

ÉTIENNE LABRIE-DION

**ÉTUDE DES INTERACTIONS DYNAMIQUES DE
LA CAMKII AVEC LE CYTOSQUELETTE DU
NEURONE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Neurobiologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE NEUROBIOLOGIE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Résumé

La formation des connexions entre les neurones durant le développement et la plasticité des connexions synaptiques une fois établies nécessite une fine régulation au niveau du cytosquelette du neurone. Les interactions entre les microtubules et l'actine du cytosquelette sont à l'origine du déplacement et du guidage de l'extrémité de l'axone en croissance, et de récentes évidences suggèrent qu'elles pourraient être importantes dans la réorganisation synaptique. La protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante II (CaMKII), une des protéines les plus abondantes du cerveau, pourrait être impliquée dans la régulation de ces interactions. Il a été montré que la sous-forme CaMKII β , exprimée dans le développement et liant l'actine en situation de faible activité, détecte les oscillations calciques dans le cône de croissance et provoque son attraction. Le mécanisme par lequel la CaMKII β entraîne le virage du cône est cependant inconnu. L'isoforme CaMKII α , essentielle dans la potentialisation à long-terme de l'épine dendritique, a été observée s'accumulant sous l'épine dendritique lors d'une forte activité locale, où elle pourrait contrôler la livraison locale de cargos destinés à la synapse. Dans le laboratoire du Dr. De Koninck, nous avons observé ces deux formes se lier à des structures ressemblant à des microtubules pendant une forte stimulation. La liaison de la CaMKII aux microtubules pourrait expliquer le mécanisme d'action de la CaMKII β dans le virage du cône de croissance ainsi que mettre en évidence un nouveau rôle de la CaMKII α dans l'épine dendritique. Au cours de mes travaux de maîtrise, j'ai observé la CaMKII et le cytosquelette dans des cultures de neurones d'hippocampe de rats en marquant les protéines avec des anticorps ou en transfectant des protéines de fusion fluorescentes. Mes analyses de colocalisation m'ont permis de montrer que la dépolarisation du neurone provoque le déplacement de la CaMKII β de l'actine vers les microtubules dans le cône de croissance et la localisation de la CaMKII α aux microtubules, mais pas aux neurofilaments, dans le neurone plus mature. Les études d'inhibition de la CaMKII β au cours du développement ainsi que l'étude du guidage du cône de croissance n'ont pas donné de résultats probants permettant d'expliquer le rôle du déplacement de la CaMKII β . Finalement, il est possible que la liaison de la CaMKII α aux microtubules sous l'épine puisse être impliquée dans les entrées de microtubules dans l'épine et dans la livraison de récepteurs AMPA.

*À ma sœur, mon frère et tous ceux qui m'ont
supporté*

Table des matières

RÉSUMÉ	I
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	8
1.1 LA CAMKII	11
1.2 RÔLES DE LA CAMKII DURANT LE DÉVELOPPEMENT	14
1.3 ACTIVITÉ DE LA CAMKII DANS L'ÉPINE DENDRITIQUE	16
1.4 FONCTION ET STRUCTURE DU CÔNE DE CROISSANCE	18
1.5 LE MOUVEMENT DU CÔNE DE CROISSANCE	19
1.5.1 <i>L'actine, muscle du cône de croissance</i>	20
1.5.2 <i>Les microtubules pour tourner</i>	20
1.5.3 <i>Les interactions entre l'actine et les microtubules</i>	21
1.6 SIGNALISATION CALCIQUE DU CÔNE DE CROISSANCE	23
1.6.1 <i>Cibles du calcium interne</i>	24
1.7 LE CYTOSQUELETTE DE L'ÉPINE DENDRITIQUE	26
1.7.1 <i>Rôles de l'actine</i>	26
1.7.2 <i>Microtubules dans l'épine</i>	27
1.8 QUESTIONS ET HYPOTHÈSES	30
CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES	31
2.1 CULTURES DISSOCIÉES D'HIPPOCAMPE DE RAT	31
2.2 TECHNIQUES DE TRANSFERT DE GÈNE PAR LIPOFECTION	31
2.3 IMMUNOCYTOCHIMIE DES CULTURES	33
2.4 IMAGERIE DES NEURONES	34
2.4.1 <i>Imagerie des neurones fixés</i>	34
2.4.2 <i>Images en temps réel</i>	34
2.4.3 <i>Acquisition</i>	34
2.4.4 <i>Perfusion</i>	35
2.4.5 <i>Stimulation</i>	36
2.5 ANALYSE DE COLOCALISATION	37
2.6 MESURE DES PROLONGEMENTS	38
2.7 MESURES DE SURFACE DU CÔNE DE CROISSANCE	38
2.8 TRAÇAGE DES RÉGIONS SYNAPTIQUES	39
2.8.1 <i>Mesures d'entrées d'EB3</i>	39
2.9 TECHNIQUES DE GUIDAGE DU CÔNE DE CROISSANCE	40
2.9.1 <i>Guidage par micro-injection locale</i>	40
2.9.2 <i>Guidage par LAPAP</i>	41
2.10 ANALYSES STATISTIQUES	42
CHAPITRE 3: RÉSULTATS	43
3.1 LA LOCALISATION DE LA CAMKII β ET SON DÉPLACEMENT DANS LE CÔNE DE CROISSANCE	43
3.2 DURANT LA STIMULATION NEURONALE, LA CAMKII β COLOCALISE D'AVANTAGE AVEC LA TUBULINE ET MOINS AVEC L'ACTINE	47
3.3 IMPACT DE L'INHIBITION GÉNÉTIQUE DE LA CAMKII SUR LE DÉVELOPPEMENT NEURITIQUE	49
3.3.1 <i>La réduction de CaMKIIα ou β ne change pas la taille du cône de croissance</i>	50
3.3.2 <i>La réduction de CaMKIIα ou de CaMKIIβ ne modifie pas le nombre de neurites</i>	54
3.3.3 <i>La réduction de CaMKII ne change pas la taille de l'axone</i>	54
3.4 ESSAIS DE GUIDAGE DU CÔNE DE CROISSANCE	54
3.5 TRANSLOCALISATION DENDRITIQUE DE LA CAMKII PRÈS DES ÉPINES	56
3.6 TRANSLOCATION ACTIVITÉ-DÉPENDANTE DE LA CAMKII SUR LES MICROTUBULES	58
3.7 LA TRANSLOCALISATION DENDRITIQUE DE LA CAMKII POURRAIT AUGMENTER LA QUANTITÉ DE GLUR1	60

3.8	ON DÉTECTE PLUS D'ENTRÉES D'EB3 DANS LES ÉPINES MONTRANT LA DOUBLE TRANSLOCATION DE CAMKII	61
3.9	L'INHIBITEUR KN93 POURRAIT AUGMENTER LES ENTRÉES D'EB3	64
CHAPITRE 4: DISCUSSION GÉNÉRALE		67
4.1	RÔLE DE LA CAMKII DANS LE DÉVELOPPEMENT ET LE GUIDAGE AXONAL	68
4.2	TECHNIQUES DE GUIDAGE AXONAL	70
4.3	RÔLE DE LA TRANSLOCALISATION LOCALE DE LA CAMKII DANS L'ÉPINE	73
4.4	ANALYSE DE COLOCALISATION	76
4.5	PERSPECTIVES	77
CONCLUSION GÉNÉRALE		80

Liste des figures

Figure 1 : Structure et activation de la CaMKII	11
Figure 2 : Structures primaires de la CaMKII α et de la CaMKII β	13
Figure 3: Structure du cône de croissance	18
Figure 4: Modèle du cytosquelette de l'épine dendritique	27
Figure 5 : Exemples de gradients de protéine produits par LAPAP.	42
Figure 6 : Déplacements de mGFP-CaMKII α et de mGFP suivant l'actine.	44
Figure 7 : Translocation de la CaMKII α lors de la dépolarisation du cône.....	45
Figure 8 : Analyse de colocalisation de la CaMKII α avec le cytosquelette du cône	48
Figure 9 : Étude de l'inhibition par shRNA de la CaMKII dans le développement.....	52
Figure 10 : Analyses morphologiques de l'impact de l'inhibition de la CaMKII	53
Figure 11: Translocalisation de la CaMKII α dans la dendrite.	57
Figure 12 : Colocalisation de la CaMKII α avec la tubuline et les neurofilaments	59
Figure 13 : Effet de la translocation synaptique et dendritique de la CaMKII α du GluR1 ..	61
Figure 14 : Effet de la translocation de la CaMKII α sur les entrées d'EB3	63
Figure 15 : Effet de l'inhibition de la CaMKII sur les entrées d'EB3	66
Figure 16 : Techniques d'essais de guidage	72
Figure 17 : Image de Tubulin-GFP prise à l'aide d'un microscope TIRF	78

Liste des films

Film 1 Cône mGFP-CaMKII et Lifeact-mRuby	vid1.avi
Film 2 Cône mGFP et Lifeact-mRuby.....	vid2.avi
Film 3 Cône Stimulé KCl mGFP-CaMKII	vid3.avi
Film 4 Cône Stimulé KCl mGFP-CaMKII A303R.....	vid4.avi
Film 5 Cône Stimulé mGFP.....	vid5.avi
Film 6 Neurone Stimulé 0MgGly, mCherry-CaMKII	vid6.avi
Film 7 Neurone Stimulé 0MgGly,GluR1-GFP,mCherry-CaMKII .	vid7.avi
Film 8 Neurone Stimulé KCl, EB3-GFP, CaMKII -mRuby.....	vid8.avi
Film 9 Guidage du Cône Puff Glutamate, Lifeact-mGFP.....	vid9.avi

Chapitre 1: INTRODUCTION

Les neurosciences sont encore très jeunes. Il est facile d'oublier qu'il y a moins de 150 ans, avant la théorie du neurone de Ramon y Cajal et de Heinrich Wilhelm Waldeyer, le système nerveux était vu comme un enchevêtrement de tissu complexe et uniforme ne possédant pas de cellules isolées. Certaines des plus grandes découvertes en neurosciences ont été permises par de malheureux accidents; une tige dans la tête détruisant les lobes frontaux de Phineas Gage, la syphilis atteignant l'aire de Broca du patient Tau de Paul Broca et les nombreuses crises d'épilepsie de Henry Molaison (mieux connu sous le nom de H.M. avant sa mort en 2008) nécessitant l'ablation de la majorité de ses hippocampes et d'autres parties des lobes temporaux. Ces patients dont le cerveau était endommagé présentaient des symptômes clairs; une impulsivité indécente chez Gage, la perte de la parole mais pas de la compréhension pour le patient Tau, et une perte de la mémoire épisodique pour Molaison. Ils ont permis de comprendre un concept qui paraît aujourd'hui plus qu'évident, soit que différentes parties du cerveau accomplissent différentes fonctions. Depuis ses premiers balbutiements, les neurosciences ont beaucoup changé. Les avancées techniques en imagerie photonique, en électrophysiologie, en génie génétique et en informatique ont permis d'avancer grandement notre compréhension du cerveau. Malgré tout, il reste de nombreuses questions sans réponses.

Ainsi, on ne comprend pas encore très bien comment l'hippocampe dans le cerveau fonctionne pour emmagasiner de l'information, ni comment il peut se développer pour arriver à un fonctionnement si précis. Pour arriver à être à la fois dynamiques mais solides, les neurones possèdent une structure complexe munie de différentes composantes en interaction. On appelle le cytosquelette cette structure commune à toutes les cellules du corps qui sert de à la fois de squelette et de muscles aux neurones. Squelette parce qu'il fournit la rigidité et la stabilité des neurones. Musculaire parce que le cytosquelette est composé entre autres d'actine, la même protéine retrouvée dans les muscles du corps, et qu'il fournit la force nécessaire au développement des neurones et au remodelage des synapses. Il existe une interface entre les différents éléments du cytosquelette dans la synapse et au bout de l'axone en croissance (le *cône de croissance*, décrit plus loin), soit

entre l'actine et les microtubules, ces derniers étant, en contrepartie de l'actine, les «os» des neurones. Cette interface est encore mal connue, mais bien la comprendre permettrait de mieux approcher une foule de phénomènes, de la formation d'un souvenir à la connexion d'un neurone du gros orteil chez un nouveau-né.

Nous savons que l'apprentissage se manifeste au niveau des synapses et fait donc intervenir certaines formes de plasticité synaptique. Certains modèles tentent d'expliquer comment les synapses peuvent changer de force dont la potentialisation à long terme (LTP), qui consiste en une augmentation durable de la réponse entre deux neurones stimulés simultanément. La LTP possède plusieurs des caractéristiques de la mémoire à long-terme (activation rapide, nécessite la synthèse de nouvelles protéines, une grande durée pouvant dépasser plusieurs mois), et se révèle un modèle important pour l'étude au niveau cellulaire de la mémoire en laboratoire. L'étude de la LTP a mené à la découverte de protéines nécessaires à son induction, des protéines qui, une fois enlevées à des modèles animaux par génie génétique, provoquent des troubles de l'apprentissage profonds.

Une de ces protéines, la protéine kinase calmoduline-dépendante de type II (CaMKII), très abondante dans le système nerveux, possède la capacité de demeurer active après de forts stimuli, ce qui pourrait être une manifestation moléculaire de la mémoire. Cette protéine pourrait justement être un des joueurs importants à l'interface actine-microtubule, autant dans l'épine synaptique que dans le cône de croissance, où cette enzyme possède déjà certaines fonctions connues. Des travaux récents effectués par l'équipe du Dr Paul De Koninck ont mené à l'observation de la CaMKII au niveau des microtubules pendant l'activité du neurone. Ainsi, il était déjà connu que des variétés de CaMKII pouvaient lier l'actine, mais le fait que l'enzyme puisse se lier aux microtubules, ou du moins à des protéines associées aux microtubules, est une toute nouvelle idée qui pourrait expliquer certains comportements de l'enzyme. La CaMKII pourrait donc se retrouver aux endroits idéaux pour réguler la mémoire et le développement: dans l'épine dendritique, où le réseau d'actine assure la stabilité de la structure et des microtubules permettent le remodelage et la livraison de cargo, ainsi que dans le cône de croissance, qui doit sa capacité à trouver sa cible durant le développement à une interaction actine-

microtubule finement régulée. On connaît déjà de nombreux rôles de la CaMKII au niveau de ces interfaces, mais aucune explication du comportement de l'enzyme n'y a jusqu'à maintenant fait intervenir une liaison aux microtubules.

Ainsi, je m'intéresse à observer, mesurer et expliquer les déplacements de la CaMKII au niveau du cytosquelette du cône de croissance et de l'épine dendritique afin de permettre de mieux comprendre le comportement de l'enzyme et de mieux expliquer les interactions actine-microtubule dans le développement et dans le remodelage synaptique. Je vous présenterai d'abord cette enzyme multifonctionnelle complexe qui joue de nombreux rôles essentiels dans les neurones, avant de passer à un aperçu des deux endroits où nous regarderons la CaMKII se déplacer et jouer ses rôles.

1.1 La CaMKII

La CaMKII est une sérine/thréonine kinase multifonctionnelle retrouvée en grande quantité dans le cerveau. Elle est la principale protéine de la densité postsynaptique, où elle participe à la potentialisation synaptique (Lisman, 2002). Elle se retrouve habituellement sous la forme d'une holoenzyme composée de douze sous-unités organisées en deux anneaux de forme hexagonale. Ces sous-unités sont activées par leur liaison avec le complexe Ca^{2+} /Calmoduline suite à une augmentation de Ca^{2+} et de façon dépendante aux oscillations de calcium (De Koninck et Schulman, 1998). La disposition particulière des sous-unités dans l'holoenzyme de CaMKII est responsable de sa capacité à conserver son activité catalytique après avoir été activée en présence de calcium et de calmoduline. Dans le cerveau, deux principales isoformes de la CaMKII sont exprimées, la CaMKII α et la CaMKII β . Ces deux variantes diffèrent par leur structure, leur activité, le moment ainsi que le lieu de leur expression, mais peuvent tout de même s'assembler entre elles et former des hétéromères α/β .

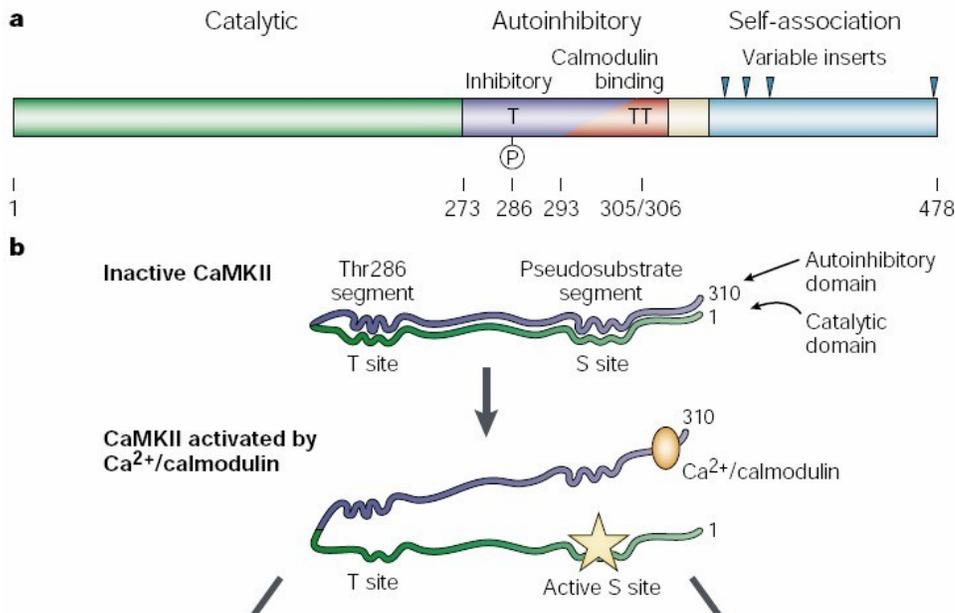


Figure 1 : Structure et activation de la CaMKII

a) Domaines de la CaMKII dans sa structure primaire. b) Le domaine autoinhibiteur bloque le domaine catalytique en l'absence de calmoduline ou de phosphorylation de la Thr286. La liaison de la Ca^{2+} /calmoduline permet l'ouverture et l'activation de la CaMKII. (Lisman et al., 2002)

La structure générale de la CaMKII comprend un domaine catalytique, un domaine autoinhibiteur, un segment variable et un domaine d'auto-association (Figure 1). Le domaine catalytique N-terminal contient des sites de liaison à l'ATP et au substrat (site S) ainsi que des sites d'interaction avec les protéines d'ancrage. Ce domaine garanti à lui seul l'activité de kinase de l'enzyme. En effet, une CaMKII monomérique tronquée ne possédant que le domaine catalytique est naturellement active. Par contre, la kinase complète en condition normale n'a pratiquement aucune activité à cause de la liaison du domaine autoinhibiteur (par sa région pseudo-substrat) au site S du domaine catalytique. Cette liaison peut être rompue par un complexe Ca^{2+} /Calmoduline qui vient se fixer à une région chevauchant la région pseudo-substrat du domaine autoinhibiteur. L'ouverture de la sous-unité en présence de ce complexe active l'enzyme et, plus important encore, expose le site T (la Thr286) du domaine catalytique. Il est ainsi possible pour un monomère voisin, également lié à la Ca^{2+} /Calmoduline, de phosphoryler le site T de la CaMKII activée. L'autophosphorylation de la Thr286 favorise le maintien de l'activité de la CaMKII de deux façons. Premièrement, elle augmente grandement l'affinité de l'enzyme pour la calmoduline. Deuxièmement, l'autophosphorylation empêche le domaine autorégulateur de se rabattre sur le domaine catalytique. L'enzyme demeure alors active même après la dissociation du complexe Ca^{2+} /Calmoduline. Dans le cas où il y a eu une élévation suffisante de calcium intracellulaire et que suffisamment de sous-unités de l'holoenzyme ont été activées, l'activité de la CaMKII persistera longtemps après la baisse de calcium.

La forme α est à ce jour la CaMKII la plus étudiée et la variante à laquelle la littérature réfère le plus souvent. Elle joue de nombreux rôles dans la potentialisation synaptique et dans le décodage des vagues de calcium chez les neurones matures. La CaMKII α est peu exprimée au début du développement des neurones. Il faut attendre la formation de l'axone et la maturation des dendrites, soit au moins trois à quatre jours en culture, avant de pouvoir détecter sa présence. La CaMKII α ne devient la CaMKII dominante dans le neurone qu'après environ dix jours en culture (Fink et al., 2003).

L'isoforme β de la protéine est la principale forme de CaMKII exprimée durant le développement des neurones (Fink, 2003). Elle diffère de la sous-forme α par son site de

liaison à l'actine filamenteuse (voir la Figure 2) et son activité d'assemblage et de stabilisation des filaments d'actine entre eux (un mécanisme appelé *F-actin bundling*). Ce site additionnel présent sur l'isoforme β est retrouvé tout près du site autoinhibiteur (Voir figure 2). Par conséquent, la liaison de l'enzyme aux microfilaments d'actine est rompue en présence de calmoduline activée. La liaison de la β au cours du développement est contrôlée par l'expression de variantes d'épissage, soit la CaMKII β^{\prime} , β_e et β_e' (O'Leary, 2006). Ces variantes présentent des degrés d'activité et de liaison à l'actine différents. La CaMKII β régule l'extension des neurites et la formation des synapses durant les deux premières semaines du développement. Elle augmente notamment la mobilité des filopodes dendritiques et le nombre de synapses lors de la première semaine de développement. La liaison de la CaMKII β à l'actine est nécessaire à cette activité (Fink et al. 2003). Récemment, il a été montré que cette activité de l'enzyme au niveau de l'actine filamenteuse de la synapse est essentielle au maintien de la structure synaptique (Okamoto et al. 2007). Il est également probable que la CaMKII β joue un rôle important au niveau de l'actine du cône de croissance.

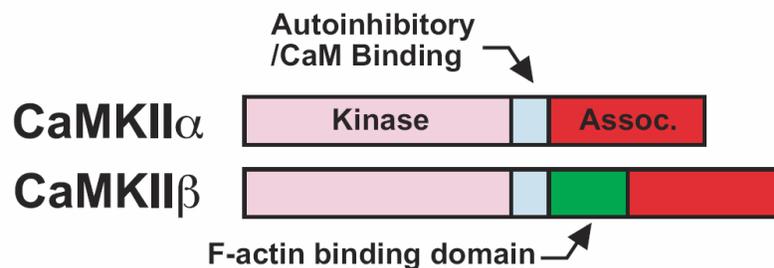


Figure 2 : Structures primaires de la CaMKII α et de la CaMKII β

La CaMKII β possède un domaine de liaison à la F-actine (en vert) situé entre le domaine d'auto-association et le domaine autoinhibiteur. (Okamoto et al., 2007)

1.2 Rôles de la CaMKII durant le développement

Il est connu depuis l'étude chez les neurones spinaux de *Xenopus* de James Q. Zheng et Mu-Ming Poo en 1994 que la CaMKII peut jouer un rôle dans le guidage du cône de croissance en détectant des variations de calcium intracellulaire en réponse à des neurotransmetteurs. Le mécanisme exact est encore mal connu, bien que Wen et ses collaborateurs aient caractérisé la réponse calcique de la CaMKII dans le cône de croissance en 2004. Dans cette étude, elle aussi réalisée chez le xénope, ils ont montré à partir de désencagement (uncaging) de cages de calcium comment différents niveaux de Ca²⁺ affectent la croissance du cône en activant préférentiellement la CaMKII ou la calcineurine (CaN) et la phosphatase-1 (PP1). Cependant, il n'est pas clair dans la littérature quelle variété de CaMKII est impliquée dans le guidage de l'axone et quels sont les rôles de la CaMKII dans le développement. Plusieurs articles ont été écrits au sujet de l'importance de l'enzyme dans le développement, mais la diversité des méthodes, des modèles animaux utilisés et l'utilisation de protocoles ne pouvant isoler l'une ou l'autre des isoformes nuisent à l'interprétation.

Il est clair malgré la non spécificité de certains inhibiteurs utilisés que la CaMKII est impliquée dans une certaine mesure dans l'attraction du cône de croissance. Ainsi, Mu-Ming Poo a montré dans son étude de guidage du cône au moyen d'un gradient créé par une pipette qu'un inhibiteur de la CaMKII, le KN62, pouvait bloquer l'attraction du cône de croissance à l'acétylcholine. Depuis, il a été observé que le KN62 peut inhiber d'autres CaMK, soit la CaMKI et CaMKIV (Hidaka, 1996). Un autre inhibiteur pensé spécifique jusqu'à tout récemment, le KN93 (et son analogue KN92, presque inactif), a été couramment utilisé pour étudier les rôles de la CaMKII mais inhibe également les CaMKI et CaMKIV (Enslin et al, 1994). L'étude du guidage par désencagement de calcium (Wen et al., 2004) mentionnée plus haut a utilisé le KN93 pour mettre en évidence l'action de la CaMKII et a confirmé ce résultat à l'aide d'un inhibiteur spécifique de la CaMKII, myr-AIP. Finalement, puisque le xénope n'exprime pas la CaMKII α , les études réalisées chez cette grenouille montrent principalement l'activité de la CaMKII β et de ses variantes d'épissage (et possiblement l'activité des isoformes de

CaMKII γ et δ). Ainsi, bien qu'il soit montré que la CaMKII β participe au guidage axonal, le rôle de la CaMKII α n'est pas clair.

Les rôles de la CaMKII durant le développement sont moins évidents. D'abord, la surexpression de la CaMKII augmente la longueur des neurites dans les neuroblastomes, mais limite la croissance de ceux-ci dans les cellules PC12 et dans les neurones rétino-tectaux de *Xenopus* (Wayman et al., 2004). L'inhibition de la CaMKII par le KN93 réduit la longueur des neurites dans les neurones PC19 (Easley et al., 2006). Tel que mentionné plus haut, lorsqu'on surexprime la CaMKII β , mais pas la α , on augmente l'arborisation dendritique, et l'inhibition spécifique de la CaMKII β seulement provoque l'effet contraire dans les cultures d'hippocampe de rat (Fink et al, 2003). De plus, l'inhibition de la CaMKII par le KN62 ou AIP2, un inhibiteur prétendument spécifique (Tang et Kalil, 2005), réduit la croissance et l'arborisation de l'axone du neurone cortical du hamster (Idem, 2005). Le KN62 a également entraîné une réduction de la croissance des neurites dans le neurone du ganglion de la racine dorsale de la souris (Arie et al., 2008). Cependant, on rapporte également que la surexpression de la CaMKII dans les neurones d'hippocampe de rat ne modifie pas la croissance de l'axone et que l'inhibition de la CaMKII par son inhibiteur naturel, la *CaMKIIN*, ne réduit pas la croissance axonale (Wayman et al., 2004). Finalement, l'étude de Fink et al. a montré que la quantité de synapses formées au cours du développement est proportionnelle à la quantité de CaMKII β , qui contrôle aussi la mobilité des filopodes dendritiques.

Certains de ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par le fait qu'ils proviennent de modèles différents, puisque le développement neural peut changer d'un organisme à un autre. De plus, l'âge des cultures peut avoir une grande influence sur l'expression des protéines et leur activité. Par exemple, il existe plusieurs variantes d'épissage de la CaMKII β dont l'expression plus ou moins tardive peut changer l'activité observée de la CaMKII. Finalement, il est étonnant de constater que certains inhibiteurs ont des effets différents sur la liaison de la CaMKII au cytosquelette, ainsi le KN93 pourrait ne pas nuire à l'activité de la CaMKII β sur l'actine alors que le *knockdown* de l'enzyme, lui, aurait un effet important sur la dynamique de l'actine. Il est donc probablement plus sage de tenter de reproduire les résultats des études d'inhibition avant

d'entreprendre toute interprétation de l'effet de la CaMKII dans le développement d'un modèle particulier.

1.3 Activité de la CaMKII dans l'épine dendritique

La CaMKII est une des protéines les plus abondantes et les plus importantes de la densité postsynaptique (PSD). Elle est particulièrement importante dans la régulation des synapses glutamatergiques où elle détecte les entrées de calcium des récepteurs NMDA et interagit avec les récepteurs AMPA pour permettre l'établissement et le maintien de la LTP. La CaMKII α est l'isoforme la plus importante pour la LTP, mais la CaMKII β joue également plusieurs rôles, dont celui d'ancrer les hétéromères de CaMKII à l'actine et de stabiliser l'actine de l'épine.

Il est bien établi qu'une hausse de l'activité de la CaMKII augmente la quantité et la force des récepteurs AMPA à la synapse (Hayashi et al., 2000; Lisman et al., 2002; Opazo et al., 2010). Comment la CaMKII parvient-elle à provoquer ces changements? D'abord, la CaMKII peut phosphoryler la Ser831 de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA, et provoquer une augmentation de la conductance de 50% des canaux AMPA (Lisman et al., 2002). Ensuite, la CaMKII peut également augmenter la quantité de récepteurs AMPA en provoquant le *trapping* à la synapse des récepteurs diffusants à la membrane. En effet, la CaMKII phosphoryle la sous-unité auxiliaire Stargazin ce qui provoque l'arrêt de la diffusion du récepteur à la synapse et ainsi le recrutement synaptique de nouveaux récepteurs AMPA (Opazo et al., 2010).

Lors de la stimulation d'une épine, l'entrée de calcium par les récepteurs NMDA active la CaMKII, qui peut se lier à la queue cytoplasmique de la sous-unité NR2B du récepteur. Cette liaison permet de conserver une fraction de l'enzyme ayant translocalisé à la synapse (Bayer et al., 2006), et ce, sous sa forme active (Bayer et al., 2001), le segment cytoplasmique de la queue NR2B ressemblant fortement au domaine autoinhibiteur de la CaMKII. La CaMKII peut également lier la sous-unité NR1, particulièrement lorsqu'elle est autophosphorylée (Lisman et al., 2002). La CaMKII joue également un rôle important dans la livraison du récepteur NMDA en phosphorylant la kinésine KIF17, ce qui rompt la liaison entre KIF17 et la protéine Mint1, qui est chargée

de transporter les vésicules contenant les sous-unités NR2B (Guillaud et al., 2008). La CaMKII pourrait donc être impliquée dans la livraison locale de récepteurs NMDA à la synapse, mais il est encore inconnu si la CaMKII phosphoryle KIF17 directement sous la synapse où bien au niveau de sites extra-synaptiques. Les observations réalisées dans le laboratoire du Dr. De Koninck de la translocalisation de la CaMKII au niveau des microtubules sous l'épine pendant certaines stimulations permettent de croire que les récepteurs NMDA pourraient être livrés localement à l'épine, mais ne nous le confirment pas hors de tout doute.

Finalement, la CaMKII β , mais pas la CaMKII α , est nécessaire au maintien de la structure de l'épine grâce à sa liaison et à sa stabilisation de l'actine de l'épine (Okamoto et al., 2007). Cette activité est indépendante de l'activité ou de la présence du domaine kinase de la CaMKII β ; seuls les domaines d'association et de liaison à la F-actine sont essentiels (Idem). La CaMKII β pourrait permettre une régulation temporaire du réseau d'actine pendant une forte activité. Ainsi, puisque le domaine de liaison à l'actine de la CaMKII β est voisin du domaine de liaison à la calmoduline, une entrée de calcium suffisante par les récepteurs NMDA permet de séparer la CaMKII β de l'actine. Pendant cette séparation, l'actine pourrait être modifiée et réorganisée, jusqu'à ce que la baisse de calcium provoque le retour de la CaMKII β à l'actine.

1.4 Fonction et structure du cône de croissance

Le cône de croissance est une structure complexe retrouvée au bout de l'axone en croissance et dotée d'un cytosquelette dynamique qui sonde la matrice extra-cellulaire à la recherche d'un autre neurone pour se connecter. Le guidage du cône de croissance est assuré par des gradients de molécules chimiques qui agissent en attirant ou en repoussant le cône. Un des impacts de la réception de ces signaux contradictoires dans le cône est une variation constante de la concentration de calcium dans le cône de croissance. Ces vagues de Ca^{2+} , qu'elles soient déclenchées par le relâchement de *stores* intracellulaires ou par une entrée d'ions retrouvés dans le milieu extérieur, provoquent une réorganisation des différents éléments du cytosquelette du cône.

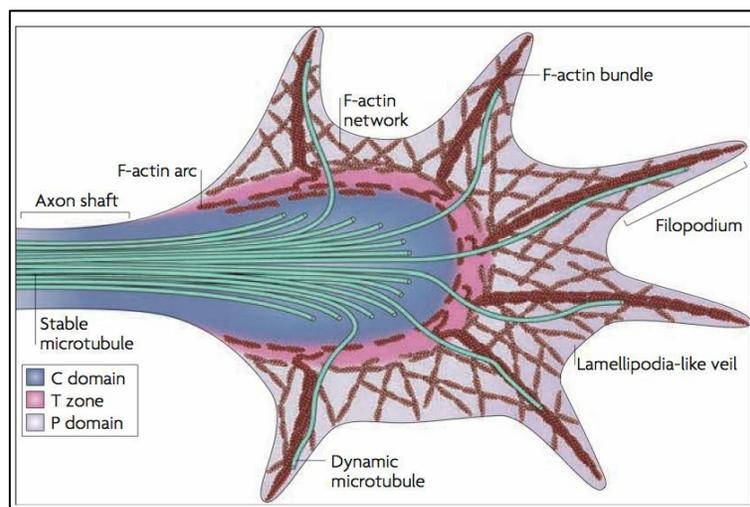


Figure 3: Structure du cône de croissance

Les trois régions du cône de croissance, le domaine C, comportant les microtubules provenant de l'axone et la partie centrale du cône, la zone T, qui représente la transition entre les deux domaines du cône et où se retrouve les arcs d'actine, et le domaine P, qui est formée d'actine assemblée en fibres, les filopodes, ou sous la forme de voile, le lamellipode. (Lowery and Van Vactor, 2009)

Le cône de croissance doit parcourir de grandes distances pour arriver à destination. Le mouvement du cône de croissance se fait au niveau de la matrice extracellulaire, dans laquelle on retrouve des protéines d'adhésion telles que la laminine et la fibronectine, ainsi qu'au niveau de la surface des neurones eux-mêmes, en se laissant guider par des protéines d'adhésion cellulaire (CAMs). Ces protéines adhésives, qui peuvent modifier la signalisation interne du cône de croissance, forment un substrat stable sur lequel le cône

peut se déplacer. De nombreuses molécules retrouvées sous forme de gradients sécrétés par certains neurones dans le milieu externe peuvent également changer la course de l'axone en l'attirant ou en le repoussant. Ces molécules de signalisation comprennent des neurotransmetteurs (le glutamate et le GABA, par exemple) ainsi que des facteurs de croissance (le NGF, la nétrine, les sémaphorines, etc.).

L'organisation complexe du cône de croissance est nécessaire à son fonctionnement. D'abord, le domaine périphérique (*P domain*) est composé principalement d'actine filamenteuse assemblée (*F-actin bundles*) qui forme la base des filopodes et d'un réseau d'actine filamenteuse sous la forme d'un lamellipode (*lamellipodia-like veil*). On retrouve également des microtubules dynamiques qui sondent le domaine périphérique en se polymérisant le long des fibres d'actine filamenteuse. Le comportement de ces microtubules est appelé l'«instabilité dynamique», ce qui réfère à la coexistence de polymérisation et de dépolymérisation à l'extrémité (+) du microtubule. Le domaine central (*C domain*) comporte de nombreux microtubules assemblés et stables provenant de l'axone lui-même. Ce domaine comprend également de nombreux organites et vésicules compris dans un volume beaucoup plus grand que le domaine périphérique. Finalement, la zone de transition (*T zone*) est située à la limite des domaines C et P, où se trouve un assemblage d'actine et de myosine sous la forme d'arcs d'actine positionnés perpendiculairement aux filaments d'actine du domaine périphérique (voir figure 3).

1.5 Le mouvement du cône de croissance

Le cône de croissance avance et tourne grâce à son cytosquelette. La progression du cône de croissance dans le milieu externe se fait en trois étapes : la protrusion, pendant laquelle les filopodes et le lamellipode (le domaine P) avancent sur le substrat, l'engorgement, lors duquel le domaine C rattrape le domaine P, et la consolidation, soit la contraction des arcs d'actine du domaine T sur les microtubules du domaine C et la rétraction des filopodes laissés derrière. Globalement, l'actine du cône fournit la force nécessaire à l'avancée du cône, alors que les microtubules permettent de stabiliser le cône et de le faire tourner. Les interactions entre les filaments d'actine et les microtubules sont indispensables à la mobilité du cône de croissance (Rodriguez et al., 2003).

1.5.1 L'actine, muscle du cône de croissance

D'abord, la mobilité de la membrane plasmique du cône est assurée par la polymérisation de l'actine. Le flux rétrograde de l'actine dans le cône de croissance (le mouvement continu de l'actine à partir de la membrane plasmique à l'avant jusqu'au centre) ainsi que la polymérisation en « tapis roulant » (des sous-unités d'actine filamenteuse sont ajoutées à l'avant alors que d'autres sont retirées à l'arrière de la fibre d'actine) permettent de fournir la force nécessaire à l'avancée du cône. Le mouvement rétrograde de l'actine provient à la fois de la polymérisation de l'actine dans le domaine P du cône, et de l'activité de la protéine motrice myosine II, retrouvée au niveau de la zone de transition du cône. L'activité de la myosine II dans la zone T provoque la compression et la flexion des fibres de F-actine du domaine P ainsi que leur rupture éventuelle au niveau proximal. Les molécules de F-actine libérées peuvent diffuser ou être transportées à la périphérie pour être recyclées dans un nouveau filament d'actine.

On s'est longtemps demandé comment le cône parvient à utiliser le mouvement rétrograde de l'actine pour avancer dans le milieu externe. L'hypothèse acceptée aujourd'hui est celle de l'embrayage moléculaire [*molecular clutch*] (Mitchison et Kirschner, 1988), qui suggère que des récepteurs à la surface du cône se fixent temporairement au substrat et forment un complexe qui permet de coupler la force du cytosquelette d'actine au milieu externe. Cette liaison préviendrait le recul de l'actine dans le cône et transférerait le mouvement à la membrane plasmique du cône, la faisant progresser vers l'avant.

1.5.2 Les microtubules pour tourner

Les microtubules sont indispensables à la croissance du cône et à ses changements de direction. Les microtubules du domaine central sont responsables de stabiliser et de faire tourner le cône, alors que les microtubules qui polymérisent vers le domaine P jouent le rôle de senseurs. Il est connu que l'inhibition des dynamiques des microtubules par des drogues prévient l'attraction et la répulsion du cône, et plus intéressant encore, que la stabilisation locale des microtubules provoque le virage du cône (Buck et Zheng, 2002). Avant l'avancée et la protrusion du cône, des microtubules individuels explorent constamment le domaine périphérique en polymérisant selon leur propriété d'instabilité

dynamique. L'arrivée d'un signal attractif attire un plus grand nombre de ces microtubules. Les microtubules qui envahissent ainsi la périphérie peuvent transporter différents composants importants dans le virage et provoquer une accumulation localisée aux sites d'adhésion de certaines protéines, dont des kinases actives de la famille des Src, nécessaires à l'attraction. Lors de la deuxième étape de l'avancée du cône, l'engorgement, des microtubules stables du domaine central progressent dans la direction de la croissance. La consolidation de cette avancée se produit derrière cette croissance et stabilise les microtubules du segment de l'axone.

1.5.3 Les interactions entre l'actine et les microtubules

Pour que les microtubules et les filaments d'actine puissent jouer leurs rôles dans le cône de croissance, ils doivent pouvoir interagir entre eux. De récentes études réalisées en imagerie en temps réel montrent que le rôle des dynamiques de l'actine serait de fournir un guidage spatiotemporel des microtubules. Également, l'actine joue un rôle dans la localisation des microtubules en empêchant leur pénétration précoce dans le domaine périphérique tout en leur fournissant des « rails » sur lesquels ils polymérisent. Il existe donc deux principales interactions entre l'actine et les microtubules dans le cône de croissance : d'abord, dans le domaine P entre les microtubules et les filaments de F-actine et ensuite, dans le domaine C au niveau des microtubules centraux et des arcs d'actine de la zone T.

Les microtubules qui explorent le domaine P du cône polymérisent préférentiellement le long des filaments d'actine. Cependant, de récentes études ont montré que cette liaison aux filaments d'actine n'est pas nécessaire (Burnette et al., 2007), et que le couplage de ces deux éléments du cytosquelette (par le biais de protéines de liaison) peut empêcher l'invasion des microtubules dans la périphérie du cône. Puisque le couplage des microtubules au flux rétrograde d'actine influence leur polymérisation, il est probable que la régulation des interactions actine-MTs soit importante dans les dynamiques des microtubules. En effet, il a été montré qu'un découplage plus élevé entre les filaments d'actine et les MTs provoque une augmentation de la quantité de microtubules qui polymérisent dans le domaine P (Lee et al., 2008), ce qui pourrait être causé par un facteur attractif et provoquer l'attraction du cône de

croissance (Lowery et Van Vactor, 2009). De plus, il arrive que des facteurs répulsifs augmentent la force du couplage et réduisent la pénétration des microtubules, forçant les microtubules à former une boucle dans le domaine C (Lowery et Van Vactor, 2009).

Il est intéressant de noter que les filaments d'actine ne sont pas nécessaires à la progression des MTs centraux. Il y aurait donc un autre mécanisme impliqué, contrairement aux microtubules dans le domaine P qui sont principalement dirigés par les filaments d'actine. Il est probable que les microtubules du domaine C sont régulés par le réseau d'actine du cône ainsi que les arcs d'actine de la zone T. Des études ont montré qu'interférer avec la formation des arcs d'actine nuit à la consolidation des microtubules lors de la croissance axonale, ce qui mène à un domaine C beaucoup plus grand que la normale. Les arcs d'actine empêchent la pénétration des microtubules dans le domaine périphérique en les capturant et en les transportant vers le domaine central. La myosine II joue un rôle important dans ce transport de microtubules (Burnette et al., 2008). Elle comprime et stabilise les microtubules dans les côtés du domaine C, ce qui permet aux MTs d'interagir avec des MAPs (*Microtubule-associated proteins*). La myosine II peut également inhiber la protrusion de la F-actine, pour permettre la consolidation du segment de l'axone.

Quelles molécules pourraient réguler l'association entre les filaments d'actine et les microtubules? Quelques protéines sont connues pour lier à la fois l'actine et les microtubules, mais leur fonction est mal comprise. Des MAPs telles que MAP1B et MAP2 peuvent lier l'actine et sont régulées par la phosphorylation, et seraient donc de très bonnes cibles en aval de la réception des signaux externes afin de réguler le couplage actine-microtubules (Rodriguez et al., 2003; Lowery et Van Vactor, 2009). Fait intéressant, la phosphorylation de MAP2 par la CaMKII pourrait inhiber la liaison de MAP2 à l'actine (Yamauchi et Fujisawa, 1988). Des protéines liant le bout des microtubules telles que EB1 et EB3 pourraient également être impliquées, en particulier EB3 qui interagit directement avec la protéine associée à l'actine *drebrin* (Geraldo et al., 2008).

Il est possible que la CaMKII puisse être impliquée dans ces interactions, en sautant de l'actine à des protéines associées aux microtubules et ainsi de suite, selon les variations de calcium dans le cône. Un tel mouvement pourrait permettre d'expliquer le rôle de la CaMKII dans le virage du cône, où elle jouerait donc un rôle hybride entre le structurel et l'enzymatique. Voyons comment le calcium varie dans le cône et comment ces variations pourraient supporter les fonctions de la CaMKII.

1.6 Signalisation calcique du cône de croissance

Le calcium est un messager intracellulaire universel; il participe à la régulation de nombreux processus cellulaires en jouant sur un grand nombre de protéines. Le calcium provoque des changements variés et importants dans le guidage et la morphologie du cône. De nombreuses protéines décodant les variations de calcium ont été identifiées, mais plusieurs effets du calcium sont encore mal compris. Les effets des variations de calcium dans le cône dépendent grandement de la quantité de calcium, de sa provenance, de sa localisation et de ses variations dans le temps. Par exemple, de larges augmentations de calcium dans le cône de croissance provoquées par des neurotransmetteurs ou de la dépolarisation peuvent entraîner l'effondrement du cône. De plus, réduire significativement le calcium du cône en retirant, par exemple, le calcium du milieu externe peut avoir le même effet (Goldberg, 1999). Dans un même ordre d'idée, de faibles augmentations locales de calcium provoquent la répulsion du cône, de même que de fortes augmentations, alors que des variations intermédiaires provoquent une attraction.

L'attraction vers certains signaux chimiques tels que le NGF, le BDNF et la nétrine-1 fait intervenir une réponse calcique dans le cône (Gomez et al., 2006). Lors de la réponse à ces facteurs de croissance, il se forme un gradient de calcium à l'intérieur du cône, la concentration augmentant en direction de la molécule attractive. Certains facteurs répulsifs, par exemple la glycoprotéine associée à la myéline (MAG, *myelin-associated glycoprotein*), provoquent également une élévation de calcium interne en direction du gradient répulsif (Gomez et al., 2006). Cependant, cette élévation est plus faible dans les cas de répulsion, ce qui suggère que la pente de la variation de calcium

joue un rôle dans la réponse du cône. La quantité de calcium cytosolique dans le cône peut également influencer la réponse à ces augmentations.

Ces signaux chimiques peuvent modifier le calcium dans le cône en provoquant l'ouverture de canaux de la membrane plasmique ou le relâchement de calcium contenu dans les stores intracellulaires. Les canaux calciques dépendants du voltage (*Voltage-operated calcium channels*, VOCCs) sont répandus dans le cône et bien connus pour leurs rôles dans le développement et dans le guidage du cône de croissance. Leur ouverture lors de la dépolarisation est généralisée et provoque un pic global de calcium dans le cône. En revanche, l'activation de récepteurs spécifiques ou de cascades intracellulaires provoquant le relâchement des stores intracellulaires peut entraîner une entrée ou un relâchement local de calcium. D'autres canaux calciques dont l'activité ne dépend pas du voltage sont également présents sur le cône et contrôleraient en partie les oscillations calciques spontanées et les entrées de calcium dans les filopodes (Gomez, 2006).

1.6.1 Cibles du calcium interne

Il existe de nombreuses cibles du calcium dans le cône qui régulent la croissance de l'axone. Par exemple, le calcium régule de nombreuses protéines impliquées dans les dynamiques des filaments d'actine telles que les petites GTPases de la famille Rho, ainsi que des protéines de la famille des myosines qui sont impliquées dans le flux rétrograde de l'actine, la formation d'un site d'adhésion et dans le trafic des vésicules. Le calcium peut également réguler localement la synthèse de protéines et jouer un rôle dans le guidage du cône de croissance, tel que dans le cas de la β -actine, dont l'ARN messager traduit localement joue un rôle dans le virage du cône (Yao, 2006). D'autres cibles importantes du calcium incluent les phosphatases et les kinases calcium/calmoduline dépendantes telles que la calcinerine (CaN) et la CaMKII (Wen et al., 2004). Des protéases dépendantes du calcium telles que calpain sont impliquées dans diverses réactions dont la répulsion du cône de croissance suite à des hausses locales de calcium dans les filopodes (Gomez et Zheng, 2006).

L'activation de différentes voies selon la provenance et la quantité de calcium permet d'expliquer la grande variété de réponses possibles du cône au calcium. Par exemple, il semble exister trois types de signaux calciques locaux. Les petites et les grandes augmentations de calcium provoquent la répulsion alors que les augmentations plus modestes entraînent l'attraction du cône. Ce comportement peut être expliqué par l'activation de différentes kinases et phosphatases selon le niveau de calcium. Ainsi, la CaMKII est impliquée dans la réponse attractive du cône suite à une hausse intermédiaire de calcium. La CaN est impliquée dans la répulsion du cône suite à de faibles augmentations de calcium. Elle agit en déphosphorylant et en activant une autre phosphatase, la protéine phosphatase 1 (PP1). Puisque la CaN réagit à des concentrations de calcium plus faibles que la CaMKII, ces deux protéines agissent pour former un système binaire en réaction au calcium: les faibles quantités de calcium activent la voie CaN-PP1 et entraîne la répulsion alors que les plus fortes quantités activent préférentiellement la CaMKII et provoquent l'attraction du cône (Wen et al., 2004).

Ainsi, il existe de nombreuses molécules modifiant le calcium dans le cône qui provoquent différentes variations de calcium activant un vaste éventail de protéines dont la CaMKII. Nous savons donc que la CaMKII provoque l'attraction du cône lors de certaines conditions calciques, mais nous ne connaissons pas le contour temporel ni la localisation de ces variations de calcium. Pourraient-elles consister en des oscillations locales provoquant un déplacement de la CaMKII sur le cytosquelette? De façon intéressante, la CaMKII δ , qui est la CaMKII importante dans le cône de croissance, possède une sensibilité au calcium bien supérieure à la CaMKII α , et est ainsi activée par une quantité de calcium beaucoup plus faible, ce qui lui permettrait de mieux réagir à des petites variations telles que celles observées dans le cône de croissance.

1.7 Le cytosquelette de l'épine dendritique

L'épine dendritique est un centre majeur de communication entre les neurones. Elle est composée d'une multitude de protéines et joue de nombreux rôles dans l'apprentissage et la mémoire. La structure de l'épine dépend grandement de son réseau de fibres d'actine et a une influence importante sur sa fonction. Jusqu'à tout récemment, on pensait ce réseau d'actine beaucoup moins complexe qu'il ne l'est en réalité. Des articles récents montrent également que les microtubules, qu'on considérait limités à la dendrite, peuvent envahir l'épine de concert avec les fibres d'actine et modifier la structure de l'épine. Les nouvelles techniques de microscopie à haute résolution ont beaucoup fait avancer nos connaissances au sujet du cytosquelette de l'épine, mais elles sont très récentes et beaucoup de travail reste à faire.

1.7.1 Rôles de l'actine

L'épine dendritique possède un réseau d'actine qui maintient la structure de l'épine et supporte une grande diversité de protéines. Ce réseau est composé principalement de F-actine, ou actine filamenteuse, organisée en fibres ramifiées et croisées dont le bout barbelé (*barbed end*) polymérise en direction de la membrane plasmique. Il est intéressant de noter que l'organisation de l'actine dans les filopodes dendritiques est différente de celle des filopodes du cône de croissance. Ainsi, plutôt que d'être formé de fibres d'actine parallèles, le filopode dendritique est formé d'un réseau mixte d'actine linéaire et ramifiée (Korobova and Svitkina, 2010). De plus, il a été observé en microscopie électronique que l'actine du cou de l'épine pouvait s'entremêler avec les microtubules de la dendrite (Korobova and Svitkina, 2010).

Il existe trois populations d'actine dans l'épine. La première polymérise rapidement près du bout de l'épine et se déplace vers l'arrière d'une façon similaire à l'actine du cône de croissance, mais plus lentement. La deuxième population d'actine est relativement plus stable et se retrouve à la base de l'épine, où elle varie selon la taille de l'épine. Finalement, il existe une population libre qui est nécessaire au grossissement de l'épine. Il a été montré que les filaments d'actine de l'épine se déplacent selon un mouvement rétrograde à partir de la périphérie vers le centre de l'épine, soit à l'endroit où la tête de l'épine rencontre son cou. De plus, la nouvelle technique de microscopie PALM

(*photoactivated localization microscopy*) a permis de montrer que la polymérisation de l'actine est plus forte dans la densité postsynaptique (PSD), sauf près des zones où il se produit de l'endocytose fréquente, et que la stabilité de la PSD serait assurée en partie par la polymérisation de l'actine (Frost et al., 2010).

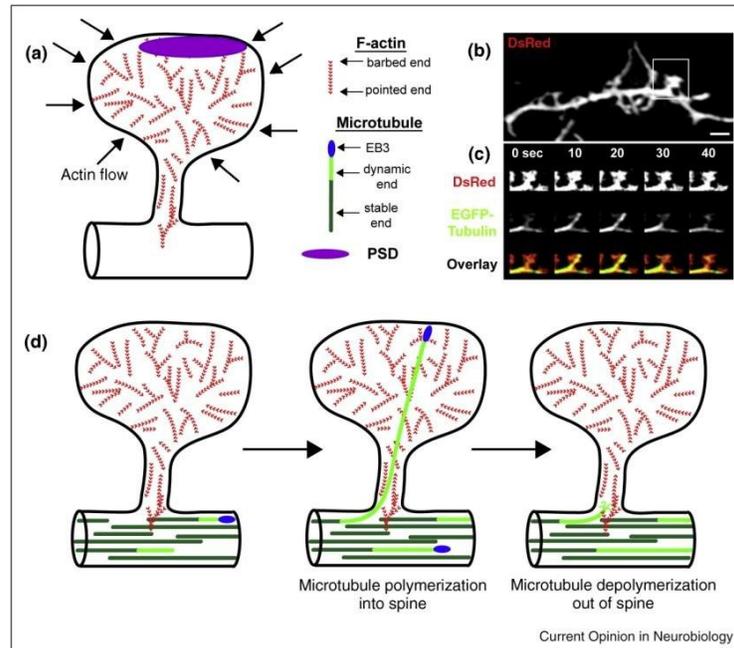


Figure 4: Modèle du cytosquelette de l'épine dendritique

(a) Modèle d'une épine dendritique montrant l'organisation des filaments d'actine dans l'épine dendritique. L'actine polymérise de la membrane vers le centre de l'épine. (b) Image d'un dendrite d'un neurone d'hippocampe de rat transfecté avec EGFP-Tubuline et DsRed. (c) Images de l'épine encadrée en (b) montrant l'entrée et la sortie d'un microtubule, ce qui dure ici environ 40sec. (d) Modèle de l'entrée d'un microtubule dans l'épine. La polymérisation se produit au bout du microtubule, où se trouve la protéine EB3. (Dent et al., 2011)

1.7.2 Microtubules dans l'épine

Les premières études qui suggéraient un rôle des microtubules dans l'épine datent du début des années 80. Grâce à la microscopie électronique, Gray et Westrum ont montré la présence de microtubules dans les épines dendritiques, parfois jusque dans la densité postsynaptique. Cependant, ces résultats avaient été remis en question vu les conditions d'expérimentation non conventionnelles (les tissus étaient disséqués dans une solution

hypotonique contenant 20% d'albumine sérum bovin) ainsi que la présence d'autres études aux conclusions négatives.

La vaste majorité des études du cytosquelette de l'épine depuis les années 80 n'observaient pas la présence de microtubules dans l'épine. Il est possible que ce soit dû à la faible fréquence du phénomène ainsi qu'à l'utilisation de techniques d'imagerie par fluorescence dont la résolution temporelle et spatiale était insuffisante. Cependant, trois études récentes indépendantes ont montré l'invasion des épines dendritiques par les microtubules dans les cultures d'hippocampe (Hu et al., 2008; Jaworski et al., 2009; Gu et Zheng, 2009;). L'équipe de Hu et ses collaborateurs ont réussi à résoudre certains des problèmes d'imagerie rencontrés dans l'observation des microtubules dans les épines en utilisant un microscope à réflexion totale interne (*TIRF*). En prenant des images fréquentes de neurones transfectés par un plasmide *EGFP-Tubulin*, ils sont parvenus à montrer que seulement une petite fraction (~1%) des épines était envahie par un microtubule, et que cette invasion était d'une durée limitée variable (de 20 secondes jusqu'à près de 30 minutes). De plus, ils ont montré que des microtubules pénétraient dans environ 10% des protrusions sur une durée d'une heure. Il n'est cependant pas encore connu si certaines épines reçoivent plus d'entrées que d'autres, ou si au courant d'une journée la plupart des épines reçoivent la visite d'un microtubule. Finalement, le phénomène a été observé dans des cultures d'hippocampe relativement vieilles (DIV63), suggérant que l'invasion des épines par les microtubules jouerait un rôle important dans le maintien et la régulation de la structure synaptique (Dent et al., 2011).

Il a également été montré par ces mêmes équipes, mais à partir de protocoles différents, que l'entrée des microtubules dans les épines dendritiques dépendait de l'activité synaptique, et que ce phénomène serait relié à la plasticité synaptique et à la formation des synapses. D'abord, Jiaping Gu et al. ont stimulé des cultures d'hippocampe avec du BDNF et ont observé une augmentation de la densité d'épine sur les dendrites. De plus, ils ont montré que la stabilisation pharmacologique des microtubules augmentait davantage la densité des épines, alors que l'inhibition pharmacologique des dynamiques de microtubules avait l'effet contraire. Finalement, le knock-down par shRNA de la protéine EB3 provoquait aussi une diminution de la densité des épines. Cependant,

l'étude réalisée par Jaworski et ses collègues ne montrait pas de différences dans la densité des épines avec les traitements pharmacologiques. Également, le traitement d'EB3 par shRNA de l'équipe de Jaworski montrait une augmentation de la quantité de filopodes dendritiques par rapport au nombre d'épines, plutôt qu'une simple réduction dans la densité d'épine. La surexpression de la protéine EB3 montrait l'effet contraire: une augmentation de la quantité d'épines par rapport aux filopodes. Finalement, le groupe de Xindao Hu et Erik Dent a observé en 2008 une augmentation de la présence de microtubules dans les épines lors de dépolarisations répétées avec une solution de KCl. De plus, cette augmentation était dépendante des potentiels d'action, puisqu'elle était inhibée par l'ajout de TTX.

Ainsi, il a été montré de plusieurs façons que les microtubules entrent dans les épines de façon spontanée et également de manière dépendante de l'activité, que ces entrées ont des conséquences morphologiques sur les épines et qu'elles continuent de se produire après le développement. Cependant, on ne connaît ni le mécanisme permettant ou provoquant l'entrée des microtubules ni leur fonction (autre provoquer des changements morphologiques et permettre la maturation des épines). Comment est-ce qu'un microtubule peut partir du segment d'une dendrite et polymériser vers l'épine? Il est probable qu'ils arrivent à polymériser dans le cou de l'épine grâce aux filaments du réseau d'actine et de protéines associées à l'actine, tel que dans le cytosquelette du cône de croissance. Quels pourraient être leurs rôles? Possiblement celui de transporter du matériel de façon spécifique et directe à une épine, puisque les microtubules dendritiques constituent le support principal pour le transport de matériel cellulaire dans le neurone. Puisque le transport par les kinésines et dynéines est plusieurs fois plus rapide que la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules, il serait possible pour le neurone d'effectuer la livraison spécifique de matériel durant la très courte présence d'un microtubule dans une épine (Dent et al., 2011). La livraison de matériel à l'épine par des protéines motrices a déjà été observée dans le cas de la livraison des récepteurs AMPA par la myosine (Correia et al., 2008). Finalement, le simple fait que les microtubules demeurent dynamiques tout au long de la vie du neurone suggère qu'il s'agit d'un phénomène important dans la régulation et le remodelage synaptique.

1.8 Questions et hypothèses

La CaMKII se retrouve dans une position charnière dans l'épine synaptique et dans le cône de croissance, au niveau de l'actine et des microtubules, où elle est à même de se déplacer en réaction à l'activité des neurones pour jouer plusieurs rôles. Les rôles connus de la CaMKII ainsi que ceux récemment observés (la phosphorylation de KIF17 [Guillaud et al., 2008] et la localisation aux microtubules [résultats du laboratoire]) clarifient certaines questions et en soulèvent de nouvelles.

D'abord, est-ce que la translocalisation de la CaMKII aux microtubules sous l'épine dendritique joue un rôle dans la potentialisation de l'épine? On sait que la CaMKII est impliquée dans la livraison des récepteurs AMPA à l'épine, on peut donc imaginer qu'une forte accumulation de CaMKII sous une épine puisse être un signal important pour la livraison de récepteurs AMPA. De plus, est-ce que le déplacement de la CaMKII au niveau des microtubules dendritiques peut influencer les entrées de microtubules dans l'épine? Les entrées de microtubules sont contrôlées par l'activité pourraient être contrôlées par la CaMKII localisée aux microtubules.

Où se trouve la CaMKII β dans le cône de croissance? Il est probable qu'elle se trouve au niveau de l'actine en période de faible activité, et qu'une forte entrée de calcium la sépare des fibres d'actine et qu'elle lie ensuite des protéines associées aux microtubules. On peut également envisager que ce mouvement soit réversible, ce qui permettrait à la CaMKII d'osciller entre les différents éléments du cytosquelette selon l'activité et les variations de calcium. La CaMKII joue-t-elle un rôle structurel au niveau du cytosquelette dans le cône? Je m'attends à ce qu'une inhibition ou un *knockdown* de la CaMKII dans le cône provoque des changements structurels au niveau de l'actine. Est-ce que la liaison de la CaMKII β au cytosquelette du cône joue un rôle dans le guidage du cône de croissance? Il est fort possible que la capacité de la CaMKII de modifier la course de l'axone passe par sa liaison au cytosquelette, en stabilisant l'actine qui ne doit pas bouger et en phosphorylant des protéines associées au cytosquelette en période de forte activité.

Chapitre 2: Matériel et méthodes

2.1 Cultures dissociées d'hippocampe de rat

Les neurones utilisés proviennent d'hippocampes de rats disséqués de 1 à 3 jours après la naissance et mis en culture selon un protocole établi (Hudmon et al., 2005). Deux substrats différents ont été utilisés pour supporter les cellules, des lamelles de verre de 18 mm et des lamelles d'aclar de 12 mm. Les deux types de culture ont également supporté une densité différente de neurones, soit un million de cellules par lamelle de verre et 75 000 cellules par lamelle d'aclar.

Les cultures ont été utilisées à deux âges différents, soit de 2 à 5 jours après la mise en culture pour l'étude du développement des neurones et de 11 à 15 jours pour les études de plasticité synaptique et translocation de la CaMKII α .

2.2 Techniques de transfert de gène par lipofection

L'imagerie en temps réel des protéines qui m'intéressent dans le neurone et son cône de croissance nécessite l'expression de protéines fluorescentes. J'ai utilisé la technique de lipofection, qui consiste en une incubation d'environ 30 minutes d'un mélange d'un microgramme (μ g) des plasmides désirés par puits et quatre microlitres de Lipofectamine dilué dans le milieu de culture Neurobasal (Invitrogen). Ce mélange est ensuite introduit goutte à goutte dans le puits contenant la lamelle à transfecter. Préalablement, on prépare la plaque de transfert qui servira à terminer la transfection en mélangeant un millilitre de milieu usé à un millilitre de milieu neuf. Les lamelles sont transférées dans cette plaque après trois à cinq heures de transfection.

J'ai utilisé de nombreux plasmides codant pour différentes variétés de CaMKII (α ou β). Pour l'imagerie en temps réel, il a souvent été nécessaire de faire appel à plusieurs fluorophores pour une même expérience; j'ai donc utilisé des plasmides codant pour des CaMKII fusionnées à des protéines fluorescentes bien connues : GFP, mCherry, mRuby. J'ai également testé des mutants de CaMKII dont certains sites ont été mutés afin de mettre en évidence la contribution de ces sites. Pour les études d'inhibition par shRNA, j'ai transfecté les plasmides shRNA anti-CaMKII α et shRNA anti-CaMKII β , pour faire le

knockdown des différentes CaMKII, et les plasmides Rescue-CaMKII α et Rescue-CaMKII β , insensibles au shRNA. Pour marquer les cellules transfectées par ces plasmides, j'ai utilisé le plasmide Lifeact-mRuby ainsi que VAMP-SEP, un marqueur axonal spécifique.

Pour le marquage des neurones d'intérêt et du cytosquelette, j'ai transfecté des protéines associées au cytosquelette, des marqueurs du cytosquelette et des marqueurs de volume (des fluorophores inactifs). J'ai marqué l'actine du neurone et du cône de croissance grâce au peptide *Lifeact* (Riedl et al., 2008), fusionné à la mGFP ou la mRFP-Ruby. Ce peptide à la fine pointe de la biotechnologie permet d'obtenir un marquage clair sans interférer avec la polymérisation ou la stabilité de l'actine, contrairement aux anciennes techniques basées sur la transfection d'actine fluorescente ou l'ajout de drogues couplées à un fluorophore. Pour marquer les microtubules j'ai utilisé la protéine EB3 liée à la mGFP. La protéine EB3 fluorescente permet de marquer la croissance des microtubules en s'insérant au bout (+) des microtubules qui se polymérisent. Ce marquage a une apparence frappante de comètes lorsqu'observé dans le temps. Il permet aussi d'identifier les microtubules dendritiques individuels. Pour certaines analyses, j'ai utilisé des marqueurs neutres tels que la mGFP ou la mCherry. Ils se révèlent nécessaires pour éviter certains biais de sélection dans l'analyse ou pour tester un protocole d'analyse avec un contrôle négatif.

Lors d'une double transfection, il faut habituellement ajuster les quantités des deux plasmides utilisés pour obtenir un signal optimal dans les deux couleurs (tout en gardant la quantité d'ADN total égale à 0,5 ou 1 μ g par puits de 12 ou 18 mm de diamètre, respectivement). Par exemple, j'utilise un mélange 1:1 de la mGFP-CaMKII β et de Lifeact-mRFPRuby dans le cône de croissance alors que pour obtenir un bon signal de CaMKII dans la transfection mGFP-EB3 et mCherry-CaMKII α , un ratio de 1:7 est nécessaire. Le choix des fluorophores est également une science en soi, et j'ai souvent dû tester l'expression de deux colorations de CaMKII et des marqueurs de volume ou de cytosquelette pour arriver au meilleur signal. Le signal GFP est souvent le plus précis et le mieux exprimé et représente souvent le signal d'intérêt.

2.3 Immunocytochimie des cultures

La transfection n'est pas toujours la meilleure méthode pour marquer les protéines à observer. En transfectant, on surexprime une protéine qui interfère avec le fonctionnement naturel du neurone et dont la localisation peut différer de celle de la protéine endogène. De plus, certaines protéines ne peuvent être bien marquées par transfection. J'ai donc eu recours aux marquages immunocytochimiques pour identifier certaines protéines endogènes sur des neurones fixés.

La technique d'immunocytochimie nécessite de travailler avec des cultures fixées et requiert habituellement de perméabiliser les membranes pour permettre aux anticorps d'accéder aux protéines d'intérêt à l'intérieur du neurone. Certaines techniques de fixation permettent de perméabiliser tout en fixant (ex : Méthanol), mais elles altèrent parfois les épitopes des protéines suffisamment pour prévenir leur identification par l'anticorps. Afin d'obtenir de meilleurs marquages du cytosquelette, j'ai testé trois protocoles de fixation différents, 4% PFA, 100% Méthanol et 0,25% Glutaraldéhyde. Je n'ai finalement employé que la solution de fixation avec PFA.

Pour fixer les neurones, j'ai employé une solution à 4% de PFA (0.1M tampon phosphate, 4% sucrose, 2mM EGTA, pH 7.4) à 37°C. J'ai ensuite lavé les neurones une fois dans une solution PBS, puis deux fois dans une solution de PBS et de Glycine à 0,1M. J'ai perméabilisé les neurones pendant 30 minutes dans une solution de blocage (PBS, 2% sérum de chèvre, 0,05% Triton X-100). J'ai marqué les neurones pendant deux heures avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage (mouse anti- α CaMKII 1/500 (clone CB 2, Zymed), mouse anti- β CaMKII 1/500 (clone CB 1, Zymed), rabbit anti-tubulin 1/200 (Sigma), mouse anti-tubulin 1/500, rabbit anti-Neurofilament M 1/500 (Millipore)). Après trois rinçages de 10 minutes aux PBS, j'ai traité les neurones pendant 45 minutes avec les anticorps secondaires dilués (1/1000) dans la solution de blocage (goat anti-mouse Alexa 488 et anti-rabbit Alexa 546, par Molecular Probes). J'ai finalement rincé les lamelles à trois reprises dans le PBS, pour ensuite les monter dans du milieu de montage Prolong Gold Antifade (Molecular Probes) sur des lames de verres.

2.4 Imagerie des neurones

L'observation de la localisation de la CaMKII et de ses déplacements sur le cytosquelette nécessite l'utilisation de microscopes à haute résolution. J'ai fait la prise d'images sur tissus fixé grâce à un microscope de type confocal muni de laser, et j'ai fait l'acquisition des films de neurones grâce à un microscope inversé muni d'une lampe au Xénon et d'une caméra à haute-résolution.

2.4.1 Imagerie des neurones fixés

Pour l'imagerie des cellules fixées, j'utilise un microscope confocal à balayage laser (Confocal laser scanning microscope) de marque Zeiss et de modèle LSM 510 META. J'ai utilisé un objectif 63x/1.4 à l'huile pour toutes les acquisitions. Le système possède plusieurs lignes de laser contrôlées par le logiciel LSM 510 de Zeiss, un laser ARGON utilisé à la longueur d'onde 488 (pour exciter la GFP et l'Alexa 488), un laser HeNe1 émettant à la longueur d'onde 543 (pour exciter l'Alexa 546 ou les protéines fluorescentes mCherry et mRuby) et un laser HeNe2 à une longueur d'onde de 633 (pour l'Alexa 633).

2.4.2 Images en temps réel

J'ai réalisé l'imagerie des neurones vivants sur un microscope inversé Zeiss de modèle Axiovert 200M avec un objectif 63x/1.4 muni d'une lampe au Xénon. Les images sont acquises avec une caméra CoolSnap 1024x1024 ou Cascade 1K et traitées avec le logiciel MetaMorph Online 7. Pour observer les neurones sur ce microscope, la lamelle est introduite dans une chambre spécialisée chauffée et munie de supports solides pour la perfusion.

2.4.3 Acquisition

Lors de la prise d'images sur des cellules vivantes, il est important de s'assurer de limiter le photoblanchiment (*photobleaching*) des fluorophores. Le photoblanchiment est le phénomène encore mal compris de dégradation d'un fluorophore exposé à la lumière. Cette réaction peut entraîner la création de ROS (*reactive oxyde species*) et nuire à la fonction d'un neurone, même provoquer sa mort. Par exemple, un cône de croissance dans lequel on provoque un fort blanchiment d'un fluorophore réagit rapidement (parfois

en quelques minutes) en se contractant sur lui-même et en s'effondrant (*growth cone collapse*). Il y a donc un équilibre à trouver entre la qualité du signal obtenue avec une exposition plus forte et plus fréquente du spécimen et assurer la santé du neurone pendant la durée de l'expérience (de 5 minutes à une heure). De plus, la vaste majorité des manipulations que j'ai faites nécessitaient l'usage de deux fluorophores, doublant l'exposition du neurone à la lumière et les risques possibles.

Après plusieurs mois de tests, j'ai déterminé qu'une exposition de 50 à 100 ms pour chaque longueur d'onde avec un gain de la caméra de 2500 à 3500 et l'utilisation de filtres réduisant l'intensité de la lumière étaient optimaux pour l'acquisition d'une image aux 10 secondes pendant 20 minutes (120 images par couleur). Une expérience plus longue doit faire intervenir une exposition plus courte ou une acquisition moins fréquente. La prise de films très rapides (une image à chaque seconde ou même plusieurs images par secondes) n'est possible que pendant quelques minutes. De manière générale, les cônes de croissance (2 à 5 jours en culture) sont plus capricieux que les neurones entiers matures (11 à 14 jours en culture) et nécessitent une attention particulière pour éviter de provoquer leur effondrement. Les déplacements rapides du cône demandent également une acquisition rapide. Pour prendre un film fluide de bonne qualité d'un cône, j'ai opté pour une image aux 5 secondes pendant un maximum de 10 minutes en utilisant les paramètres d'exposition les plus faibles possibles (50ms par couleur).

2.4.4 Perfusion

L'imagerie en temps réel comporte plusieurs avantages, mais aussi plusieurs inconvénients, dont la nécessité d'offrir un environnement contrôlé aux neurones pour assurer leur survie. J'ai utilisé une perfusion contrôlée de solution extracellulaire chauffée pour maintenir stables les concentrations ioniques (surtout le Mg^{2+} et le Ca^{2+}) ainsi que l'osmolarité et le pH extracellulaire. Le débit de perfusion était gardé à autour d'un millilitre par minute pour la durée de l'expérience.

Au cours d'une même expérience, j'ai souvent utilisé différentes solutions de perfusion afin de stimuler mes neurones ou, au contraire, de limiter leur activité (en bloquant l'activité des récepteurs NMDA) avant l'observation. J'ai utilisé deux solutions

principales; la **solution de blocage**¹, contenant 8,7% de Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{NaHCO}_3/\text{Phenol Red}$), 10mM de HEPES à pH 7.8, 5mM de chlorure de magnésium (MgCl_2), 0.6mM de chlorure de calcium (CaCl_2) et 2mM de glucose, le tout à un pH d'environ 7.4 et une osmolarité de 270 mmol/kg; la **solution régulière**, contenant 8,7% de Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{NaHCO}_3/\text{Phenol Red}$), 10mM de HEPES à pH 7.8, 1mM de chlorure de magnésium (MgCl_2), 1.2mM de chlorure de calcium (CaCl_2) et 2mM de glucose, le tout à un pH d'environ 7.4 et une osmolarité de 260 mmol/kg..

2.4.5 Stimulation

Pour stimuler les neurones, j'ai utilisé deux principaux protocoles, la dépolarisation au chlorure de potassium (KCl) et l'augmentation de l'activité des récepteurs NMDA avec une solution de glycine sans magnésium ($0\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}$).

La **solution de stimulation KCl** contient 8,7% de Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{NaHCO}_3/\text{Phenol Red}$), 10mM de HEPES à pH 7.8, 1mM de chlorure de magnésium (MgCl_2) et 2.5mM de chlorure de calcium (CaCl_2), le tout à un pH d'environ 7.4 et une osmolarité de 260 mmol/kg. Lorsqu'on baigne les cellules dans une solution de KCl, il se produit une dépolarisation de la membrane plasmique, ce qui entraîne l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage de type L (Bading et al., 1993).

La **solution de stimulation 0 $\text{Mg}^{2+}/\text{Gly}$** est composée de 200 μM de glycine, 8.7 % de Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{NaHCO}_3/\text{Phenol Red}$), 10mM de HEPES et 1.2 mM de chlorure de calcium (CaCl_2). Aucun magnésium n'est ajouté à cette solution afin de faciliter le déblocage des récepteurs NMDA. La glycine ajoutée permet d'activer les récepteurs NMDA au niveau des synapses dont le bouton pré-synaptique relâche spontanément du glutamate. Cette stimulation augmente donc le niveau d'activité du neurone de façon locale et n'entraîne habituellement pas d'activation globale du neurone, contrairement aux stimulations Glutamate/Glycine et KCl.

¹ À ne pas confondre avec la solution de blocage utilisée pendant l'immunocytochimie pour bloquer les sites non-spécifiques.

2.5 Analyse de colocalisation

La façon la plus triviale de procéder à une analyse de colocalisation est de superposer les signaux et d'évaluer leur coïncidence à l'œil. Cette technique demeure encore utilisée de nos jours, mais elle n'est pratique que dans certains cas, par exemple une étude préliminaire de colocalisation entre un marqueur synaptique et une protéine qui pourrait se localiser à la synapse. L'étude de petites variations de colocalisation entre deux signaux est cependant impossible sans une quantification plus poussée. J'ai donc utilisé une analyse de colocalisation développée par Frédéric Jaskolski, Christophe Mulle et Olivier J. Manzoni et basée sur la comparaison de la déviation de l'intensité de la fluorescence entre deux signaux. Cette méthode permet également de bâtir une carte visuelle de la colocalisation entre deux signaux.

L'analyse de colocalisation de Jaskolski et al. est basée sur une technique proposée par Li et al. en 2004 qui consiste à calculer la déviation de la moyenne de l'intensité pour chaque pixel et pour les deux signaux, ce qui donne un indice de corrélation global. Bien que cette technique permette la quantification de la coïncidence entre deux signaux, elle ne produit pas d'image permettant d'évaluer visuellement la colocalisation. L'analyse de Jaskolski permet de produire une image de la distribution de deux signaux en analysant la corrélation entre des paires de pixels individuels plutôt qu'entre les deux images complètes.

L'analyse débute par la sélection des régions d'intérêt sur les images, puis une détection automatique des contours des régions sur une image traitée avec l'algorithme de Sobel. Les régions partagées dans les deux images sont conservées pour le restant de l'analyse. Ensuite, on calcule l'intensité moyenne des deux images (\bar{I}_a, \bar{I}_b) dans cette région, ainsi que le produit des déviations moyennes des deux signaux $((I_a - \bar{I}_a)(I_b - \bar{I}_b))$ pour chaque ensemble de pixels. Ce produit est ensuite normalisé en le divisant par la déviation moyenne maximale, ce qui permet d'obtenir le nMDP (*normalized mean deviation product*) :

$$nMDP = \frac{(I_a - \bar{I}_a)(I_b - \bar{I}_b)}{(I_{a \max} - \bar{I}_a)(I_{b \max} - \bar{I}_b)}$$

Où I_a représente l'intensité du pixel de l'image A, \bar{I}_a l'intensité moyenne, et $I_{a \max}$ l'intensité maximale d'un pixel. L'index nMDP varie de -1 à 1, mais je n'observe et ne montre dans mes données que des valeurs de -0.5 à 0.5.

Finalement, j'ai utilisé principalement l'index I_{Corr} dans mon analyse pour comparer la colocalisation de la CaMKII au cytosquelette du neurone. On calcule l'index I_{Corr} à partir du ratio de pixels corrélés ($nMDP > 0$) par rapport au nombre total de pixels. Il varie de 0 à 1, la valeur 0.5 représentant un signal aléatoire et non corrélé.

2.6 Mesure des prolongements

Pour arriver à mesurer la longueur des prolongements des neurones en développement, j'ai utilisé le logiciel Fiji² basé sur ImageJ. Il s'agit d'un logiciel gratuit doté de multiples fonctions dont « *Simple neurite tracer* », qui permet de tracer automatiquement les neurites sélectionnés sur les images. Le logiciel utilise également la calibration des images codée par le logiciel LSM utilisé pour l'acquisition des images sur le microscope confocal. La longueur des prolongements est ainsi calculée directement par le logiciel.

2.7 Mesures de surface du cône de croissance

J'ai fait les mesures de surface du cône à partir du logiciel MetaMorph. Mon script fonctionne en détectant les régions d'une taille d'au moins 100 pixels² (nécessaire pour retirer les résultats aberrants) sur des images de cône dont on retire le bruit de fond moyen et sur lesquelles on applique un seuil de détection (*threshold*). La surface est calculée à partir de la calibration des images effectuée par le logiciel LSM Meta 500 lors de l'acquisition des images.

² <http://pacific.mpi-cbg.de/wiki/index.php/Fiji>

2.8 Traçage des régions synaptiques

J'ai utilisé un script Metamorph basé sur celui de Mado Lemieux pour tracer les épines synaptiques et mesurer l'intensité des signaux des protéines d'intérêt dans les dendrites et les épines. Ce script traite d'abord les images en retirant le bruit de fond (à partir d'une région tracée hors du signal d'intérêt), puis permet de retirer les plans hors-focus en présentant les images une par une à l'utilisateur. Ensuite, l'utilisateur est appelé à sélectionner des régions d'une centaine de pixels de diamètre autour des épines à analyser. Le script sépare ensuite ces épines en films distincts sur lesquels sera tracé le contour de l'épine de façon manuelle. Les mesures d'intensité des régions sont exportées automatiquement vers un classeur Excel.

2.8.1 Mesures d'entrées d'EB3

Mesurer les comètes d'EB3 requiert une acquisition rapide et très sensible, et la meilleure façon d'obtenir ces images demeure un microscope à réflexion totale interne (*Total Internal Reflexion Microscope*). Je n'ai malheureusement pas eu accès à cet outil, mais plutôt à un microscope inversé à fluorescence. J'ai donc eu à faire face à plusieurs problèmes pour obtenir des images suffisamment claires pour en faire l'analyse. J'ai développé deux techniques d'analyse différentes pour mesurer les entrées d'EB3 sur des neurones de 12 à 15 jours, basées sur la méthode décrite par (Kapitein et al. 2010).

La première, basée sur un protocole de Simon Labrecque, consistait en l'acquisition de plusieurs plans pour un même signal afin de réduire les problèmes dus aux changements de focus et afin d'augmenter la qualité du signal. Ensuite, ces plans sont déconvolués, puis additionnés entre eux, et finalement les intensités des pixels sont ramenées sur une échelle de 16-bit. La qualité des images obtenue par cette technique est supérieure à celle pouvant être obtenue par une acquisition conventionnelle, mais la fréquence d'acquisition est réduite (9-10 secondes entre chaque image vs 2-3 secondes avec l'acquisition normale). À partir de cette acquisition, j'ai mesuré les changements d'intensité moyenne dans le signal EB3 pendant la stimulation comparativement à avant la stimulation. La deuxième technique d'acquisition que j'ai employée est simplement une acquisition d'une seule image par signal à une fréquence d'environ 2 à 3 secondes par image. J'ai ensuite utilisé deux types de mesures : soit la variation de l'intensité

moyenne dans chaque épine soit un décompte individuel de chaque entrée d'EB3 dans l'épine. Pour compter les entrées d'EB3 une à une, j'ai traité les films en retirant le signal total moyen à chaque plan afin d'améliorer le contraste tel que décrit (Kapitein et al., 2010) et j'ai ensuite utilisé le logiciel Metamorph pour afficher un graphique interactif permettant de visualiser la présence de pics d'intensité dans le temps sur le film.

2.9 Techniques de guidage du cône de croissance

J'ai utilisé deux techniques pour tenter de guider le cône de croissance et observer le comportement de la CaMKII lors du virage du cône et l'impact de l'enzyme sur le guidage du cône de croissance. La première technique consiste en la création d'un gradient d'une molécule attractive à l'aide d'une pipette selon un protocole établi (Zheng et al., 1994, Bouzigues et al., 2007). La deuxième technique, le LAPAP (*Laser-assisted protein adsorption by photobleaching*) a été développée dans le laboratoire de Santiago Costantino, et permet de produire des gradients de protéines associées au substrat en photoblanchissant des molécules fluorescentes spéciales (Bélisle et al., 2008).

2.9.1 Guidage par micro-injection locale

Pour réaliser le gradient de neurotransmetteur, j'ai injecté la solution de stimulation dans une pipette (tirée avec le Micropipette Puller P-97 de Sutter Instruments) fixée à un appareil pouvant créer une pression précise (Picospritzer II, General Valve Co.) contrôlé par un stimulateur digital capable d'envoyer un train régulier d'impulsions électriques (Digital Stimulator PG4000A, Cygnus Technologies Inc.). J'ai ensuite positionné la pipette à environ 100 μ m du cône de croissance à stimuler, à un angle d'environ 45° de la direction de croissance de l'axone (tel que dans Zheng et al., 1996 et Bouzigues et al., 2007) que j'ai déterminé sur le logiciel d'acquisition Metamorph 7. La fréquence d'injection utilisée était habituellement d'environ 1 *puff* par seconde. Pour produire la solution de stimulation, j'ai incorporé 0,5 mM de glutamate ou 10mM de GABA à la solution de perfusion régulière et ajouté le marqueur fluorescent Alexa 568 à une concentration de 5,5 μ M pour l'observation du gradient. La quantité de glutamate utilisée (0,5mM) a été identifiée comme la plus efficace pour attirer le cône dans ce paradigme de stimulation (Zheng et al., 1996). De plus, la concentration de GABA a été utilisée pour attirer le cône et provoquer une réponse calcique asymétrique et une réorganisation locale

des microtubules, toujours selon le même protocole de micro-injection (Bouzigues et al., 2007).

2.9.2 Guidage par LAPAP

Le LAPAP est une nouvelle technique développée à l'Université de Montréal par Jonathan Belisle de l'équipe du Dr. Santiago Costantino. Elle consiste d'abord en l'adsorption grâce à un laser de biotin-4-fluoresceïn (B4F) à de l'albumine de sérum bovin associée à une lamelle de verre. La biotine s'associe de manière covalente à l'albumine grâce à la production de radicaux libres par le photoblanchiment de la fluorescéine par le laser. En bougeant le point focal du laser, il est possible d'associer la biotine à l'endroit désiré sur la lamelle. De plus, puisque l'intensité du laser contrôle la quantité de protéines associées au substrat, il est possible de créer des gradients avec une concentration précise de protéine. La résolution spatiale de la technique est limitée par la diffraction de la lumière et la précision mécanique du système. La quantité totale de protéine associée sera déterminée par la vitesse de déplacement du laser, la puissance du laser et la concentration de départ de la solution. L'étape suivante consiste à incuber de la streptavidine, qui s'associe à la biotine nouvellement liée au substrat. Il est ensuite possible de lier à cette streptavidine des molécules préalablement biotinisées: des anticorps, des protéines ou des peptides.

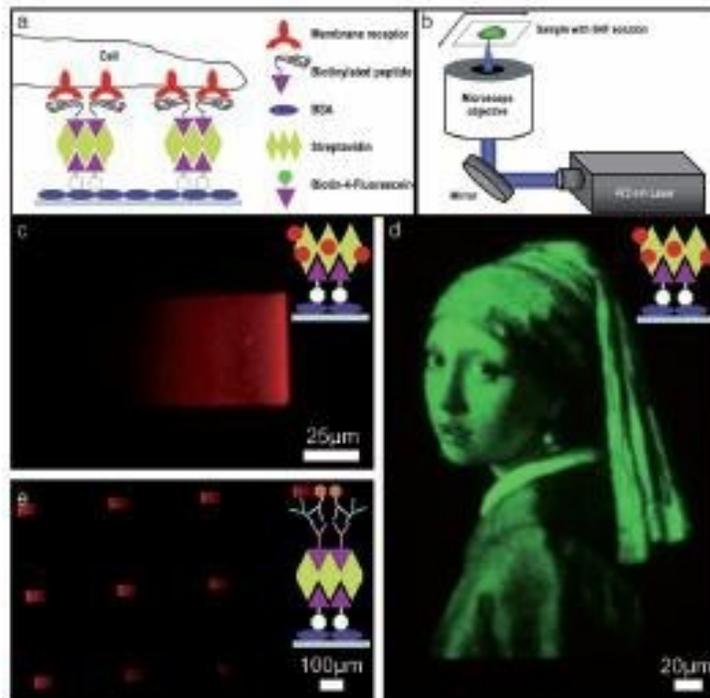


Figure 5 : Exemples de gradients de protéine produits par LAPAP.

A) Schéma du mélange de B4F, streptavidine et de peptide biotinylé requis pour produire le gradient. B) La technique nécessite seulement un microscope avec un laser bleu et un contrôle motorisé. C) D) E) Exemples de gradients produits par LAPAP, incluant en D) La jeune fille à la perle de Vermeère. (Bélisle et al., 2008)

2.10 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées dans le logiciel MatLab, à partir de fonctions déjà présentes. Je teste d'abord la normalité des groupes à comparer avec la fonction *Lillietest*. Si la normalité des échantillons est confirmée, je réalise ensuite une analyse de la variance ANOVA suivie du test de la plus petite différence significative de Tukey afin de comparer les différences entre les moyennes. Si les groupes ne sont pas normaux, j'effectue un test de Kruskal-Wallis, suivi également par le test de Tukey.

Chapitre 3: Résultats

3.1 La localisation de la CaMKII β et son déplacement dans le cône de croissance

Plusieurs études ont documenté la liaison de la CaMKII à l'actine et son impact structurel (O'Leary et al., 2006; Okamoto et al., 2007; Lin et Redmond, 2008). Il a également été montré que la proximité des sites de liaison à l'actine et à la calmoduline permet à la CaMKII de se séparer de l'actine lors de la présence de Ca²⁺/calmoduline et de se lier à l'actine de nouveau lors de la dissociation du complexe Ca²⁺/calmoduline. Suivant l'observation de la CaMKII se déplaçant de l'actine à des structures qui sont probablement des microtubules dans les neurones matures (Lemieux et al., en préparation), nous avons donc émis l'hypothèse que la CaMKII pourrait se déplacer, selon l'activité dans le cône de croissance, entre l'actine et les microtubules. La première étape a été de suivre la CaMKII dans un cône sans stimulation. Dans presque tous les cônes de croissance étudiés, la CaMKII suit le flux rétrograde d'actine (voir Figure 6A et Film 1: Cône mGFP-CaMKII et Lifeact-mRuby) et est retrouvée en grande quantité dans la zone de transition (zone T) et dans la région centrale (région C), mais moins dans la région périphérique (région P) (Figure 6; comparer avec Figure 3 de l'introduction). Ces résultats semblaient suggérer que l'interaction actine-CaMKII est responsable du flux de l'enzyme. Cependant, nous avons répété l'expérience avec un marqueur diffusant librement, la GFP monomérique (mGFP) et observé qu'elle montre un déplacement semblable à celui de la CaMKII à travers le flux rétrograde d'actine (Figure 6B, Film 2: Cône mGFP et Lifeact-mRuby). De plus, la mGFP a montré une présence équivalente dans la région centrale et dans la région périphérique mais plus faible dans la zone de transition. Les kymographes dans la figure 6 dans les sections ii) à iv) sont la représentation dans le temps des variations d'intensité dans la boîte contenue dans la section i). Le flux rétrograde d'actine y est clair; les pentes descendantes visibles montrent le déplacement des protéines vers le centre du cône. La coïncidence du flux rétrograde observée entre la mGFP-CaMKII et l'actine est également observée avec le signal de la protéine mGFP seule, et n'est donc probablement due qu'en partie à la liaison à l'actine de la CaMKII. Le flux rétrograde de la mGFP-CaMKII et de la mGFP

observé est donc probablement dû aux déplacements des membranes et du cytosol dans le cône de croissance.

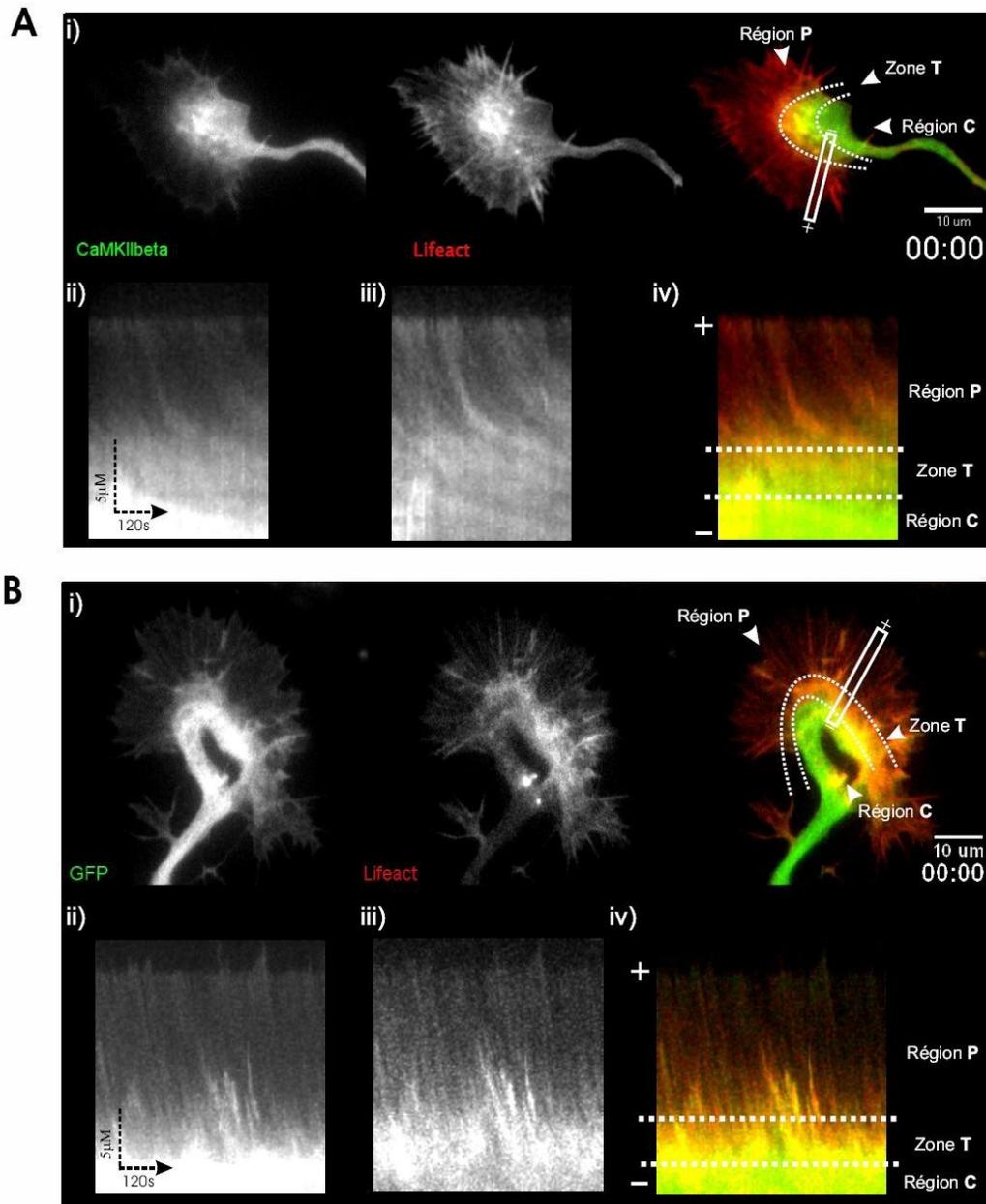


Figure 6 : Déplacements de mGFP-CaMKII et de mGFP suivant l'actine.

A) i) Plan extrait du film #1 montrant les différentes parties du cône de croissance et la région utilisée pour le kymographe, **ii)** Kymographe de mGFP-CaMKII, **iii)** Kymographe de Lifeact-mRuby, **iv)** Kymographe combiné des deux signaux montrant les régions du cône. Noter les signes + et - indiquant le sens du kymographe sur le plan du film. **B) i)** Plan extrait du film #2 montrant les différentes parties du cône de croissance et la région utilisée pour le kymographe, **ii)** Kymographe de mGFP, **iii)** Kymographe de Lifeact-mRuby, **iv)** Kymographe combiné des deux signaux montrant les régions du cône et le sens du kymographe sur le plan du film (signes + et -).

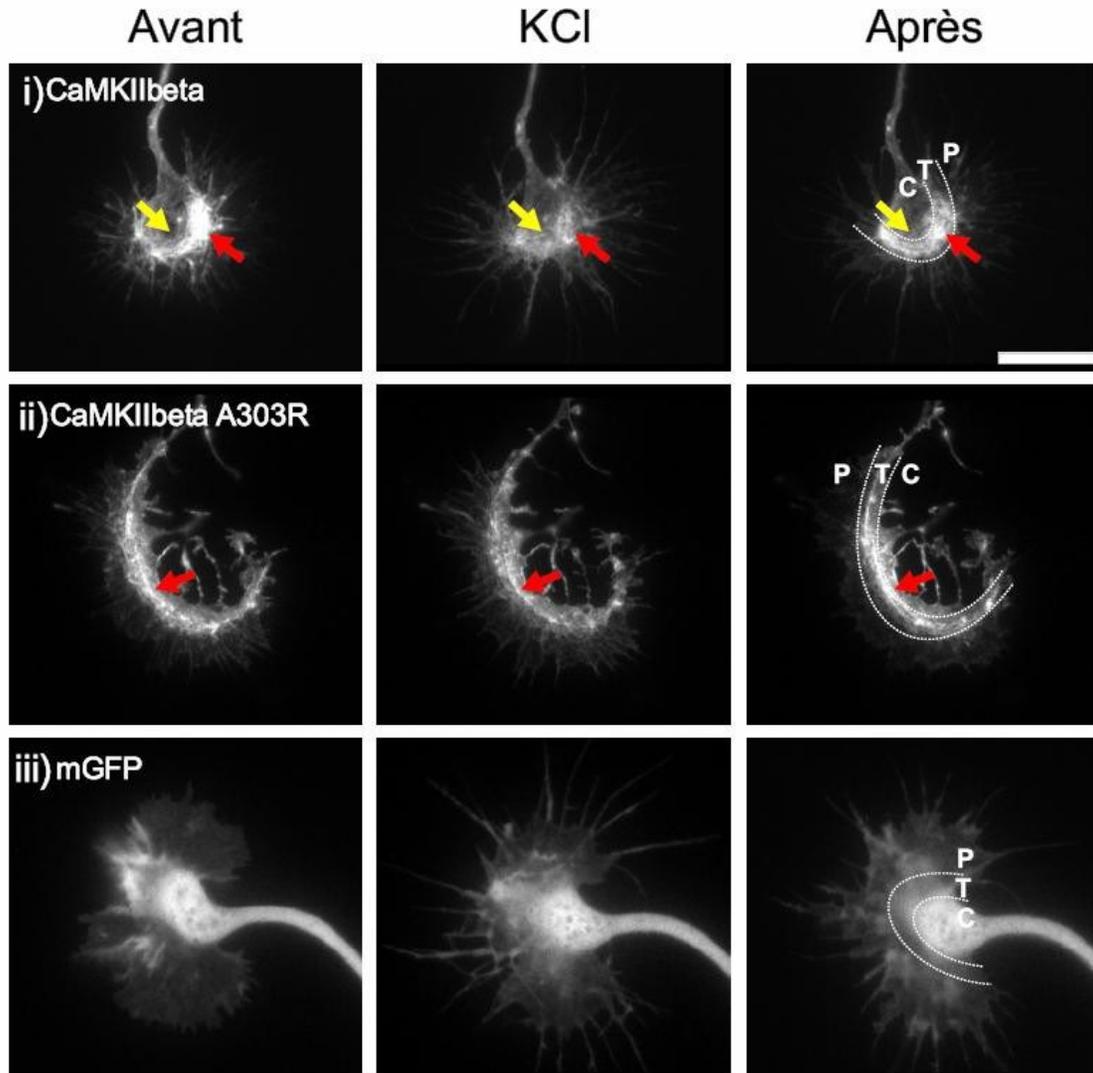


Figure 7 : Translocation de la CaMKII lors de la dépolarisation du cône

Effet de la dépolarisation du cône de croissance par la perfusion d'une solution de KCl 40mM pendant 90sec. **i)** Plans extraits du film #3 montrant les différentes parties du cône de croissance et la translocation de la mGFP-CaMKII de la zone T jusqu'aux régions C et P pendant la dépolarisation. Les flèches rouges désignent une région de la zone T que la CaMKII quitte partiellement pendant la stimulation, les flèches jaunes désignent une partie de la région C où la CaMKII se déplace pendant la stimulation. **ii)** Plans extraits du film #4 montrant les différentes parties du cône de croissance et la persistance de la mGFP-CaMKII A303R dans la zone T lors de la dépolarisation du cône. Les flèches rouges montrent une région de la zone T où se localise la CaMKII pendant toute la durée du film. **iii)** Plans extraits du film #5 montrant une faible translocation de la protéine mGFP vers la zone T et la région P lors de la dépolarisation du cône de croissance. Échelle=10 μ m

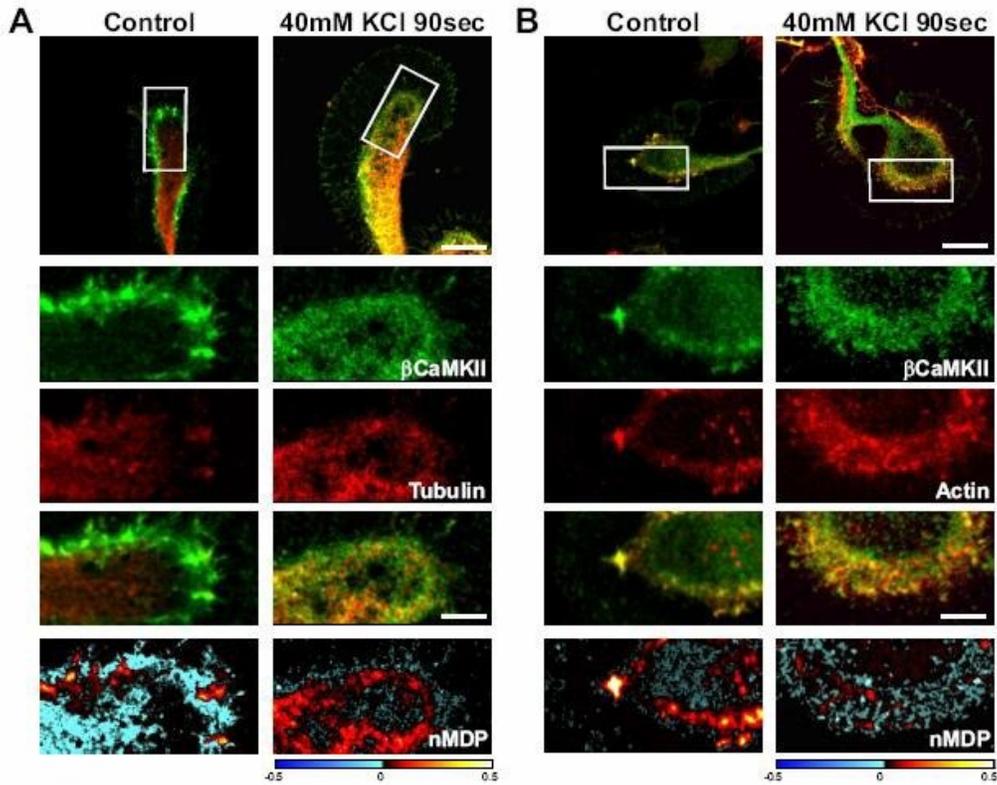
Nous avons provoqué une dépolarisation du cône avec une stimulation dans un bain de KCl 40mM pendant 90sec et observé la distribution de la mGFP-CaMKII ainsi que celle de marqueurs de cytosquelette (Lifeact-mRuby, EB3-mCherry) ou des marqueurs

volumétriques (mCherry). Tel que rapporté précédemment (Welnhofer, et al., 1999), la dépolarisation du cône provoque rapidement (soit en 30 à 90 secondes dans nos cultures) une forte diminution du flux rétrograde de l'actine, une élongation des filopodes et parfois une réduction de la taille du lamellipode. Pendant la dépolarisation, la mGFP-CaMKII semble se séparer des arcs d'actine de la zone T et se distribuer principalement dans la région centrale et diffuser légèrement dans la région périphérique (voir Figure 7-i, et Film 3: Cône Stimulé KCl mGFP-CaMKII). Le mutant mGFP-CaMKII -A303R, dont le site de liaison à la calmoduline est inactif et inhibe ainsi la séparation de la CaMKII de l'actine sous l'effet du calcium, semble demeurer lié aux arcs d'actine de la zone de transition pendant la dépolarisation mais semble diffuser légèrement dans les régions centrales et périphériques (Figure 7-ii et Film 4: Cône Stimulé KCl mGFP-CaMKII A303R). Finalement, la dépolarisation n'entraîne pas de translocation majeure de la protéine libre mGFP, mais provoque tout de même une augmentation de sa diffusion vers la région P et la zone T (Figure 7-iii et Film 5: Cône Stimulé mGFP).

Les figures 6 et 7 montrent que la CaMKII est dynamique dans le cône de croissance, qu'elle se localise principalement dans les régions riches en actine au repos et qu'elle peut changer de localisation pendant la stimulation. Je n'ai pas montré ici la séparation de la CaMKII de l'actine, bien que la Figure 7-ii) avec le mutant A303R permette de supposer que le déplacement de la CaMKII dépende bien de changements au niveau de cette liaison. De plus, je n'ai pas observé si la CaMKII pouvait se localiser aux microtubules. Bien que nous possédions un marqueur d'actine efficace et spécifique, les marqueurs transfectés de microtubules le sont beaucoup moins dans le cône et n'ont pas permis de clairement les distinguer. Afin d'analyser les changements de localisation de la CaMKII dans le cône au niveau du cytosquelette pendant la stimulation, j'ai donc opté pour l'immunocytochimie, qui permet du même coup de marquer les protéines endogènes, sans surexpression.

3.2 Durant la stimulation neuronale, la CaMKII β colocalise davantage avec la tubuline et moins avec l'actine

Selon mon hypothèse, la CaMKII β du cône de croissance est liée à l'actine des filopodes et aux arcs d'actine la zone T à l'état de repos, et lors d'une forte activité et d'une entrée de calcium, l'activation de la CaMKII rompt sa liaison à l'actine et lui permet de se lier à des protéines associées aux microtubules dans les régions C et P. J'ai utilisé des neurones de 2 à 3 jours sur lesquels j'ai effectué des marquages de la CaMKII β et de la tubuline en immunocytochimie avec les anticorps Mouse Anti-CaMKII β et Rabbit Anti-Tubulin, couplés avec des Alexa 488 et 546, et j'ai marqué l'actine avec la drogue Phalloïdine Alexa 546. Ensuite, j'ai tracé des régions de taille et de forme variables à partir des signaux du cytosquelette (comprenant tout le marquage observé, évitant les zones non marquées qui nuisent à l'analyse) et j'ai utilisé le script de colocalisation de Jaskolski et al. pour évaluer la colocalisation entre la CaMKII et le cytosquelette. J'ai observé qu'une stimulation de KCl 40mM pendant 90 secondes augmente la colocalisation entre la CaMKII β et la tubuline (Figure 8A et C) et diminue la colocalisation entre la CaMKII β et l'actine (Figure 8B et C). De plus, la CaMKII β colocalise significativement plus avec l'actine que la tubuline en condition contrôle (Figure 8C). Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse du déplacement de la CaMKII β de l'actine vers les microtubules lors d'une activation de l'enzyme. La majeure partie de l'augmentation de la colocalisation de la CaMKII avec les microtubules provient de la translocalisation de la CaMKII vers la région centrale et de sa séparation de la zone de transition, où la tubuline est peu enrichie. C'est également le même déplacement généralisé qui provoque la diminution de la colocalisation entre la CaMKII et l'actine lors de la dépolarisation au KCl. Il existe peut-être également une petite fraction de CaMKII qui colocalise avec les microtubules de la région périphérique après s'être séparé des fibres de F-actine de cette région suivant la dépolarisation. Cependant, le volume de cette région est petit et le signal n'est généralement pas assez intense pour donner des résultats clairs dans cette région.



C

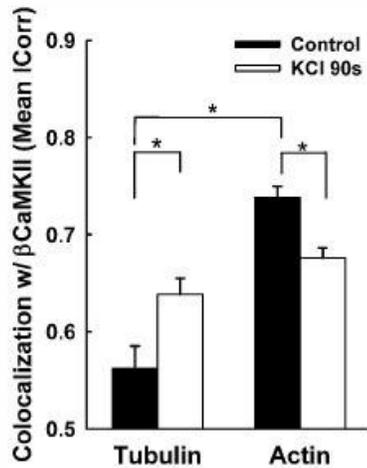


Figure 8 : Analyse de colocalisation de la CaMKII avec le cytosquelette du cône

A) Marquages immunocytochimiques de CaMKII et de tubuline. Les cases tout en bas montrent le résultat de l'analyse de colocalisation. La valeur ICorr représente le degré de corrélation, soit contrôle (ICorr = 0.56) et stimulé (ICorr = 0.65). B) Cônes de croissance contrôle (ICorr = 0.52) et stimulé (ICorr = 0.56) marqués pour la CaMKII et l'actine. Les neurones ont été stimulés 90sec dans du KCl 40mM. Les images nMDP (normalized mean deviation product) représentent dans une échelle de couleur la quantité de colocalisation, les couleurs les plus chaudes représentant une colocalisation plus fortes, et les couleurs froides une colocalisation très faible. C) ICorr moyen (\pm ES) entre la CaMKII et la tubuline ainsi qu'entre la CaMKII et l'actine en contrôle ou en condition stimulée. N=40 cônes de croissance par conditions, deux expériences, * $p < 0,05$ ANOVA suivi du test de la plus faible différence significative de Tukey.

La CaMKII β est donc dynamique dans le cône selon l'activité et elle se déplace au niveau du cytosquelette. Il est probable que la présence de la CaMKII β sur les filaments d'actine les stabilise (Okamoto et al., 2007), et ainsi que les déplacements localisés de l'enzyme puissent changer localement la rigidité des filaments d'actine et influencer de cette façon le virage du cône de croissance. La première étape dans l'étude de l'effet de ce déplacement de la CaMKII β sur le cytosquelette est d'observer l'effet de l'inhibition de la protéine sur la stabilité et la structure de l'actine. La déstabilisation de l'actine devrait entraîner une réduction de la taille du cône de croissance (Forscher et Smith, 1988). J'ai donc voulu mesurer le résultat de la réduction de l'expression de la CaMKII β avec un shRNA dirigé contre l'ARN de la CaMKII β . La deuxième étape, qui n'a malheureusement pas porté fruit, est de provoquer le virage du cône de croissance, d'observer la localisation de la CaMKII β sur le cytosquelette pendant le virage, et d'étudier l'impact sur le guidage de CaMKII portant des mutations au niveau des sites essentiels à sa liaison au cytosquelette.

3.3 Impact de l'inhibition génétique de la CaMKII sur le développement neuritique

Pour étudier l'impact de la CaMKII α et β sur la croissance axonale et le développement, j'ai voulu utiliser un protocole d'inhibition par shRNA afin de faire le *knockdown* de la protéine. Les études d'inhibition de la CaMKII durant le développement ont donné des résultats parfois contradictoires et difficiles à concilier entre eux (voir la section 1.2 de l'introduction). Il est évident que les modèles étudiés ont joué un rôle important dans cette disparité. De plus, le type d'inhibition utilisée a certainement eu un impact; il est probable que les inhibiteurs chimiques couramment utilisés ne bloquent pas toutes les fonctions de la CaMKII dans le neurone et permettent à l'enzyme inactivée de jouer certains de ses rôles à l'état de repos, ce qu'une inhibition par siRNA ou shRNA peut aider à contrer. Le protocole d'inhibition par shRNA devrait ainsi nous informer sur les fonctions structurelles de la CaMKII dans le cône et dans le neurone en développement. J'ai d'abord évalué l'efficacité du traitement au shRNA en mesurant les niveaux de CaMKII dans toutes les conditions. Le graphique de la figure 10-i montre la

moyenne d'intensité (exprimée en multiples de l'intensité du contrôle) de la CaMKII β et confirme que le traitement shRNA β et le «sauvetage» de l'inhibition fonctionnent bien (voir aussi Figure 9v et vi).

J'ai étudié l'impact de l'inhibition de la CaMKII β et de la CaMKII α sur le développement des neurones en culture en mesurant les valeurs susceptibles d'être affectées par la réduction de l'expression des enzymes. J'ai transfecté les cultures d'hippocampe de rat le jour suivant leur mise en culture avec un mélange de plasmides codant pour la protéine mGFP ou Lifeact-mGFP (comme marqueur neutre), ainsi que les shRNA β , shRNA α ou les deux. J'ai ensuite fixé les cellules après trois jours d'expression (période nécessaire pour une réduction maximale de l'expression de la CaMKII par les shRNA). J'ai pris des images avec le microscope confocal sur les lamelles fixées. J'ai utilisé divers scripts personnels sur le logiciel Metamorph pour mesurer les paramètres de développement ainsi que pour vérifier l'efficacité de l'inhibition de la CaMKII. J'ai mesuré avec le logiciel Fiji la neurite la plus longue de chaque neurone. Ensuite, j'ai calculé la surface du cône de croissance situé au bout de la même neurite. Finalement, j'ai compté manuellement le nombre de prolongements partants du soma qui n'étaient en apparence pas des filopodes (plus longs que 5 μ m environ). Il était parfois difficile d'arriver à compter le nombre de neurites puisque certains neurones possédaient des projections très arborisées et serrées les unes contre les autres.

3.3.1 La réduction de CaMKII α ou β ne change pas la taille du cône de croissance

Je n'ai pas observé de différence significative dans la taille du cône de croissance parmi toutes les conditions, même dans les conditions où l'intensité de la CaMKII était très faible. Curieusement, des résultats préliminaires avaient montré une réduction de la surface du cône de croissance transfecté par le shRNA anti-CaMKII. Je doutais cependant de ces résultats puisque le «sauvetage» de la CaMKII par le Rescue-CaMKII n'avait pas été efficace (les cônes n'étaient pas plus grands qu'en shRNA), ce qui compliquait l'interprétation et suggérait plutôt que le traitement par le shRNA avait été nuisible aux neurones en général.

Je m'attendais à voir une réduction de la taille du cône de croissance en condition shRNA en raison d'une désorganisation de l'actine en l'absence de suffisamment de CaMKII pour stabiliser l'actine des filopodes et des arcs de la zone T. On pourrait penser aussi que si la CaMKII avait un rôle stabilisateur au niveau des microtubules, l'absence de CaMKII pourrait entraîner une désorganisation des microtubules qui pourrait nuire à la formation du cône de croissance. Je ne pensais pas voir de différence de taille du cône de croissance en transfectant le shRNA anti-CaMKII α puisque cette isoforme est peu exprimée au cours du développement et qu'elle ne possède pas le site de liaison à l'actine.

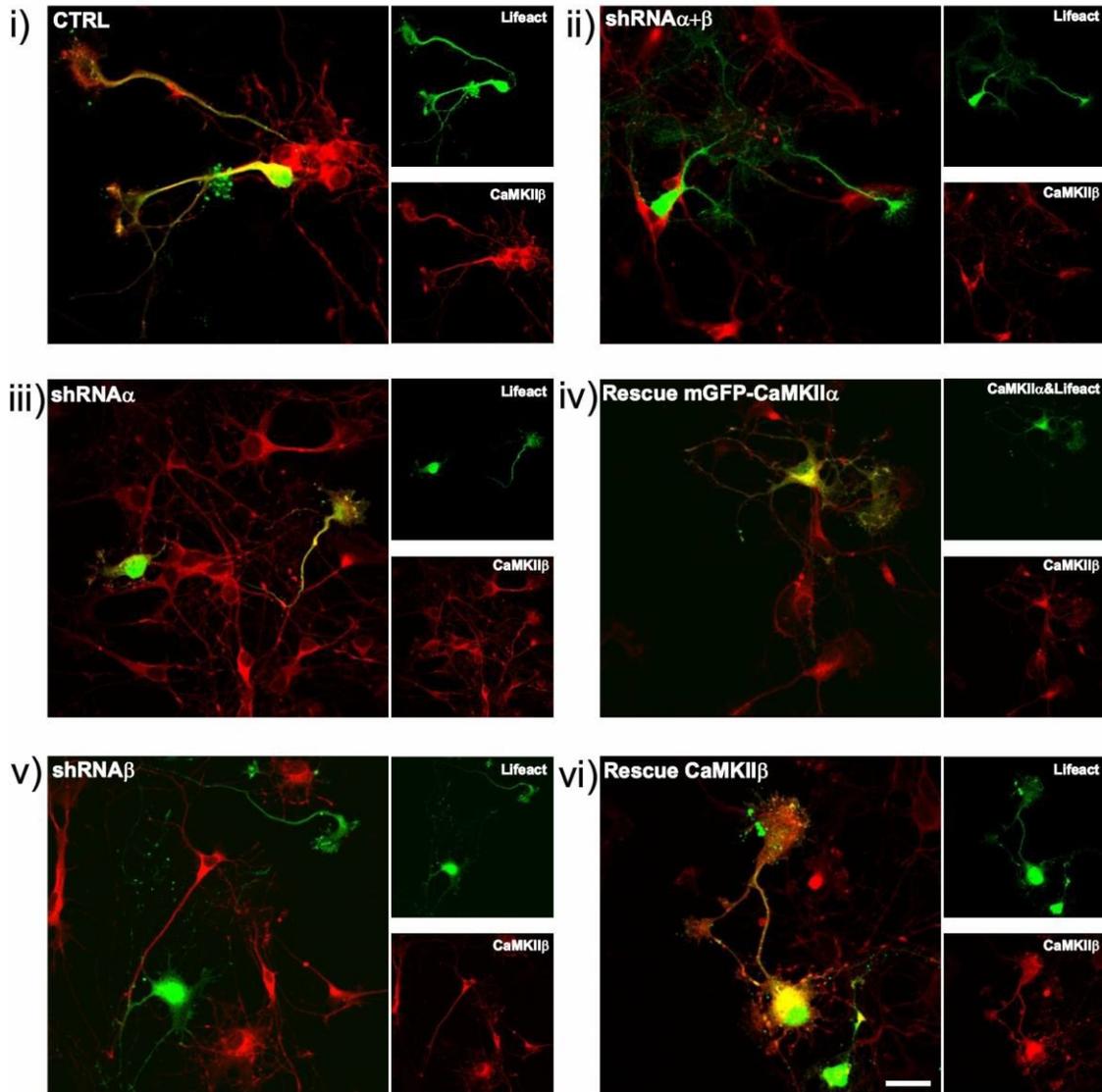


Figure 9 : Étude de l'inhibition par shRNA de la CaMKII dans le développement.

Neurones de 4 jours marqués en rouge avec l'anticorps Mouse anti-CaMKII et transfectés avec le marqueur L1feact-mGFP, avec ou sans plasmides codants pour les shRNA et les protéines Rescue, résistantes au shRNA. **i)** Contrôle ; **ii)** Neurone transfecté avec les shRNA anti-CaMKII α et anti-CaMKII β ; **iii)** Neurone transfecté avec le shRNA anti-CaMKII α ; **iv)** Neurone transfecté avec le shRNA anti-CaMKII α et le Rescue mGFP-CaMKII α ; **v)** Neurone transfecté avec le shRNA anti-CaMKII β ; **vi)** Neurone transfecté avec le plasmide anti-CaMKII β et le Rescue CaMKII β . Scale bar = 20 μ m

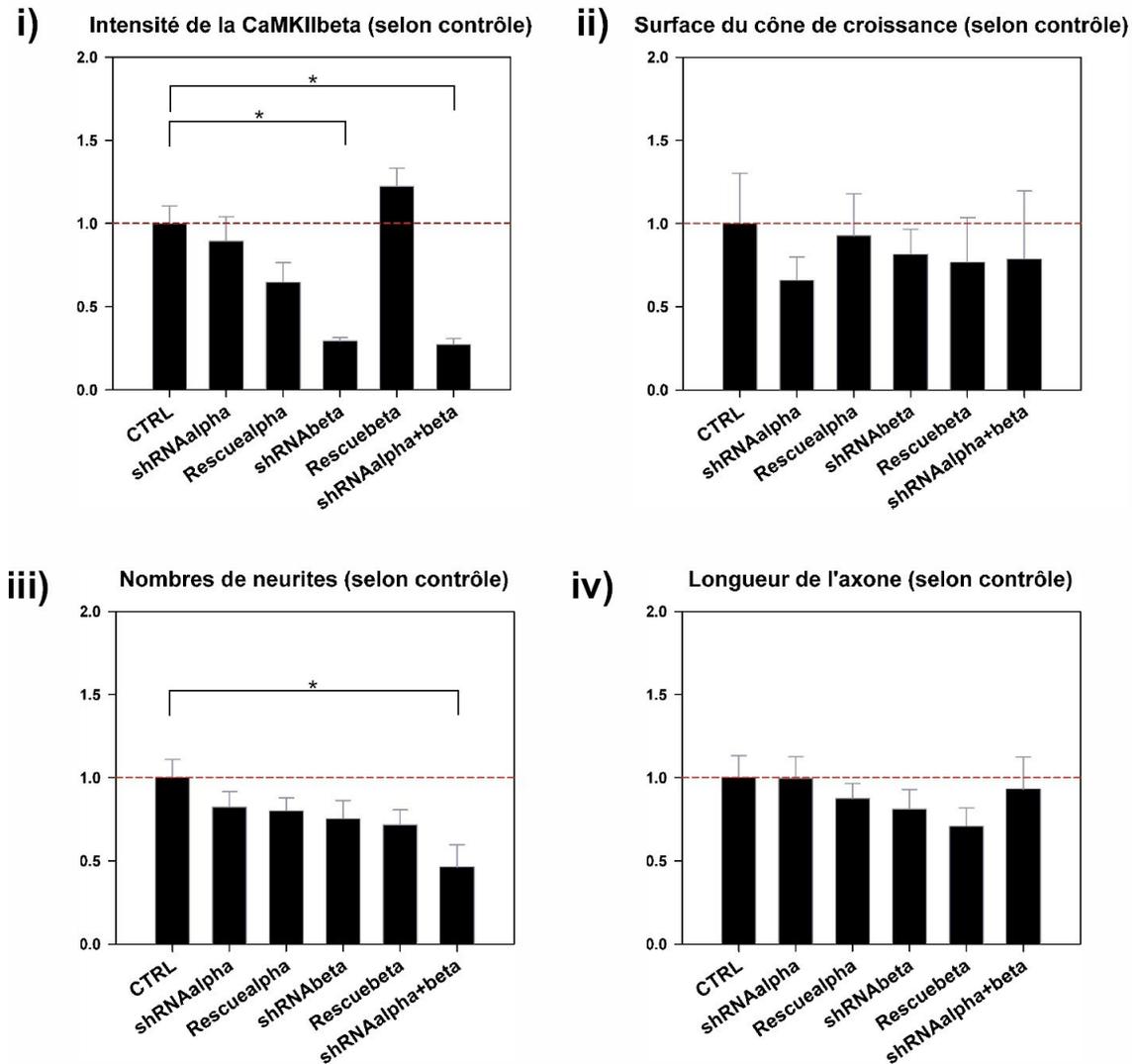


Figure 10 : Analyses morphologiques de l'impact de l'inhibition de la CaMKII
 Résultat des analyses morphologiques de l'impact du *knockdown* de la CaMKII et de la CaMKII dans les neurones en développement. **i)** Impact du shRNA anti-CaMKII sur la quantité de CaMKII mesurée en immunocytochimie. **ii)** Effets de l'inhibition de la CaMKII sur la taille du cône de croissance. **iii)** Impact des traitements sur le nombre de neurites. **iv)** Impact des shRNA sur la longueur de l'axone. * $p < 0,05$ Test Kruskal-Wallis suivi du test de la plus faible différence significative de Tukey.

3.3.2 La réduction de CaMKII α ou de CaMKII β ne modifie pas le nombre de neurites

Je n'ai pas observé de baisse significative du nombre de neurites dans les neurones transfectés avec les shRNA séparés, mais j'ai noté une réduction significative ($p < 0,05$) lors du traitement simultané avec les deux shRNA. Je doute un peu de la validité de ce résultat puisque cet effet devrait être dû à la baisse de la quantité de CaMKII α , résultat qu'on ne voit pas dans la quarantaine de neurones observés. De plus, la très faible quantité de CaMKII β (souvent indétectable en immunocytochimie, non montré ici) qui est exprimée tôt dans le développement est probablement peu importante à la formation des dendrites et de l'axone. Je trouve plus probable que l'effet observé soit dû à un effet néfaste de la double transfection des shRNA sur la santé des neurones, exacerbé par le fait que cette condition comptait moins de neurones et que ceux-ci provenaient d'une seule expérience plutôt que de deux.

3.3.3 La réduction de CaMKII ne change pas la taille de l'axone.

Nous n'avons pas observé d'impact de l'absence de la CaMKII (α ou β) sur la croissance de l'axone (défini comme la neurite la plus longue). Les traitements aux shRNA individuels ainsi que le traitement double shRNA α et shRNA β n'ont pas montré de différence significative dans la longueur de l'axone des neurones en développement. Nous aurions pu nous attendre à ce que la CaMKII β puisse réguler la longueur des neurites des neurones en développement grâce à son activité stabilisatrice au niveau de l'actine ou en phosphorylant des protéines associées aux microtubules. La littérature est très partagée à ce sujet, mais beaucoup de papiers se fient à une inhibition chimique qui pourrait ne pas supprimer l'activité stabilisatrice de la CaMKII β sur l'actine. Je pensais donc que le traitement par le shRNA anti-CaMKII β pourrait modifier la croissance de l'axone, soit une réduction ou même une augmentation de sa longueur.

3.4 Essais de guidage du cône de croissance

Après avoir observé le déplacement de la CaMKII β sur le cytosquelette, j'avais comme principal objectif d'étudier l'impact de cette dynamique sur le virage du cône de croissance. Une fois les essais de virage mis au point, je voulais tester l'effet des divers mutants de CaMKII β que nous possédons sur le guidage axonal. Nous possédons, entre

autres, la CaMKII β A303R, qui ne peut lier la calmoduline et se séparer de l'actine, et la CaMKII β E97K, qui selon les observations de Mado Lemieux ne devrait pas lier les microtubules. Malheureusement, je ne suis pas arrivé à mettre au point les deux techniques d'essai de virage que j'ai voulu employer, soient la création d'un gradient attractif à l'aide d'une pipette et le couplage d'un gradient sur la lamelle par LAPAP, décrites en détail dans la section matériel et méthodes. La figure 16 de la discussion montre des exemples de l'application de ces deux techniques. Les principales difficultés que j'ai rencontrées ont été de créer un gradient constant avec la pipette sous la perfusion de mon microscope et de faire croître des neurones en santé sur les lamelles traitées par LAPAP. Je discute en détail des problèmes et des solutions envisagées dans la discussion.

La deuxième partie de mon projet porte sur la dynamique de la CaMKII dans le neurone mature et l'impact des déplacements de l'enzyme sur l'épine dendritique. À l'instar de la CaMKII β , la CaMKII semble se déplacer sur les microtubules selon l'activité, ce que je présente au moyen de l'analyse de colocalisation présentée plus haut. De plus, j'ai observé que la translocalisation de la CaMKII près de l'épine pourrait augmenter la quantité de récepteurs AMPA à la synapse et même augmenter les intrusions de microtubules dans l'épine.

3.5 Translocalisation dendritique de la CaMKII près des épines

Il est déjà bien connu que lors d'une stimulation synaptique, la CaMKII translocalise au niveau de la synapse et que cette translocation joue de nombreux rôles (Merrill et al., 2005). Il a également été observé dans le laboratoire du Dr. De Koninck qu'une stimulation synaptique $0\text{Mg}^{2+}/\text{Glycine}$ peut entraîner une accumulation locale sous la synapse de CaMKII (voir Figure 11B et Film 7 Stimulation $0\text{Mg}/\text{Gly}$, mGFP-GluR1 et mCherry-CaMKII). Cette accumulation de CaMKII relativement rapide (1 à 2 minutes) et transitoire provoque également une baisse de fluorescence dans les régions plus éloignées (à environ 5 μm de l'épine). Mado Lemieux a également observé et documenté la liaison de la CaMKII à des structures fibreuses dans le neurone lors de certaines stimulations (voir mes images à la Figure 11A et la Figure 12A-B et le Film 6 Stimulation $0\text{Mg}/\text{Gly}$ mCherry-CaMKII). Il est probable que ces structures soient des microtubules, mais il est également possible que d'autres structures, par exemple les neurofilaments, interviennent dans cette liaison. La figure 11A montre la translocalisation généralisée de la CaMKII au niveau de ces structures fibreuses, ce qui est parfois observé lors de la stimulation $0\text{Mg}^{2+}/\text{Glycine}$. Des stimulations plus fortes, glutamate/glycine ou KCl, provoquent de façon plus régulière ce changement de localisation de la CaMKII.

Dans cette section des résultats, je m'intéresse d'abord à montrer quels sont les partenaires du cytosquelette (microtubules ou neurofilaments) qui sont responsables de l'apparence fibreuse de la CaMKII suivant sa translocalisation lors d'une stimulation. De plus, nous ne connaissons toujours pas le rôle de la translocalisation généralisée ou de la translocation locale de la CaMKII. Je montre des résultats encourageants au niveau d'un marqueur de potentialisation synaptique, GluR1 (sous-unité du récepteur AMPA), et d'un marqueur de microtubules impliqué dans les entrées synaptiques des microtubules, EB3.

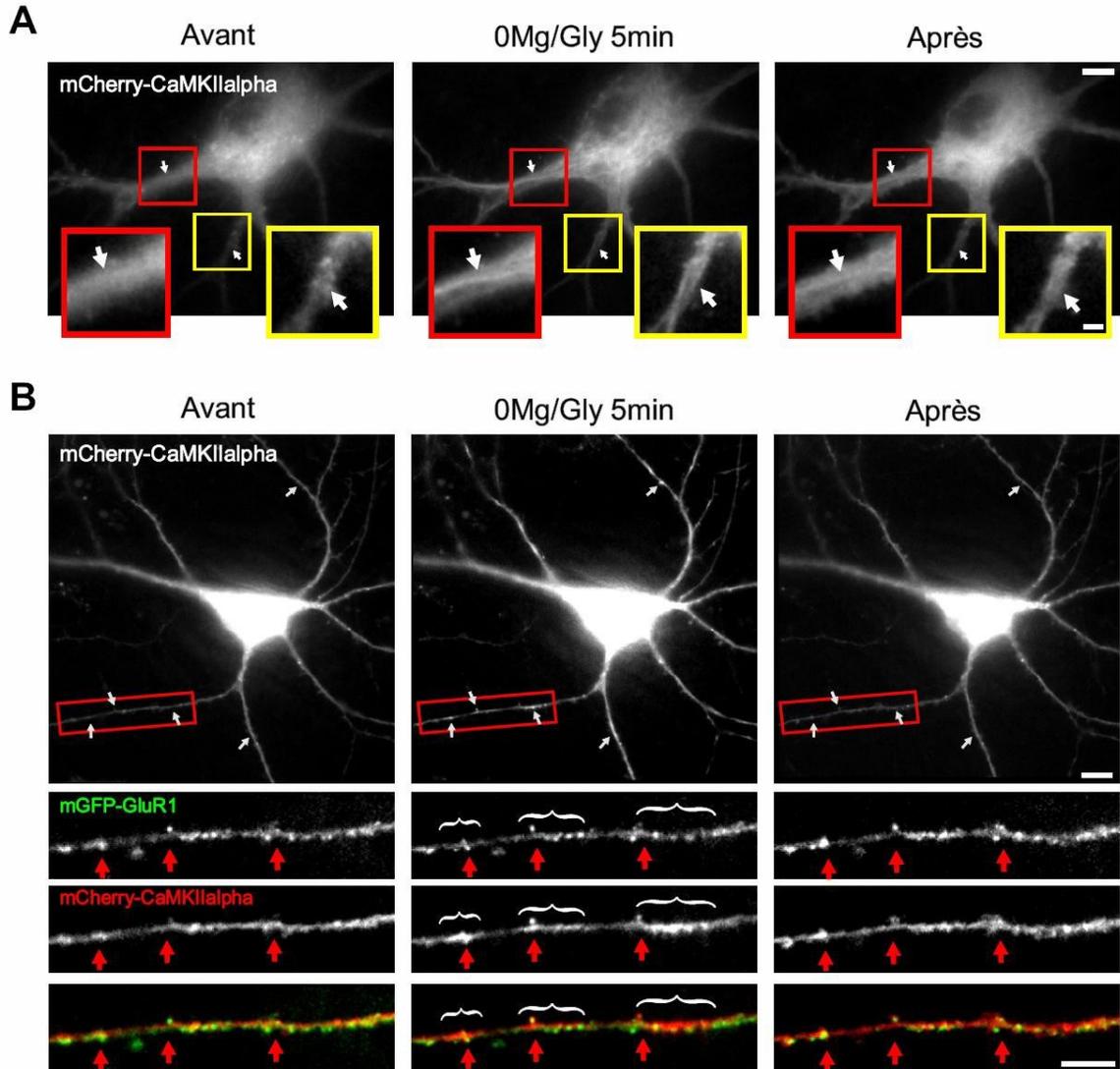


Figure 11: Translocalisation de la CaMKII dans la dendrite.

Exemples extraits respectivement des films 6 et 7 montrant **A**) la translocation dendritique généralisée de mCherry-CaMKII . Les flèches indiquent des régions fibreuses pouvant correspondre à des microtubules. Échelle = 10 μ m, encadré = 2 μ m ; et **B**) la translocation locale de CaMKII lors d'une stimulation 0Mg²⁺/Glycine de 5 minutes. Les flèches indiquent des épines montrant de la translocation locale de CaMKII . Les accolades mettent les zones de translocation locale en évidence. Échelle = 10 μ m, dendrite = 5 μ m.

3.6 Translocation activité-dépendante de la CaMKII sur les microtubules

Lors d'une stimulation des neurones par la perfusion de KCl, Glutamate/Glycine et parfois 0Mg^{2+} /Glycine, nous avons observé la translocation de la CaMKII vers les synapses ainsi que sur des régions à l'apparence de fibres dans les dendrites. Puisque ces régions ont une ressemblance frappante avec les microtubules, nous avons pensé que la CaMKII pourrait se lier à la tubuline ou à des protéines associées aux microtubules (ex. MAP2) pendant la stimulation. Il est également possible que les neurofilaments, une autre composante du cytosquelette du neurone, soient impliqués dans ce phénomène. Justement, la CaMKII a déjà été observée à proximité des microtubules et des neurofilaments en microscopie électronique (Vallano et al., 1986).

J'ai pris des images de neurones de 11 à 14 jours, stimulés (ou non) pendant 90 secondes dans une solution de KCl 40mM, puis fixés au PFA et marqués à la fois pour la CaMKII (Alexa 488) et les microtubules (Alexa 546), ou alors pour la CaMKII (Alexa 488) et les neurofilaments (Alexa 546) (voir Matériel et Méthodes). J'ai ensuite choisi deux régions par neurone avec le logiciel Metamorph que j'ai analysées dans MatLab avec une version personnelle modifiée du script de Jaskolski et al. J'ai ensuite calculé une moyenne par neurone de l'index de corrélation, I_{Corr} . Finalement, j'ai calculé la moyenne de colocalisation entre la CaMKII et la tubuline ou NFM, en condition contrôle et stimulée.

Lors de la stimulation au KCl, la CaMKII colocalise significativement plus avec la tubuline qu'en situation contrôle (Figure 12). La CaMKII ne semble cependant pas colocaliser plus avec les neurofilaments pendant la dépolarisation. Ainsi, il est clair que les microtubules composent la majorité des fibres sur lesquelles la CaMKII se déplace pendant la stimulation. On ne peut toujours pas écarter un apport des neurofilaments, puisqu'il est possible qu'une petite fraction de CaMKII translocalise aux neurofilaments et que cette quantité soit simplement trop faible pour être détectée par le script.

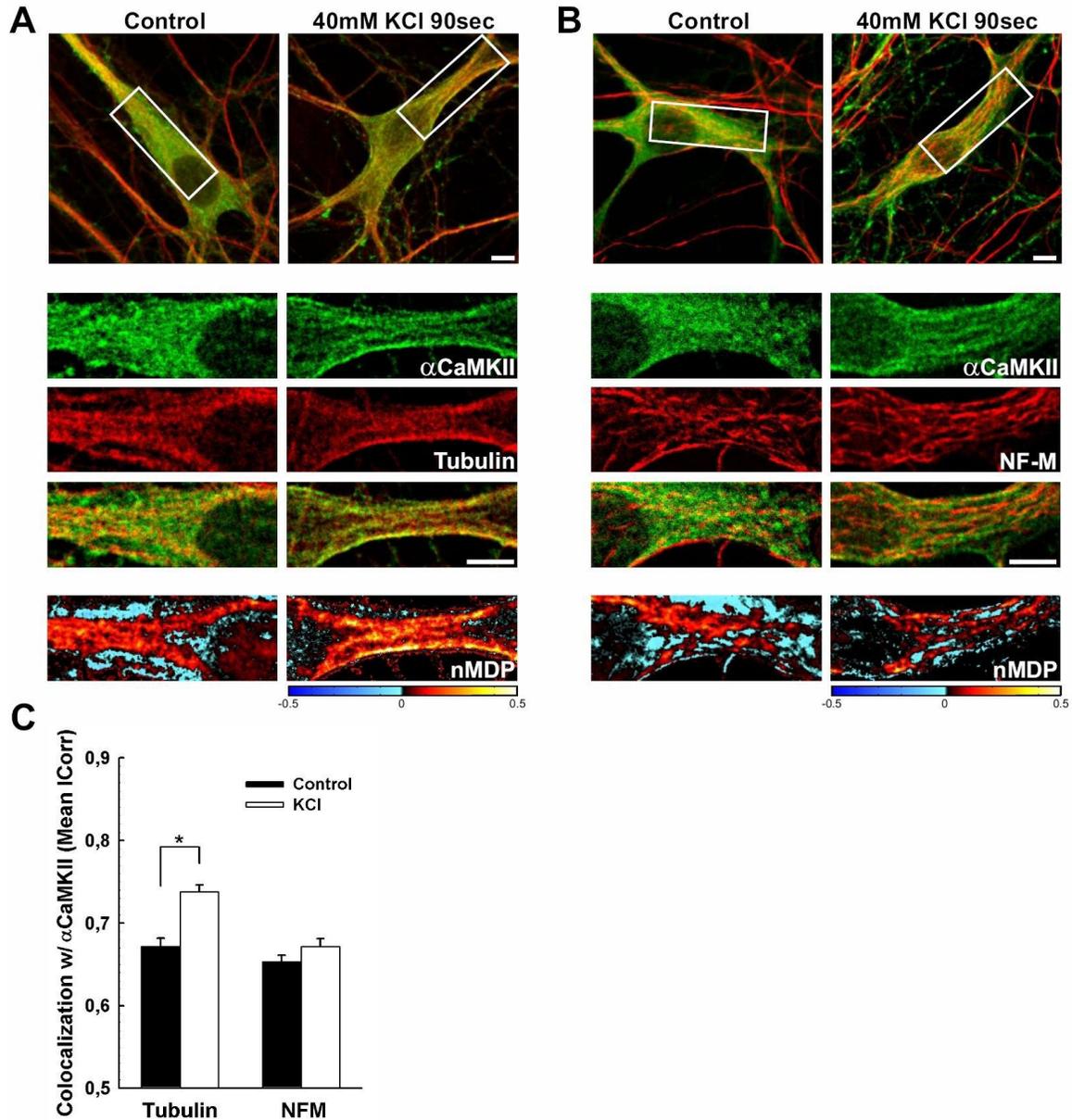


Figure 12 : Colocalisation de la CaMKII avec la tubuline et les neurofilaments

A) Marquages immunocytochimiques de CaMKII et de tubuline. Les cases tout en bas montrent le résultat de l'analyse de colocalisation. La valeur ICorr représente le degré de corrélation, soit Contrôle (ICorr = 0.56) et stimulé (ICorr = 0.65). B) Neurones contrôle (ICorr = 0.52) et stimulé (ICorr = 0.56) marqués pour la CaMKII et les neurofilaments-M. Les neurones ont été stimulés 90sec dans du KCl 40mM. Les images nMDP (normalized mean deviation product) représentent dans une échelle de couleur la quantité de colocalisation, les couleurs les plus chaudes représentant une colocalisation plus fortes, et les couleurs froides une colocalisation très faible. C) ICorr moyen (\pm ES) entre la CaMKII et la tubuline ainsi qu'entre la CaMKII et les neurofilaments-M en contrôle ou en condition stimulée. N=40 neurones par conditions, deux expériences, * $p < 0,05$ ANOVA suivi du test de la plus faible différence significative de Tukey.

3.7 La translocalisation dendritique de la CaMKII pourrait augmenter la quantité de GluR1

Il est établi que la CaMKII est impliquée dans l'insertion synaptique du récepteur AMPA (Hayashi et al., 2000; Lisman et al., 2002; Opazo et al., 2010). Cependant, on comprend encore mal comment elle procède pour agir de la sorte. Il a été récemment montré que la CaMKII peut provoquer l'insertion synaptique de récepteurs AMPA qui diffusent à la membrane par le biais de la phosphorylation de la sous-unité Stargazin (Opazo et al., 2010). J'ai voulu savoir si la translocation dendritique et synaptique de la CaMKII peut influencer la quantité de récepteurs AMPA dans l'épine synaptique. Quelques outils différents sont disponibles pour le marquage des récepteurs AMPA, principalement les plasmides codant pour les protéines de fusion fluorescentes GluR1-GFP et GluR1-SEP. J'ai utilisé le plasmide GluR1-GFP après avoir obtenu de bons résultats préliminaires

J'ai mesuré la variation de l'intensité du signal GluR1 dans les épines de neurones de 11 à 14 jours transfectés avec les plasmides GluR1-GFP et mCherry-CaMKII et stimulés avec la solution 0Mg²⁺/Glycine. J'ai ensuite calculé le changement d'intensité de GluR1-GFP pour chaque épine en divisant l'intensité moyenne après la stimulation par l'intensité moyenne avant la stimulation. J'ai ensuite mesuré l'intensité de la CaMKII dans les dendrites et dans les synapses afin de classer les épines selon leur degré de translocation. J'ai employé les valeurs de translocation de Mado Lemieux: une augmentation de 110% de l'intensité de la CaMKII dans la dendrite ou dans l'épine signifie qu'il y a eu translocation de la CaMKII. Ces valeurs ont été déterminées après plusieurs observations et visent à représenter le plus fidèlement possible le phénomène tout en tentant d'identifier un maximum d'épines ayant eu de la translocation.

J'ai observé une augmentation, quoique non significative, du signal de GluR1-GFP comparativement au contrôle dans les épines ayant fait l'objet de translocation dendritique avoisinante et synaptique de CaMKII (Figure 13 et Film 7 Stimulation 0MgGly, GluR1-GFP et mCherry-CaMKII). Je n'ai pas observé d'augmentation notable dans les épines n'ayant eu qu'une translocation dendritique seule ou synaptique seule. Il y a peu de synapses qui ont montré une translocation synaptique seule. En effet, un bon

nombre d'épines montrant une accumulation de CaMKII pendant la stimulation montraient également une augmentation de l'intensité de l'enzyme dans la dendrite. C'est pourquoi cette catégorie est plus variable et qu'il n'a pas été possible de montrer une différence significative entre la translocation synaptique seule *versus* une translocation synaptique et dendritique.

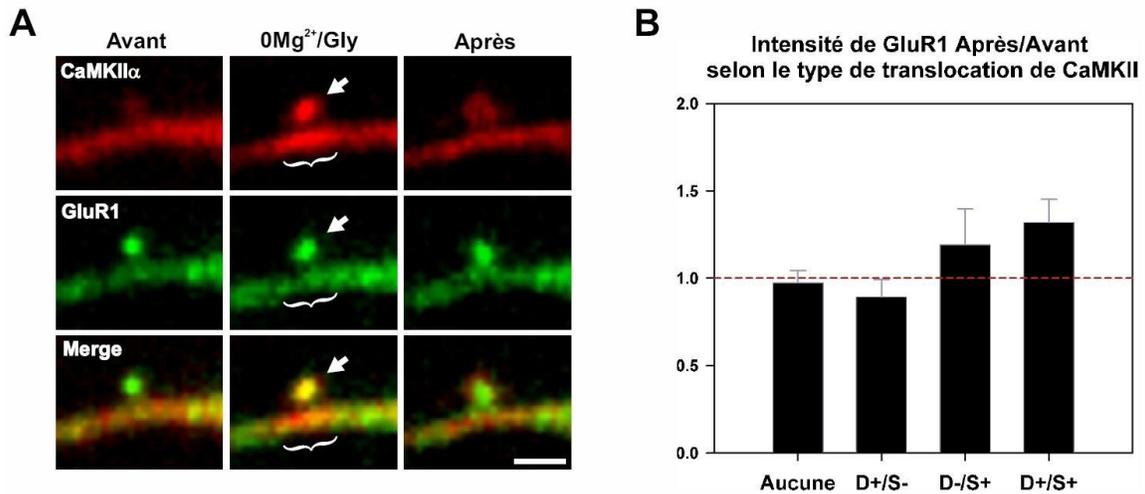


Figure 13 : Effet de la translocation synaptique et dendritique de la CaMKII du GluR1

A) Épine extraite de la figure 7B montrant de la translocation dendritique (accolade) et synaptique (flèche) de mCherry-CaMKII ainsi qu'un grossissement de l'épine et une légère augmentation de l'intensité du signal GluR1 dans l'épine. Échelle = 5 μ m **B)** Graphique montrant le ratio de l'intensité de GluR1 après la stimulation divisée par l'intensité de GluR1 avant la stimulation. Légende : Aucune = aucune translocation, D+/S- = translocation dendritique de CaMKII seulement, D-/S+ = translocation synaptique de CaMKII seulement, D+/S+= translocation dendritique et synaptique de CaMKII .

3.8 On détecte plus d'entrées d'EB3 dans les épines montrant la double translocation de CaMKII

Une découverte récente très intéressante a été la régulation de la formation des épines synaptiques par les microtubules. Des entrées fréquentes de microtubules dans les épines dépendantes de l'activité ont été observées en TIRF (*total internal reflection microscopy*) sur des signaux de tubuline et d'EB3 fluorescentes. Ces entrées ont été corrélées avec la potentialisation des épines et des changements de leur morphologie. Mes travaux ainsi que ceux de Mado Lemieux sur l'interaction de la CaMKII au niveau des microtubules et sa translocalisation sous la synapse nous ont mené naturellement à

nous pencher sur le rôle de la CaMKII dans les entrées des microtubules au niveau des épines. J'ai utilisé une acquisition avec de multiples plans en « z » pour étudier l'impact de la translocalisation locale de la CaMKII α sur les entrées de microtubules dans les épines dendritiques lors d'une stimulation 0mg2+/Gly. J'ai fait l'acquisition à toutes les 9 à 10 secondes d'images de mGFP-EB3 et mCherry-CaMKII α . J'ai ensuite fait l'analyse des épines à l'aide d'un script personnel. Contrairement à l'analyse des expériences avec GluR1-GFP, j'ai classé manuellement les épines selon la présence de translocation dendritique ou synaptique.

J'ai observé un signal moyen d'EB3-GFP plus fort dans les épines montrant les deux translocations (D+/S+) que la translocation synaptique seule (D-/S+) (Figure 14). Cette augmentation signifie soit que la translocation dendritique de CaMKII cause plus d'entrées d'EB3 dans les épines soit que les deux phénomènes coïncident dans les mêmes épines. Les épines qui montrent une translocation dendritique locale de CaMKII sont souvent des épines plus actives, et présentent souvent une plus grande quantité de calcium (résultats de Mado Lemieux non montrés ici), il est facile d'imaginer que cette activité plus grande puisse être à l'origine de plus d'entrées d'EB3, les entrées de microtubules augmentant avec l'activité (Hu et al., 2008). La CaMKII pourrait également être responsable de ces entrées en phosphorylant des protéines associées aux microtubules, ou EB3 elle-même, à proximité de l'épine activée. La prochaine étape est donc de tester l'effet d'un inhibiteur chimique de la CaMKII, le KN93, afin de déterminer si l'effet observé de la translocation de la CaMKII sur EB3 est dû à l'activité de la CaMKII ou simplement dû à la coïncidence des deux phénomènes dans les épines les plus actives.

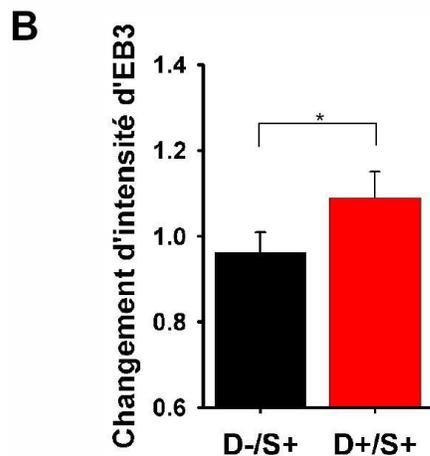
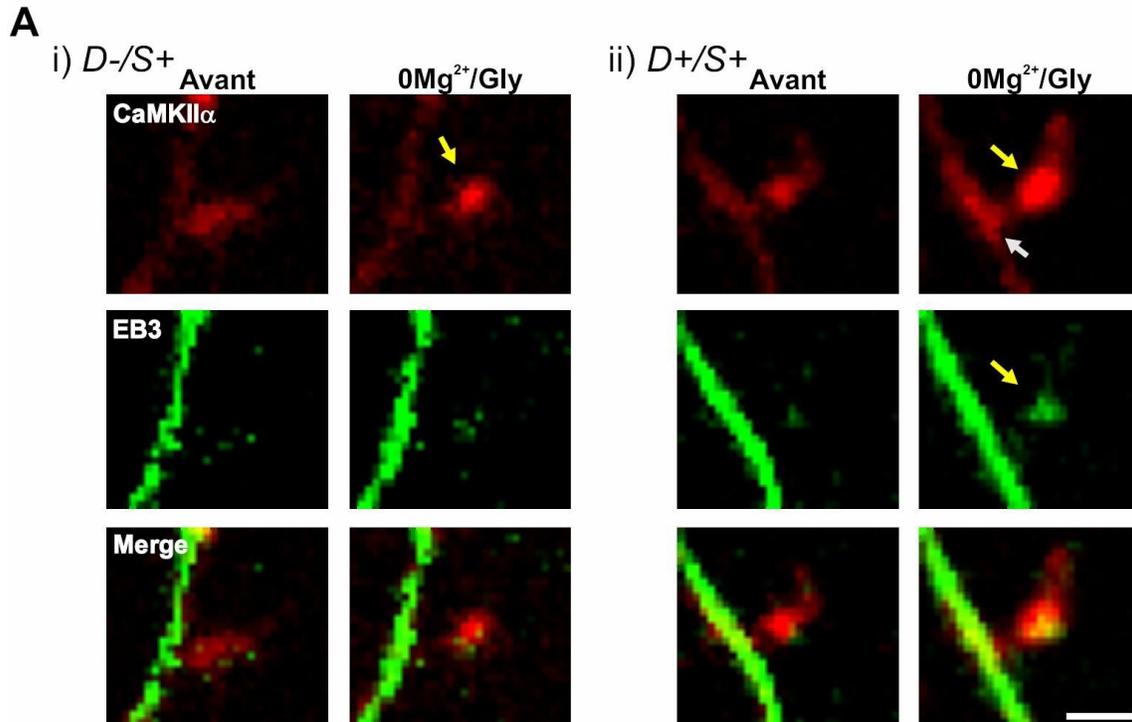


Figure 14 : Effet de la translocation de la CaMKII sur les entrées d'EB3 dans l'épine

Les épines montrant une translocation dendritique et synaptique de CaMKII pendant la stimulation 0Mg²⁺/Gly présentent une plus grande intensité d'EB3 que les épines montrant une translocation synaptique seulement de CaMKII. A) Épines présentant soit de la translocation synaptique seule (*D*⁻/*S*⁺) soit les deux translocations (*D*⁺/*S*⁺), Augmentation d'EB3= i) 0,004; ii) 1,2. Les flèches jaunes indiquent la translocation synaptique et les flèches blanches indiquent la translocation dendritique de CaMKII. Échelle= 5 μm. B) Moyenne d'intensité d'EB3 des épines *D*⁻/*S*⁺ et *D*⁺/*S*⁺. **p*>0,02

3.9 L'inhibiteur KN93 pourrait augmenter les entrées d'EB3

Puisque l'application de KN93 sur les neurones prévient la translocation de la CaMKII, il est impossible de reproduire avec l'inhibiteur la même analyse de translocation décrite dans la section précédente. J'ai donc opté pour une version modifiée d'un protocole de stimulation au KCl qui a déjà été utilisé pour augmenter les entrées de microtubules (Hu et al., 2008). Suivant le résultat précédent, nous pensions que la CaMKII peut provoquer ou augmenter les entrées d'EB3, et ainsi que le traitement de KN93 réduise les entrées détectées. J'ai fait l'acquisition de deux neurones par lamelle, un neurone sans stimulation à raison d'une image toutes les trois secondes pendant cinq minutes, et l'autre avec une stimulation de KCl de trois minutes effectuée après les cinq premières minutes d'une acquisition totale de quinze minutes. Pour l'étude des neurones sans stimulation, j'ai mesuré la moyenne d'intensité brute (sans standardisation) dans les épines dans le signal EB3 pour tous les plans. Pour l'analyse des neurones stimulés, j'ai réalisé le comptage manuel complet des entrées d'EB3 à l'aide d'un script personnel.

J'ai observé une augmentation significative de l'intensité moyenne d'EB3 en présence de KN93 par rapport au DMSO et KN92 dans les neurones imagés cinq minutes sans stimulation (Figure 15B). Le Film 8 Stimulation KCl, EB3-GFP et CaMKII-mRuby et la Figure 15A montrent de bons exemples de ces entrées d'EB3 dans un neurone traité au KN93. Il n'y a de différence significative entre le contrôle et le KN93 parmi ces neurones ; on observe cependant un effet significatif entre ces mêmes groupes sur le nombre d'évènements comptés chez les neurones avant stimulation de la Figure 15C. On n'observe cependant pas de différence significative entre les groupes traités au KN92 et au KN93 chez les neurones stimulés (Figure 15C). De plus, la stimulation au KCl ne semble pas avoir eu d'effet clair sur les entrées d'EB3, donnant parfois des résultats étranges tels qu'une forte augmentation dans le groupe DMSO de la Figure 15C en même temps qu'une réduction faible dans le groupe contrôle. Il est donc impossible de bien conclure sur l'effet du KN93 sur les entrées d'EB3, bien qu'il existe une tendance intéressante vers une augmentation du nombre de comètes d'EB3 après l'inhibition de la CaMKII. L'augmentation des entrées causées par le KN93 est contraire à notre

hypothèse, mais suggère tout de même qu'il existe un lien entre les entrées de microtubules et la CaMKII.

Le protocole de stimulation n'a pas été très efficace et cela pourrait être dû soit à un problème au niveau de l'analyse ou à l'inefficacité de la stimulation. La dépolarisation au KCl n'a jamais semblé causer une augmentation claire des entrées. Mon protocole était légèrement différent du protocole de Hu et de ses collaborateurs ; ils stimulaient à trois reprises pendant trois minutes avec 75mM de KCl en laissant un délai de 10 minutes entre chaque stimulation, alors que je stimulais une seule fois pendant trois minutes avec 40mM de KCl. J'ai principalement choisi cette durée parce qu'elle demandait moins de temps, ce qui me laissait la chance d'observer plus de neurones, et que cette stimulation était déjà connue pour entraîner la localisation de la CaMKII aux microtubules (Figure 12).

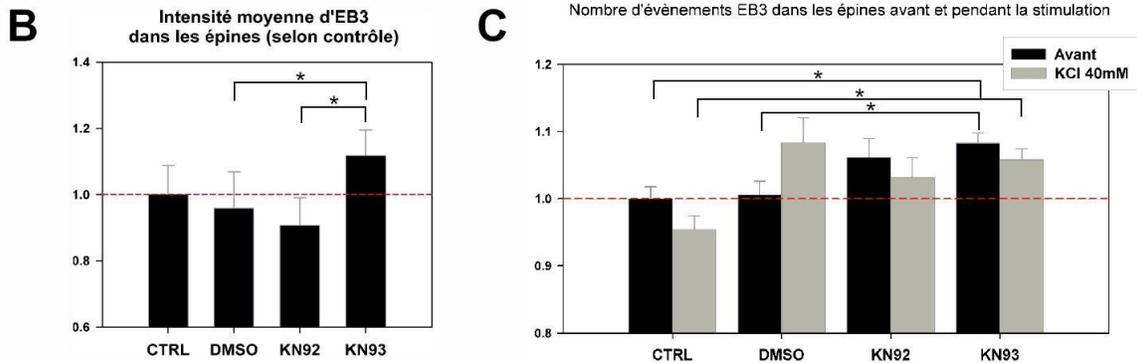
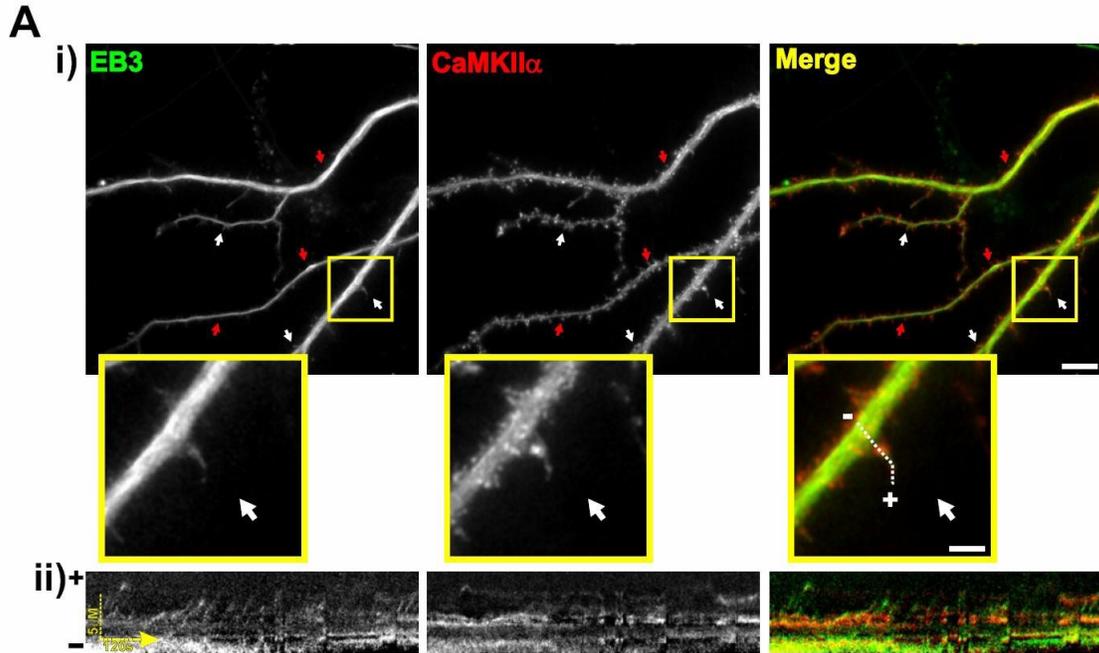


Figure 15 : Effet de l'inhibition de la CaMKII sur les entrées d'EB3

A-i) Neurone traité 1h au KN93 5 μ M montrant des entrées répétées d'EB3 dans les épines. Ces images sont la projection des maximums de chaque signal, pour permettre d'observer les comètes. Échelle neurone entier=20 μ m, échelle de l'encadré = 5 μ m; L'encadré correspond au Film 8 Stimulation KCl, EB3-GFP et CaMKII α -mRuby **ii)** Kymographe de l'épine encadrée en i). Les entrées d'EB3 y sont visibles sous forme de lignes obliques. **B)** Intensité moyenne mesurée d'EB3 dans les épines pendant 5 minutes d'observations. **C)** Nombre d'évènements d'EB3 par secondes selon le contrôle.

Chapitre 4: Discussion générale

Nous avons voulu montrer que la CaMKII jouait un rôle important dans le développement et dans la plasticité synaptique en interagissant avec le cytosquelette neuronal, particulièrement avec les microtubules. Les figures 8 et 12 montrent la colocalisation de la CaMKII avec la tubuline lors de la dépolarisation du cône de croissance et du neurone entier, respectivement. La littérature n'a encore jamais fait mention d'une telle localisation, bien que la phosphorylation de protéines associées aux microtubules par la CaMKII (MAP2, Tau, KIF17, etc.) ait été observée. Les multiples fonctions documentées de la CaMKII dans le cône de croissance et dans le neurone mature pourraient vraisemblablement passer par une association aux microtubules, soit pour favoriser une phosphorylation locale de protéines sur les microtubules et supporter le virage du cône ou pour participer à la livraison locale de protéines dans la synapse. Ainsi, la capacité de la CaMKII de lier l'actine, son expression au tout début du développement ainsi que son activité dans le virage du cône nous ont menés à l'hypothèse de la régulation du virage du cône de croissance par la CaMKII par une association au cytosquelette qui alterne entre l'actine et les microtubules selon l'activité. Je montre que la CaMKII colocalise moins avec l'actine mais davantage avec les microtubules lors d'une dépolarisation du cône de croissance, en accord avec notre hypothèse de départ d'un déplacement de la CaMKII de l'actine aux microtubules et vice-versa, selon les oscillations de calcium. Nous n'avons malheureusement pas pu mesurer l'impact de la localisation de l'enzyme sur la structure et le virage du cône de croissance. J'ai testé deux techniques de virage du cône sans résultats probants: le guidage par un gradient créé à l'aide de micro-injections locales et la culture de neurones sur un substrat auquel on a couplé un gradient attractif selon divers patrons. L'inhibition de la CaMKII par la transfection avec un shRNA anti-CaMKII n'a pas donné de résultats clairs, ce qui porte à croire que la CaMKII ne soit pas essentielle au développement des neurones, où que sa réduction soit compensée par d'autres mécanismes.

J'ai également obtenu quelques pistes intéressantes qui suggèrent que la liaison de la CaMKII aux microtubules pourrait être impliquée dans la régulation des entrées de microtubules dans l'épine dendritique ou dans la livraison de récepteurs AMPA à la synapse. Les résultats sur les entrées de microtubules dans la synapse sont contradictoires : j'ai observé d'une part une plus grande quantité d'entrées d'EB3 dans les épines ayant montré de la translocation dendritique et synaptique que dans les épines ayant montré seulement de la translocation synaptique, et d'autre part, j'ai observé que le KN93 semblait augmenter les entrées d'EB3 dans les épines. Finalement, j'ai noté une augmentation non significative intéressante de GluR1 dans les épines ayant montré de la translocation dendritique et synaptique de CaMKII .

4.1 Rôle de la CaMKII dans le développement et le guidage axonal

Il est connu que la CaMKII est liée à l'actine du neurone en développement et y régule l'extension des neurites et la formation des synapses (Fink et al., 2003) et qu'elle est impliquée dans le guidage du cône (Wen et al., 2004), mais le mécanisme par lequel elle contrôle le virage et son importance dans le développement sont encore mal compris. Les études de l'inhibition de la CaMKII pendant le développement sont contradictoires. L'attraction du cône de croissance dépendante de CaMKII passe probablement par la phosphorylation de certaines RhoGTPases, dont Rac1 et Cdc42 (Gomez et Zheng, 2006), des petites Rho GTPases qui contrôlent la progression du cône de croissance et la polymérisation de l'actine (Dickson B.J., 2001) et qui sont importantes dans les interactions microtubules-actine (Buck et Zheng, 2002). Selon notre hypothèse et nos observations à la figure 8, la CaMKII se localise aux microtubules pendant une activité élevée; elle pourrait donc phosphoryler des protéines associées aux microtubules et y modifier les interactions microtubules-actine. L'observation que la CaMKII détecte les variations locales de calcium pour agir sur le virage du cône (Wen et al., 2004) porte à croire que c'est en phosphorylant localement des protéines que la CaMKII provoque l'attraction du cône. Nous savons que la CaMKII se déplace dans le cône suivant une dépolarisation au KCl 40mM pendant 90 secondes (Figure 7), stimulation connue pour augmenter le calcium dans le cône (Welnhöfer et al., 1999), et que ce déplacement de

CaMKII coïncide avec les microtubules du cône et diminue la localisation de l'enzyme à l'actine (Figure 8). Ce déplacement pourrait être à l'origine de l'activité de la CaMKII dans le virage du cône de croissance. D'ailleurs, il est intéressant de noter que la CaMKII possède un seuil d'activation à la Ca^{2+}/CaM beaucoup plus faible que celui de la CaMKII, ce qui lui permet de réagir à de plus faibles concentrations de calcium (Brocke et al., 1999), et donc lors d'évènements locaux de faible intensité ou d'intensité modérée.

Je n'ai pas observé d'effets clairs de l'inhibition de la CaMKII et de la CaMKII sur le développement de nos neurones d'hippocampe de rat en culture. Ces résultats rejoignent une étude récente sur un rat *knockout* de CaMKII, dont le cerveau se développe normalement et sans changements morphologiques apparents (Borgesius et al., 2011). Les auteurs de cette dernière étude n'ont d'ailleurs pas observé de changements dans l'arborisation dendritique, contrairement à la littérature (Fink et al., 2003) et aucun changement dans l'expression de la CaMKII, également à l'opposé de ce qui avait été rapporté précédemment (Thiadarajan et al., 2002). Ces observations compliquent encore plus l'interprétation de la littérature. Il est possible que la CaMKII joue bien les rôles qu'on lui attribue dans le développement, mais que des phénomènes compensateurs se déclenchent dans le cerveau complet et préviennent les effets délétères de l'inhibition de la CaMKII sur le développement. Le protocole d'inhibition que j'ai utilisé pourrait aussi avoir bien fonctionné et avoir montré que la CaMKII ne joue pas de rôles importants dans le développement morphologique des neurones. Il est aussi possible que la durée d'expression de plusieurs jours requise pour l'efficacité des shRNA permette le développement normal des neurones. Les observations sur le rat *knockout* me convainquent suffisamment pour affirmer que la CaMKII n'est probablement pas essentielle à la structure des neurones en développement, mais qu'elle puisse avoir des fonctions détectables en culture, tel que vu dans la littérature.

Notre objectif était de tester l'effet des mutants de CaMKII sur l'attraction du cône de croissance au moyen d'essais de guidage, ainsi que d'étudier le déplacement de la CaMKII et de ses mutants lors du virage. J'ai montré que la CaMKII se déplaçait dans

le cône de croissance et que ce mouvement est probablement un déplacement d'une partie de la CaMKII liée à l'actine vers les microtubules du cône de croissance (voir Figure 8). Nous possédons plusieurs mutants dont l'activité et la liaison au cytosquelette sont modifiées. La CaMKII -A303R, par exemple, possède un site de liaison à la calmoduline muté qui ne lui permet pas de lier cette protéine. Ainsi, lors d'une hausse de calcium, cette CaMKII ne peut être activée et sa liaison à l'actine ne peut être rompue par la liaison de la calmoduline, ce qui devrait en théorie inhiber le déplacement de la CaMKII (tel que suggéré par la figure 7 et le film 4, mais pas quantifié). Si l'attraction du cône par certains facteurs nécessite le déplacement de la CaMKII, la transfection du neurone par la CaMKII -A303R devrait réduire le virage du cône pendant un essai de guidage attractif. De plus, nous possédons le mutant CaMKII -E97K qui ne lierait pas les microtubules selon les résultats obtenus par Mado Lemieux sur la CaMKII -E96K. Cette CaMKII, une fois sa liaison altérée aux microtubules mise en évidence, aurait pu nous permettre d'observer l'effet sur le virage axonal de la séparation de la CaMKII de l'actine sans une liaison aux microtubules. Mais comme la section suivante l'expliquera, des mesures fiables de virage axonal n'ont pu être produites, rendant les tests de ces mutants inutiles.

4.2 Techniques de guidage axonal

J'ai tenté de mettre au point deux protocoles de guidage du cône de croissance pour tester l'effet des mutants sur le guidage du cône. J'ai testé deux techniques différentes qui nous ont permis de faire certaines observations encourageantes, mais insuffisamment reproductibles pour répondre à nos questions. La première technique que j'ai tenté de mettre au point est la création d'un gradient attractif local par micro-injection régulière d'un facteur attractif. Cette technique a été utilisée plusieurs fois pour faire tourner le cône de croissance du neurone spinal du xénope (Lohof AM et al., 1992 ; Zheng et al., 1994 ; Jin et al., 2005), le cône du neurone spinal du rat (Bouzigues et al., 2007), mais plus rarement le cône du neurone de l'hippocampe du rat (Goh et al., 2008). Néanmoins, le guidage par micro-injection a été sérieusement critiqué pour l'irrégularité du gradient utilisé, le manque de précision dans la description des conditions utilisées dans la littérature et le fait qu'il existe certaines opinions dans la littérature au niveau de la

concentration réelle du gradient créé (Pujic et al., 2008). Une étude rigoureuse du gradient créé par la pipette a révélé que la concentration de la molécule injectée et la position du gradient variaient parfois de façon imprévisible avec le poids moléculaire du facteur utilisé, sa charge, ainsi que la durée et la fréquence des injections (Idem). De plus, il a été discuté que la plupart des études de guidage (par injection ou non) ne possèdent pas suffisamment d'échantillons pour obtenir des résultats significatifs statistiquement puisque le nombre d'essais de guidage requis est parfois beaucoup trop grand (Aletti et Causin, 2008). Par exemple, un protocole expérimental de trente minutes provoquant 20% de virage par rapport au contrôle pourrait nécessiter plus de 1800 essais afin d'obtenir des différences significatives (Idem).

J'ai essayé le protocole de guidage par micro-injection locale essentiellement tel que décrit (Zheng et al., 1994 ; Bouzigues et al., 2008) avec 0,5mM de glutamate ou 10mM de GABA, qui est attractif lors du développement (Bouzigues et al., 2008). J'ai utilisé une série d'injection de la solution à chaque seconde, à environ 100 μ m du cône et à un angle de 45°. J'ai parfois observé une attraction rapide probablement causée par l'injection puisqu'elle s'est produite en moins d'une minute suivant la stimulation (voir figure 16B et Film 9 Guidage du Cône Puff Glutamate, Lifeact-mGFP.avi), mais la plupart des essais de guidage ont été infructueux. Une série de tests à l'aveugle (injection avec une solution inerte de PBS ou de solution attractive de PBS/Glutamate 0,5mM) a finalement été abandonnée vu l'absence d'effet de l'une ou l'autre des solutions après de nombreux essais. Il est probable que l'inefficacité de la technique soit due à l'irrégularité du gradient créé, ce qui est de plus exacerbé par le fait que je travaille sous une perfusion continue pour maintenir les neurones en santé et pour éviter l'accumulation d'attracteur injecté. Je n'ai pas pu trouver de discussion dans la littérature des problèmes causés par l'emploi d'une perfusion pendant l'essai de guidage par micro-injection locale. Il semble qu'il soit peu réaliste de vouloir provoquer le virage du cône sous ces conditions, et qu'une chambre fermée ou un environnement d'imagerie à atmosphère contrôlée soit la meilleure approche.

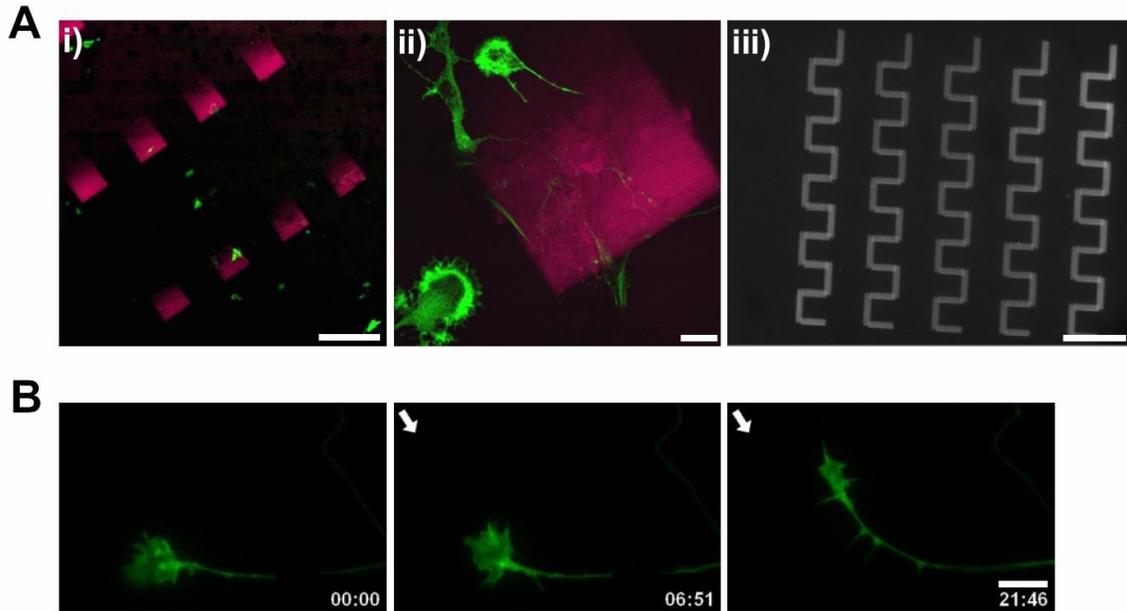


Figure 16 : Techniques d'essais de guidage

A) Gradients créés par LAPAP, **i)** Patrons de laminine-Cy5 (rose) dans un pètri avec culture d'hippocampe transfectés avec la mGFP-CaMKII (vert). Échelle = 200 µm. **ii)** Zoom sur un patron de laminine-Cy5 (rose) avec des neurones transfectés mGFP-CaMKII (vert). Échelle=20 µm. **iii)** Exemple de patron de laminine-Cy5 en zigzag. Échelle=200 µm. **B)** Cône guidé par une micro-injection locale de glutamate 0,5mM tel que montré dans le Film 9 Guidage du Cône Puff Glutamate, Lifeact-mGFP.avi ; La flèche indique la localisation de la pipette, à environ 100 µm du cône. Échelle = 10 µm.

La deuxième technique j'ai voulu employer pour le guidage est le LAPAP (*laser-assisted protein adsorption by photobleaching*), une nouvelle technique qui permet de coupler des protéines à un substrat selon la patron et la concentration désirée au moyen d'un laser (Bélisle et al., 2008) (voir Matériels et Méthodes). Cette nouvelle technique a été utilisée récemment pour étudier la croissance des neurites et leur compétition dans la formation de l'axone (Wissner-Gross et al., 2011), mais n'a pas été employée directement pour le guidage du cône de croissance. Jonathan Bélisle, l'étudiant ayant développé la technique, a observé plusieurs exemples de virage dans les neurones du ganglion spinal du rat avec des gradients de laminine. La technique semble fonctionner dans certaines conditions et avec certaines cultures, mais n'a jamais été mise au point pour les neurones d'hippocampe du rat. Nous avons essayé de mettre au point l'essai de virage par LAPAP avec nos cultures. J'ai testé deux patrons de gradient de laminine dans des pètris de verre. Le premier patron est une grille de carrés dont la concentration en protéine augmente

progressivement dans une seule direction. Le deuxième est un patron de protéine en zigzag afin de guider un axone sur une plus longue distance. Cependant, la culture d'hippocampe de Francine Nault, qui fonctionne très bien sur les lamelles d'aclar et de verre que nous utilisons, n'a pas fonctionné dans ces pétris. Après les quelques jours requis pour l'expression de marqueurs fluorescents transfectés, il ne restait que quelques neurones, et presque seulement des cellules gliales.

4.3 Rôle de la translocalisation locale de la CaMKII dans l'épine

Il est déjà bien connu que lors d'une stimulation synaptique, la CaMKII translocalise au niveau de la synapse et cette translocation joue de nombreux rôles (Merrill et al., 2005). Cette translocalisation est due principalement à la liaison de la CaMKII au récepteur NMDA lors de l'activité synaptique et de l'entrée de calcium par les NMDAR. Cette accumulation synaptique de CaMKII est liée à la potentialisation à long terme de l'épine. Selon nos observations, il semble également que la CaMKII translocalise dans la dendrite sous certaines épines lors d'une stimulation synaptique. Ce mouvement pourrait, par exemple, être lié au relâchement de cargos de récepteurs NMDA par la phosphorylation de la kinésine KIF17 (Guillaud et al., 2008). Mado Lemieux, une collègue étudiante au doctorat sous la direction du Dr. Paul De Koninck, a également observé que cette translocation locale de CaMKII dans la dendrite coïncide avec une augmentation locale de calcium et plus grande activité de la CaMKII. Il est donc possible que la double translocation, dendritique et synaptique, de CaMKII soit associée au relâchement de cargos et à la potentialisation de l'épine.

Tel que mentionné précédemment, la CaMKII contribue à l'insertion synaptique des récepteurs AMPA (Hayashi et al., 2000; Lisman et al., 2002; Opazo et al., 2010). J'ai étudié le rôle de la translocation dendritique locale de la CaMKII dans l'insertion des récepteurs AMPA au moyen du marqueur de la sous-unité GluR1, la protéine de fusion GluR1-GFP. Je ne suis pas parvenu montrer une augmentation de la quantité de GluR1-GFP dans les synapses montrant de la translocation dendritique et synaptique par rapport aux synapses sans translocation ou montrant seulement de la translocation synaptique (les groupes D-/S- et D+/S+ sont statistiquement différents [$p=0,03$], mais le test de groupe

Kruskal-Wallis ne l'est pas [$p=0,14$]). Je crois que la tendance que j'ai observée représente une vraie augmentation de GluR1 suite à la double translocation de la CaMKII puisque Simon Labrecque, étudiant au doctorat dans notre laboratoire, a montré une augmentation significative de GluR1 lors de ses observations avec le marqueur GluR1-SEP (*superecliptic pHluorin*). La fluorescence de ce marqueur à 488 nm est faible dans un milieu acide tel que celui d'une vésicule ($pH\sim 5,6$), mais elle augmente beaucoup dans un milieu neutre comme le milieu externe ($pH\sim 7,4$) (Sankaranarayanan et al., 2000). Le seul signal détecté avec le marqueur GluR1-SEP est donc celui des récepteurs relâchés par exocytose à la membrane; les sous-unités encore contenues dans les vésicules étant très peu fluorescentes. Ce meilleur contraste a donc permis à M. Labrecque de mettre en évidence l'effet positif de la translocation dendritique et synaptique de la CaMKII sur l'insertion des récepteurs AMPA à la synapse.

Des études récentes ont montré que les microtubules n'étaient pas confinés à la dendrite, mais qu'ils pouvaient entrer dans les épines dendritiques au repos ou de façon dépendante de l'activité, et que ces entrées entraînaient des modifications de l'épine (Hu et al., 2008; Jaworski et al., 2009; Gu et Zheng, 2009). De plus, ces entrées semblent importantes tout au long de la vie du neurone puisqu'elles se produisent bien après le développement (Dent et al., 2011). J'ai observé une augmentation de l'intensité de la protéine associée aux microtubules EB3 dans les épines lors de la translocalisation dendritique et synaptique de la CaMKII mais pas lors de la translocalisation synaptique seule (Figure 14). Cependant, j'ai observé une augmentation de la quantité d'entrées d'EB3 en présence de KN93, un inhibiteur de CaMKII (Figure 15). Il est difficile de bien concilier ces deux résultats, soit qu'une forte activation ou inhibition de la CaMKII provoquent toutes les deux des entrées d'EB3. Il est probable qu'un de ces deux résultats soit incorrect. Un article récent a montré que l'activation des récepteurs NMDA limitait les entrées de microtubules dans les épines et la présence de comètes d'EB3 dans les dendrites (Kapitein et al., 2011). Il est donc possible que l'augmentation des entrées d'EB3 que j'ai observée pendant la stimulation $0Mg^{2+}/Gly$, qui active les récepteurs NMDA, soit erronée. De plus, dans ce papier, les auteurs notent que le mécanisme par lequel les récepteurs NMDA suppriment les dynamiques des microtubules est inconnu, mais pourrait être dû à l'action directe du calcium ou un autre phénomène dépendant du

calcium. Selon mes observations en présence de KN93, il serait possible que la CaMKII soit responsable de cet effet de réduction puisque son inhibition provoque une augmentation des entrées. La CaMKII jouerait donc un rôle totalement opposé à celui que nous avons entrevu ; elle pourrait servir à limiter localement les entrées d'EB3 vers les épines ayant une forte activité. Il est cependant difficile d'imaginer pourquoi la CaMKII, qui se sépare de l'actine pour permettre la réorganisation de l'actine de l'épine en période d'activité (Okamoto et al., 2007) irait se lier aux microtubules pour empêcher cette même réorganisation.

Comment ai-je pu obtenir ces deux résultats apparemment opposés ? Le résultat montrant une augmentation d'EB3 dans les épines ayant montré les deux types de translocation de CaMKII a été obtenu à partir d'une acquisition lente (une image toutes les 9 à 10 secondes) de multiples images à des hauteurs différentes qui ont ensuite été déconvoluées et additionnées entre elles. L'effet de l'inhibition de la CaMKII sur les entrées d'EB3 a été évalué de deux façons, mais à partir d'une même acquisition rapide (3 secondes entre les images). J'avais utilisé la première technique d'acquisition pour augmenter le signal EB3, qui était très faible. Il est possible que cette façon de procéder entraîne une détection plus grande de la fraction libre du marqueur, et que j'aie détecté une augmentation de la taille de l'épine pendant la stimulation plutôt qu'une augmentation des comètes d'EB3. Lorsque j'ai évalué l'effet du KN93 sur les entrées d'EB3, j'ai compté directement les comètes visibles au moyen des films déconvolués, dont j'avais retiré le signal moyen afin d'augmenter le contraste lors des entrées, et d'un graphique interactif traçant les variations d'intensité dans l'épine. Je crois que ce résultat est plus solide, bien que le signal fût parfois équivoque et que l'analyse nécessitait beaucoup de concentration et d'interaction. Finalement, il reste la possibilité que le KN93 ait eu des effets non spécifiques; il est connu que le KN93 peut aussi inhiber la CaMKI et la CaMKIV et interférer avec les canaux calciques et potassiques dépendants du voltage (Enslin et al., 1994; Vest et al., 2010). Malgré tout, ces effets sont principalement observés dans des doses légèrement supérieures à celle que j'ai employée (~10 M).

4.4 Analyse de colocalisation

De nombreuses études en neurosciences se basent sur des analyses de colocalisation (Zinchuk et Grossenbacher-Zinchuk, 2009). Il existe plusieurs types de coefficients utilisés pour estimer la colocalisation, soient le coefficient de corrélation de Pearson, le coefficient de superposition de Manders, les coefficients de superposition k_1 et k_2 ainsi que les coefficients de colocalisation m_1 et m_2 (Zinchuk et al., 2007). Dans mes analyses, j'ai utilisé une analyse de colocalisation basée sur le coefficient de corrélation de Pearson dont l'objectif était de conserver l'information spatiale de la colocalisation, permettant de donner les images de colocalisation nMDP vues aux figures 8 et 12 (Jaskolski et al., 2005). J'ai eu du mal à mettre au point l'analyse pour les deux modèles, d'abord parce que j'ai fait les premiers tests à partir de signaux de cellules transfectées. Les cellules transfectées sont beaucoup moins nombreuses sur chaque lamelle que lorsque j'utilise des marqueurs immunocytochimiques, ce qui nécessitait de prendre des images sur des neurones aux morphologies différentes et à l'intensité de marquage peu constante. J'ai donc finalement utilisé des marquages immunocytochimiques, plus fiables que la surexpression, mais ne permettant pas l'expression de mutants de CaMKII. L'analyse de Jaskolski et al. était très sensible aux ROIs utilisées. Pour définir les régions dans les neurones entiers, la solution était simple, j'ai tracé deux régions identiques dans les dendrites pour chaque neurone, ce qui m'a permis d'obtenir des ICorr représentatifs des images d'origine. Dans les cônes de croissance, cette approche ne fonctionnait pas puisque la morphologie des cônes était très variable. J'ai essayé d'utiliser des ROIs contenant les cônes entiers, mais le fait que les signaux du cytosquelette ne couvrent qu'une partie du cône nuisait à l'analyse, qui identifiait souvent les régions sans aucun signal comme étant très colocalisées, ce qui n'était pas le but de mon analyse. J'ai finalement tracé des régions ne contenant que le signal de tubuline ou le signal d'actine pour les échantillons marqués par l'un ou l'autre, ce qui m'a permis finalement de révéler le déplacement de la CaMKII sur le cytosquelette.

Cette analyse de colocalisation, décrite en détail dans la section matériels et méthodes, m'a permis de montrer la translocalisation de la CaMKII dans le cône de croissance et la translocalisation de la CaMKII dans le neurone mature. Dans le cône de

croissance, la CaMKII colocalise beaucoup avec l'actine à l'état de repos et significativement moins pendant la dépolarisation du cône, alors qu'elle colocalise plus avec la tubuline pendant la stimulation qu'au repos. Dans le neurone mature, la CaMKII colocalise de façon semblable avec la tubuline et les neurofilaments à l'état de repos et colocalise significativement plus avec la tubuline pendant la stimulation. Malgré tout, l'analyse de colocalisation ne nous permet pas de dire que la CaMKII interagit directement avec les éléments avec lesquels elle colocalise, ce que certaines études d'imagerie peuvent arriver à faire de façon plus robuste (telle que l'étude du temps de vie de fluorescence, FLIM). Il est plus probable que la CaMKII se lie à des protéines associées à la tubuline qu'elle peut phosphoryler telles que Tau (Yoshimura et al., 2003), MAP2 (Goldenring et al., 1985), KIF17 (Guillaud et al., 2008), STOP (Baratier et al., 2006) et Stathmin (Ohkawa et al., 2007), qu'à la tubuline elle-même, bien que cette dernière liaison ait été observée (Levine and Sahyoun, 1988 in Griffith et al., 2003). De plus, cette analyse ne peut établir hors de tout doute que la CaMKII qui quitte l'actine lors de la stimulation est la même qui se colocalise avec la tubuline, bien que cela est clairement possible, puisque nous observons un tel mouvement (film 3, figure 7).

4.5 Perspectives

J'ai rencontré des problèmes importants dans la mise au point des techniques de guidage; il a été difficile de créer un gradient stable à l'aide d'une pipette et de produire des cultures de neurones en santé avec les échantillons traités en LAPAP. Pour pallier à ces problèmes, j'ai proposé une nouvelle technique de guidage à Jonathan Belisle, l'étudiant responsable de la création du LAPAP, et cette technique serait applicable selon lui. Le principe est de combiner les techniques de création de gradient par micro-injection locale et le LAPAP. La technique reposerait sur une injection locale, à environ 100 μ m d'un cône choisi, d'une solution contenant le facteur attractif modifié afin de pouvoir être conjugué à la surface de la lamelle par LAPAP. En même temps que cette injection, on exposerait la solution au laser blanchissant et on combinerait ainsi localement la quantité voulue de facteur attractif. Cette technique nécessiterait uniquement de modifier les composés pour le LAPAP et l'utilisation d'un microscope muni d'un laser, autrement dit, ce « LAPAP local » est immédiatement à notre portée. Cela permettrait d'abord de régler

les principaux problèmes rencontrés avec les deux techniques, soit le manque de contrôle du gradient lors de l'injection locale d'un gradient, et l'absence de contrôle sur la localisation du gradient par rapport aux cellules en LAPAP. La technique permettrait également d'utiliser les mêmes cultures et les mêmes équipements que nous possédons. Les principales difficultés seraient de limiter l'impact de la solution injectée mais non conjuguée sur le guidage du cône de croissance et de mettre au point les complexes nécessaires au LAPAP local.

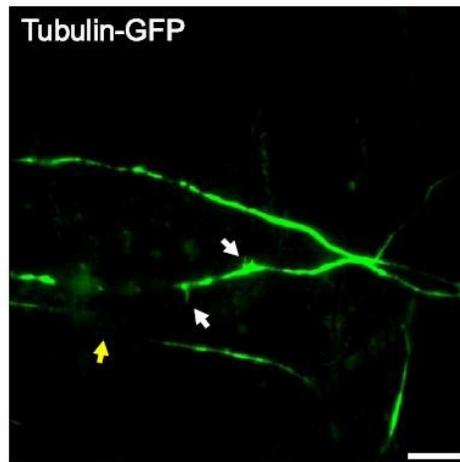


Figure 17 : Image de Tubulin-GFP prise à l'aide d'un microscope TIRF.
Les flèches blanches indiquent les entrées de microtubules dans les épines. La flèche jaune montre comment certaines régions hors-focus ne produisent aucun signal en microscopie TIRF. Échelle = 20 μ m

Dans un autre ordre d'idée, l'augmentation du nombre de comètes d'EB3 en présence de l'inhibiteur KN93 de la CaMKII mériterait de faire l'objet de nouvelles expérimentations. La plupart des auteurs ayant étudié les comètes d'EB3 ont utilisé des systèmes de microscopes à réflexion totale interne (*Total internal reflection fluorescence*, TIRF), qui permettent d'exciter l'échantillon sur une tranche de quelques centaines de nanomètres, réduisant beaucoup le bruit et permettant d'avoir des images beaucoup plus claires. J'ai eu la chance de tester un tel microscope durant l'école de neurophotonique au CRULRG lors du mois de mai 2011, et j'ai réussi à obtenir des images encourageantes (Figure 17). Un nouveau projet visant à montrer l'interaction CaMKII et EB3

nécessiterait également de faire l'étude de leur colocalisation ainsi que l'activité des mutants de la CaMKII (incluant entre autres le mutant ne liant pas les microtubules, E96K) sur les comètes d'EB3 dans les dendrites et dans l'épine. Il serait très intéressant également de revenir sur l'étude de la translocation locale de la CaMKII sur les entrées d'EB3 avec un microscope TIRF afin de résoudre la disparité dans mes résultats. Il est selon moi certain que la CaMKII colocalise avec EB3 puisqu'EB3 lie MAP2 (Kapitein et al., 2011), et il est possible que la CaMKII soit le lien manquant entre le récepteur NMDA et EB3, et qu'il s'agisse ici d'un rôle de la CaMKII encore insoupçonné.

Conclusion générale

Le développement du neurone et la plasticité de ses synapses font intervenir de multiples protéines et nécessitent des changements réguliers dans la structure du cytosquelette. Les interactions entre l'actine et les microtubules dans le neurone sont essentielles au guidage du cône de croissance et des évidences récentes suggèrent qu'elles seraient importantes dans l'épine dendritique. La CaMKII, une des protéines les plus abondantes du cerveau, pourrait faire le pont entre les oscillations calciques, un messager secondaire essentiel de l'activité neuronale, et le cytosquelette en interagissant avec les microtubules sous ses isoformes CaMKII α et CaMKII β et avec l'actine sous sa forme CaMKII γ . La littérature propose des rôles de la CaMKII qui sont cohérents avec la liaison de la CaMKII au cytosquelette de manière activité-dépendante.

J'ai montré pendant mes travaux de maîtrise à l'aide d'une analyse de colocalisation que la dépolarisation du cône de croissance et du neurone mature entraîne la translocalisation de la CaMKII aux microtubules. Dans le cône, ce mouvement se produit de concurrence avec une diminution de la localisation de la CaMKII à l'actine, tel que prévu par notre hypothèse de translocation de la CaMKII sur le cytosquelette du cône de croissance. Il n'a pas été possible de tester l'importance de ce phénomène sur le guidage axonal, malgré la mise au point de deux types d'essais de virage. Un meilleur protocole de virage est nécessaire. De plus, le *knockdown* de la CaMKII par shRNA n'a pas changé le développement du neurone contrairement à nos attentes. La translocation de la CaMKII sur les microtubules dendritiques dans le neurone mature, lorsqu'elle coïncide avec une translocation à la synapse, pourrait être associée à une faible augmentation de la quantité de récepteurs AMPA et à une augmentation d'entrées de microtubules. Cependant, l'inhibition de la CaMKII dans le neurone a révélé une tendance à la hausse de ces mêmes entrées de microtubules. D'autres expériences sur des équipements mieux adaptés sont requises pour clarifier cette divergence.

Une meilleure compréhension des interactions entre une des protéines les plus importantes du cerveau et les protéines responsables de la structure même du neurone

pourrait éventuellement mener à de nouveaux traitements de maladies neurologiques telles que la maladie d'Alzheimer. Ainsi, de multiples études lient l'activité de la CaMKII avec cette maladie, particulièrement au niveau de la phosphorylation de Tau, une protéine associée aux microtubules dont la dysfonction, particulièrement son hyperphosphorylation, est liée au développement de la maladie d'Alzheimer (Yoshimura et al., 2003). De plus, les études du développement neural sont essentielles à la recherche de nouveaux traitements des traumatismes médullaires, particulièrement les traitements faisant intervenir la croissance axonale. Les microtubules sont très importants dans les processus de cicatrisation et de croissance axonale suivant une blessure de la colonne vertébrale. Il a été montré récemment que la stabilisation des microtubules après une lésion de la moelle épinière pouvait réduire la cicatrisation et augmenter la régénération des axones endommagés (Hellal et al., 2011). Ainsi, il serait intéressant de mesurer l'activité de la CaMKII dans des lésions de moelle épinière, vu son rôle dans l'attraction du cône de croissance et sa capacité de lier les microtubules.

Bibliographie

- Aletti G, Causin P. Mathematical characterisation of the transduction chain in growth cone pathfinding. *IET Syst Biol.* (2008) May;2(3):150-61.
- Arie, Y, Iketani, M, Takamatsu, K, Mikoshiba, K, Goshima, Y, Takei, K. Developmental changes in the regulation of calcium-dependent neurite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) pp.
- Bading, Hilmar, David D. Ginty and Michael E. Greenberg, Regulation of Gene Expression in Hippocampal Neurons by Distinct Calcium Signaling Pathways, *Science* (1993) Vol. 260 pp 181-186
- Baratier J, Peris L, Brocard J, Gory-Fauré S, Dufour F, Bosc C, Fourest-Lieuvain A, Blanchoin L, Salin P, Job D, Andrieux A., Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II., *J Biol Chem.* (2006) Jul 14;281(28):19561-9. Epub 2006 May 1.
- Bayer, Karl-Ulrich, De Koninck, Paul, Leonard, A S, Hell, Johannes W, Schulman, Howard, Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* (2001) vol. 411 (6839) pp. 801-5
- Bayer, Karl-Ulrich, LeBel, Eric, McDonald, Greg L, O'Leary, Heather, Schulman, Howard, De Koninck, Paul, Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *J Neurosci* (2006) vol. 26 (4) pp. 1164-74
- Bélisle, Jonathan M, Correia, James P, Wiseman, Paul W, Kennedy, Timothy E, Costantino, Santiago, Patterning protein concentration using laser-assisted adsorption by photobleaching, LAPAP. *Lab Chip* (2008) vol. 8 (12) pp. 2164-7
- Bouzigues, Cédric, Morel, Mathieu, Triller, Antoine, Dahan, Maxime, Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) vol. 104 (27) pp. 11251-6
- Borgesius, Nils Z, van Woerden, Geeske M, Buitendijk, Gabrielle H S, Keijzer, Nanda, Jaarsma, Dick, Hoogenraad, Casper C, Elgersma, Ype, CaMKII Plays a Nonenzymatic Role in Hippocampal Synaptic Plasticity and Learning by Targeting CaMKII to Synapses. *J Neurosci* (2011) vol. 31 (28) pp. 10141-10148
- Brocke, L., Chiang, L.W., Wagner, P.D., Schulman, H. Functional implications of the subunit composition of neuronal CaM kinase II. *J Biol Chem* (1999) vol. 274 (32) pp. 22713-22

- Buck, Kenneth B., Zheng, James Q. Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *J Neurosci* (2002) vol. 22 (21) pp. 9358-67
- Burnette, Dylan T, Schaefer, Andrew W, Ji, Lin, Danuser, Gaudenz, Forscher, Paul. Filopodial actin bundles are not necessary for microtubule advance into the peripheral domain of *Aplysia* neuronal growth cones. *Nat Cell Biol* (2007) vol. 9 (12) pp. 1360-9
- Burnette, Dylan T, Ji, Lin, Schaefer, Andrew W, Medeiros, Nelson A, Danuser, Gaudenz, Forscher, Paul, Myosin II activity facilitates microtubule bundling in the neuronal growth cone neck. *Dev Cell* (2008) vol. 15 (1) pp. 163-9
- Correia, Susana S, Bassani, Silvia, Brown, Tyler C, Lisé, Marie-France, Backos, Donald S, El-Husseini, Alaa, Passafaro, Maria, Esteban, José A, Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation. *Nat Neurosci* (2008) vol. 11 (4) pp. 457-66
- Dent, Erik W, Merriam, Elliott B, Hu, Xindao, The dynamic cytoskeleton: backbone of dendritic spine plasticity. *Curr Opin Neurobiol* (2011) vol. 21 (1) pp. 175-81
- De Koninck P, Schulman H., Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations., *Science*. (1998) Jan 9;279(5348):227-30.
- Dickson, B.J., Rho GTPases in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* (2001) vol. 11 (1) pp. 103-10
- Enslin et al. Characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. *J Biol Chem* (1994) vol. 269 (22) pp. 15520-7
- Easley et al. Laminin activates CaMK-II to stabilize nascent embryonic axons. *Brain Res* (2006) vol. 1092 (1) pp. 59-68
- Fink, Charles C, Bayer, Karl-Ulrich, Myers, Jason W, Ferrell, James E, Schulman, Howard, Meyer, Tobias Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the β but not the α isoform of CaMKII. *Neuron* (2003) vol. 39 (2) pp. 283-97
- Frost, Nicholas A, Shroff, Hari, Kong, Huihui, Betzig, Eric, Blanpied, Thomas A, Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron* (2010) vol. 67 (1) pp. 86-99
- Forscher, Paul et Stephen J. Smith, Actions of Cytochalasins on the Organization of Actin Filaments and Microtubules in a Neuronal Growth Cone, *J Cell Biol* (1988), Volume 107, October 1988 1505-1516

- Geraldo et al. Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis. *Nat Cell Biol* (2008) vol. 10 (10) pp. 1181-9
- Goh, Eyleen LK, Young, Ju Kim, Kuwako, Kenichiro, Tessier-Lavinge, Marc, He, Zhigang, Griffin, John W, Ming, Guo-Li, α 1-integrin mediates myelin-associated glycoprotein signaling in neuronal growth cones. *Molecular Brain* 2009 2:25 (2008) vol. 1 pp. 10
- Goldberg et Grabham. Braking news: calcium in the growth cone. *Neuron* (1999) vol. 22 (3) pp. 423-5
- Goldenring JR, Vallano ML, DeLorenzo RJ., Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 at distinct sites by calmodulin-dependent and cyclic-AMP-dependent kinases., *J Neurochem.* (1985) Sep;45(3):900-5.
- Gomez, Timothy M, Zheng, James Q. The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nat Rev Neurosci* (2006) vol. 7 (2) pp. 115-25
- Griffith, Leslie C, Lu, Cecilia S, Sun, Xiu Xia, CaMKII, an enzyme on the move: regulation of temporospatial localization. *Mol Interv* (2003) vol. 3 (7) pp. 386-403
- Gu, Jiaping, Firestein, Bonnie L, Zheng, James Q, Microtubules in dendritic spine development. *J Neurosci* (2008) vol. 28 (46) pp. 12120-4
- Guillaud, Laurent, Wong, Richard, Hirokawa, Nobutaka, Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: a molecular model of kinesin-cargo release, *Nat Cell Biol* (2008), vol. 10 (1) pp. 19-29
- Hayashi, Y, Shi, S H, Esteban, J A, Piccini, A, Poncer, J C, Malinow, R., Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* (2000) vol. 287 (5461) pp. 2262-7
- Hellal F, Hurtado A, Ruschel J, Flynn KC, Laskowski CJ, Umlauf M, Kapitein LC, Strikis D, Lemmon V, Bixby J, Hoogenraad CC, Bradke F., Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury., *Science.* (2011) Feb 18;331(6019):928-31. Epub 2011 Jan 27.
- Henley, John, Poo, Mu-Ming. Guiding neuronal growth cones using Ca²⁺ signals. *Trends Cell Biol* (2004) vol. 14 (6) pp. 320-30
- Hidaka et Yokokura. Molecular and cellular pharmacology of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaM kinase II) inhibitor, KN-62, and proposal of CaM kinase phosphorylation cascades. *Adv Pharmacol* (1996) vol. 36 pp. 193-219

- Hu X, Viesselmann C, Nam S, Merriam E, Dent EW. Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *J Neurosci*. 2008 Dec 3;28(49):13094-105.
- Hudmon A, Lebel E, Roy H, Sik A, Schulman H, Waxham MN, De Koninck P. A mechanism for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association., *J Neurosci*. (2005) Jul 27;25(30):6971-83.
- Jaskolski, F., Mulle, C., and Manzoni, O. J. (2005). An automated method to quantify and visualize colocalized fluorescent signals. *J Neurosci Methods* 146, 42-49.
- Jaworski, Jacek, Kapitein, Lukas C, Gouveia, Susana Montenegro, Dortland, Bjorn R, Wulf, Phebe S, Grigoriev, Ilya, Camera, Paola, Spangler, Samantha A, Di Stefano, Paola, Demmers, Jeroen, Krugers, Harm, Defilippi, Paola, Akhmanova, Anna, Hoogenraad, Casper C, Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* (2009) vol. 61 (1) pp. 85-100
- Jin Ming, Guan, Chen-bing, Jiang, Yun-ai, Chen, Gang, Zhao, Chun-tao, Cui, Kai, Song, Yuan-quan, Wu, Chien-ping, Poo, Mu-Ming, Yuan, Xiao-bing, Ca²⁺-dependent regulation of rho GTPases triggers turning of nerve growth cones. *J Neurosci* (2005) vol. 25 (9) pp. 2338-47
- Kapitein LC, Yau KW, Gouveia SM, van der Zwan WA, Wulf PS, Keijzer N, Demmers J, Jaworski J, Akhmanova A, Hoogenraad CC. NMDA receptor activation suppresses microtubule growth and spine entry. *J Neurosci*. (2011) Jun 1;31(22):8194-209.
- Korobova, Farida, Svitkina, Tatyana., Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* (2010) vol. 21 (1) pp. 165-76
- Lee, Aih Cheun, Suter, Daniel M., Quantitative analysis of microtubule dynamics during adhesion-mediated growth cone guidance. *Dev Neurobiol* (2008) vol. 68 (12) pp. 1363-77
- Lemieux, Mado, Christian Tardif, Simon Labrecque, Étienne Labrie-Dion, Éric Lebel, Paul de Koninck, Activity-dependent translocation of CaMKII to dendritic microtubules at the base of active synapses to support their plasticity, en préparation
- Lowery, Laura Anne, Van Vactor, David. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2009) vol. 10 (5) pp. 332-43
- Li, Q., Lau, A., Morris, T. J., Guo, L., Fordyce, C. B., and Stanley, E. F. (2004). A syntaxin 1, Gα(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve

- terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci* 24, 4070-4081
- Lin, Y, Redmond, L CaMKII binding to stable F-actin in vivo regulates F-actin filament stability. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) pp.
- Lisman, J, Schulman, Howard, Cline, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* (2002) vol. 3 (3) pp. 175-90
- Mitchison T, Kirschner M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* (1988) vol. 1 (9) pp. 761-72
- Lohof, A M, Quillan, M, Dan, Y, Poo, M.M. Asymmetric modulation of cytosolic cAMP activity induces growth cone turning. *J Neurosci* (1992) vol. 12 (4) pp. 1253-61
- Lukas C. Kapitein, Kah Wai Yau, Casper C. Hoogenraad, *Microtubule Dynamics in Dendritic Spines*, In: Lynne Cassimeris and Phong Tran, Editor(s), *Methods in Cell Biology*, Academic Press, 2010, Volume 97, *Microtubules: in vivo*, Pages 111-132, ISSN 0091-679X, ISBN 9780123813497, DOI: 10.1016/S0091-679X(10)97007-6.
- Merrill, A Michelle, Yucui Chen, Stefan Strack, Johannes W. Hell, *Activity-driven postsynaptic translocation of CaMKII* (2005), *Trends in Pharmacological Sciences*, Volume 26, Issue 12, December 2005, Pages 645-653
- Ohkawa N, Fujitani K, Tokunaga E, Furuya S, Inokuchi K., *The microtubule destabilizer stathmin mediates the development of dendritic arbors in neuronal cells.*, *J Cell Sci.* (2007) Apr 15;120(Pt 8):1447-56. Epub 2007 Mar 27.
- Okamoto, Ken-Ichi, Narayanan, Radhakrishnan, Lee, Sang H, Murata, Kazuyoshi, Hayashi, Yasunori. *The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure.* *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) vol. 104 (15) pp. 6418-23
- O'Leary, Heather, Lasda, Erika, Bayer, Karl-Ulrich, *CaMKII β association with the actin cytoskeleton is regulated by alternative splicing.* *Molecular Biology of the Cell* (2006) vol. 17 (11) pp. 4656-65
- Opazo, Patricio, Labrecque, Simon, Tigaret, Cezar M, Frouin, Arnaud, Wiseman, Paul W, De Koninck, Paul, Choquet, Daniel, *CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin.* *Neuron* (2010) vol. 67 (2) pp. 239-52
- Pujic, Zac, Giacomantonio, Clare E, Unni, Divya, Rosoff, William J, Goodhill, Geoffrey J, *Analysis of the growth cone turning assay for studying axon guidance.* *J Neurosci Methods* (2008) vol. 170 (2) pp. 220-8

- Riedl, Julia, Crevenna, Alvaro H, Kessenbrock, Kai, Yu, Jerry Haochen, Neukirchen, Dorothee, Bista, Michal, Bradke, Frank, Jenne, Dieter, Holak, Tad A, Werb, Zena, Sixt, Michael, Wedlich-Soldner, Roland. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* (2008) vol. 5 (7) pp. 605-7
- Rodriguez, Olga C, Schaefer, Andrew W, Mandato, Craig A, Forscher, Paul, Bement, William M, Waterman-Storer, Clare M., Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol* (2003) vol. 5 (7) pp. 599-609
- Sethuraman Sankaranarayanan, Dino De Angelis, James E. Rothman, Timothy A. Ryan, The Use of pHluorins for Optical Measurements of Presynaptic Activity, *Biophysical Journal* (2000) Volume 79, Issue 4, October, Pages 2199-2208
- Tang et Kalil. Netrin-1 induces axon branching in developing cortical neurons by frequency-dependent calcium signaling pathways. *J Neurosci* (2005) vol. 25 (28) pp. 6702-15
- Thiagarajan, Tara C, Piedras-Renteria, Erika S, Tsien, Richard W., α - and β CaMKII. Inverse regulation by neuronal activity and opposing effects on synaptic strength. *Neuron* (2002) vol. 36 (6) pp. 1103-14
- Vallano ML, Goldenring JR, Lasher RS & Delorenzo RJ (1986) Association of calcium/calmodulin-dependent kinase with cytoskeletal preparations: phosphorylation of tubulin, neurofilament, and microtubule-associated proteins. *Ann N Y Acad Sci* 466, 357-74.
- Vest Rebekah S., Heather O'Leary, Steven J. Coultrap, Mark S. Kindy and K. Ulrich Bayer, Effective Post-insult Neuroprotection by a Novel Ca²⁺/ Calmodulin-dependent Protein Kinase II (CaMKII) Inhibitor, (2010) July 2, *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 20675-20682.
- Wayman, Gary A, Kaech, Stefanie, Grant, Wilmon F, Davare, Monika, Impey, Soren, Tokumitsu, Hiroshi, Nozaki, Naohito, Banker, Gary, Soderling, Thomas R., Regulation of axonal extension and growth cone motility by calmodulin-dependent protein kinase I. *J Neurosci* (2004) vol. 24 (15) pp. 3786-94
- Welnhofner et al. Calcium influx alters actin bundle dynamics and retrograde flow in *Helisoma* growth cones. *J Neurosci* (1999) vol. 19 (18) pp. 7971-82
- Wen, Zhexiong, Guirland, Carmine, Ming, Guo-Li, Zheng, James Q. A CaMKII/calcineurin switch controls the direction of Ca²⁺-dependent growth cone guidance. *Neuron* (2004) vol. 43 (6) pp. 835-46
- Wissner-Gross ZD, Scott MA, Ku D, Ramaswamy P, Fatih Yanik M., Large-scale analysis of neurite growth dynamics on micropatterned substrates., *Integr Biol (Camb)*. (2011) Jan;3(1):65-74. Epub 2010 Oct 25.

- Yamauchi, T, Fujisawa, H., Regulation of the interaction of actin filaments with microtubule-associated protein 2 by calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochim Biophys Acta* (1988) vol. 968 (1) pp. 77-85
- Yao, Jiaqi, Sasaki, Yukio, Wen, Zhexing, Bassell, Gary J, Zheng, James Q. An essential role for β -actin mRNA localization and translation in Ca^{2+} -dependent growth cone guidance. *Nat Neurosci* (2006) vol. 9 (10) pp. 1265-73
- Yoshimura Y, Ichinose T, Yamauchi T., Phosphorylation of tau protein to sites found in Alzheimer's disease brain is catalyzed by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II as demonstrated tandem mass spectrometry., *Neurosci Lett.* (2003) Dec 26;353(3):185-8.
- Zheng, J Q, Wan, J J, Poo, M M., Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *J Neurosci* (1996) vol. 16 (3) pp. 1140-9
- Zheng, J Q, Felder, M, Connor, J A, Poo, Mu-Ming, Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* (1994) vol. 368 (6467) pp. 140-4
- Zinchuk, Vadim, Zinchuk Olga, Okada Teruhiko, Quantitative Colocalization Analysis of Multicolor Confocal Immunofluorescence Microscopy Images: Pushing Pixels to Explore Biological Phenomena, *Acta Histochemica et Cytochemica* (2007) Vol. 40 , No. 4 pp.101-111
- Zinchuk,, Vadim, Grossenbacher-Zinchukb Olga, Recent advances in quantitative colocalization analysis: Focus on neuroscience, *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* (2009), Volume 44, Issue 3, October 2009, Pages 125-172