpha$ -SAP97 est localisé principalement au niveau de la PSD où il régule la population synaptique des AMPAR<sup>339</sup>, alors que l'isoforme

$\beta$ -SAP97 régule la population extra-synaptique et inhibe la LTP dépendante des NMDAR<sup>339</sup>. Cependant, l'effet de l'interaction de SAP97 et GluA1 sur son TI pendant la LTP n'a jamais été établi.



**Figure 34 : Effet de l'interaction de SAP97 sur le TI après induction de la cLTP**

**A-** Sur cellules vivantes transfectés avec un vecteur inducible contenant ARIAD-GFP-GluA1 WT ou  $\Delta 7$ , marquage de GFP-GluA1 présent à la MP après 60minutes d'incubation dans le ligand et induites pour la cLTP après 20 minutes d'incubation. **B-** Quantification de l'intensité du marquage à la MP. **C-** Tracés manuels obtenus à partir des vidéos du TI (1min) de neurones transfectés avec ARIAD-TdTomato-GluA1 WT ou  $\Delta 7$  dans un vecteur inducible, incubées entre 60 et 80 minutes dans le ligand et induites pour cLTP après 20minutes. **D-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 WT ou  $\Delta 7$  par 20 $\mu$ m<sup>2</sup> par minute. Les cellules ne présentant aucune vésicule ont été exclues. **E-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **F-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **G-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT.

Nous avons donc étudié l'effet de cette interaction sur l'exocytose des récepteurs après induction de la cLTP. Les cellules ont été transfectées avec ARIAD-GFP-GluA1 WT ou  $\Delta 7$  sous clonés dans des vecteurs inducibles permettant de transfecter les neurones à DIV7 avec une bonne efficacité de transfection et d'exprimer la protéine d'intérêt pendant seulement 48h avant l'induction de la cLTP. Les neurones sont incubés dans le ligand pendant 20 minutes, la cLTP est induite pendant 5 minutes et l'immunomarquage été réalisé sur cellules vivantes 25

minutes après l'induction (soit un total de 60 minutes dans le ligand). L'augmentation de l'intensité du marquage à la MP de GluA1 WT par rapport à la condition non traitée confirme l'efficacité de l'induction de la cLTP à 60 minutes (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.) : WT basal=100 +/- 5,63, n=59 ; WT cLTP=129,6 +/- 6,22, n=56, N=4 ; p=0,0001) (Figure 34A,B). L'induction de la cLTP n'a par contre aucun effet sur le mutant  $\Delta 7$  pour lequel l'expression à la MP avec ou sans induction de la cLTP est identique (Intensité moyenne (a.u.) :  $\Delta 7$  basal=60,85 +/- 4,27, n=54 ;  $\Delta 7$  cLTP=57,62 +/- 4,5, n=55, N=4 ; p=0,5429) (Figure 34B).

Pour l'étude du TI, les mêmes mutants étiquetés avec TdTomato ont été utilisés. Les vidéos des vésicules sont acquises 25 à 40 minutes après l'induction de la cLTP soit 60 minutes après addition du ligand. Comme l'avait montré Hangen et al., le TI est régulé par l'activité et les caractéristiques générales du transport sont augmentées dès 25 minutes après l'induction de la cLTP. Le nombre de vésicules contenant le mutant  $\Delta 7$  est légèrement diminué par rapport au WT, mais pas de manière significative (Nombre de vésicules/20 $\mu\text{m}^2$ /min : WT=14,65 +/- 2,37, n=20 ;  $\Delta 7$ =11,48 +/- 1,79, n=27, N=2 ; p=0.2998) (Figure 34C,D). Le pourcentage du temps passé en PAUSE est légèrement augmenté, mais pas de manière significative (% du temps : WT=20 +/- 0,8 ;  $\Delta 7$ =22 +/- 0,8 ; p=0,0599) (Figure 34E). Les vitesses sont légèrement réduites, mais pas de manière significative ( $\mu\text{m/s}$  : IN : WT=1,67 +/- 0,10 ;  $\Delta 7$ =1,41 +/- 0,09 ; p=0,1144 ; OUT : WT=1,67 +/- 0,10 ;  $\Delta 7$ =1,49 +/- 0,08 ; p=0,2025) (Figure 34F,G). Ces résultats sont préliminaires et doivent être répliqués afin de déterminer si la régulation que SAP97 opère sur le TI en conditions basales est maintenu lors de la LTP.

## **C) 4.1N régule le transport intracellulaire pendant la LTP**

GluA1 interagit directement avec 4.1N, une protéine associée à l'actine qui est très importante pour l'exocytose de GluA1 particulièrement lors de la LTP<sup>145</sup>. Cette interaction a lieu avant l'exocytose du récepteur, mais le moment précis de l'interaction lors de la sécrétion de la protéine et si elle participe à la régulation du TI des récepteurs néo-synthétisés en conditions basales et/ou pendant la LTP reste à définir.

### **1 – Régulation de l'exocytose par 4.1N en conditions basales**

#### **Diminution du 4.1N endogène**

Nous avons diminué l'expression de 4.1N à l'aide d'un shRNA (sh4.1N) donné par le laboratoire du Pr. Richard Huganir<sup>145</sup> (Figure 35A). Les neurones d'hippocampe de rat en culture ont été infectés avec le sh4.1N ou avec un Scr. Un western blot a confirmé que l'expression du sh4.1N diminue l'expression de 4.1N (% du contrôle : Scr.=100 ; sh4.1N=40,85 +/- 8,34, N=4) (Figure 35A). Dans des cellules COS-7 nous avons transfecté le sh4.1N ou Scr.

avec 4.1N WT ou rescue (R). L'expression du sh4.1N diminue l'expression du 4.1N WT sans affecter l'expression du 4.1N (R) (% du contrôle : Scr.+4.1N=100 ; sh4.1N+4.1N=21,9 +/- 2,84 ; Scr.+R=100, sh4.1N+R=107,9 +/-13,66, N=3) (Figure 35B), ce qui confirme d'une part l'efficacité du sh4.1N et d'autre part sa spécificité. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par l'équipe du Pr. Huganir.

Afin de quantifier l'externalisation du GluA1 néo-synthétisé due à la présence de la protéine 4.1N, nous avons transfecté les neurones avec ARIAD-GFP-GluA1 et le sh4.1N ou Scr. avec ou sans co-transfection du 4.1N (R) (Figure 35C,D). L'immunomarquage anti-GFP réalisé sur cellules vivantes après 45 et 60 minutes d'incubation dans le ligand ARIAD montre que l'expression du sh4.1N diminue drastiquement l'externalisation de GluA1 par rapport au Scr. (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.) à 45min : Scr.=100 +/- 7,32, n=43 ; sh4.1N=57,36 +/- 6,27, n=36, N=3 ; p<0,0001 ; à 60min : Scr.=100 +/- 7,59, n=50 ; sh4.1N=37,29 +/- 4,16, n=39, N=3 ; p<0,0001) (Figure 35C). Cette diminution est du même ordre que celle observée avec le shSAP97. La présence de GluA1 à la MP est rétablie quand la protéine 4.1N (R) est exprimée (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.) à 45min : sh4.1N+R=105 +/- 10,34, n=33, N=3 ; p=0,0004 ; à 60min : sh4.1N+R=89,73 +/- 7,81, n=38, N=3 ; p<0,0001) (Figure 35D).

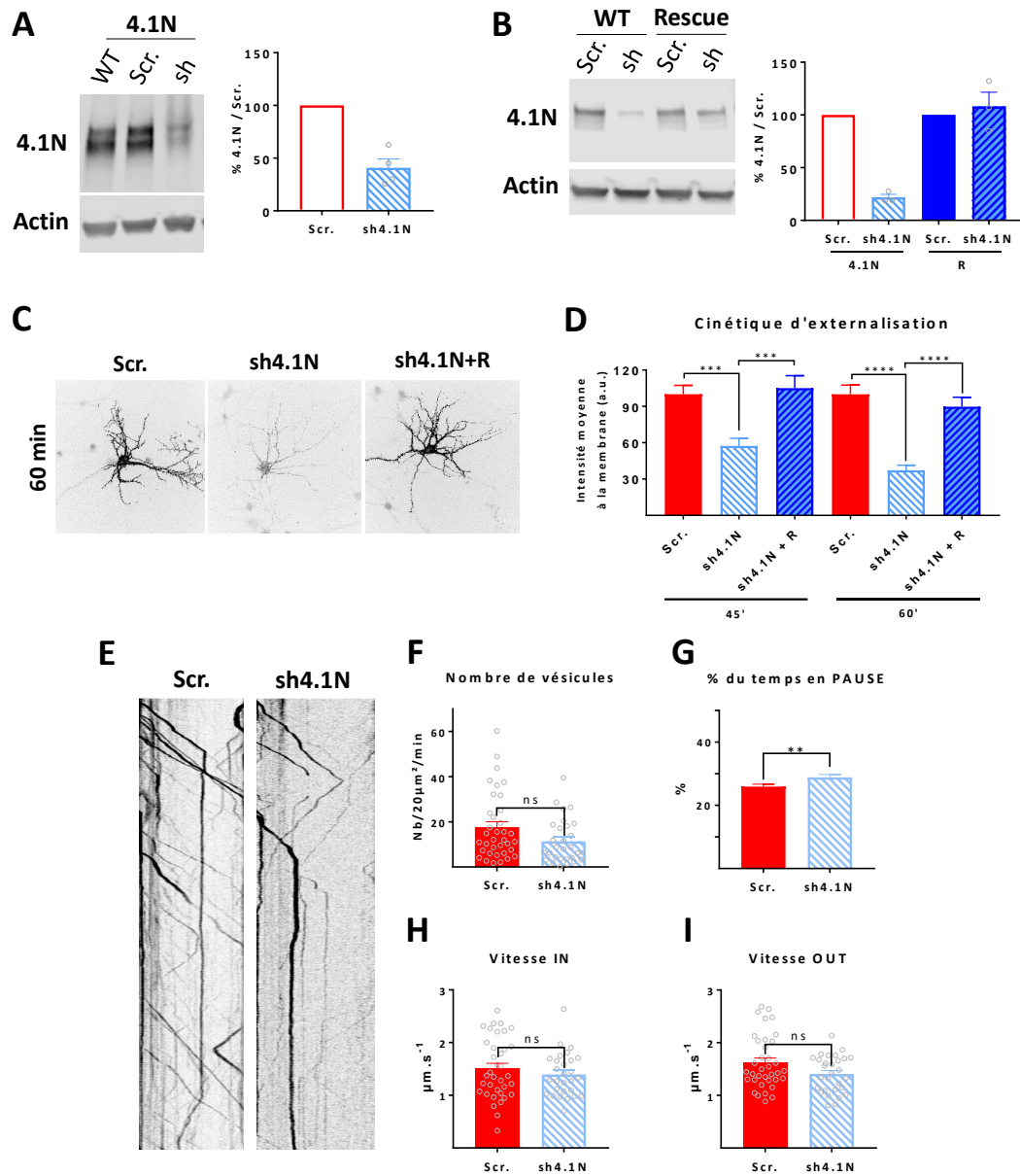
La caractérisation du TI de GluA1 WT quand l'expression de 4.1N est inhibée montre un nombre de vésicules diminué par rapport au Scr. (nombre de vésicules/20µm<sup>2</sup>/min : Scr.=17,6 +/- 2,44, n=36, sh4.1N=11,34 +/- 1,82, n=27, N=3 ; p=0,0738) (Figure 35F), de manière non significative et moins drastique que celle observée pour SAP97 (Figure 32F). Le temps passé en PAUSE est très légèrement augmenté (% du temps : Scr.=26 +/- 0,7, sh4.1N=30 +/- 0,9 ; p=0,0028) (Figure 35G), mais les vitesses ne sont pas affectées par l'expression du sh4.1N (µm/s : IN : Scr.=1,51 +/- 0,09, n=36 ; sh4.1N=1,39 +/- 0,08 ; p=0,4717 ; OUT : Scr. =1,62 +/- 0,08 ; sh4.1N=1.41 +/- 0,06 ; p=0,1861) (Figure 35H, I).

Ces expériences confirment l'importance de 4.1N pour l'exocytose des récepteurs néo-synthétisés. Cependant, contrairement à SAP97, qui semble posséder un effet régulateur sur le TI, l'effet de 4.1N ne semble pas être aussi évident en conditions basales, hormis pour le nombre de vésicules diminué qui suggère que cette interaction pourrait être importante pour la formation des vésicules au niveau du TGN. Nous avons ensuite analysé l'impact de l'interaction directe entre GluA1 et 4.1N grâce à des mutants de GluA1 n'interagissant pas avec 4.1N.

### Interaction avec 4.1N

Nous avons généré un mutant de GluA1 incapable de lier 4.1N. Le site d'interaction avec 4.1N est situé juste après le dernier TMD de GluA1<sup>415</sup>. Cette interaction est rendue

possible par la dé-palmitoylation de C811 qui promeut les phosphorylations des S816 et S818 par PKC<sup>145</sup>. Nous avons donc créé un mutant dont 15 acides aminés ont été supprimés après le TM4 ( $\Delta$ 4.1N) (Figure 31A). L'importance de cette séquence pour la liaison avec 4.1N a déjà été caractérisée dans la littérature<sup>415</sup>.

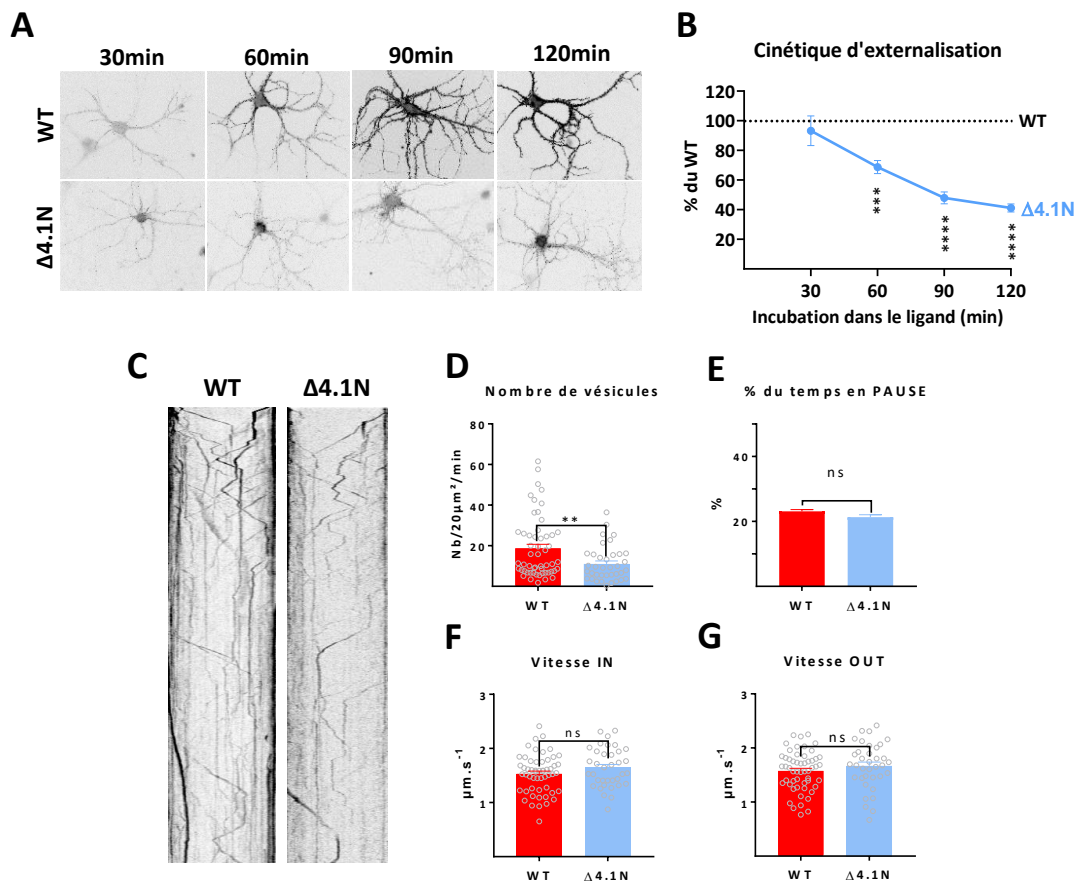


**Figure 35 : Effet général de 4.1N sur le TI basal de GluA1**

**A-** Western Blot réalisé sur des neurones WT ou transfectés avec le shRNA contre 4.1N (sh4.1N) ou le contrôle (Scr.) et quantification du 4.1N endogène. **B-** Western Blot et quantification de 4.1N réalisée sur des cellules COS-7 transfectées avec 4.1N WT (4.1N) ou 4.1N rescue (R) et co-transfectées avec sh4.1N ou Scr. **C-** Sur cellules vivantes transfectées avec sh4.1N ou Scr. +/- R, marquage de GFP-GluA1 WT présent à la MP après 45 et 60 minutes d'incubation dans le ligand. **D-** Quantification de l'intensité du marquage à la MP. **E-** Tracés manuels des kymographes obtenus à partir des vidéos (1min) du TI de ARIAD-TdTomato-GluA1 WT avec co-transfection de sh4.1N ou Scr. réalisées entre 30 et 60 minutes après addition du ligand. **F-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 WT par 20µm<sup>2</sup> par minute. Les cellules ne présentant aucune vésicule ont été exclues. **G-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **H-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **I-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT.



L'immunomarquage des récepteurs GFP-GluA1 WT ou GFP-GluA1  $\Delta 4.1N$  externalisés a été réalisé après plusieurs temps d'incubation dans le ligand ARIAD (Figure 36A). L'intensité à la membrane du mutant est normalisée sur celle du WT. La présence du mutant  $\Delta 4.1N$  à la MP diminue progressivement par rapport au WT, à mesure du temps passé dans le ligand (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.) : à 30min WT=100 +/- 7,63, n=40 ;  $\Delta 4.1N$ =93,22 +/- 10, n=38, N=4 ; p=0.2298 ; à 60min : WT=100 +/- 3.9, n=40 ;  $\Delta 4.1N$ =68,75 +/- 4,43, n=38 ; p=0,0003 ; à 90min : WT=100 +/- 5,71, n=43 ;  $\Delta 4.1N$ =47,94 +/- 4,01, n=36 ; p<0,0001 ; à 120min : WT=100 +/- 6,32, n=40 ;  $\Delta 4.1N$ =41,19 +/- 2,7, n=40 ; p<0,0001) (Figure 36B).

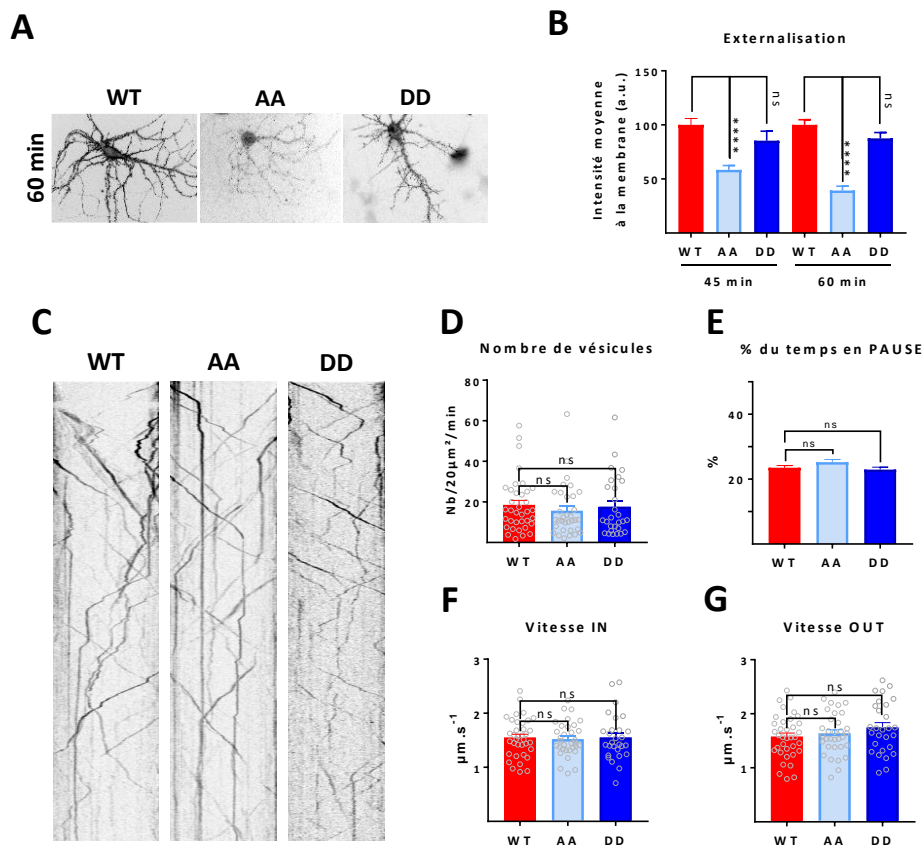


**Figure 36 : Effet de l'interaction de 4.1N sur le TI basal**

**A-** Sur cellules vivantes transfectées avec ARIAD-GFP-GluA1 WT ou  $\Delta 4.1N$ , marquage de GFP-GluA1 présent à la MP après 30, 60, 90 et 120 minutes d'incubation dans le ligand. **B-** Quantification de l'intensité du marquage à la MP en pourcentage du WT. **C-** Tracés manuels des kymographes obtenus à partir des vidéos (1min) du TI de ARIAD-TdTomato-GluA1 WT ou  $\Delta 4.1N$  réalisées entre 30 et 60 minutes après addition du ligand. **D-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 WT ou  $\Delta 4.1N$  par  $20\mu\text{m}^2$  par minute. Les cellules ne présentant aucune vésicule ont été exclues. **E-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **F-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **G-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT.

Nous avons analysé les caractéristiques du transport vésiculaire du mutant  $\Delta 4.1N$  par rapport au WT (Figure 36C-G). L'abolition de l'interaction avec 4.1N diminue le nombre de

vésicules par rapport au GluA1 WT (nombre de vésicules/20 $\mu\text{m}^2$ /min : WT=18,68 +/- 2,05, n=54 ;  $\Delta$ 4.1N=11,06 +/- 1,42, n=37, N=5 ; p=0,0091) (Figure 36D). Le temps passé en PAUSE n'est pas affecté (% du temps : WT=23 +/- 0,5, n=4203 ;  $\Delta$ 4.1N=21 +/- 0,8 ; p=0,1231) (Figure 36E). De même pour les vitesses IN ( $\mu\text{m/s}$  : WT=1,53 +/- 0,05, n=54 ;  $\Delta$ 4.1N=1,64 +/- 0,06 ; p=0,2073) (Figure 36F) et OUT ( $\mu\text{m/s}$  : WT=1,57 +/- 0,05 ;  $\Delta$ 4.1N=1,67 +/- 0,07 ; p=0,2226) (Figure 36G) ne sont pas affectées. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec le sh4.1N.



**Figure 37 : Effet des phosphorylations S816 et S818 sur le TI basal de GluA1**

**A-** Sur cellules vivantes transfectées avec ARIAD-GFP-GluA1 WT, AA ou DD, marquage de GFP-GluA1 présent à la MP après 45 et 60 minutes d'incubation dans le ligand. **B-** Quantification de l'intensité du marquage à la MP en pourcentage du WT. **C-** Tracés manuels des kymographes obtenus à partir des vidéos (1min) du TI de ARIAD-TdTomato-GluA1 WT, AA ou DD réalisées entre 30 et 60 minutes après addition du ligand. **D-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 WT, AA ou DD par 20 $\mu\text{m}^2$  par minute. Les cellules ne présentant aucune vésicule ont été exclues. **E-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **F-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **G-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT.

La liaison de 4.1N avec GluA1 dépend de la phosphorylation de S816 et S818 de son CTD. Nous avons donc étudié les propriétés d'exocytose et de TI des phospho-mutants GluA1 S816A-S818A (AA) et S816D-S818D (DD) (Figure 31A). La présence de GFP-GluA1 WT, AA ou DD à la MP est quantifiée par immunomarquage après 45 et 60 minutes d'incubation dans

le ligand en normalisant sur le WT (Figure 37A). La présence à la PM du mutant AA est diminuée de moitié après 45 et 60 minutes dans le ligand par rapport au WT (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.) à 45 min : WT=100 +/- 5,96, n=51 ; AA=58,45 +/- 3,99, n=35 ; p<0,0001 ; 60min : WT=100 +/- 4,76, n=53 ; AA=39,27 +/- 4,01, n=35 ; p<0,0001) (Figure 37B). Le mutant DD est externalisé au même niveau que le WT (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.) à 45 min : DD=85,39 +/- 8,75, n=35 ; p=0,0754 ; 60min : DD=87,57 +/- 5,39, n=43, N=3 ; p=0,0878) (Figure 37B). Comme précédemment, l'interaction avec 4.1N se révèle importante pour l'exocytose du récepteur.

Le TI de TdTomato-GluA1 WT, AA ou DD a été étudié entre 30 et 60 minutes d'incubation dans le ligand. Les mutant AA et DD ne présentent pas de différence par rapport au WT en termes de nombre de vésicule (nombre de vésicules/20 $\mu$ m<sup>2</sup>/min : WT=17,62 +/- 2,09, n=35 ; AA=15,65 +/- 2,02, n=33 ; p=0,2789 ; DD=17,12 +/- 2,75, n=29, N=5 ; p=0,6332) (Figure 37C-D). De même pour le pourcentage de temps passé en PAUSE (% du temps : WT=23 +/- 0,7 ; AA=25 +/- 0,8 ; p=0,0704 ; DD=23 +/- 0,8 ; p=0,4064) (Figure 37E), la vitesse IN ( $\mu$ m/s : WT=1,52 +/- 0,05 ; AA=1,44 +/- 0,06 ; p=0,6035 ; DD=1,55 +/- 0,08 ; p=0,7521) (Figure 37F), et OUT ( $\mu$ m/s : WT=1,58 +/- 0,07 ; AA=1,64 +/- 0,07 ; p=0,6287 ; DD=1,75 +/- 0,09 ; p=0,193) (Figure 37G).

En conditions basales, 4.1N a un rôle important pour l'exocytose des récepteurs néo-synthétisés. Ceci est vérifié pour nos trois conditions d'expérience : sh4.1N, mutant  $\Delta$ 4.1N et mutant AA. En revanche, la modulation du TI de GluA1 par 4.1N semble modérée en conditions basales.

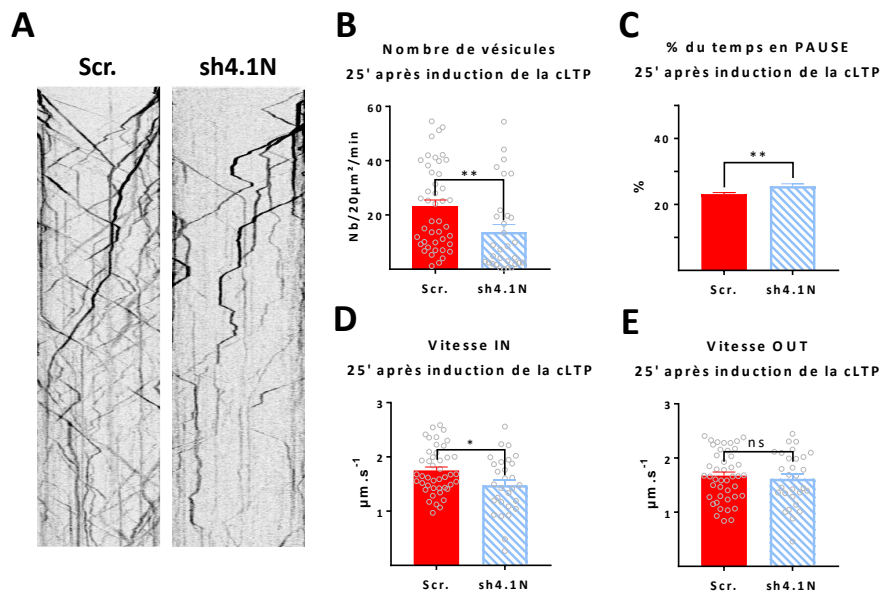
## 2 – Effet de 4.1N sur le TI après induction de la cLTP

L'effet de 4.1N est particulièrement important lors de la LTP, puisque le KD de 4.1N diminue l'expression de la LTP<sup>145</sup>. Son interaction avec GluA1 est dépendant de phosphorylations réalisées par PKC<sup>333</sup> qui est activée lors de la LTP. La visualisation directe d'événements d'exocytose chez les rongeurs a montré que 4.1N est nécessaire pour l'insertion des sous-unités GluA1 dépendante de l'activité, mais son effet sur le TI dans ces conditions reste à éclaircir. Pour cette raison nous avons décidé d'analyser si l'interaction entre GluA1 et 4.1N avait un rôle sur l'exocytose et le TI de GluA1 néo-synthétisé après induction de la cLTP.

Nous avons d'abord analysé les propriétés de TI après diminution de la protéine 4.1N par l'expression du sh4.1N (Figure 38). Les neurones ont été transfectés avec un vecteur inductible ARIAD-TdTomato-GluA1 WT et le sh4.1N ou Scr. Les vidéos du transport vésiculaire sont réalisées 60 minutes après l'addition du ligand et 25 minutes après l'induction de la cLTP. La co-expression du sh4.1N entraîne une diminution du nombre de vésicules par rapport au contrôle (nombre de vésicules/20 $\mu$ m<sup>2</sup>/min : Scr.=23,21 +/- 2,33, n=44, sh4.1N=13,7



+/- 2,76, n=31, N=3 ; p=0,0021) (Figure 38A,B). Le temps passé en PAUSE est augmenté (% du temps : Scr.=23 +/- 0,4, sh4.1N=25 +/- 0,7 ; p=0,0064) (Figure 38C). La vitesse IN est diminuée significativement ( $\mu\text{m/s}$  : Scr.=1,75 +/- 0,06, sh4.1N=1,48 +/- 0,09 ; p=0,0349) (Figure 38D) alors que la vitesse OUT n'est pas affectée ( $\mu\text{m/s}$  : Scr.=1,67 +/- 0,07, sh4.1N=1,62 +/- 0,09 ; p=0,6744) (Figure 38E). Cette diminution des vitesses IN lors du KD de 4.1N suggère que cette protéine pourrait jouer un rôle régulateur du TI lors de la cLTP. Pour investiguer plus précisément l'effet de l'interaction, nous nous sommes donc tournés vers les mutants d'interaction.

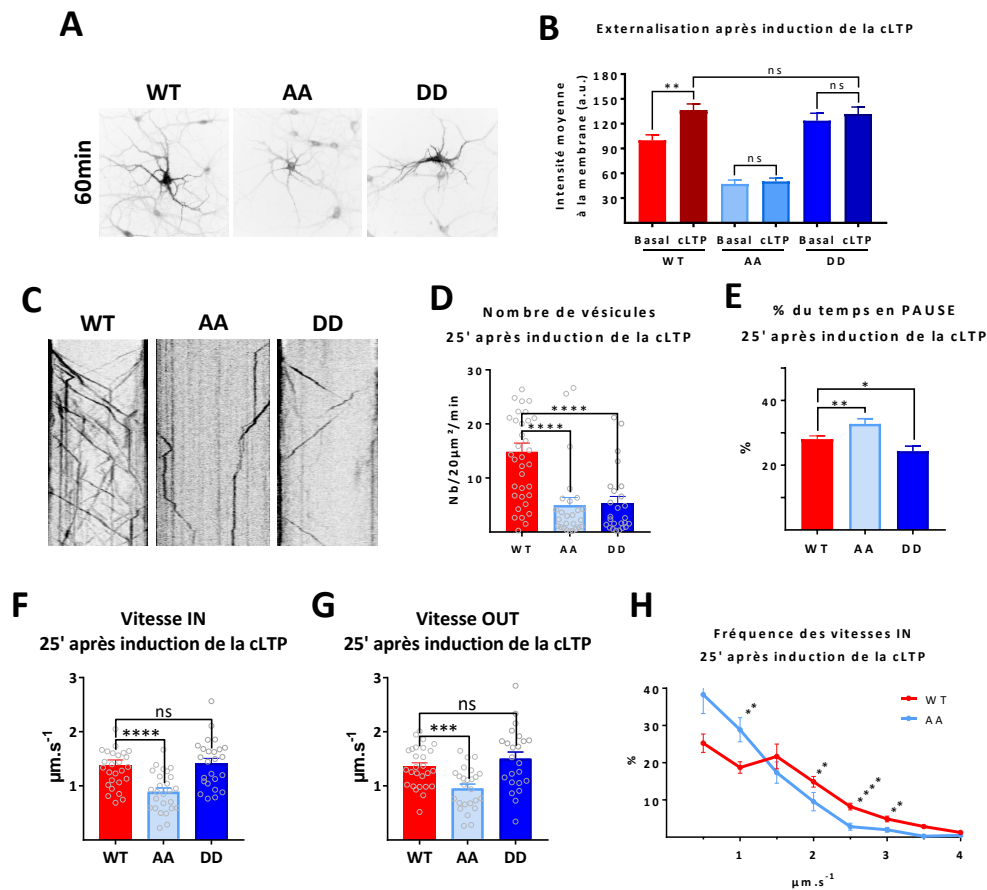


**Figure 38 : Effet général de 4.1N sur le TI après induction de la cLTP**

**A-** Tracés manuels obtenus à partir des vidéos du TI (1min) de neurones transfectés avec sh4.1N ou Scr. et ARIAD-TdTomato-GluA1 WT dans un vecteur inducible, incubées entre 60 et 80 minutes dans le ligand et induites pour cLTP après 20minutes. **B-** Nombre moyen de vésicules contenant ARIAD-TdTomato-GluA1 WT par 20µm² par minute. Les cellules ne présentant aucune vésicule ont été exclues. **C-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **D-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **E-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT.

La liaison entre GluA1 et 4.1N est critique pour l'exocytose du GluA1 néo-synthétisé en conditions basales et nous avons voulu confirmer qu'elle est importante après induction de la cLTP (Figure 39). Les neurones ont été transfectés avec des vecteurs inducibles ARIAD-GFP-GluA1 WT, AA ou DD. Compte tenu de la littérature<sup>145</sup>, on attend également une présence réduite du mutant AA à la MP. Après 20 minutes d'incubation dans le ligand, les cellules ont été traitées pour induire la cLTP. 25 minutes après induction de la cLTP, GluA1 WT montre une augmentation de l'intensité du marquage à la MP par rapport à la condition non traitée, confirmant l'efficacité du traitement (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.) : WT basal=100 +/- 6,52, n=45 ; WT cLTP=136,5 +/- 7,47, n=40, N=3 ; p=0.0072) (Figure 39A). L'induction de la cLTP n'a montré aucun effet sur le mutant AA ou sur le mutant DD. Le mutant

AA maintient une localisation à la PM à 50% du WT avant et après l'induction (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.) : AA basal=47,18 +/- 4,64, n=45 ; AA cLTP=50,17 +/- 4,05, n=46, N=3 ; p=0,72) (Figure 39B) alors que le mutant DD est externalisé dans les deux conditions au même niveau que le WT après induction de la cLTP (Intensité moyenne normalisée sur le contrôle (a.u.) : DD basal=123,7 +/- 9,02, n=59 ; DD cLTP=131,8 +/- 8,44, n=49, N=3 ; p=0,50 ; p=0,5323) (Figure 39B).



**Figure 39 : Effet des phosphorylations S816 et S818 sur le TI de GluA1 après induction de la cLTP**

**A-** Sur cellules vivantes transfectés avec un vecteur inducible contenant ARIAD-GFP-GluA1 WT, AA ou DD, marquage de GFP-GluA1 WT présent à la MP après 60minutes d'incubation dans le ligand et induites pour la cLTP après 20 minutes d'incubation. **B-** Quantification de l'intensité du marquage à la MP. **C-** Tracés manuels obtenus à partir des vidéos du TI (1min) de neurones transfectés avec ARIAD-TdTomato-GluA1 WT, AA ou DD dans un vecteur inducible, incubées entre 60 et 80 minutes dans le ligand et induites pour cLTP après 20minutes. **D-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 WT, AA ou DD par 20μm<sup>2</sup> par minute. Les cellules ne présentant aucune vésicule ont été exclues. **E-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **F-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **G-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT. **H-** Fréquence distribution des vitesses IN.

Nous avons ensuite étudié l'effet de ces mutations sur le TI après induction de la cLTP. Les mutants AA et DD montrent des nombres de vésicules drastiquement diminués 25 minutes après induction de la cLTP (nombre de vésicules/20μm<sup>2</sup>/min : WT=13,99 +/- 1,52, n=25 ; AA=4,99 +/- 1,38, n=26 ; p<0,0001 ; DD=5,37 +/- 1,21, n=25, N=3 ; p<0,0001) (Figure 39C,D).

Cette réduction drastique du nombre de vésicules pour les mutants AA et DD après la cLTP, n'est pas retrouvée en conditions basales. Le pourcentage du temps passé en PAUSE est très légèrement augmenté pour le mutant AA par rapport au WT et au mutant DD (% du temps : WT=28 +/- 0,9, n=1500 ; AA=32 +/- 1 ; p=0,0036 ; DD=24 +/- 1 ; p=0,0312) (Figure 39E). Le mutant AA a des vitesses drastiquement diminuées par rapport au WT, à la fois IN ( $\mu\text{m/s}$  : WT=1,38 +/- 0,09 ; AA=0,89 +/- 0,07 ; p<0,0001) (Figure 39F) et OUT ( $\mu\text{m/s}$  : WT=1,35 +/- 0,007 ; AA=0,96 +/- 0,007 ; p=0,0008) (Figure 39G). Le mutant DD, constitutivement phosphorylé, possède des vitesses IN similaires au WT et des vitesses OUT plus rapides mais non significatives ( $\mu\text{m/s}$  : IN : DD=1,41 +/- 0,008 ; p=0,5129 ; OUT : DD=1,51 +/- 0,12 ; p=0,3051) (Figure 39F, G).

La distribution des fréquences des vitesses du mutant AA est modifiée par rapport au WT (Figure 39H). Le mutant AA possède proportionnellement moins de trajectoires de haute vitesse par rapport au WT, au profit de trajectoires de basse vitesse, alors que le mutant DD possède une distribution similaire au WT (data not shown).

Ces résultats indiquent que, comme en conditions basales, l'interaction de 4.1N possède un rôle capital pour l'exocytose des GluA1 néo-synthétisés après induction de la cLTP. Dans ces conditions, l'interaction entre GluA1 et 4.1N a aussi un rôle majeur pour la régulation du TI de GluA1, en modulant drastiquement les vitesses et le temps de pause des vésicules. Cet effet de 4.1N sur le TI n'avait jamais été montré dans la littérature.

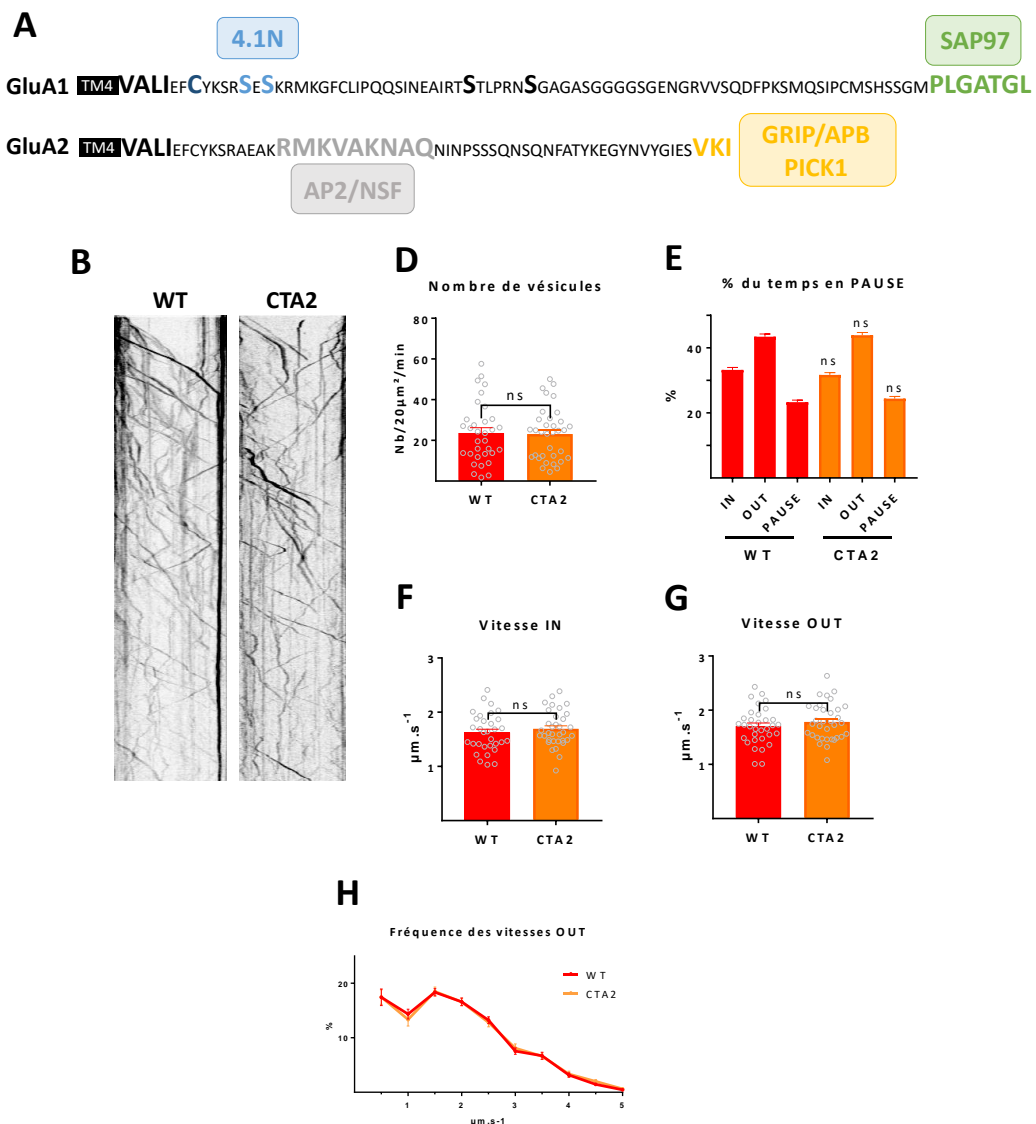
## **D) Influence d'autres protéines associées à GluA1**

### **1 – Hétéromérisation avec GluA2**

Dans l'hippocampe, les AMPAR les plus abondants sont les hétéromères GluA1/GluA2<sup>32</sup>. Bien que son implication soit débattue, le CTD semble avoir un impact sur les récepteurs recrutés préférentiellement lors d'événements de plasticité synaptique<sup>123</sup>. Le CTD de GluA1 semble plus impliqué dans la LTP, alors que celui de GluA2 est impliqué dans la LTD. Ces CTD sont peu homologues et sont le substrat de MPT et d'interactions protéiques différentes (Figure 40A).

Afin d'étudier les caractéristiques du transport de GluA2 en s'affranchissant de l'influence des CTD de ses partenaires, nous avons utilisé un mutant GluA1 dont le CTD a été remplacé par le CTD de GluA2 (mutant CTA2), donné par le laboratoire du Dr. Eric Boué-Grabot. Le mutant CTA2 rend possible la formation d'homomères de « GluA1 » mais qui possèdent uniquement des CTD de GluA2. Ce mutant possède un TI similaire à celui de GluA1 autant en terme de nombre de vésicules (nombre de vésicules/20 $\mu\text{m}^2$ /min : WT=23,1 +/- 2,45, n=33; CTA2=23,12 +/- 2,2, n=34, N=4 ; p=0,9572) (Figure 40D), de temps passé dans les

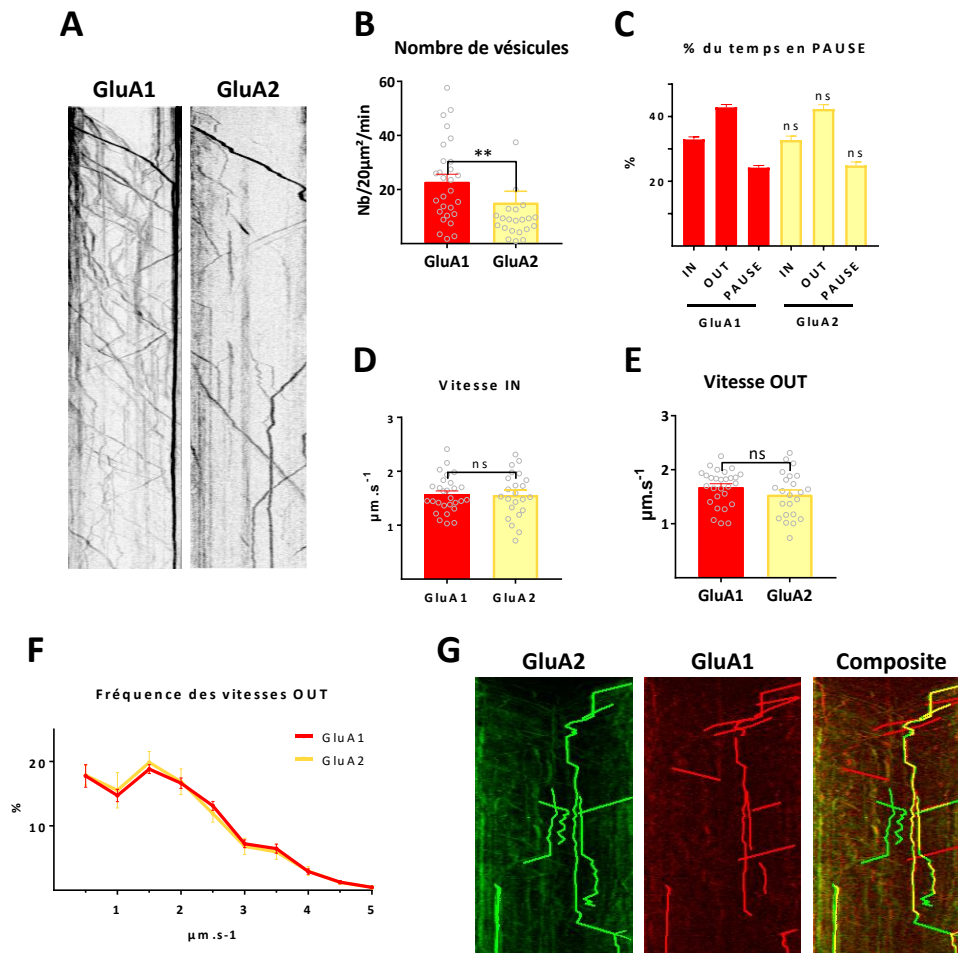
différents modes de transport (% du temps IN : WT=33 +/- 0,7 ; CTA2=32 +/- 0,7 ; p=0,5453 ; OUT : WT=43 +/- 0,8 ; CTA2=44 +/- 0,7 ; p=0,4429 ; PAUSE : WT=23 +/- 0,6 ; CTA2=24 +/- 0,6 ; p<0,3126) (Figure 40E), de vitesses IN ( $\mu\text{m/s}$  : WT=1,62 +/- 0,006 ; CTA2=1,69 +/- 0,005, n=34 ; p=0,348) (Figure 40F) et OUT ( $\mu\text{m/s}$  : WT=1,7 +/- 0,006 ; CTA2=1,78 +/- 0,006 ; p=0,458) (Figure 40G). La distribution de ses fréquences de vitesses OUT est également la même que celle de GluA1 WT (Figure 40H). Le CTD de GluA2 est donc suffisant pour assurer le TI des AMPAR en conditions basales, et ses caractéristiques sont impossibles à distinguer du TI de GluA1 WT.



**Figure 40 : Influence des domaines C-terminaux des récepteurs du glutamate sur le TI basal**

**A-** Schéma du domaine C-terminal de GluA1 et GluA2, représentant les différentes MPT et les différents sites d'interactions protéiques connus. **B-** Tracés manuels des kymographes obtenus à partir des vidéos (1min) du TI de ARIAD-TdTomato-GluA1 WT ou CTA2 réalisées entre 30 et 60 minutes après addition du ligand. **D-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 WT ou CTA2 par 20 $\mu\text{m}^2$  par minute. Les cellules ne présentant aucune vésicule ont été exclues. **E-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **F-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **G-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT. **H-** Fréquence distribution des vitesses OUT.

Cependant, en conditions natives, GluA2 est associé le plus souvent à GluA1<sup>32</sup>. Les hétéromères GluA1/GluA2 ont des propriétés différentes des homomères GluA1 telles que leur perméabilité au Ca<sup>2+</sup> et ne sont pas recrutés à la synapse aux mêmes moments. Nous nous sommes alors intéressé au TI des hétéromères.



**Figure 41 : Transport de GluA2(R) et des hétéromères**

**A-** Tracés manuels des kymographes obtenus à partir des vidéos (1min) du TI de ARIAD-TdTomato-GluA1 WT GluA2 WT réalisées entre 30 et 60 minutes après addition du ligand. **B-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 WT ou GluA2 WT par 20µm<sup>2</sup> par minute. Les cellules ne présentant aucune vésicule ont été exclues. **C-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **D-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **E-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT. **F-** Fréquence distribution des vitesses IN. **G-** Kymographes obtenus à partir de vidéos en deux couleurs simultanées du TI de neurones transfectés avec ARIAD-GFP-GluA2 et ARIAD-TdTomato-GluA1, avec des vésicules tracées manuellement.

Pour commencer nous avons étudié le TI de ARIAD-TdTomato-GluA2 qui peut s'associer avec le GluA1 endogène. GluA2 présente moins de vésicules que GluA1, sans doute expliqué par sa rétention dans le RE (nombre de vésicules/20µm<sup>2</sup>/min : GluA1=22,86 +/- 2,81, n=34 ; GluA2=15,16 +/- 4,22, n=33, N=3 ; p=0,004) (Figure 41B). Le pourcentage du temps que les vésicules contenant GluA2 passent IN, OUT et en PAUSE est le même que

pour GluA1 (% du temps IN : GluA1=33 +/- 0,8 ; GluA2=33 +/- 1 ; p=0,778 ; OUT GluA1=43 +/- 0,8 ; GluA2=43 +/- 1 ; p=0,7715 ; PAUSE : GluA1=24 +/- 0,7 ; GluA2=25 +/- 1 ; p=0,7353) (Figure 41C). Les autres caractéristiques de son TI sont également inchangées ( $\mu\text{m/s}$  : IN : GluA1=1,57 +/- 0,06 ; GluA2=1,56 +/- 0,09; p=0,8585 ; OUT : GluA1=1,68 +/- 0,06 ; GluA2=1,54 +/- 0,09 ; p=0,3604) (Figure 41C-7). Ces résultats semblent en adéquation avec les résultats du mutant CTA2 et hormis la diminution du nombre de vésicules, le TI de GluA2 est impossible à distinguer du TI de GluA1 dans ces conditions.

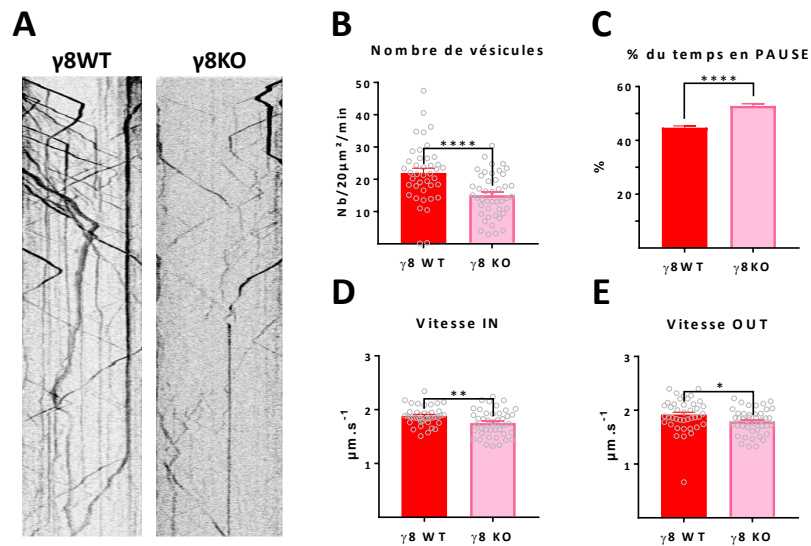
Cependant cette quantification du TI de ARIAD-TdTomato-GluA2 ne permet pas de distinguer la composition des vésicules, qui pourraient contenir des hétéromères GluA1/GluA2, GluA2/GluA3, ou des homomères de GluA2 potentiellement formés par l'accumulation dans le RE. Ces différentes sous-populations de vésicules pourraient être soumises à des régulations différentes. La solution serait d'imager le transport en deux couleurs afin de distinguer la composition des vésicules. Afin de conserver la même résolution temporelle (100ms), nous avons décidé d'acquérir les deux couleurs en simultanément. Pour ce faire, nous avons équipé le microscope spinning-disk d'une seconde caméra EMCCD qui permet d'imager des objets présentant peu de contraste. Cette méthode nous permet d'observer le TI des sous-unités GluA1 et GluA2 simultanément. Les neurones ont été transfectés avec ARIAD-TdTomato-GluA1 et ARIAD-GFP-GluA2 et le TI est acquis entre 30 et 60 minutes après addition du ligand. Ces vidéos et les kymographes qui en découlent nous permettent de distinguer des vésicules contenant des homomères de GluA1 (en rouge), des hétéromères GluA2/GluA3 ou homomères de GluA2 (en vert) et les hétéromères GluA1/GluA2 (en jaune) (Figure 41G). Il pourrait donc s'opérer un certain triage au niveau du TGN et qui donne lieu à différentes sous-populations de vésicules. La quantification de ce TI s'annonce complexe et reste à développer. A terme, cette méthode nous permettra d'étudier le TI de ces sous-populations de vésicules en conditions basales ou après induction de la cLTP, avec l'espoir de distinguer des modulations plus fines.

## 2 – $\gamma 8$ participe au TI des AMPAR

$\gamma 8$  possède un rôle important sur la localisation des AMPAR à la MP<sup>122</sup>. Dans les souris  $\gamma 8$ -KO, seulement 10% des AMPAR sont localisés à la MP par rapport au  $\gamma 8$ -WT et l'expression de la LTP est diminuée. Il a été montré que  $\gamma 8$  est lié aux AMPAR au début de la voie de sécrétion, dès le RE<sup>170</sup> et qu'il les accompagne vraisemblablement jusqu'à la MP.  $\gamma 8$  est donc un candidat potentiel pour les régulations du TI observées par Hangen et al. puisqu'il est nécessaire à l'expression de la LTP et que, comme les AMPAR, il possède un CTD cytosolique disponible pour lier directement ou indirectement des moteurs moléculaires.



Nous avons décidé de caractériser le transport de GluA1 dans des neurones de souris  $\gamma 8$ -KO ou  $\gamma 8$ -WT (Figure 42). Les neurones ont été transfectés avec les constructions ARIAD-TdTomato-GluA1 WT et les vidéos ont été acquises entre 30 et 60 minutes d'incubation dans le ligand. Dans les souris  $\gamma 8$ -KO, le nombre de vésicules est drastiquement réduit par rapport au  $\gamma 8$ -WT (nombre de vésicules/ $20\mu\text{m}^2/\text{min}$  :  $\gamma 8$ -WT=22 +/- 1,44, n=41;  $\gamma 8$ -KO=15,04 +/- 1,02, n=44, N=5 ;  $p<0,0001$ ) (Figure 42A,B), de même pour les vitesses ( $\mu\text{m}/\text{s}$  : IN :  $\gamma 8$ -WT=1,88 +/- 0,03 ;  $\gamma 8$ -KO=1,75 +/- 0,04 ;  $p=0,0074$  ; OUT :  $\gamma 8$ -WT=1,92 +/- 0,05 ;  $\gamma 8$ -KO=1,79 +/- 0,03 ;  $p=0,0109$ ) (Figure 42D, E) alors que le pourcentage du temps passé en PAUSE est augmenté (% du temps :  $\gamma 8$ -WT=45 +/- 0,6 ;  $\gamma 8$ -KO=53 +/- 0,8 ;  $p<0,0001$ ) (Figure 42C). Ces résultats suggèrent que les AMPAR ne seraient pas seuls en charge de leur TI, et que leurs protéines associées, telles que  $\gamma 8$  participent et pourraient réguler le TI.



**Figure 42 : Effet de  $\gamma 8$  sur le TI basal de GluA1**

**A-** Traces automatique réalisées par KB sur des kymographes obtenus à partir des vidéos (1min) du TI de ARIAD-TdTomato-GluA1 WT transfecté dans des neurones d'hippocampe en culture issues de souris  $\gamma 8$ -WT ou  $\gamma 8$ -KO. Les vidéos sont réalisées entre 30 et 60 minutes après addition du ligand. **B-** Nombre moyen de vésicules contenant TdTomato-GluA1 par  $20\mu\text{m}^2$  par minute. Les cellules ne présentant aucune vésicule ont été exclues. **C-** Pourcentage du temps passé en PAUSE. **D-** Mesure de la vitesse moyenne des segments IN. **E-** Mesure de la vitesse moyenne des segments OUT.

# **DISCUSSION**





Lors de cette thèse, la combinaison de l'outil moléculaire ARIAD permettant la rétention des récepteurs néo-synthétisés dans le RE et la vidéo-microscopie nous ont permis de caractériser l'importance du CTD de GluA1 et de GluA2 pour le TI des AMPAR. Ces méthodes nous ont également permis d'identifier des interactions protéiques, nommément SAP97, 4.1N et  $\gamma 8$  participant à ce transport en conditions basales et/ou après induction de plasticité synaptique (cLTP). Les résultats présentés dans cette thèse sont en cours de rédaction pour être soumis à publication. Certaines figures restent encore préliminaires et doivent être répliquées. Les expériences de biochimie visant à confirmer l'interaction entre nos différents mutants et 4.1N ou SAP97, dont les sites d'interaction ont déjà caractérisées dans la littérature<sup>249,415</sup>, sont en cours et n'ont pas pu être intégrées à ce manuscrit.

## **A) Importance du CTD pour le TI des AMPAR néo-synthétisés**

Les récepteurs néo-synthétisés sont d'importants contributeurs de la transmission basale et lors de la LTP<sup>81</sup>. Récemment, l'importance du CTD pour l'expression d'événements de plasticité synaptique tels que la LTP et LTD a été vivement débattu<sup>55,123,124,403</sup>. Compte tenu de l'effet modulateur de mutations ponctuelles du CTD de GluA1 sur son TI, nous voulions caractériser plus précisément l'influence du CTD des AMPAR sur le TI. Pour cela nous avons généré un mutant  $\Delta 78$  ne possédant pas de CTD. Nous n'avons pas détecté ce mutant à la MP, même 120 minutes après l'ajout du ligand. De plus, le nombre de vésicules observé par vidéo-microscopie est presque nul. Cela pourrait signifier que le mutant ne parvient pas sortir du RE ou de l'AG et à être intégré dans des vésicules ou qu'il intègre des vésicules très statiques. En effet, notre séquence d'acquisition débute par le photo-blanchiment d'une portion de dendrite qui pourrait éteindre les vésicules en pause déjà présentes dans la zone. L'immobilité des vésicules rendrait l'arrivée de nouvelles vésicules dans la zone éteinte improbable. Les quelques vésicules contenant  $\Delta 78$  qui ont été observées pourraient résulter de l'association du mutant avec des sous-unités endogènes qui lui permettraient d'être transporté. Cependant, les quelques vésicules contenant le mutant  $\Delta 78$  ont des caractéristiques de transport altérées par rapport au WT, en termes de vitesses notamment, bien que le faible nombre de vésicules nous empêche d'en tirer des conclusions précises. Les caractéristiques du TI du mutant  $\Delta 78$  à part, le CTD apparaît critique pour assurer la formation et/ou permettre le mouvement des vésicules, une observation corroborée par les différentes interactions protéiques influençant le TI et qui seront discutées ci-après.

## **B) Régulation du TI par les protéines cytosoliques**

L'importance de SAP97 sur le transport antérograde de la sous-unité GluA1 a déjà été identifiée<sup>252</sup>. Nos expériences ont permis de confirmer que SAP97 possède un rôle sur la sortie

du RE ou de l'AG<sup>190</sup>. En effet, nos résultats montrent une diminution du nombre de vésicules contenant GluA1 observées après le KD de SAP97. Nous avons également confirmé cette diminution avec le mutant d'interaction  $\Delta 7$  qui a un nombre de vésicules réduit par rapport au WT. Dans ces deux conditions lors desquelles l'interaction avec SAP97 est inhibée, le transport est aussi globalement diminué, autant en termes de vitesses qui sont réduites que du temps passé en pause qui est augmenté.

Après induction de la cLTP, les résultats présentés précédemment restent préliminaires, mais le TI pourrait être légèrement diminué, de manière similaire à l'effet observé en basal. L'effet de SAP97 sur le TI de GluA1 que nous avons observé en conditions basales pourrait donc être maintenu après l'induction.

L'influence de SAP97 sur le TI que nous avons observé pourrait être le fruit de son rôle de protéine adaptatrice, faisant le lien entre GluA1 et le moteur moléculaire MyoVI<sup>250</sup>. En effet, il a été montré que MyoVI et SAP97 sont impliqués dans le transport antérograde des AMPAR, vers la MP<sup>252</sup>. La diminution de la vitesse moyenne observée lorsque l'interaction avec SAP97 est abolie pourrait résulter d'une absence de recrutement de ce moteur. Cette interaction pourrait être responsable d'un transport rapide, qui lorsqu'il est impossible diminue la vitesse moyenne du transport observé. Cela signifierait alors que le moteur moléculaire MyoVI, qui se déplace sur les filaments d'actine, est aussi impliqué dans du transport longue distance dans les dendrites. Il est également possible que SAP97, associé à plusieurs moteurs moléculaires connus tels que KIF1B<sup>347</sup> ou KIF17<sup>236</sup>, assure la liaison entre les AMPAR et un moteur moléculaire qui n'a pas été identifié.

Bien que le mutant  $\Delta 7$  présente des caractéristiques de transport similaires à celles observées lors du KD de SAP97, il est possible que la diminution observée pour le mutant  $\Delta 7$  ne soit pas le fruit de l'interaction avec SAP97. Le site de liaison PDZ de GluA1 permet son interaction avec SAP97<sup>249</sup>, mais il est possible que ce domaine permette l'interaction avec une autre protéine cytosolique. Afin de confirmer l'implication de SAP97 et du moteur MyoVI dans le TI de GluA1 néo-synthétisé que nous observons, il serait intéressant d'exprimer un mutant dominant négatif de MyoVI incapable d'interagir avec les filaments d'actine ou qui ne permet pas la liaison avec SAP97. Dans ces conditions, et si ces deux protéines sont impliquées dans le TI longue distance des AMPAR, les vitesses des vésicules observées devraient être diminuées. La possibilité que les myosines soient responsable d'un transport longue distance ouvre de nouvelles perspectives quant aux moteurs impliqués dans le TI des AMPAR, comme par exemple le moteur MyoVb<sup>247,248</sup>, bien que son interaction avec les AMPAR n'ait pas été caractérisée. Dans ce cas également, l'utilisation d'un mutant dominant négatif pourrait permettre de caractériser son implication dans le TI des récepteurs néo-synthétisés que nous observons.

Nous avons observé que dans des conditions de KD de SAP97 ou lorsque les 7 derniers acides aminés de GluA1 sont tronqués, la présence de GluA1 à la MP est diminuée. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Nash et al.<sup>252</sup> qui montrent que l'utilisation d'un mutant dominant négatif de MyoVI diminue le nombre de clusters de GluA1 à la surface des dendrites d'environ 50%. Compte tenu des caractéristiques de transport observées dans les conditions basales, cette diminution à la MP pourrait résulter de son transport globalement diminué. La présence de  $\Delta 7$  à la MP, déjà diminuée en conditions basales, n'est pas augmentée lors de la cLTP (environ 50% du WT avant et après l'induction). Bien qu'il présentant en moyenne 11,48 vésicules/20 $\mu\text{m}^2$ /min, le mutant  $\Delta 7$  n'est pas recruté lors de la LTP. Les 7 derniers acides aminés de GluA1 et donc potentiellement l'interaction avec SAP97 apparaissent donc critique pour l'augmentation du nombre de récepteurs néo-synthétisés à la MP que nous observons après induction de la cLTP pour le GluA1 WT. Ce résultat pourrait, comme en conditions basales, être le reflet du TI altéré. Il est également possible que ce mutant ne soit pas recruté pour l'exocytose. SAP97 pourrait alors servir au recrutement de la machinerie d'exocytose ou conjointement avec MyoVI, assurer le TI local le long des filaments d'actine qui précède l'exocytose. Lorsque ce transport est impossible, les récepteurs ne peuvent pas être externalisés. L'utilisation du mutant dominant négatif MyoVI pourrait s'avérer utile pour investiguer cette hypothèse. En effet, s'il s'avère qu'il n'influence pas le TI longue distance, l'effet de SAP97 observé sur l'exocytose pourrait alors être dû au transport local qu'il permet.

L'importance de 4.1N sur l'exocytose de GluA1, en particulier lors de la cLTP, est bien caractérisée<sup>145</sup>. Nos expériences ont pu confirmer ces résultats et les transposer aux récepteurs néo-synthétisés. En conditions basales, lorsque la quantité de 4.1N endogène est diminuée à l'aide du sh4.1N, la présence de GluA1 à la MP est diminuée (50% du Scr. à 60min). L'effet est le même lorsque les mutants qui ne permettent pas la liaison avec 4.1N sont étudiés ( $\Delta 4.1N$  : 80% du WT à 60min, AA : 50% du WT à 60min). A l'inverse, le mutant DD, interagissant avec 4.1N, est présent à la MP au même niveau que le WT. La quantité résiduelle des mutants  $\Delta 4.1N$  et AA que nous avons observé à la MP pourrait-être due à leur association avec des sous-unités endogènes qui permettent leur exocytose. L'exocytose de GluA1 lorsque son interaction avec 4.1N est inhibée pourrait également être compensée par un autre mécanisme. 25 minutes après l'induction de la cLTP, on observe un recrutement massif du GluA1 WT à la MP (130% du contrôle). Dans ces conditions, la quantité du mutant AA à la MP est inchangée par rapport aux conditions basales et ne représente que 40% du GluA1 WT. A l'inverse, le mutant DD est localisé à la MP au même niveau que le GluA1 WT après induction de la LTP.

L'interaction de GluA1 avec 4.1N permet également une régulation du TI de GluA1, mais seulement après induction de la cLTP. En conditions basales, lors de l'utilisation du sh4.1N, la légère diminution du nombre de vésicules pourrait indiquer qu'il participe à la translocation du récepteur entre les différents compartiments, peut-être en facilitant la sortie de l'AG. Cette régulation n'est pas retrouvée pour le mutant AA, suggérant que cet effet de 4.1N pourrait être indépendant de cette interaction. Le mutant  $\Delta$ 4.1N présente cependant la même diminution du nombre de vésicules qui pourrait être dû à son CTD plus court, tronqué de 15 acides aminés et qui rend potentiellement les interactions protéiques nécessaires à son export plus difficiles. Cependant les caractéristiques du TI des mutants permettant (DD) ou pas ( $\Delta$ 4.1N, AA) la liaison sont identiques à celles du GluA1 WT. Contrairement à SAP97, en conditions basales, 4.1N ne semble pas être un acteur majeur du TI. En conditions basales, le nombre de GluA1 AA diminué à la MP serait alors dû uniquement à l'effet de 4.1N sur l'exocytose. 25 minutes après l'induction de la cLTP, le mutant AA est transporté dans des vésicules dont la vitesse est réduite par rapport à celles contenant le GluA1 WT. A l'inverse, elles sont légèrement augmentées pour le mutant DD. Cela semble indiquer que 4.1N pourrait être impliqué dans le recrutement de moteurs uniquement lors de la LTP. L'augmentation des vitesses observée pour le GluA1 WT après l'induction<sup>81</sup> pourrait être dû à l'interaction de GluA1 et 4.1N qui est facilitée pendant la LTP. L'absence d'augmentation de la présence du mutant AA à la MP après l'induction de la LTP serait donc le reflet à la fois du rôle de l'interaction avec 4.1N pour l'exocytose et de son rôle sur le TI.

Après l'induction de la cLTP, les mutants AA et DD montrent un nombre de vésicules très diminué par rapport au WT (environ 5 vésicules/20 $\mu$ m<sup>2</sup>/min pour AA et DD contre 15 pour le WT) et très diminué par rapport à leur nombre de vésicules en conditions basales (entre 15-20 vésicules/20 $\mu$ m<sup>2</sup>/min). Le mécanisme qui décroît le nombre de vésicules et donc potentiellement la sortie de l'AG reste à mettre à jour. La palmitoylation de C811 pourrait être responsable de cette régulation. En effet, l'interaction avec 4.1N est complexe et repose sur la dé-palmitoylation de C811 et la phosphorylation de S818 et S816. Nos mutants possèdent un site cystéine WT, pouvant signifier que la palmitoylation initiale est impossible, peut-être à cause de la mauvaise reconnaissance du site par les palmitoyltransférases à cause des mutations 816 et 818. A l'inverse, l'interaction pourrait avoir lieu sans la dé-palmitoylation de la C811, une situation qui à priori ne se produit pas chez le GluA1 WT. C811 pourrait donc être à l'origine de la modulation du nombre de vésicules après l'induction de la cLTP. On sait que la dé-palmitoylation d'une cystéine située sur le TM2 est nécessaire pour l'export de l'AG<sup>35</sup>. Il serait donc intéressant de générer un mutant pour la C811, seul ou en conjonction avec les mutations S816 et S818 afin de voir si l'état dé-palmitoylé constitutif altère la sortie de l'AG. Malgré le peu de vésicules contenant le mutant DD après induction de la cLTP, la

présence à la MP est encore plus importante que celle du WT. Il se pourrait donc soit qu'il y ait plus de récepteurs par vésicules, soit que l'effet de 4.1N sur l'exocytose soit suffisante pour compenser le manque de vésicule et maintenir le nombre important de récepteurs DD à la MP. Une autre hypothèse est que la diminution du nombre de vésicules observée pour le mutant DD après l'induction est causée par une augmentation du nombre de vésicules en pause. Une pause massive est également observée par Hangen et al. lors de l'induction de la LTP et pourrait être corrélée avec l'exocytose des récepteurs. Si les vésicules contenant le mutant DD sont en pause dans ces conditions, cela pourrait expliquer le nombre de récepteurs important localisé à la MP. La visualisation en parallèle du TI et des événements d'exocytose qui sera discutée plus loin pourraient confirmer ou infirmer cette hypothèse.

### **C) Transport des hétéromères GluA1/GluA2**

Dans nos expériences et celles de Hangen et al., l'utilisation du système de rétention ARIAD accumule massivement les sous-unités GluA1 néo-synthétisées dans le RE. Bien que ces conditions favorisent la formation d'homomères GluA1, certaines vésicules pourraient contenir des hétéromères GluA1/GluA2 compte tenu de la plus grande affinité de GluA1 pour GluA2 que pour un autre GluA1<sup>31</sup>. Nos GluA1 étiquetés pourraient s'associer avec le GluA2 endogène. Il pourrait être intéressant de mesurer la proportion du GluA2 endogène dans les vésicules que nous étudions. Cette quantification pourrait être effectuée par biochimie sur des neurones infectés avec ARIAD-TdTomato-GluA1, en réalisant une co-immunoprécipitation des GluA1 néo-synthétisés étiquetés après addition du ligand.

Les hétéromères GluA1/GluA2 sont les plus abondants<sup>32</sup> et leur TI pourrait relever de régulations croisées entre ces deux sous-unités. En effet, celles-ci subissent un recrutement différent, avec GluA1 qui est recruté lors d'événements de plasticité synaptique, alors que GluA2 qui est recruté de manière constitutive<sup>67,150</sup>. En premier lieu, pour étudier la contribution du CTD de GluA2 et afin de nous affranchir de l'influence du CTD de GluA1, nous avons utilisé le mutant CTA2 pour lequel le CTD de GluA1 a été remplacé par celui de GluA2. Cela permet la formation de récepteurs ne contenant que des CTD de GluA2. Le mutant CTA2 possède des caractéristiques de transport identiques à celles du GluA1 WT. Dans nos conditions d'analyses, le CTD de GluA2 s'est avéré suffisant pour assurer le transport des vésicules en conditions basales, de façon identique à celui de GluA1. Cependant, des différences pourraient émerger lors d'événements de plasticité synaptique que nous n'avons, pour l'instant, pas encore étudié. Selon les résultats de Zhou et al., alors que le CTD de GluA1 est nécessaire à l'expression de la LTP, le CTD de GluA2 est nécessaire à l'expression de la LTD<sup>123</sup>. Il serait donc particulièrement intéressant d'étudier le TI du mutant CTA2 après induction de la cLTP, afin de déterminer si/comment son transport est affecté. De plus, il nous

reste également à caractériser le TI des deux sous-unités et leurs régulations lors de la LTD. De même, il pourrait être intéressant de créer des mutants CTA2 dont certaines parties sont tronquées afin d'inhiber les interactions protéiques avec les protéines associées à GluA2, et d'étudier comment le TI d'un tel mutant est affecté en conditions basales ou après l'induction de cLTP ou cLTD. L'interaction la plus intéressante est celle avec GRIP1 dont on sait qu'elle est associée au moteur moléculaire KIF5<sup>239</sup>. Une autre possibilité serait d'étudier le transport après co-transfection d'un shRNA contre GRIP1 et quantifier à quel point le TI de CTA2 que nous observons est tributaire de l'interaction avec GRIP1-KIF5 ou encore d'utiliser un mutant dominant négatif de KIF5.

Afin d'étudier directement le transport des hétéromères, nous avons commencé par caractériser le TI de la sous-unité GluA2 WT qui s'associe supposément avec le GluA1 endogène. Nous avons déterminé que GluA2 WT possède des caractéristiques de transport similaires à GluA1 WT en condition basale. La seule réelle différence observée est le nombre de vésicules qui est diminuée chez GluA2 (R) (60% du WT), dont on sait qu'il est retenu dans le RE<sup>39</sup>. Nous avons mené les mêmes expériences avec le variant Q (data not shown), la version non éditée très minoritaire qui ne subit pas de rétention dans le RE et le nombre de vésicules est restauré au niveau de GluA1 WT. Les vésicules contenant GluA2 possèdent une vitesse moyenne d'environ 1,5µm/s, tout comme celles contenant GluA1 dans nos expériences<sup>81</sup>. Précédemment, des vésicules contenant GluA2 ont été mesurées à des vitesses de 1µm/s<sup>253</sup>, une vitesse proche, mais plus lente que celle que nous avons observé.

Compte tenu de ces résultats et ceux du mutant CTA2, il est possible que les différences du TI entre les sous-unités GluA1 et GluA2 soient trop fines pour émerger lors de nos analyses. A l'aide d'un microscope spinning-disk permettant l'acquisition simultanée de deux couleurs, nous sommes parvenus à imager le transport des sous-unités GluA1 et GluA2 étiquetées respectivement avec TdTomato et GFP. Cette technique nous a permis de mettre à jour trois populations de vésicules, contenant GluA1 ou GluA2 ou les deux à la fois, suggérant un tri entre les AMPAR en fonction de leur composition au niveau du TGN. A terme, l'objectif grâce à cette technique est de déterminer si les vésicules contenant les hétéromères GluA1/GluA2 et les vésicules contenant les homomères GluA1 sont la cible de régulations différentes, visant à les recruter de manière différentielle en fonction des besoins. En distinguant les différentes populations de vésicules dans une même cellule, les variations fines de leurs caractéristiques de transport respectives pourraient apparaître plus précisément. La régulation opérée par les interactions ou MPT décrites précédemment pourrait être différente en fonction de si elle concerne un homomère GluA1 ou un hétéromère GluA1/GluA2.

Nous n'avons pu réaliser que quelques expériences très préliminaires de l'observation du TI en deux couleurs. L'analyse des kymographes deux couleurs générés par cette

technique doit encore être développée. De plus, les vésicules pourraient contenir des quantités variables de GluA1 et GluA2 et pas simplement uniquement GluA1, GluA2 ou les deux à 50-50%. Les vésicules étant associées à plusieurs moteurs à la fois<sup>224</sup>, la proportion de chaque sous-unité dans une vésicule modifiera la probabilité qu'une sous-unité et les moteurs qui lui sont associés dirigent le transport de cette vésicule. Il faudrait alors déterminer les ratios des sous-unités présentes dans la vésicule et déterminer comment, en fonction de ceux-ci, pondérer les caractéristiques de transport que nous obtiendrons.

## **D) Effet des protéines auxiliaires sur le TI des AMPAR**

L'importance des protéines auxiliaires pour le trafic des AMPAR est très documentée<sup>292</sup>. La protéine  $\gamma 8$  en particulier lie les AMPAR dès le RE<sup>170</sup> et est importante pour leur présence à la MP en particulier au niveau des réserves extra-synaptiques<sup>122</sup>. Le rôle de  $\gamma 8$  pourrait donc être d'alimenter les réserves extra-synaptiques lors de la cLTP, un rôle proposé par Hangen et al. pour les récepteurs GluA1 néo-synthétisés transportés lors de la cLTP.

Nous avons déterminé que  $\gamma 8$  est impliqué dans le transport de GluA1, et semble responsable d'un transport rapide comme en atteste la diminution des vitesses des vésicules observées chez les souris  $\gamma 8$ -KO. Les protéines auxiliaires seraient donc des acteurs du TI des AMPAR. Ceci pourrait expliquer les caractéristiques similaires que nous avons observé pour le transport en conditions basales de GluA1 et GluA2. Bien qu'aucun moteur moléculaire ne lui ait été associé jusqu'à présent, il serait intéressant d'exprimer dans des neurones de souris  $\gamma 8$ -KO divers mutants de  $\gamma 8$  tronqués ou mutés sur leur CTD cytoplasmique afin de déterminer s'il existe/quelles sont les séquences nécessaires au TI de GluA1. L'importance de  $\gamma 8$  étant déterminante pendant la cLTP<sup>122</sup>, il serait également intéressant de caractériser le TI de GluA1 en présence/absence de  $\gamma 8$  dans ces conditions. Cependant, les cultures de neurones d'hippocampe de souris KO pour  $\gamma 8$  sont particulièrement fragiles ce qui ne permet pas leur maintien jusqu'à la maturité nécessaire pour les expériences de cLTP. Pour ce faire, nous comptons utiliser un CRISPR pour la protéine  $\gamma 8$  qui est en cours de validation dans le laboratoire. Cela nous permettrait d'étudier le TI dans des neurones qui se sont développées normalement, en présence de  $\gamma 8$ , et de maintenir les neurones en culture jusqu'à leur maturité afin d'induire la cLTP.

L'implication de  $\gamma 8$  dans le TI des AMPAR soulève de nouvelles pistes d'études concernant les régulations que les différentes protéines auxiliaires pourraient opérer sur le TI. Les protéines auxiliaires CNIH2 et SynDIG4 sont abondantes dans les complexes GluA1/GluA2 de l'hippocampe<sup>32</sup> et leur rôle sur le TI mérite d'être investigué. En effet, CNIH2 intègre les mêmes complexes que  $\gamma 8$  et est associé au AMPAR tôt dans la voie de sécrétion



puisque'il participe à la maturation et à la sortie des AMPAR du RE<sup>313</sup>. SynDIG4, bien qu'il soit aussi décelé dans les complexes AMPAR contenant GluA2<sup>32</sup> semble participer spécifiquement au recrutement des homomères de GluA1 à la MP lors d'événements de plasticité synaptique<sup>327,328</sup>.

Le développement de la technique deux couleurs pourrait nous permettre de déterminer la proportion de vésicules transportées contenant à la fois  $\gamma 8$  et GluA1, et ainsi de caractériser plus précisément l'effet de  $\gamma 8$  sur le TI des AMPAR. Cette méthode pourrait également être utilisée pour l'étude d'autres protéines auxiliaires.

La technique développée par Hangen et al. nous a donc permis d'obtenir les premiers résultats concernant la régulation des propriétés du transport vésiculaire des AMPAR par leurs protéines associées. Nos travaux soulignent l'importance du domaine C-terminal, en particulier celui de la sous-unité GluA1, en conditions basales et lors de la LTP. Nos expériences suggèrent que le TI des AMPAR est extrêmement complexe et régulé par de nombreux interacteurs. En effet, le TI de GluA1 est modulé par les protéines cytosoliques 4.1N et SAP97 et la protéine auxiliaire  $\gamma 8$ . Le TI des GluA1 WT néo-synthétisés que nous avons observé est vraisemblablement composé de diverses sous-populations dont le transport est assuré via différents mécanismes. L'hétéromérisation des récepteurs ajoute une complexité supplémentaire et les régulations opérées par les CTD de GluA2 et GluA3 doivent être caractérisés plus précisément. De même l'effet de nombreuses protéines cytosoliques sur le TI restent à caractériser telles que GRIP1 et de nombreuses protéines auxiliaires telles que CNIH2 ou SynDIG4.

Nos résultats soulèvent de nombreuses questions et perspectives de recherche. Les AMPAR pourraient posséder des interacteurs cytosoliques ou membranaires qui n'ont pas encore été identifiés. 4.1N et  $\gamma 8$  pourraient être liés directement ou indirectement à des moteurs moléculaires.

Les AMPAR néo-synthétisés peuvent intégrer la MP sans transiter par l'AG<sup>162</sup>. Des études réalisées par biochimie rapportent que 80% du GluA1 et 40% du GluA2 présent à la MP sont sensible à l'endoH, et présentent donc des motifs de glycosylations immatures, caractéristiques de récepteurs ne transitant pas par l'AG<sup>162</sup>. La nature du TI que nous observons dans nos conditions reste donc à élucider. Des expériences préliminaires qui ont été réalisées dans notre laboratoire ont montré que les constructions ARIAD-GFP-GluA1 présentes à la MP ne possèdent plus les domaines FKBP qui sont clivés par la furine, une protéine enrichie dans l'AG<sup>416,417</sup>. Cela signifierait donc que les vésicules que nous observons suivent la voie de sécrétion classique et transitent par l'AG. Cependant, les récepteurs

pourraient rencontrer la furine dans d'autres compartiments. Dans nos conditions d'expérience, il serait particulièrement intéressant d'étudier le TI des AMPAR après un traitement BFA. La disruption de l'AG pourrait ainsi nous permettre d'identifier une sous-population de vésicules contenant des AMPAR qui court-circuite l'AG, et qui pourrait être soumise à des régulations différentes.

Hangen et al. a montré que les phosphorylations des S831 et S845 du CTD de GluA2 modulent la localisation des AMPAR à la MP (dendrite proximale versus dendrite distale). D'autres MPT ou interactions protéiques en charge de cette régulation pourraient rester à découvrir. Les localisations précises des événements d'exocytose des récepteurs néo-synthétisés sont inconnus. L'utilisation du microscope spinning-disk deux couleurs pourra nous permettre de visualiser simultanément le TI et l'exocytose des récepteurs néo-synthétisés à l'aide de sous-unités AMPAR étiquetées avec TdTomato-SEP, une technique que nous sommes actuellement en train de développer. Cette technique pourrait également nous permettre de vérifier l'hypothèse d'Hangen et al. selon laquelle l'augmentation importante de la pause observée lors de l'influx massif de  $Ca^{2+}$  pendant de l'induction de la cLTP précède l'exocytose massive des récepteurs néo-synthétisés. A terme, ces expériences pourraient également nous permettre de déterminer les zones d'exocytose des récepteurs néo-synthétisés par rapport aux recyclés en conditions basales ou lors de la cLTP, ou encore leur position par rapport aux épines dendritiques.

Le nombre d'AMPAR est très finement régulé et sous-tend les phénomènes tels que l'apprentissage et la mémoire. Les récepteurs néo-synthétisés sont d'importants contributeurs à la transmission synaptique et pour les phénomènes de plasticité. Elucider le TI des AMPAR est alors une étape cruciale pour commencer à comprendre l'équilibre qui existe entre les différentes voies qui permettent la régulation du nombre d'AMPAR à la MP et plus particulièrement à la synapse. Les résultats que nous avons obtenus laissent entrevoir des régulations complexes, mais les techniques que nous avons utilisées peuvent être transposées à de nombreuses nouvelles questions qui pourront améliorer notre compréhension du TI.

## Références

1. Garner, C. C., Zhai, R. G., Gundelfinger, E. D. & Ziv, N. E. Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* **25**, 243–250 (2002).
2. Hamberger, A. C., Chiang, G. H., Nylén, E. S., Scheff, S. W. & Cotman, C. W. Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain Res.* **168**, 513–530 (1979).
3. Ikeda, K. & Bekkers, J. M. Counting the number of releasable synaptic vesicles in a presynaptic terminal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2945–2950 (2009).
4. Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J.-E. & Woolfrey, K. M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* **14**, 285–293 (2011).
5. Lima Caldeira, G., Peça, J. & Carvalho, A. L. New insights on synaptic dysfunction in neuropsychiatric disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* **57**, 62–70 (2019).
6. Basu, S. & Lamprecht, R. The Role of Actin Cytoskeleton in Dendritic Spines in the Maintenance of Long-Term Memory. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, (2018).
7. Sorra, K. E. & Harris, K. M. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* **10**, 501–511 (2000).
8. Carlin, R. K., Grab, D. J., Cohen, R. S. & Siekevitz, P. Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J. Cell Biol.* **86**, 831–845 (1980).
9. Bayés, À. *et al.* Characterization of the proteome, diseases and evolution of the human postsynaptic density. *Nat. Neurosci.* **14**, 19–21 (2011).
10. Chamma, I. & Thoumine, O. Dynamics, nanoscale organization, and function of synaptic adhesion molecules. *Mol. Cell. Neurosci.* **91**, 95–107 (2018).
11. Goncalves, J. *et al.* Nanoscale co-organization and coactivation of AMPAR, NMDAR, and mGluR at excitatory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 14503–14511 (2020).
12. Lee, H.-J. & Zheng, J. J. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun. Signal.* **8**, 8 (2010).
13. Sheng, M. & Hoogenraad, C. C. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 823–847 (2007).
14. Sheng, M. & Kim, E. The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
15. Coley, A. A. & Gao, W.-J. PSD-95 deficiency disrupts PFC-associated function and behavior during neurodevelopment. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
16. Sala, C. *et al.* Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* **31**, 115–130 (2001).
17. Monteiro, P. & Feng, G. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 147–157 (2017).
18. Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B. & Nägerl, U. V. Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat. Neurosci.* **17**, 678–685 (2014).
19. Jedlicka, P., Vlachos, A., Schwarzacher, S. W. & Deller, T. A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behav. Brain Res.* **192**, 12–19 (2008).
20. Niswender, C. M. & Conn, P. J. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 295–322 (2010).

21. Sherman, S. M. The Function of Metabotropic Glutamate Receptors in Thalamus and Cortex. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* **20**, 136–149 (2014).
22. Crupi, R., Impellizzeri, D. & Cuzzocrea, S. Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Neurological Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, (2019).
23. Henley, J. M. & Wilkinson, K. A. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 337–350 (2016).
24. Lu, W. *et al.* Subunit Composition of Synaptic AMPA Receptors Revealed by a Single-Cell Genetic Approach. *Neuron* **62**, 254–268 (2009).
25. Rogers, S. W. *et al.* The characterization and localization of the glutamate receptor subunit GluR1 in the rat brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **11**, 2713–2724 (1991).
26. Schauder, D. M. *et al.* Glutamate receptor desensitization is mediated by changes in quaternary structure of the ligand binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 5921–5926 (2013).
27. Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y. & Malinow, R. Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat. Neurosci.* **3**, 1098–1106 (2000).
28. Schwenk, J. *et al.* Regional Diversity and Developmental Dynamics of the AMPA-Receptor Proteome in the Mammalian Brain. *Neuron* **84**, 41–54 (2014).
29. von Gersdorff, H. & Borst, J. G. G. Short-term plasticity at the calyx of Held. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 53–64 (2002).
30. Pelkey, K. A. *et al.* Pentraxins coordinate excitatory synapse maturation and circuit integration of parvalbumin interneurons. *Neuron* **85**, 1257–1272 (2015).
31. Greger, I. H., Watson, J. F. & Cull-Candy, S. G. Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* **94**, 713–730 (2017).
32. Yu, J. *et al.* Hippocampal AMPA receptor assemblies and mechanism of allosteric inhibition. *Nature* 1–6 (2021) doi:10.1038/s41586-021-03540-0.
33. Zhao, Y., Chen, S., Swensen, A. C., Qian, W.-J. & Gouaux, E. Architecture and subunit arrangement of native AMPA receptors elucidated by cryo-EM. *Science* **364**, 355–362 (2019).
34. Wenthold, R. J., Petralia, R. S., Blahos J, I. I. & Niedzielski, A. S. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **16**, 1982–1989 (1996).
35. Diering, G. H. & Huganir, R. L. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron* **100**, 314–329 (2018).
36. Sommer, B. *et al.* Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* **249**, 1580–1585 (1990).
37. Lomeli, H. *et al.* Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science* **266**, 1709–1713 (1994).
38. Greger, I. H., Akamine, P., Khatri, L. & Ziff, E. B. Developmentally regulated, combinatorial RNA processing modulates AMPA receptor biogenesis. *Neuron* **51**, 85–97 (2006).
39. Greger, I. H., Khatri, L. & Ziff, E. B. RNA Editing at Arg607 Controls AMPA Receptor Exit from the Endoplasmic Reticulum. *Neuron* **34**, 759–772 (2002).
40. Rueter, S. M., Burns, C. M., Coode, S. A., Mookherjee, P. & Emeson, R. B. Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine. *Science* **267**, 1491–1494 (1995).

41. Wright, A. & Vissel, B. The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Front. Mol. Neurosci.* **5**, (2012).
42. Lu, W. & Roche, K. W. Posttranslational regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 470–479 (2012).
43. Hansen, K. B. *et al.* Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* **150**, 1081–1105 (2018).
44. Wolosker, H. D-serine regulation of NMDA receptor activity. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2006**, pe41 (2006).
45. Mayer, M. L., Westbrook, G. L. & Guthrie, P. B. Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* **309**, 261–263 (1984).
46. Perrais, D., Veran, J. & Mulle, C. Gating and permeation of kainate receptors: differences unveiled. *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 516–522 (2010).
47. Chittajallu, R. *et al.* Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* **379**, 78–81 (1996).
48. Rodríguez-Moreno, A. & Lerma, J. Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron* **20**, 1211–1218 (1998).
49. Castillo, P. E., Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* **388**, 182–186 (1997).
50. Rivera, R., Rozas, J. L. & Lerma, J. PKC-dependent autoregulation of membrane kainate receptors. *EMBO J.* **26**, 4359–4367 (2007).
51. Valbuena, S. & Lerma, J. Kainate Receptors, Homeostatic Gatekeepers of Synaptic Plasticity. *Neuroscience* (2019) doi:10.1016/j.neuroscience.2019.11.050.
52. Petrovic, M. M. *et al.* Metabotropic action of postsynaptic kainate receptors triggers hippocampal long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* **20**, 529–539 (2017).
53. Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* **130**, 1007S–15S (2000).
54. Siddoway, B., Hou, H. & Xia, H. Glutamatergic Synapses: Molecular Organisation. in *eLS* (American Cancer Society, 2011). doi:10.1002/9780470015902.a0000235.pub2.
55. Granger, A. J., Shi, Y., Lu, W., Cerpas, M. & Nicoll, R. A. LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type. *Nature* **493**, 495–500 (2013).
56. Holtmaat, A. & Svoboda, K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 647–658 (2009).
57. Hebb, D. The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory. *undefined* (1949).
58. Dudek, S. M. & Bear, M. F. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4363–4367 (1992).
59. Mulkey, R. M. & Malenka, R. C. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **9**, 967–975 (1992).
60. Bliss, T. V. & Gardner-Medwin, A. R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **232**, 357–374 (1973).
61. Bliss, T. V. & Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **232**, 331–356 (1973).

62. Pastalkova, E. *et al.* Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* **313**, 1141–1144 (2006).
63. Bortolotto, Z. A. *et al.* Kainate receptors are involved in synaptic plasticity. *Nature* **402**, 297–301 (1999).
64. Vissel, B. *et al.* The role of RNA editing of kainate receptors in synaptic plasticity and seizures. *Neuron* **29**, 217–227 (2001).
65. Bortolotto, Z. A., Bashir, Z. I., Davies, C. H. & Collingridge, G. L. A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation. *Nature* **368**, 740–743 (1994).
66. Wallis, J. L. *et al.* An interchangeable role for kainate and metabotropic glutamate receptors in the induction of rat hippocampal mossy fiber long-term potentiation in vivo. *Hippocampus* **25**, 1407–1417 (2015).
67. Cull-Candy, S., Kelly, L. & Farrant, M. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 288–297 (2006).
68. Ascher, P. & Nowak, L. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J. Physiol.* **399**, 247–266 (1988).
69. MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J. & Barker, J. L. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* **321**, 519–522 (1986).
70. Larkum, M. E., Zhu, J. J. & Sakmann, B. Dendritic mechanisms underlying the coupling of the dendritic with the axonal action potential initiation zone of adult rat layer 5 pyramidal neurons. *J. Physiol.* **533**, 447–466 (2001).
71. Giese, K. P., Fedorov, N. B., Filipkowski, R. K. & Silva, A. J. Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* **279**, 870–873 (1998).
72. Brecht, D. S. & Nicoll, R. A. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* **40**, 361–379 (2003).
73. Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L. C. & Soderling, T. R. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* **276**, 2042–2045 (1997).
74. Mammen, A. L., Kameyama, K., Roche, K. W. & Huganir, R. L. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J. Biol. Chem.* **272**, 32528–32533 (1997).
75. Benke, T. A., Lüthi, A., Isaac, J. T. & Collingridge, G. L. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* **393**, 793–797 (1998).
76. Hayashi, Y. *et al.* Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* **287**, 2262–2267 (2000).
77. Bailey, C. H., Kandel, E. R. & Harris, K. M. Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, (2015).
78. Yuste, R. & Bonhoeffer, T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1071–1089 (2001).
79. Kwon, H.-B. & Sabatini, B. L. Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature* **474**, 100–104 (2011).
80. Granger, A. J. & Nicoll, R. A. Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view, 10 years on. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369**, 20130136 (2014).

81. Hangen, E., Cordelières, F. P., Petersen, J. D., Choquet, D. & Coussen, F. Neuronal Activity and Intracellular Calcium Levels Regulate Intracellular Transport of Newly Synthesized AMPAR. *Cell Rep.* **24**, 1001-1012.e3 (2018).
82. Bramham, C. R. Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**, 524–531 (2008).
83. Stanton, P. K. & Sejnowski, T. J. Associative long-term depression in the hippocampus induced by hebbian covariance. *Nature* **339**, 215–218 (1989).
84. Hou, L. & Klann, E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 6352–6361 (2004).
85. Cummings, J. A., Mulkey, R. M., Nicoll, R. A. & Malenka, R. C. Ca<sup>2+</sup> signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron* **16**, 825–833 (1996).
86. Kameyama, K., Lee, H. K., Bear, M. F. & Huganir, R. L. Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression. *Neuron* **21**, 1163–1175 (1998).
87. Lee, H. K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M. F. & Huganir, R. L. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* **405**, 955–959 (2000).
88. Nägerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B. & Bonhoeffer, T. Bidirectional Activity-Dependent Morphological Plasticity in Hippocampal Neurons. *Neuron* **44**, 759–767 (2004).
89. Banke, T. G. *et al.* Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 89–102 (2000).
90. Ehlers, M. D. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* **28**, 511–525 (2000).
91. Lee, H.-K. *et al.* Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* **112**, 631–643 (2003).
92. Palmer, C. L., Cotton, L. & Henley, J. M. The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol. Rev.* **57**, 253–277 (2005).
93. Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C. & Nelson, S. B. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* **391**, 892–896 (1998).
94. Abbott, L. F. & Nelson, S. B. Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat. Neurosci.* **3 Suppl**, 1178–1183 (2000).
95. Styr, B. & Slutsky, I. Imbalance between Firing Homeostasis and Synaptic Plasticity Drives Early-Phase Alzheimer’s Disease. *Nat. Neurosci.* **21**, 463–473 (2018).
96. Wondolowski, J. & Dickman, D. Emerging links between homeostatic synaptic plasticity and neurological disease. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, (2013).
97. Lee, H.-K. & Kirkwood, A. Mechanisms of Homeostatic Synaptic Plasticity in vivo. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, (2019).
98. Wang, G., Gilbert, J. & Man, H.-Y. AMPA Receptor Trafficking in Homeostatic Synaptic Plasticity: Functional Molecules and Signaling Cascades. *Neural Plast.* **2012**, (2012).
99. Borgdorff, A. J. & Choquet, D. Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* **417**, 649–653 (2002).
100. Matsuzaki, M. *et al.* Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* **4**, 1086–1092 (2001).

101. Choquet, D. & Triller, A. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 251–265 (2003).
102. Tardin, C., Cognet, L., Bats, C., Lounis, B. & Choquet, D. Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *EMBO J.* **22**, 4656–4665 (2003).
103. Heine, M. *et al.* Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* **320**, 201–205 (2008).
104. Nair, D. *et al.* Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 13204–13224 (2013).
105. Fukata, Y. *et al.* Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *J. Cell Biol.* **202**, 145–161 (2013).
106. MacGillavry, H. D., Song, Y., Raghavachari, S. & Blanpied, T. A. Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic AMPA receptors. *Neuron* **78**, 615–622 (2013).
107. Opazo, P. & Choquet, D. A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* **46**, 1–8 (2011).
108. Opazo, P., Sainlos, M. & Choquet, D. Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 453–460 (2012).
109. Tang, A.-H. *et al.* A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature* **536**, 210–214 (2016).
110. Choquet, D. & Triller, A. The Dynamic Synapse. *Neuron* **80**, 691–703 (2013).
111. Bats, C., Groc, L. & Choquet, D. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* **53**, 719–734 (2007).
112. Tomita, S., Stein, V., Stocker, T. J., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs. *Neuron* **45**, 269–277 (2005).
113. Opazo, P. *et al.* CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron* **67**, 239–252 (2010).
114. Sumioka, A., Yan, D. & Tomita, S. TARP phosphorylation regulates synaptic AMPA receptors through lipid bilayers. *Neuron* **66**, 755–767 (2010).
115. Hafner, A.-S. *et al.* Lengthening of the Stargazin Cytoplasmic Tail Increases Synaptic Transmission by Promoting Interaction to Deeper Domains of PSD-95. *Neuron* **86**, 475–489 (2015).
116. Constals, A. *et al.* Glutamate-induced AMPA receptor desensitization increases their mobility and modulates short-term plasticity through unbinding from Stargazin. *Neuron* **85**, 787–803 (2015).
117. Compans, B., Choquet, D. & Hosy, E. Review on the role of AMPA receptor nano-organization and dynamic in the properties of synaptic transmission. *Neurophotonics* **3**, 041811 (2016).
118. Klaassen, R. V. *et al.* Shisa6 traps AMPA receptors at postsynaptic sites and prevents their desensitization during synaptic activity. *Nat. Commun.* **7**, 10682 (2016).
119. Bats, C., Soto, D., Studniarczyk, D., Farrant, M. & Cull-Candy, S. G. Channel properties reveal differential expression of TARPed and TARPless AMPARs in stargazer neurons. *Nat. Neurosci.* **15**, 853–861 (2012).
120. Kato, A. S. *et al.* New Transmembrane AMPA Receptor Regulatory Protein Isoform,  $\gamma$ -7, Differentially Regulates AMPA Receptors. *J. Neurosci.* **27**, 4969–4977 (2007).



121. Sumioka, A. *et al.* PDZ binding of TARPy-8 controls synaptic transmission but not synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* **14**, 1410–1412 (2011).
122. Rouach, N. *et al.* TARP  $\gamma$ -8 controls hippocampal AMPA receptor number, distribution and synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* **8**, 1525–1533 (2005).
123. Zhou, Z. *et al.* The C-terminal tails of endogenous GluA1 and GluA2 differentially contribute to hippocampal synaptic plasticity and learning. *Nat. Neurosci.* **21**, 50–62 (2018).
124. Díaz-Alonso, J. *et al.* Long-term potentiation is independent of the C-tail of the GluA1 AMPA receptor subunit. *eLife* **9**, e58042 (2020).
125. Kennedy, M. J. & Ehlers, M. D. Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 325–362 (2006).
126. Kwart, D. *et al.* A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP  $\beta$ -CTFs, Not A $\beta$ . *Neuron* **104**, 256-270.e5 (2019).
127. Blanpied, T. A., Scott, D. B. & Ehlers, M. D. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* **36**, 435–449 (2002).
128. Lasiecka, Z. M. & Winckler, B. Mechanisms of polarized membrane trafficking in neurons -- focusing in on endosomes. *Mol. Cell. Neurosci.* **48**, 278–287 (2011).
129. Maxfield, F. R. & McGraw, T. E. Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 121–132 (2004).
130. Kirchhausen, T. Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 699–727 (2000).
131. Glebov, O. O., Tigaret, C. M., Mellor, J. R. & Henley, J. M. Clathrin-independent trafficking of AMPA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **35**, 4830–4836 (2015).
132. Hanley, J. G. The Regulation of AMPA Receptor Endocytosis by Dynamic Protein-Protein Interactions. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, (2018).
133. Grant, B. D. & Donaldson, J. G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 597–608 (2009).
134. Yap, C. C. & Winckler, B. Harnessing the power of the endosome to regulate neural development. *Neuron* **74**, 440–451 (2012).
135. Schmidt, M. R. & Haucke, V. Recycling endosomes in neuronal membrane traffic. *Biol. Cell* **99**, 333–342 (2007).
136. Bakr, M. Role of vSNAREs in post-synaptic AMPAR trafficking, glutamatergic transmission and plasticity. (Bordeaux, 2020).
137. Ungar, D. & Hughson, F. M. SNARE protein structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 493–517 (2003).
138. Wang, T., Li, L. & Hong, W. SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic* **18**, 767–775 (2017).
139. Han, J., Pluhackova, K. & Böckmann, R. A. The Multifaceted Role of SNARE Proteins in Membrane Fusion. *Front. Physiol.* **8**, (2017).
140. Scales, S. J. *et al.* SNAREs contribute to the specificity of membrane fusion. *Neuron* **26**, 457–464 (2000).
141. Fasshauer, D., Eliason, W. K., Brünger, A. T. & Jahn, R. Identification of a Minimal Core of the Synaptic SNARE Complex Sufficient for Reversible Assembly and Disassembly. *Biochemistry* **37**, 10354–10362 (1998).
142. Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. & Brunger, A. T. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347–353 (1998).

143. Lledo, P. M., Zhang, X., Südhof, T. C., Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. *Science* **279**, 399–403 (1998).
144. Yudowski, G. A. *et al.* Real-Time Imaging of Discrete Exocytic Events Mediating Surface Delivery of AMPA Receptors. *J. Neurosci.* **27**, 11112–11121 (2007).
145. Lin, D.-T. *et al.* Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nat. Neurosci.* **12**, 879–887 (2009).
146. Kennedy, M. J., Davison, I. G., Robinson, C. G. & Ehlers, M. D. Syntaxin-4 Defines a Domain for Activity-Dependent Exocytosis in Dendritic Spines. *Cell* **141**, 524–535 (2010).
147. Patterson, M. A., Szatmari, E. M. & Yasuda, R. AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK–dependent manner during long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15951–15956 (2010).
148. Makino, H. & Malinow, R. AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron* **64**, 381–390 (2009).
149. Tanaka, H. & Hirano, T. Visualization of subunit-specific delivery of glutamate receptors to postsynaptic membrane during hippocampal long-term potentiation. *Cell Rep.* **1**, 291–298 (2012).
150. Araki, Y., Lin, D.-T. & Huganir, R. L. Plasma membrane insertion of the AMPA receptor GluA2 subunit is regulated by NSF binding and Q/R editing of the ion pore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 11080–11085 (2010).
151. Sanderson, J. L., Gorski, J. A. & Dell’Acqua, M. L. NMDA receptor-dependent LTD requires transient synaptic incorporation of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors mediated by AKAP150-anchored PKA and calcineurin. *Neuron* **89**, 1000–1015 (2016).
152. Penn, A. C. *et al.* Hippocampal LTP and contextual learning require surface diffusion of AMPA receptors. *Nature* **549**, 384–388 (2017).
153. Choquet, D. Linking Nanoscale Dynamics of AMPA Receptor Organization to Plasticity of Excitatory Synapses and Learning. *J. Neurosci.* **38**, 9318–9329 (2018).
154. He, K. *et al.* Stabilization of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors at perisynaptic sites by GluR1-S845 phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 20033–20038 (2009).
155. Plant, K. *et al.* Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nat. Neurosci.* **9**, 602–604 (2006).
156. Guire, E. S., Oh, M. C., Soderling, T. R. & Derkach, V. A. Recruitment of Calcium-Permeable AMPA Receptors during Synaptic Potentiation Is Regulated by CaM-Kinase I. *J. Neurosci.* **28**, 6000–6009 (2008).
157. Yang, Y., Wang, X. & Zhou, Q. Perisynaptic GluR2-lacking AMPA receptors control the reversibility of synaptic and spines modifications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 11999–12004 (2010).
158. Conservation of Glutamate Receptor 2-Containing AMPA Receptors during Long-Term Potentiation | Journal of Neuroscience. <https://www.jneurosci.org/content/27/17/4598>.
159. Gray, E. E., Fink, A. E., Sariñana, J., Vissel, B. & O’Dell, T. J. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region does not require insertion and activation of GluR2-lacking AMPA receptors. *J. Neurophysiol.* **98**, 2488–2492 (2007).
160. Shi, S.-H., Hayashi, Y., Esteban, J. A. & Malinow, R. Subunit-Specific Rules Governing AMPA Receptor Trafficking to Synapses in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Cell* **105**, 331–343 (2001).
161. Park, M., Penick, E. C., Edwards, J. G., Kauer, J. A. & Ehlers, M. D. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* **305**, 1972–1975 (2004).

162. Bowen, A. B., Bourke, A. M., Hiester, B. G., Hanus, C. & Kennedy, M. J. Golgi-independent secretory trafficking through recycling endosomes in neuronal dendrites and spines. *eLife* **6**, e27362 (2017).
163. Schwarz, D. S. & Blower, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 79–94 (2016).
164. Winder, D. G. *et al.* ERK plays a regulatory role in induction of LTP by theta frequency stimulation and its modulation by beta-adrenergic receptors. *Neuron* **24**, 715–726 (1999).
165. Ju, W. *et al.* Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat. Neurosci.* **7**, 244–253 (2004).
166. A, N., Dj, Z., R, L., Nr, Z. & Md, B. Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis. *Nature* **394**, (1998).
167. Stanton, P. & Sarvey, J. Blockade of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region by inhibitors of protein synthesis. *J. Neurosci.* **4**, 3080–3088 (1984).
168. Mameli, M., Balland, B., Luján, R. & Lüscher, C. Rapid Synthesis and Synaptic Insertion of GluR2 for mGluR-LTD in the Ventral Tegmental Area. *Science* **317**, 530–533 (2007).
169. Brechet, A. *et al.* AMPA-receptor specific biogenesis complexes control synaptic transmission and intellectual ability. *Nat. Commun.* **8**, 15910 (2017).
170. Schwenk, J. *et al.* An ER Assembly Line of AMPA-Receptors Controls Excitatory Neurotransmission and Its Plasticity. *Neuron* **104**, 680-692.e9 (2019).
171. Wu, X. & Rapoport, T. A. Mechanistic insights into ER-associated protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **53**, 22–28 (2018).
172. Ayalon, G. & Stern-Bach, Y. Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* **31**, 103–113 (2001).
173. Kennedy, M. J. & Hanus, C. Architecture and Dynamics of the Neuronal Secretory Network. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **35**, 543–566 (2019).
174. Zielinska, D. F., Gnad, F., Wiśniewski, J. R. & Mann, M. Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. *Cell* **141**, 897–907 (2010).
175. Scott, H. & Panin, V. M. The role of protein N-glycosylation in neural transmission. *Glycobiology* **24**, 407–417 (2014).
176. Hanson, S. R. *et al.* The core trisaccharide of an N-linked glycoprotein intrinsically accelerates folding and enhances stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 3131–3136 (2009).
177. Breitling, J. & Aebi, M. N-Linked Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
178. Kandel, M. B. *et al.* N-glycosylation of the AMPA-type glutamate receptor regulates cell surface expression and tetramer formation affecting channel function. *J. Neurochem.* **147**, 730–747 (2018).
179. Möykkynen, T., Coleman, S. K., Semenov, A. & Keinänen, K. The N-terminal domain modulates  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **289**, 13197–13205 (2014).
180. Morise, J. *et al.* Distinct Cell Surface Expression Patterns of N-Glycosylation Site Mutants of AMPA-Type Glutamate Receptor under the Homo-Oligomeric Expression Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
181. Yamamoto, S. *et al.* Mice Deficient in Nervous System-specific Carbohydrate Epitope HNK-1 Exhibit Impaired Synaptic Plasticity and Spatial Learning \*. *J. Biol. Chem.* **277**, 27227–27231 (2002).

182. Takeuchi, Y., Morise, J., Morita, I., Takematsu, H. & Oka, S. Role of Site-Specific N-Glycans Expressed on GluA2 in the Regulation of Cell Surface Expression of AMPA-Type Glutamate Receptors. *PLOS ONE* **10**, e0135644 (2015).
183. Grunwald, M. E. & Kaplan, J. M. Mutations in the ligand-binding and pore domains control exit of glutamate receptors from the endoplasmic reticulum in *C. elegans*. *Neuropharmacology* **45**, 768–776 (2003).
184. Guerriero, C. J. & Brodsky, J. L. The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol. Rev.* **92**, 537–576 (2012).
185. Hetz, C., Zhang, K. & Kaufman, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 421–438 (2020).
186. Vandenberghe, W., Nicoll, R. A. & Bredt, D. S. Interaction with the Unfolded Protein Response Reveals a Role for Stargazin in Biosynthetic AMPA Receptor Transport. *J. Neurosci.* **25**, 1095–1102 (2005).
187. Coleman, S. K. *et al.* Isoform-Specific Early Trafficking of AMPA Receptor Flip and Flop Variants. *J. Neurosci.* **26**, 11220–11229 (2006).
188. Lu, W., Khatri, L. & Ziff, E. B. Trafficking of  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptor (AMPA) Receptor Subunit GluA2 from the Endoplasmic Reticulum Is Stimulated by a Complex Containing  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-activated Kinase II (CaMKII) and PICK1 Protein and by Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from Internal Stores. *J. Biol. Chem.* **289**, 19218–19230 (2014).
189. Sans, N. *et al.* Aberrant Formation of Glutamate Receptor Complexes in Hippocampal Neurons of Mice Lacking the GluR2 AMPA Receptor Subunit. *J. Neurosci.* **23**, 9367–9373 (2003).
190. Sans, N. *et al.* Synapse-Associated Protein 97 Selectively Associates with a Subset of AMPA Receptors Early in their Biosynthetic Pathway. 11.
191. Peotter, J., Kasberg, W., Pustova, I. & Audhya, A. COPII-mediated trafficking at the ER/ERGIC interface. *Traffic Cph. Den.* **20**, 491–503 (2019).
192. Saraste, J. & Marie, M. Intermediate compartment (IC): from pre-Golgi vacuoles to a semi-autonomous membrane system. *Histochem. Cell Biol.* **150**, 407–430 (2018).
193. Tan, J. Z. A. & Gleeson, P. A. Cargo Sorting at the trans-Golgi Network for Shunting into Specific Transport Routes: Role of Arf Small G Proteins and Adaptor Complexes. *Cells* **8**, (2019).
194. Tucholski, J., Pinner, A. L., Simmons, M. S. & Meador-Woodruff, J. H. Evolutionarily Conserved Pattern of AMPA Receptor Subunit Glycosylation in Mammalian Frontal Cortex. *PLOS ONE* **9**, e94255 (2014).
195. Sohn, H. & Park, M. Palmitoylation-mediated synaptic regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Arch. Pharm. Res.* **42**, 426–435 (2019).
196. Hayashi, T., Rumbaugh, G. & Huganir, R. L. Differential Regulation of AMPA Receptor Subunit Trafficking by Palmitoylation of Two Distinct Sites. *Neuron* **47**, 709–723 (2005).
197. Ye, B. *et al.* Growing dendrites and axons differ in their reliance on the secretory pathway. *Cell* **130**, 717–729 (2007).
198. Gu, Y. *et al.* Differential vesicular sorting of AMPA and GABAA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E922–E931 (2016).
199. Cuadra, A. E., Kuo, S.-H., Kawasaki, Y., Bredt, D. S. & Chetkovich, D. M. AMPA Receptor Synaptic Targeting Regulated by Stargazin Interactions with the Golgi-Resident PDZ Protein nPIST. *J. Neurosci.* **24**, 7491–7502 (2004).

200. Hémar, A., Olivo, J.-C., Williamson, E., Saffrich, R. & Dotti, C. G. Dendroaxonal Transcytosis of Transferrin in Cultured Hippocampal and Sympathetic Neurons. *J. Neurosci.* **17**, 9026–9034 (1997).
201. de Hoop, M. *et al.* Intracellular routing of wild-type and mutated polymeric immunoglobulin receptor in hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* **130**, 1447–1459 (1995).
202. Rind, H. B., Butowt, R. & von Bartheld, C. S. Synaptic Targeting of Retrogradely Transported Trophic Factors in Motoneurons: Comparison of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor, and Cardiotrophin-1 with Tetanus Toxin. *J. Neurosci.* **25**, 539–549 (2005).
203. Gumy, L. F. & Hoogenraad, C. C. Local mechanisms regulating selective cargo entry and long-range trafficking in axons. *Curr. Opin. Neurobiol.* **51**, 23–28 (2018).
204. Jareb, M. & Banker, G. The Polarized Sorting of Membrane Proteins Expressed in Cultured Hippocampal Neurons Using Viral Vectors. *Neuron* **20**, 855–867 (1998).
205. West, A. E., Neve, R. L. & Buckley, K. M. Identification of a Somatodendritic Targeting Signal in the Cytoplasmic Domain of the Transferrin Receptor. *J. Neurosci.* **17**, 6038–6047 (1997).
206. Rivera, J. F., Ahmad, S., Quick, M. W., Liman, E. R. & Arnold, D. B. An evolutionarily conserved dileucine motif in Shal K<sup>+</sup> channels mediates dendritic targeting. *Nat. Neurosci.* **6**, 243–250 (2003).
207. Poyatos, I. *et al.* Polarized Distribution of Glycine Transporter Isoforms in Epithelial and Neuronal Cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **15**, 99–111 (2000).
208. Xu, J., Zhu, Y. & Heinemann, S. F. Identification of Sequence Motifs That Target Neuronal Nicotinic Receptors to Dendrites and Axons. *J. Neurosci.* **26**, 9780–9793 (2006).
209. Carrel, D., Hamon, M. & Darmon, M. Role of the C-terminal di-leucine motif of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in plasma membrane targeting. *J. Cell Sci.* **119**, 4276–4284 (2006).
210. Ruberti, F. & Dotti, C. G. Involvement of the proximal C terminus of the AMPA receptor subunit GluR1 in dendritic sorting. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, RC78 (2000).
211. Baas, P. W., Rao, A. N., Matamoros, A. J. & Leo, L. Stability properties of neuronal microtubules. *Cytoskelet. Hoboken NJ* **73**, 442–460 (2016).
212. Hu, X., Viesselmann, C., Nam, S., Merriam, E. & Dent, E. W. Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 13094–13105 (2008).
213. Jaworski, J. *et al.* Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* **61**, 85–100 (2009).
214. Park, J. H. & Roll-Mecak, A. The tubulin code in neuronal polarity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **51**, 95–102 (2018).
215. Karasmanis, E. P. *et al.* Polarity of Neuronal Membrane Traffic Requires Sorting of Kinesin Motor Cargo during Entry into Dendrites by a Microtubule-Associated Septin. *Dev. Cell* **46**, 204–218.e7 (2018).
216. Spence, E. F. & Soderling, S. H. Actin Out: Regulation of the Synaptic Cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **290**, 28613–28622 (2015).
217. Lavoie-Cardinal, F. *et al.* Neuronal activity remodels the F-actin based submembrane lattice in dendrites but not axons of hippocampal neurons. *Sci. Rep.* **10**, 11960 (2020).
218. Xu, K., Babcock, H. P. & Zhuang, X. Dual-objective STORM reveals three-dimensional

- filament organization in the actin cytoskeleton. *Nat. Methods* **9**, 185–188 (2012).
219. Woolner, S. & Bement, W. M. Unconventional myosins acting unconventionally. *Trends Cell Biol.* **19**, 245–252 (2009).
220. Hirokawa, N. & Tanaka, Y. Kinesin superfamily proteins (KIFs): Various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases. *Exp. Cell Res.* **334**, 16–25 (2015).
221. Fili, N. & Toseland, C. P. Unconventional Myosins: How Regulation Meets Function. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2019).
222. Reck-Peterson, S. L., Redwine, W. B., Vale, R. D. & Carter, A. P. The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 382–398 (2018).
223. Hartman, M. A., Finan, D., Sivaramakrishnan, S. & Spudich, J. A. Principles of Unconventional Myosin Function and Targeting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 133–155 (2011).
224. Kaplan, L., Ierokomos, A., Chowdary, P., Bryant, Z. & Cui, B. Rotation of endosomes demonstrates coordination of molecular motors during axonal transport. *Sci. Adv.* **4**, e1602170 (2018).
225. Kevenaar, J. T. *et al.* Kinesin-Binding Protein Controls Microtubule Dynamics and Cargo Trafficking by Regulating Kinesin Motor Activity. *Curr. Biol.* **26**, 849–861 (2016).
226. Gumy, L. F. *et al.* MAP2 Defines a Pre-axonal Filtering Zone to Regulate KIF1- versus KIF5-Dependent Cargo Transport in Sensory Neurons. *Neuron* **94**, 347–362.e7 (2017).
227. Hoerndli, F. J. *et al.* Neuronal Activity and CaMKII Regulate Kinesin-Mediated Transport of Synaptic AMPARs. *Neuron* **86**, 457–474 (2015).
228. Yin, X., Feng, X., Takei, Y. & Hirokawa, N. Regulation of NMDA Receptor Transport: A KIF17–Cargo Binding/Releasing Underlies Synaptic Plasticity and Memory In Vivo. *J. Neurosci.* **32**, 5486–5499 (2012).
229. Guillaud, L., Wong, R. & Hirokawa, N. Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: a molecular model of kinesin-cargo release. *Nat. Cell Biol.* **10**, 19–29 (2008).
230. Hanus, C. *et al.* Synaptic Control of Secretory Trafficking in Dendrites. *Cell Rep.* **7**, 1771–1778 (2014).
231. Batters, C., Brack, D., Ellrich, H., Averbek, B. & Veigel, C. Calcium can mobilize and activate myosin-VI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1162–E1169 (2016).
232. Yoshimura, M. *et al.* Dual regulation of mammalian myosin VI motor function. *J. Biol. Chem.* **276**, 39600–39607 (2001).
233. Morris, C. A. *et al.* Calcium functionally uncouples the heads of myosin VI. *J. Biol. Chem.* **278**, 23324–23330 (2003).
234. Raynaud, F. *et al.* SNAP23–Kif5 complex controls mGlu1 receptor trafficking. *J. Mol. Cell Biol.* **10**, 423–436 (2018).
235. Wong, R. W.-C., Setou, M., Teng, J., Takei, Y. & Hirokawa, N. Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 14500–14505 (2002).
236. Jeyifous, O. *et al.* SAP97 and CASK mediate sorting of NMDA receptors through a previously unknown secretory pathway. *Nat. Neurosci.* **12**, 1011–1019 (2009).
237. Kim, C.-H. & Lisman, J. E. A Labile Component of AMPA Receptor-Mediated Synaptic Transmission Is Dependent on Microtubule Motors, Actin, and N-Ethylmaleimide-Sensitive

- Factor. *J. Neurosci.* **21**, 4188–4194 (2001).
238. Wang, N. & Xu, J. Functions of Kinesin Superfamily Proteins in Neuroreceptor Trafficking. *BioMed Res. Int.* **2015**, 1–8 (2015).
239. Setou, M. *et al.* Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* **417**, 83–87 (2002).
240. Heisler, F. F. *et al.* GRIP1 interlinks N-cadherin and AMPA receptors at vesicles to promote combined cargo transport into dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 5030–5035 (2014).
241. Hoerndli, F. J. *et al.* Kinesin-1 Regulates Synaptic Strength by Mediating the Delivery, Removal, and Redistribution of AMPA Receptors. *Neuron* **80**, 1421–1437 (2013).
242. Lv, K. *et al.* Trip6 promotes dendritic morphogenesis through dephosphorylated GRIP1-dependent myosin VI and F-actin organization. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **35**, 2559–2571 (2015).
243. Monteiro, M. I. *et al.* The kinesin-3 family motor KLP-4 regulates anterograde trafficking of GLR-1 glutamate receptors in the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **23**, 3647–3662 (2012).
244. Gutiérrez, Y. *et al.* KIF13A drives AMPA receptor synaptic delivery for long-term potentiation via endosomal remodeling. *J. Cell Biol.* **220**, e202003183 (2021).
245. Wyszynski, M. *et al.* Interaction between GRIP and liprin-alpha/SYD2 is required for AMPA receptor targeting. *Neuron* **34**, 39–52 (2002).
246. Shin, H. *et al.* Association of the kinesin motor KIF1A with the multimodular protein liprin-alpha. *J. Biol. Chem.* **278**, 11393–11401 (2003).
247. Wang, Z. *et al.* Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* **135**, 535–548 (2008).
248. Lisé, M.-F. *et al.* Involvement of myosin Vb in glutamate receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* **281**, 3669–3678 (2006).
249. Leonard, A. S., Davare, M. A., Horne, M. C., Garner, C. C. & Hell, J. W. SAP97 is associated with the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. *J. Biol. Chem.* **273**, 19518–19524 (1998).
250. Wu, H., Nash, J. E., Zamorano, P. & Garner, C. C. Interaction of SAP97 with Minus-end-directed Actin Motor Myosin VI: IMPLICATIONS FOR AMPA RECEPTOR TRAFFICKING. *J. Biol. Chem.* **277**, 30928–30934 (2002).
251. Osterweil, E., Wells, D. G. & Mooseker, M. S. A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J. Cell Biol.* **168**, 329–338 (2005).
252. Nash, J. E. *et al.* Disruption of the interaction between myosin VI and SAP97 is associated with a reduction in the number of AMPARs at hippocampal synapses. *J. Neurochem.* **112**, 677–690 (2010).
253. Esteves da Silva, M. *et al.* Positioning of AMPA Receptor-Containing Endosomes Regulates Synapse Architecture. *Cell Rep.* **13**, 933–943 (2015).
254. Hausser, A. & Schlett, K. Coordination of AMPA receptor trafficking by Rab GTPases. *Small GTPases* **10**, 419–432 (2017).
255. Lesage, S. *et al.* Loss-of-function mutations in RAB39B are associated with typical early-onset Parkinson disease. *Neurol. Genet.* **1**, e9 (2015).
256. del Toro, D. *et al.* Mutant huntingtin impairs post-Golgi trafficking to lysosomes by delocalizing optineurin/Rab8 complex from the Golgi apparatus. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1478–1492 (2009).

257. Cataldo, A. M. *et al.* Endocytic Pathway Abnormalities Precede Amyloid  $\beta$  Deposition in Sporadic Alzheimer's Disease and Down Syndrome. *Am. J. Pathol.* **157**, 277–286 (2000).
258. Sheerin, U.-M. *et al.* ALS2 mutations. *Neurology* **82**, 1065–1067 (2014).
259. Meggouh, F., Bienfait, H. M. E., Weterman, M. a. J., de Visser, M. & Baas, F. Charcot-Marie-Tooth disease due to a de novo mutation of the RAB7 gene. *Neurology* **67**, 1476–1478 (2006).
260. Mignogna, M. L. *et al.* The intellectual disability protein RAB39B selectively regulates GluA2 trafficking to determine synaptic AMPAR composition. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
261. Brown, T. C., Correia, S. S., Petrok, C. N. & Esteban, J. A. Functional compartmentalization of endosomal trafficking for the synaptic delivery of AMPA receptors during long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 13311–13315 (2007).
262. Gerges, N. Z., Backos, D. S. & Esteban, J. A. Local control of AMPA receptor trafficking at the postsynaptic terminal by a small GTPase of the Rab family. *J. Biol. Chem.* **279**, 43870–43878 (2004).
263. Gerges, N. Z., Backos, D. S., Rupasinghe, C. N., Spaller, M. R. & Esteban, J. A. Dual role of the exocyst in AMPA receptor targeting and insertion into the postsynaptic membrane. *EMBO J.* **25**, 1623–1634 (2006).
264. Brown, T. C., Tran, I. C., Backos, D. S. & Esteban, J. A. NMDA receptor-dependent activation of the small GTPase Rab5 drives the removal of synaptic AMPA receptors during hippocampal LTD. *Neuron* **45**, 81–94 (2005).
265. Szíber, Z. *et al.* Ras and Rab interactor 1 controls neuronal plasticity by coordinating dendritic filopodial motility and AMPA receptor turnover. *Mol. Biol. Cell* **28**, 285–295 (2017).
266. Glodowski, D. R., Chen, C. C.-H., Schaefer, H., Grant, B. D. & Rongo, C. RAB-10 regulates glutamate receptor recycling in a cholesterol-dependent endocytosis pathway. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4387–4396 (2007).
267. Fernández-Monreal, M., Brown, T. C., Royo, M. & Esteban, J. A. The balance between receptor recycling and trafficking toward lysosomes determines synaptic strength during long-term depression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 13200–13205 (2012).
268. Lin, J. W. *et al.* Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nat. Neurosci.* **3**, 1282–1290 (2000).
269. Zhang, D., Dubey, J., Koushika, S. P. & Rongo, C. RAB-6.1 and RAB-6.2 Promote Retrograde Transport in *C. elegans*. *PLoS One* **11**, e0149314 (2016).
270. Zhang, D. *et al.* RAB-6.2 and the retromer regulate glutamate receptor recycling through a retrograde pathway. *J. Cell Biol.* **196**, 85–101 (2012).
271. Raptis, A., Torrejón-Escribano, B., Gómez de Aranda, I. & Blasi, J. Distribution of synaptobrevin/VAMP 1 and 2 in rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* **30**, 201–211 (2005).
272. Jurado, S. *et al.* LTP Requires a Unique Postsynaptic SNARE Fusion Machinery. *Neuron* **77**, 542–558 (2013).
273. Jurado, S. The dendritic SNARE fusion machinery involved in AMPARs insertion during long-term potentiation. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, (2014).
274. Bin, N.-R. *et al.* Crucial Role of Postsynaptic Syntaxin 4 in Mediating Basal Neurotransmission and Synaptic Plasticity in Hippocampal CA1 Neurons. *Cell Rep.* **23**, 2955–2966 (2018).
275. Spacek, J. & Harris, K. M. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 190–203 (1997).



276. Gray, E. G. AXO-SOMATIC AND AXO-DENDRITIC SYNAPSES OF THE CEREBRAL CORTEX: AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY. 20.
277. Gray, E. G. & Guillery, R. W. A note on the dendritic spine apparatus. 7.
278. Deller, T., Merten, T., Roth, S. U., Mundel, P. & Frotscher, M. Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: Localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *J. Comp. Neurol.* **418**, 164–181 (2000).
279. Perez-Alvarez, A. *et al.* Endoplasmic reticulum visits highly active spines and prevents runaway potentiation of synapses. *Nat. Commun.* **11**, 5083 (2020).
280. Deller, T. *et al.* Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 10494–10499 (2003).
281. Jedlicka, P., Papadopoulos, T., Deller, T., Betz, H. & Schwarzacher, S. W. Increased network excitability and impaired induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of collybistin-deficient mice in vivo. *Mol. Cell. Neurosci.* **41**, 94–100 (2009).
282. Holbro, N., Grunditz, Å. & Oertner, T. G. Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 15055–15060 (2009).
283. Vlachos, A. *et al.* Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 1017–1033 (2009).
284. Segal, M., Vlachos, A. & Korkotian, E. The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* **16**, 125–131 (2010).
285. Hanus, C. *et al.* Unconventional secretory processing diversifies neuronal ion channel properties. *eLife* **5**, e20609 (2016).
286. Cajigas, I. J. *et al.* The Local Transcriptome in the Synaptic Neuropil Revealed by Deep Sequencing and High-Resolution Imaging. *Neuron* **74**, 453–466 (2012).
287. Torre, E. R. & Steward, O. Protein Synthesis within Dendrites: Glycosylation of Newly Synthesized Proteins in Dendrites of Hippocampal Neurons in Culture. *J. Neurosci.* **16**, 5967–5978 (1996).
288. Cui-Wang, T. *et al.* Local Zones of Endoplasmic Reticulum Complexity Confine Cargo in Neuronal Dendrites. *Cell* **148**, 309–321 (2012).
289. Steward, O. & Levy, W. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* **2**, 284–291 (1982).
290. Langhans, M., Meckel, T., Kress, A., Lerich, A. & Robinson, D. G. ERES (ER exit sites) and the ‘secretory unit concept’. *J. Microsc.* **247**, 48–59 (2012).
291. Broutman, G. & Baudry, M. Involvement of the Secretory Pathway for AMPA Receptors in NMDA-Induced Potentiation in Hippocampus. *J. Neurosci.* **21**, 27–34 (2001).
292. Bissen, D., Foss, F. & Acker-Palmer, A. AMPA receptors and their minions: auxiliary proteins in AMPA receptor trafficking. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 2133–2169 (2019).
293. Shi, Y., Lu, W., Milstein, A. D. & Nicoll, R. A. The stoichiometry of AMPA receptors and TARPs varies by neuronal cell type. *Neuron* **62**, 633–640 (2009).
294. Letts, V. A. Stargazer—A Mouse to Seize! *Epilepsy Curr.* **5**, 161–165 (2005).
295. Tomita, S. *et al.* Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J. Cell Biol.* **161**, 805–816 (2003).
296. Chen, S. *et al.* Activation and desensitization mechanism of AMPA receptor – TARP

complex by cryo-EM. *Cell* **170**, 1234–1246.e14 (2017).

297. Cho, C.-H., St-Gelais, F., Zhang, W., Tomita, S. & Howe, J. R. Two families of TARP isoforms that have distinct effects on the kinetic properties of AMPA receptors and synaptic currents. *Neuron* **55**, 890–904 (2007).

298. Körber, C. *et al.* Stargazin interaction with alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) receptors is critically dependent on the amino acid at the narrow constriction of the ion channel. *J. Biol. Chem.* **282**, 18758–18766 (2007).

299. Tomita, S. Dynamic Interaction of Stargazin-like TARPs with Cycling AMPA Receptors at Synapses. *Science* **303**, 1508–1511 (2004).

300. Bedoukian, M. A., Weeks, A. M. & Partin, K. M. Different domains of the AMPA receptor direct stargazin-mediated trafficking and stargazin-mediated modulation of kinetics. *J. Biol. Chem.* **281**, 23908–23921 (2006).

301. Hashimoto, K. *et al.* Impairment of AMPA Receptor Function in Cerebellar Granule Cells of Ataxic Mutant Mouse Stargazer. *J. Neurosci.* **19**, 6027–6036 (1999).

302. Chetkovich, D. M., Chen, L., Stocker, T. J., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. Phosphorylation of the postsynaptic density-95 (PSD-95)/discs large/zona occludens-1 binding site of stargazin regulates binding to PSD-95 and synaptic targeting of AMPA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **22**, 5791–5796 (2002).

303. Choi, J. *et al.* Phosphorylation of stargazin by protein kinase A regulates its interaction with PSD-95. *J. Biol. Chem.* **277**, 12359–12363 (2002).

304. Matsuda, S. *et al.* Stargazin regulates AMPA receptor trafficking through adaptor protein complexes during long-term depression. *Nat. Commun.* **4**, 2759 (2013).

305. Sheng, N. *et al.* LTP requires postsynaptic PDZ-domain interactions with glutamate receptor/auxiliary protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 3948–3953 (2018).

306. Dakoji, S., Tomita, S., Karimzadegan, S., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. Interaction of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins with multiple membrane associated guanylate kinases. *Neuropharmacology* **45**, 849–856 (2003).

307. Park, J. *et al.* CaMKII Phosphorylation of TARPy-8 Is a Mediator of LTP and Learning and Memory. *Neuron* **92**, 75–83 (2016).

308. Chen, L. *et al.* Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* **408**, 936–943 (2000).

309. Zheng, C.-Y., Chang, K., Suh, Y. H. & Roche, K. W. TARP  $\gamma$ -8 glycosylation regulates the surface expression of AMPA receptors. *Biochem. J.* **465**, 471–477 (2015).

310. Schwenk, J. *et al.* Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science* **323**, 1313–1319 (2009).

311. Straub, C. & Tomita, S. The regulation of glutamate receptor trafficking and function by TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 488–495 (2012).

312. Boudkazi, S., Brechet, A., Schwenk, J. & Fakler, B. Cornichon2 Dictates the Time Course of Excitatory Transmission at Individual Hippocampal Synapses. *Neuron* **82**, 848–858 (2014).

313. Harmel, N. *et al.* AMPA Receptors Commandeer an Ancient Cargo Exporter for Use as an Auxiliary Subunit for Signaling. *PLOS ONE* **7**, e30681 (2012).

314. Herring, B. E. *et al.* Cornichon Proteins Determine the Subunit Composition of Synaptic AMPA Receptors. *Neuron* **77**, 1083–1096 (2013).

315. Schwenk, J. *et al.* High-Resolution Proteomics Unravel Architecture and Molecular

Diversity of Native AMPA Receptor Complexes. *Neuron* **74**, 621–633 (2012).

316. Gu, X. *et al.* GSG1L suppresses AMPA receptor-mediated synaptic transmission and uniquely modulates AMPA receptor kinetics in hippocampal neurons. *Nat. Commun.* **7**, 10873 (2016).
317. Abdollahi Nejat, M., Klaassen, R. V., Spijker, S. & Guus Smit, A. B. Auxiliary subunits of the AMPA: The Shisa family of proteins. *Curr. Opin. Pharmacol.* **58**, 52–61 (2021).
318. von Engelhardt, J. AMPA Receptor Auxiliary Proteins of the CKAMP Family. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
319. Khodosevich, K. *et al.* Coexpressed auxiliary subunits exhibit distinct modulatory profiles on AMPA receptor function. *Neuron* **83**, 601–615 (2014).
320. Kunde, S.-A., Rademacher, N., Zieger, H. & Shoichet, S. A. Protein kinase C regulates AMPA receptor auxiliary protein Shisa9/CKAMP44 through interactions with neuronal scaffold PICK1. *FEBS Open Bio* **7**, 1234–1245 (2017).
321. Karataeva, A. R. *et al.* C-Terminal Interactors of the AMPA Receptor Auxiliary Subunit Shisa9. *PLOS ONE* **9**, e87360 (2014).
322. Schmitz, L. J. M. *et al.* The AMPA receptor-associated protein Shisa7 regulates hippocampal synaptic function and contextual memory. *eLife* **6**,.
323. Kalashnikova, E. *et al.* SynDIG1: An Activity-Regulated, AMPA- Receptor-Interacting Transmembrane Protein that Regulates Excitatory Synapse Development. *Neuron* **65**, 80–93 (2010).
324. Kaur, I. *et al.* Activity-Dependent Palmitoylation Controls SynDIG1 Stability, Localization, and Function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **36**, 7562–7568 (2016).
325. Lovero, K. L., Blankenship, S. M., Shi, Y. & Nicoll, R. A. SynDIG1 promotes excitatory synaptogenesis independent of AMPA receptor trafficking and biophysical regulation. *PLoS One* **8**, e66171 (2013).
326. Chenux, G. *et al.* Loss of SynDIG1 Reduces Excitatory Synapse Maturation But Not Formation In Vivo. *eNeuro* **3**, (2016).
327. Matt, L. *et al.* SynDIG4/Prrt1 Is Required for Excitatory Synapse Development and Plasticity Underlying Cognitive Function. *Cell Rep.* **22**, 2246–2253 (2018).
328. Troyano-Rodriguez, E., Mann, S., Ullah, R. & Ahmad, M. PRRT1 regulates basal and plasticity-induced AMPA receptor trafficking. *Mol. Cell. Neurosci.* **98**, 155–163 (2019).
329. Valente, P. *et al.* PRRT2 Is a Key Component of the Ca<sup>2+</sup>-Dependent Neurotransmitter Release Machinery. *Cell Rep.* **15**, 117–131 (2016).
330. Li, M. *et al.* PRRT2 Mutant Leads to Dysfunction of Glutamate Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 9134–9151 (2015).
331. Walensky, L. D. *et al.* A Novel Neuron-Enriched Homolog of the Erythrocyte Membrane Cytoskeletal Protein 4.1. *J. Neurosci.* **19**, 6457–6467 (1999).
332. Baines, A. J., Lu, H.-C. & Bennett, P. M. The Protein 4.1 family: Hub proteins in animals for organizing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838**, 605–619 (2014).
333. Boehm, J. *et al.* Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* **51**, 213–225 (2006).
334. Cai, C., Coleman, S. K., Niemi, K. & Keinänen, K. Selective binding of synapse-associated protein 97 to GluR-A alpha-amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit is determined by a novel sequence motif. *J. Biol. Chem.* **277**, 31484–31490 (2002).

335. Marcello, E. *et al.* SAP97-mediated local trafficking is altered in Alzheimer disease patients' hippocampus. *Neurobiol. Aging* **33**, 422.e1–10 (2012).
336. Toyooka, K. *et al.* Selective reduction of a PDZ protein, SAP-97, in the prefrontal cortex of patients with chronic schizophrenia. *J. Neurochem.* **83**, 797–806 (2002).
337. Tully, M. D. *et al.* Conformational characterization of synapse-associated protein 97 by nuclear magnetic resonance and small-angle X-ray scattering shows compact and elongated forms. *Biochemistry* **51**, 899–908 (2012).
338. Muller, B. M. *et al.* Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J. Neurosci.* **15**, 2354–2366 (1995).
339. Fourie, C., Li, D. & Montgomery, J. M. The anchoring protein SAP97 influences the trafficking and localisation of multiple membrane channels. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838**, 589–594 (2014).
340. Goodman, L. *et al.* N-terminal SAP97 isoforms differentially regulate synaptic structure and postsynaptic surface pools of AMPA receptors: GOODMAN ET AL .GOODMAN ET AL . *Hippocampus* **27**, 668–682 (2017).
341. Cai, C., Li, H., Rivera, C. & Keinänen, K. Interaction between SAP97 and PSD-95, two Maguk proteins involved in synaptic trafficking of AMPA receptors. *J. Biol. Chem.* **281**, 4267–4273 (2006).
342. Waites, C. L. *et al.* Synaptic SAP97 Isoforms Regulate AMPA Receptor Dynamics and Access to Presynaptic Glutamate. *J. Neurosci.* **29**, 4332–4345 (2009).
343. Li, D. *et al.* SAP97 directs NMDA receptor spine targeting and synaptic plasticity. *J. Physiol.* **589**, 4491–4510 (2011).
344. Mauceri, D., Gardoni, F., Marcello, E. & Di Luca, M. Dual role of CaMKII-dependent SAP97 phosphorylation in mediating trafficking and insertion of NMDA receptor subunit NR2A. *J. Neurochem.* **100**, 1032–1046 (2007).
345. Lee, S., Fan, S., Makarova, O., Straight, S. & Margolis, B. A novel and conserved protein-protein interaction domain of mammalian Lin-2/CASK binds and recruits SAP97 to the lateral surface of epithelia. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1778–1791 (2002).
346. Lin, E. I., Jeyifous, O. & Green, W. N. CASK regulates SAP97 conformation and its interactions with AMPA and NMDA receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 12067–12076 (2013).
347. Mok, H. *et al.* Association of the Kinesin Superfamily Motor Protein KIF1B $\alpha$  with Postsynaptic Density-95 (PSD-95), Synapse-Associated Protein-97, and Synaptic Scaffolding Molecule PSD-95/Discs Large/Zona Occludens-1 Proteins. *J. Neurosci.* **22**, 5253–5258 (2002).
348. Tavalin, S. J. *et al.* Regulation of GluR1 by the A-Kinase Anchoring Protein 79 (AKAP79) Signaling Complex Shares Properties with Long-Term Depression. *J. Neurosci.* **22**, 3044–3051 (2002).
349. Mauceri, D., Cattabeni, F., Di Luca, M. & Gardoni, F. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation drives synapse-associated protein 97 into spines. *J. Biol. Chem.* **279**, 23813–23821 (2004).
350. Nikandrova, Y. A., Jiao, Y., Baucum, A. J., Tavalin, S. J. & Colbran, R. J. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Binds to and Phosphorylates a Specific SAP97 Splice Variant to Disrupt Association with AKAP79/150 and Modulate  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid-type Glutamate Receptor (AMPA) Activity. *J. Biol. Chem.* **285**, 923–934 (2010).

351. Anggono, V. & Huganir, R. L. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 461–469 (2012).
352. Yong, A. J. H. *et al.* Tyrosine phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluA2 gates homeostatic synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 4948–4958 (2020).
353. Seidenman, K. J., Steinberg, J. P., Huganir, R. & Malinow, R. Glutamate Receptor Subunit 2 Serine 880 Phosphorylation Modulates Synaptic Transmission and Mediates Plasticity in CA1 Pyramidal Cells. *J. Neurosci.* **23**, 9220–9228 (2003).
354. Chung, H. J., Xia, J., Scannevin, R. H., Zhang, X. & Huganir, R. L. Phosphorylation of the AMPA Receptor Subunit GluR2 Differentially Regulates Its Interaction with PDZ Domain-Containing Proteins. *J. Neurosci.* **20**, 7258–7267 (2000).
355. Steinberg, J. P. *et al.* Targeted in vivo mutations of the AMPA receptor subunit GluR2 and its interacting protein PICK1 eliminate cerebellar long-term depression. *Neuron* **49**, 845–860 (2006).
356. Gainey, M. A., Tataavarty, V., Nahmani, M., Lin, H. & Turrigiano, G. G. Activity-dependent synaptic GRIP1 accumulation drives synaptic scaling up in response to action potential blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E3590–E3599 (2015).
357. Fu, J., deSouza, S. & Ziff, E. B. Intracellular Membrane Targeting and Suppression of Ser880 Phosphorylation of Glutamate Receptor 2 by the Linker I-Set II Domain of AMPA Receptor-Binding Protein. *J. Neurosci.* **23**, 7592–7601 (2003).
358. Xia, J., Chung, H. J., Wihler, C., Huganir, R. L. & Linden, D. J. Cerebellar long-term depression requires PKC-regulated interactions between GluR2/3 and PDZ domain-containing proteins. *Neuron* **28**, 499–510 (2000).
359. Terashima, A. *et al.* An Essential Role for PICK1 in NMDA Receptor-Dependent Bidirectional Synaptic Plasticity. *Neuron* **57**, 872–882 (2008).
360. Ho, M. T.-W. *et al.* Developmental Expression of Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPA Receptors Underlies Depolarization-Induced Long-Term Depression at Mossy Fiber–CA3 Pyramid Synapses. *J. Neurosci.* **27**, 11651–11662 (2007).
361. Kim, C.-H., Chung, H. J., Lee, H.-K. & Huganir, R. L. Interaction of the AMPA receptor subunit GluR2/3 with PDZ domains regulates hippocampal long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 11725–11730 (2001).
362. Iwakura, Y. *et al.* N-methyl-D-aspartate-induced alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor down-regulation involves interaction of the carboxyl terminus of GluR2/3 with Pick1. Ligand-binding studies using Sindbis vectors carrying AMPA receptor decoys. *J. Biol. Chem.* **276**, 40025–40032 (2001).
363. Hanley, J. G. Actin-dependent mechanisms in AMPA receptor trafficking. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, (2014).
364. Hanley, J. G. & Henley, J. M. PICK1 is a calcium-sensor for NMDA-induced AMPA receptor trafficking. *EMBO J.* **24**, 3266–3278 (2005).
365. Perez, J. L. *et al.* PICK1 targets activated protein kinase Calpha to AMPA receptor clusters in spines of hippocampal neurons and reduces surface levels of the AMPA-type glutamate receptor subunit 2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 5417–5428 (2001).
366. Xia, J., Zhang, X., Staudinger, J. & Huganir, R. L. Clustering of AMPA receptors by the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* **22**, 179–187 (1999).
367. Fiuza, M. *et al.* PICK1 regulates AMPA receptor endocytosis via direct interactions with AP2  $\alpha$ -appendage and dynamin. *J. Cell Biol.* **216**, 3323–3338 (2017).
368. Daw, M. I. *et al.* PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* **28**, 873–886

(2000).

369. Lin, D.-T. & Huganir, R. L. PICK1 and Phosphorylation of the Glutamate Receptor 2 (GluR2) AMPA Receptor Subunit Regulates GluR2 Recycling after NMDA Receptor-Induced Internalization. *J. Neurosci.* **27**, 13903–13908 (2007).
370. Sossa, K. G., Beattie, J. B. & Carroll, R. C. AMPAR exocytosis through NO modulation of PICK1. *Neuropharmacology* **53**, 92–100 (2007).
371. Citri, A. *et al.* Calcium Binding to PICK1 Is Essential for the Intracellular Retention of AMPA Receptors Underlying Long-Term Depression. *J. Neurosci.* **30**, 16437–16452 (2010).
372. Jaafari, N., Henley, J. M. & Hanley, J. G. PICK1 mediates transient synaptic expression of GluA2-lacking AMPA receptors during glycine-induced AMPA receptor trafficking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 11618–11630 (2012).
373. DeSouza, S., Fu, J., States, B. A. & Ziff, E. B. Differential Palmitoylation Directs the AMPA Receptor-Binding Protein ABP to Spines or to Intracellular Clusters. *J. Neurosci.* **22**, 3493–3503 (2002).
374. Yamazaki, M. *et al.* Differential palmitoylation of two mouse glutamate receptor interacting protein 1 forms with different N-terminal sequences. *Neurosci. Lett.* **304**, 81–84 (2001).
375. Furst, J., Sutton, R. B., Chen, J., Brunger, A. T. & Grigorieff, N. Electron cryomicroscopy structure of N-ethyl maleimide sensitive factor at 11 Å resolution. *EMBO J.* **22**, 4365–4374 (2003).
376. Umanah, G. K. E. *et al.* AMPA Receptor Surface Expression Is Regulated by S-Nitrosylation of Thorase and Transnitrosylation of NSF. *Cell Rep.* **33**, 108329 (2020).
377. Song, I. *et al.* Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* **21**, 393–400 (1998).
378. Huang, Y. *et al.* S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. *Neuron* **46**, 533–540 (2005).
379. Steinberg, J. P., Huganir, R. L. & Linden, D. J. N-ethylmaleimide-sensitive factor is required for the synaptic incorporation and removal of AMPA receptors during cerebellar long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 18212–18216 (2004).
380. Beretta, F. *et al.* NSF interaction is important for direct insertion of GluR2 at synaptic sites. *Mol. Cell. Neurosci.* **28**, 650–660 (2005).
381. Hanley, J. G., Khatri, L., Hanson, P. I. & Ziff, E. B. NSF ATPase and alpha-/beta-SNAPs disassemble the AMPA receptor-PICK1 complex. *Neuron* **34**, 53–67 (2002).
382. Lee, S. H., Liu, L., Wang, Y. T. & Sheng, M. Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* **36**, 661–674 (2002).
383. Lussier, M. P., Gu, X., Lu, W. & Roche, K. W. Casein kinase 2 phosphorylates GluA1 and regulates its surface expression. *Eur. J. Neurosci.* **39**, 1148–1158 (2014).
384. Lu, W., Isozaki, K., Roche, K. W. & Nicoll, R. A. Synaptic targeting of AMPA receptors is regulated by a CaMKII site in the first intracellular loop of GluA1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 22266–22271 (2010).
385. Coultrap, S. J. *et al.* Autonomous CaMKII mediates both LTP and LTD using a mechanism for differential substrate site selection. *Cell Rep.* **6**, 431–437 (2014).
386. Pougnet, J.-T. *et al.* P2X-mediated AMPA receptor internalization and synaptic depression is controlled by two CaMKII phosphorylation sites on GluA1 in hippocampal neurons. *Sci. Rep.* **6**, 31836 (2016).

387. Diering, G. H., Heo, S., Hussain, N. K., Liu, B. & Huganir, R. L. Extensive phosphorylation of AMPA receptors in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E4920–E4927 (2016).
388. Roche, K. W., O'Brien, R. J., Mammen, A. L., Bernhardt, J. & Huganir, R. L. Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* **16**, 1179–1188 (1996).
389. Oh, M. C., Derkach, V. A., Guire, E. S. & Soderling, T. R. Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. *J. Biol. Chem.* **281**, 752–758 (2006).
390. Man, H.-Y., Sekine-Aizawa, Y. & Huganir, R. L. Regulation of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 3579–3584 (2007).
391. Lee, H.-K., Takamiya, K., He, K., Song, L. & Huganir, R. L. Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus. *J. Neurophysiol.* **103**, 479–489 (2010).
392. Sun, X., Zhao, Y. & Wolf, M. E. Dopamine Receptor Stimulation Modulates AMPA Receptor Synaptic Insertion in Prefrontal Cortex Neurons. *J. Neurosci.* **25**, 7342–7351 (2005).
393. Esteban, J. A. *et al.* PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat. Neurosci.* **6**, 136–143 (2003).
394. Selvakumar, B. *et al.* S-nitrosylation of AMPA receptor GluA1 regulates phosphorylation, single-channel conductance, and endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 1077–1082 (2013).
395. Hussain, N. K., Thomas, G. M., Luo, J. & Huganir, R. L. Regulation of AMPA receptor subunit GluA1 surface expression by PAK3 phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E5883–E5890 (2015).
396. Delgado, J. Y. *et al.* NMDA Receptor Activation Dephosphorylates AMPA Receptor Glutamate Receptor 1 Subunits at Threonine 840. *J. Neurosci.* **27**, 13210–13221 (2007).
397. Jenkins, M. A. *et al.* Regulation of GluA1  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptor Function by Protein Kinase C at Serine-818 and Threonine-840. *Mol. Pharmacol.* **85**, 618–629 (2014).
398. Hayashi, T. & Huganir, R. L. Tyrosine phosphorylation and regulation of the AMPA receptor by SRC family tyrosine kinases. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 6152–6160 (2004).
399. Kohda, K. *et al.* The  $\delta 2$  glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E948-957 (2013).
400. Taylor, E. W. *et al.* O-GlcNAcylation of AMPA Receptor GluA2 Is Associated with a Novel Form of Long-Term Depression at Hippocampal Synapses. *J. Neurosci.* **34**, 10–21 (2014).
401. Widagdo, J. *et al.* Activity-Dependent Ubiquitination of GluA1 and GluA2 Regulates AMPA Receptor Intracellular Sorting and Degradation. *Cell Rep.* **10**, 783–795 (2015).
402. Widagdo, J., Guntupalli, S., Jang, S. E. & Anggono, V. Regulation of AMPA Receptor Trafficking by Protein Ubiquitination. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 347 (2017).
403. Liu, A. *et al.* The Requirement of the C-Terminal Domain of GluA1 in Different Forms of Long-Term Potentiation in the Hippocampus Is Age-Dependent. *Front. Synaptic Neurosci.* **12**, (2020).
404. Rollins, C. T. *et al.* A ligand-reversible dimerization system for controlling protein-

- protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 7096–7101 (2000).
405. Rivera, V. M. Regulation of Protein Secretion Through Controlled Aggregation in the Endoplasmic Reticulum. *Science* **287**, 826–830 (2000).
406. Presley, J. F. *et al.* ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**, 81–85 (1997).
407. Scales, S. J., Pepperkok, R. & Kreis, T. E. Visualization of ER-to-Golgi Transport in Living Cells Reveals a Sequential Mode of Action for COPII and COPI. *Cell* **90**, 1137–1148 (1997).
408. Mironov, A. A. *et al.* Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J. Cell Biol.* **155**, 1225–1238 (2001).
409. Boncompain, G. *et al.* Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat. Methods* **9**, 493–498 (2012).
410. Kaech, S. & Banker, G. Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* **1**, 2406–2415 (2006).
411. Neumann, S., Chassefeyre, R., Campbell, G. E. & Encalada, S. E. KymoAnalyzer: a software tool for the quantitative analysis of intracellular transport in neurons. *Traffic Cph. Den.* **18**, 71–88 (2017).
412. Mangeol, P., Prevo, B. & Peterman, E. J. G. KymographClear and KymographDirect: two tools for the automated quantitative analysis of molecular and cellular dynamics using kymographs. *Mol. Biol. Cell* **27**, 1948–1957 (2016).
413. Jakobs, M. A. H., Dimitracopoulos, A. & Franze, K. *KymoButler, a Deep Learning software for automated kymograph analysis*. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/405183> (2018) doi:10.1101/405183.
414. Zhou, W. *et al.* GluR1 Controls Dendrite Growth through Its Binding Partner, SAP97. *J. Neurosci.* **28**, 10220–10233 (2008).
415. Shen, L., Liang, F., Walensky, L. D. & Huganir, R. L. Regulation of AMPA Receptor GluR1 Subunit Surface Expression by a 4.1N-Linked Actin Cytoskeletal Association. *J. Neurosci.* **20**, 7932–7940 (2000).
416. Thomas, G. FURIN AT THE CUTTING EDGE: FROM PROTEIN TRAFFIC TO EMBRYOGENESIS AND DISEASE. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 753–766 (2002).
417. Molloy, S. S., Anderson, E. D., Jean, F. & Thomas, G. Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* **9**, 28–35 (1999).



## Transport intracellulaire des récepteurs AMPA et régulation par leurs protéines associées

L'apprentissage et la mémoire se fondent sur les événements de plasticité synaptique lors desquels le neurone module l'efficacité de la transmission synaptique. Ces événements nécessitent un contrôle spatial et temporel strict du nombre de récepteurs AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate : AMPAR) à la membrane plasmique (MP) post-synaptique et plus particulièrement à la synapse. Ce contrôle est un réel challenge pour les neurones chez lesquels une synapse peut être localisée à des centaines de micromètres du corps cellulaire et du noyau où les gènes sont transcrits. Le trafic et la localisation des AMPAR sont assurés par une coopération complexe entre différents mécanismes : le transport intracellulaire (TI) des récepteurs néosynthétisés jusqu'à la MP, leur diffusion membranaire et stabilisation à la post-synapse ou leur recyclage lors duquel les récepteurs sont endocytés puis réinsérés à la MP ou dégradés. Le TI des récepteurs néosynthétisés concerne tous les récepteurs et est un contributeur important de l'augmentation du nombre de récepteurs à la synapse observée lors de la potentialisation à long terme (Long term potentiation : LTP). Les récepteurs mûrent dans les compartiments de la voie de sécrétion et sont ensuite transportés dans des vésicules jusqu'à la MP. Le TI est très peu étudié car il est composé de petites vésicules rapides de faible contraste, impossibles à distinguer de celles contenant les récepteurs recyclés. Grâce à un outil moléculaire permettant la rétention des AMPAR dans le réticulum endoplasmique combiné à la vidéo-microscopie, notre laboratoire a montré que le TI de GluA1 possède des caractéristiques stables en conditions basales. Ce TI est régulé par la concentration de  $Ca^{2+}$  qui varie après l'induction de la LTP comme lors de la phase tardive où le nombre de vésicules et leur vitesse sont augmentées. Il est également modulé par des mutations ponctuelles au niveau du domaine C-terminal (CTD) des AMPAR.

Notre objectif était d'éclaircir les mécanismes moléculaires qui régissent cette régulation. Les AMPAR possèdent beaucoup d'interacteurs protéiques dont leurs protéines auxiliaires, des protéines transmembranaires qui modulent leurs propriétés et leur trafic. Gamma8, la protéine auxiliaire la plus abondante de l'hippocampe, a un rôle majeur pour l'expression de la LTP. Le TI que nous avons observé dans des neurones de souris Gamma8-KO est diminué par rapport au WT avec un nombre de vésicules et des vitesses diminués alors que le temps passé en pause est augmenté. Nos données suggèrent donc que Gamma8 participe au TI de GluA1.

Les AMPAR interagissent également avec des protéines cytosoliques par le biais de leur CTD. GluA1 possède deux interacteurs cytosoliques connus : 4.1N et SAP97. L'interaction avec 4.1N est régie par deux phosphorylations. 4.1N est impliquée dans l'exocytose des récepteurs en particulier lors de la LTP. SAP97 est impliquée dans la sortie de l'appareil de Golgi et sert d'adaptateur au moteur moléculaire MyoVI. En plus de son rôle dans l'exocytose, nos données suggèrent que 4.1N régule le TI de GluA1 lors de la LTP mais pas en conditions basales. En effet, après l'induction, le TI du mutant S816A S818A qui ne lie pas 4.1N a des vitesses réduites. A l'inverse, SAP97 régule le TI en conditions basales en contrôlant le nombre de vésicules bourgeonnant de l'appareil de Golgi et en modulant la vitesse des vésicules, une régulation qui pourrait être maintenue après l'induction de la LTP.

Les AMPAR majoritaires sont des hétéromères composés des sous-unités GluA1 et GluA2. Le TI de la sous-unité GluA2 que nous avons observé a les mêmes caractéristiques que celui de GluA1. GluA2 est liée à d'autres interacteurs qui pourraient moduler le TI lors de l'activité mais leurs effets restent à déterminer. Nous proposons donc que le TI des AMPAR est très fortement modulé par leurs protéines auxiliaires et les interactions de leur CTD avec des protéines cytosoliques.

**Mots-clefs :** récepteurs AMPA, plasticité synaptique, vidéo-microscopie, transport intracellulaire

---

INSTITUT INTERDISCIPLINAIRE DE NEUROSCIENCES

UMR 5297, Université de Bordeaux

146, rue Léo-Saignat 33077 Bordeaux