



Stimulation optique localisée assistée par les nanoparticules d'or : Un nouvel outil pour étudier la communication synaptique et la plasticité

Mémoire

Pierre-Luc Ayotte-Nadeau

Maîtrise en biophotonique - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

Stimulation optique localisée assistée par les nanoparticules d'or : Un nouvel outil pour étudier la communication synaptique et la plasticité

Mémoire

Pierre-Luc Ayotte-Nadeau

Sous la direction de :

Paul De Koninck, directeur de recherche
Flavie Lavoie-Cardinal, codirectrice de recherche



Résumé

Pour mieux comprendre les processus moléculaires à la base de la communication synaptique, il est nécessaire de pouvoir observer et contrôler l'activité synaptique avec une grande précision temporelle (ms) et spatiale (échelle nanométrique).

Mon projet propose d'utiliser une technique de stimulation optique localisée basée sur l'excitation plasmonique de nanoparticules d'or (Nanoparticle Assisted Localized Optical Stimulation – NALOS) afin de produire une stimulation synaptique localisée sur une seule synapse. NALOS peut être réalisé en utilisant un microscope confocal équipé d'un laser infrarouge femtoseconde pour stimuler des nanoparticules d'or déposées sur les neurones en culture. Il a été démontré qu'il est possible d'induire avec NALOS une augmentation transitoire de Ca^{2+} intracellulaire sur une dendrite, mesurée avec l'aide de GCaMP6s, un indicateur de Ca^{2+} génétiquement encodé¹.

Afin de mieux comprendre les effets physiologiques de NALOS sur les neurones, la première partie de mon projet vise à caractériser le mécanisme sous-jacent à la technique. Pour ce faire, nous avons varié la puissance de la stimulation laser sur les nanoparticules d'or pour caractériser les différentes réponses calciques transitoires intracellulaires obtenues ainsi que la possible formation de trous sur la membrane. Nous avons ensuite identifié les principaux récepteurs et canaux ioniques pouvant être stimulés avec NALOS en utilisant différents antagonistes.

Nous avons ensuite appliqué NALOS pour générer une stimulation synaptique. Pour y parvenir, nous avons stimulé localement un axone et observé la réponse calcique reliée à une stimulation synaptique par relâchement naturel de glutamate via des vésicules de la zone active présynaptique. Cet outil permettra donc de stimuler et d'observer, une synapse à la fois, des changements structurels et moléculaires reliés à la communication synaptique.

Abstract

To better understand the molecular processes underlying synaptic communication, it is necessary to be able to observe and control synaptic activity with high temporal (ms) and spatial (nanoscale) precision.

My project proposes using a localized optical stimulation technique based on the plasmonic excitation of gold nanoparticles (Nanoparticle Assisted Localized Optical Stimulation – NALOS) to produce synaptic stimulation localized at a single synapse. NALOS can be performed using a confocal microscope equipped with an infrared femtosecond laser to stimulate gold nanoparticles deposited on cultured neurons. It has been shown that NALOS can induce a transient stimulation of intracellular Ca^{2+} on a dendrite, measured with the help of GCaMP6s, a genetically encoded Ca^{2+} indicator¹.

For a better understanding the physiological effects of NALOS on neurons, the first part of my project aims to characterize the mechanism underlying this technique. To do this, we varied the power of laser stimulation on gold nanoparticles to decipher the different intracellular transient Ca^{2+} responses obtained as well as to investigate the possible formation of holes on the membrane. We then determined the main receptors and ion channels that can be stimulated with NALOS.

We then applied NALOS to generate synaptic stimulation. To do this, we locally stimulated an axon and look at the Ca^{2+} response related to synaptic stimulation by natural release of glutamate via vesicles of the presynaptic active zone. This tool will thus make it possible to stimulate and observe, one synapse at a time, structural and molecular changes related to synaptic communication

Table des matières

Résumé	II
Abstract.....	III
Table des matières	IV
Liste des figures.....	V
Liste des abréviations	VI
Remerciements.....	VII
Introduction	1
1.1 Le cerveau, du neurone à la synapse	1
1.2 La synapse, de l'épine dendritique à la densité postsynaptique.....	2
1.3 Les récepteurs membranaires.....	5
1.4 La plasticité synaptique et l'induction de la LTP	6
1.5 Techniques pour l'étude de la communication synaptique	8
1.6 Les nanoparticules d'or	12
1.7 Objectifs de recherche.....	16
Chapitre 2 - Méthodologie.....	18
2.1 Culture cellulaire et transfection	18
2.2 Protocole d'imagerie.....	19
2.3 Solution d'imagerie et pharmacologie.....	21
2.4 Protocoles expérimentaux et analyse des résultats	22
2.5 Nanoparticules d'or et fonctionnalisation.....	27
Chapitre 3 – Résultats	29
3.1 Simulation thermique.....	29
3.2 Caractérisation de l'activité calcique des neurones.....	30
3.3 Validation de l'hypothèse de la nanocavitation.....	32
3.4 Implication des récepteurs.....	34
3.5 Caractérisation des réponses axonales évoquées par NALOS.....	38
3.6 Blocage réversible de NALOS axonal	42
3.7 Analyse de la spécificité des AuNPs fonctionnalisés.....	44
3.8 Enregistrement électrophysiologique pendant NALOS	48
3.9 Potentialisation à long terme et plasticité synaptique	50
Chapitre 4 - Discussion.....	53
Conclusion	62
Bibliographie.....	64

Liste des figures

Introduction

Figure 1.1 : Le neurone	2
Figure 1.2 : Du neurone à la synapse	3
Figure 1.3 : L'épine dendritique et synapse des neurones pyramidaux	4
Figure 1.4 : Récepteurs synaptiques impliqués dans la densité postsynaptique.....	6
Figure 1.5 : Transmission synaptique et potentialisation de l'épine postsynaptique	7
Figure 1.6 : Stimulation optique induite par les AuNPs	13
Figure 1.7 : Stimulation neuronale avec NALOS.....	15

Chapitre 2 : Méthodologie

Figure 2.1 : Images contextuelles des stimulations synaptiques avec NALOS	24
--	----

Chapitre 3 : Résultats

Figure 3.1 : Caractérisation du mécanisme NALOS – Simulation	30
Figure 3.2 : Caractérisation du mécanisme NALOS – Expérience	31
Figure 3.3 : Caractérisation du mécanisme NALOS – SYTOX	34
Figure 3.4 : Caractérisation du mécanisme NALOS – Implication des récepteurs	37
Figure 3.5 : Caractérisation des réponses évoquées par NALOS axonal	41
Figure 3.6 : Blocage réversible de NALOS axonal par NBQX.....	44
Figure 3.7 : Fonctionnalisation des AuNPs (fAuNPs)	47
Figure 3.8 : Tests de colocalisation des fAuNPs	48
Figure 3.9 : Corrélation des réponses Ca^{2+} et des réponses électrophysiologiques	49
Figure 3.10 : Potentialisation à long terme et plasticité synaptique	52

Liste des abréviations

aCSF : Fluide cérébro-spinal artificiel (artificial cerebrospinal fluid)

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate

APV : Acide 2-amino-5-phosphonoaléique

AuNP : Nanoparticule d'or (Gold nanoparticle)

Bic : Bicuculline

CaM : Calmoduline

CaMKII : Ca^{2+} /CaM-dépendante protéine kinase 2

cLTP : Potentialisation à long terme chimique (Chemical long-term potentiation)

DIV : Jours *in vitro* (Days *in vitro*)

fAuNP : Nanoparticule d'or fonctionnalisée (functionalize gold nanoparticle)

GFP : Protéine fluorescente verte (Green fluorescent protein)

Gly : Glycine

LTP : Potentialisation à long terme (Long-term potentiation)

MSCT : Influx calcique synaptique miniature (Miniature synaptic calcium transient)

NALOS : Stimulation optique localisée assistée par les nanoparticules d'or (Gold nanoparticle-assisted all optical localized stimulation)

NES : signal d'exportation nucléaire (nuclear export signal)

NBQX : 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide

NMDA : *N*-methyl-D-aspartate

PPSE : Potentiels postsynaptiques excitateurs

SH : Thiol

rAMPA : Récepteur α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate

RGECO : Indicateur Ca^{2+} rouge fluorescent encodé génétiquement pour l'imagerie optique (Red fluorescent genetically encoded Ca^{2+} indicator for optical imaging)

rNMDA : récepteur *N*-methyl-D-aspartate

SEP : pHluorine superécliptique (Super-ecliptic pHluorin)

TTX : Tétrodotoxine

Vamp : Protéine membranaire associée à la vésicule (vesicle-associated membrane protein)

Remerciements

Je souhaite adresser mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de cet ouvrage. En premier lieu, je tiens à remercier monsieur Paul De Koninck, professeur en neurobiologie et biophotonique de l'Université Laval. En tant que directeur de recherche pour le présent essai, sa disponibilité, son soutien et ses nombreux conseils m'ont grandement aidé à l'élaboration et la rédaction de ce projet. Je veux aussi remercier ma co-directrice de maîtrise madame Flavie Lavoie-Cardinal, qui fut une source d'inspiration et un modèle en ce qui a trait à l'éthique et à la rigueur scientifique.

Je souhaite également remercier tous mes collègues du laboratoire CERVO pour leur ouverture et leur soutien moral durant ces deux dernières années. Ils ont démontré une grande flexibilité et un souci sincère à ma réussite universitaire. Je leur en suis profondément reconnaissant.

Finalement, je ne me pardonnerais pas d'oublier ma copine Pénélope Cyr, mon alliée de rédaction. Je repense à toutes ces fins de semaines de couple que nous transformions en journées "travail-étude-pyjamas". Le soutien constant et les nombreux encouragements de ces personnes qui me sont chères m'ont permis de persévérer jusqu'à la toute fin et il m'aurait été impossible d'y arriver sans eux.

Introduction

1.1 Le cerveau, du neurone à la synapse

Les neuroscientifiques ont longtemps pensé que le cerveau était une masse de tissus uniforme sans cellules isolées. Ce n'est qu'après les années 1900 qu'un neuropathologiste italien du nom de Camillo Golgi que Ramon y Cajal proposa l'idée de l'existence de cellules individuelles interconnectées entre elles². À l'aide de la microscopie et d'une technique de marquage au nitrate d'argent, Cajal a pu observer l'arborisation de la cellule neuronale et des parties qui la compose. Un corps cellulaire, des dendrites aux extrémités et un axone se prolongeant sur une grande distance ont permis à Cajal de déduire que l'information circule dans un vaste réseau où l'information se propage par des connexions entre ces neurones (Figure 1.1). De ces observations est née l'hypothèse que l'information acquise par le cerveau serait reliée à des modifications de ces connexions. Ce n'est qu'en 1949 qu'un neuroscientifique du nom de Donald Hebb proposa une théorie qui stipule que la mémoire serait reliée à la plasticité des circuits neuronaux, c'est-à-dire à la capacité des neurones à changer leurs connexions entre eux, à former de nouvelles connexions et à transmettre de l'information³. La théorie de Hebb nous explique que la mémoire serait alors conservée dans les connexions ayant subi une modification et qu'il serait possible de récupérer cette information une fois ces réseaux réactivés. Aujourd'hui, les neuroscientifiques savent qu'au sein même de ce transfert d'information siège une structure d'une incroyable complexité : la synapse.

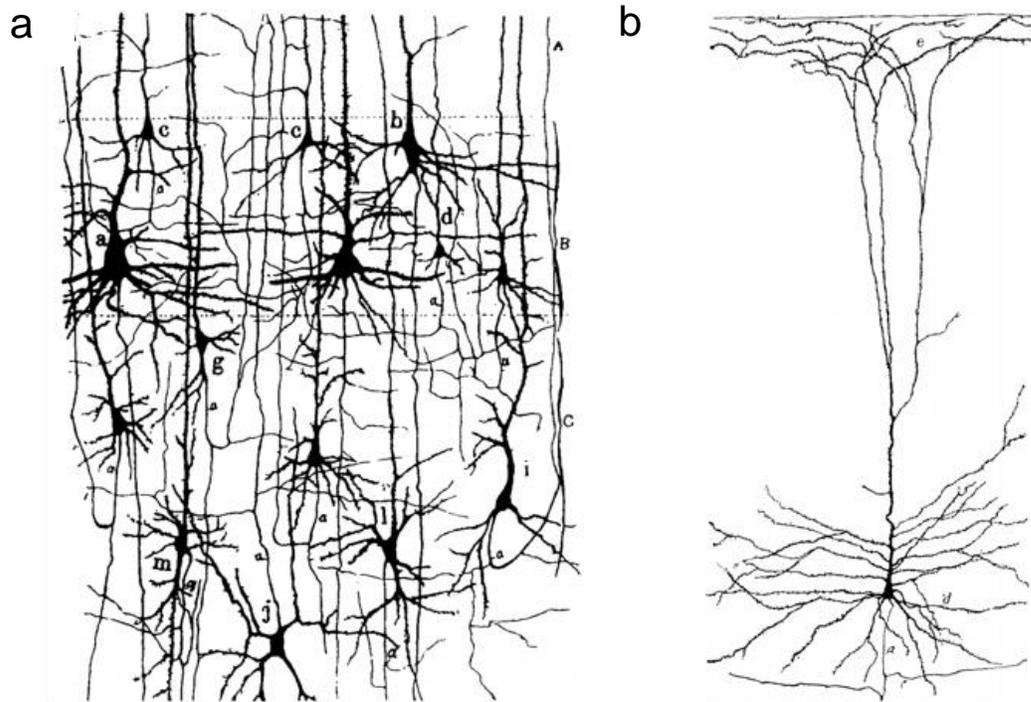


Figure 1.1. Le neurone a | Dessins de Ramón y Cajal montrant des neurones dans les couches profondes du cortex visuel. b | Dessin d'un neurone pyramidal marqué par la technique de Golgi².

1.2 La synapse, de l'épine dendritique à la densité postsynaptique

La transmission de l'information et l'intégration du signal se déroulent principalement à la synapse. La synapse est le lieu de connexion entre une épine dendritique et un bouton axonal (Figure 1.2). L'information y circulant de manière unidirectionnelle, du bouton à l'épine, pour être ensuite transmise de la dendrite jusqu'au corps cellulaire. Les neurones propagent l'information par des potentiels d'action produits lors de l'altération des propriétés électriques de la membrane. La synapse transforme ensuite le signal électrique en signal chimique⁴. D'abord, un potentiel d'action dépolarisant rejoint le bouton présynaptique et active des canaux calciques voltage dépendant. Le Ca^{2+} extracellulaire pénètre dans le bouton et engendre une cascade de réaction qui mène à la fusion des vésicules contenant des neurotransmetteurs à la membrane. Une fois fusionnées, les vésicules relâchent les neurotransmetteurs par exocytose dans la fente synaptique. Les

neurotransmetteurs se lient et activent les récepteurs de l'épine postsynaptique pour permettre l'échange d'ions du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire.

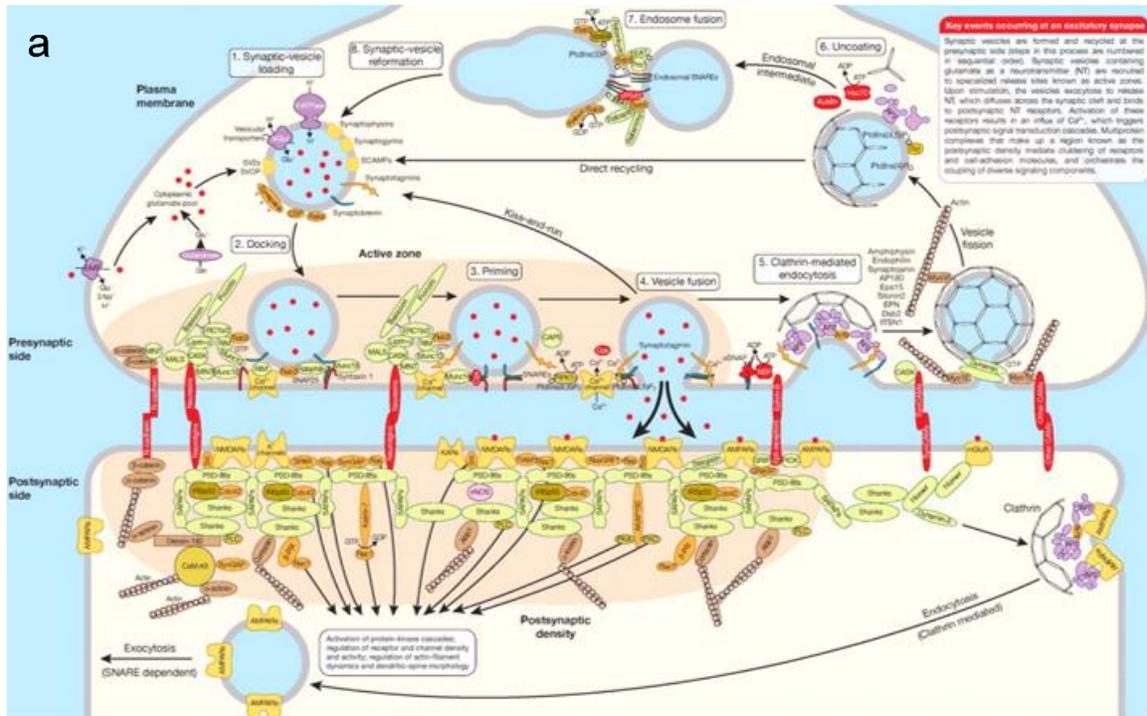


Figure 1.2. Du neurone à la synapse a | Architecture de la synapse excitatrice. Reconstitution imagée du fonctionnement d'une synapse chimique excitatrice illustrant la complexité de l'échafaudage protéique présynaptique et postsynaptique. Le fonctionnement synaptique est régi par des complexes macromoléculaires maintenus ensemble par des interactions protéine-protéines, protéine-lipide et protéine-ion. Des cascades de réactions permettent l'échange d'information⁵.

L'épine postsynaptique est une excroissance de la membrane des dendrites (Figure 1.3). Elle possède un cou étroit émergent de la dendrite, ce qui lui donne généralement la forme d'un champignon⁶. L'épine mesure de 1 à 3 μm de long pour environ 1 μm de large et possède une très forte concentration de protéines situées à l'extrémité supérieure nommée la densité postsynaptique (PSD). Cette structure en forme de disque est alignée avec la zone active du bouton présynaptique et la zone de relâchement des vésicules. La densité postsynaptique est essentielle à la traduction du signal porté par les neurotransmetteurs, car elle permet de relier les récepteurs synaptiques aux protéines intracellulaires via des cascades de seconds messagers⁷. La première intégration du signal se fait donc à cet endroit par les

récepteurs synaptiques glutamatergiques. Pour mieux comprendre l'importance de ces récepteurs dans la synapse, une description de la structure et de leurs propriétés est de mise.

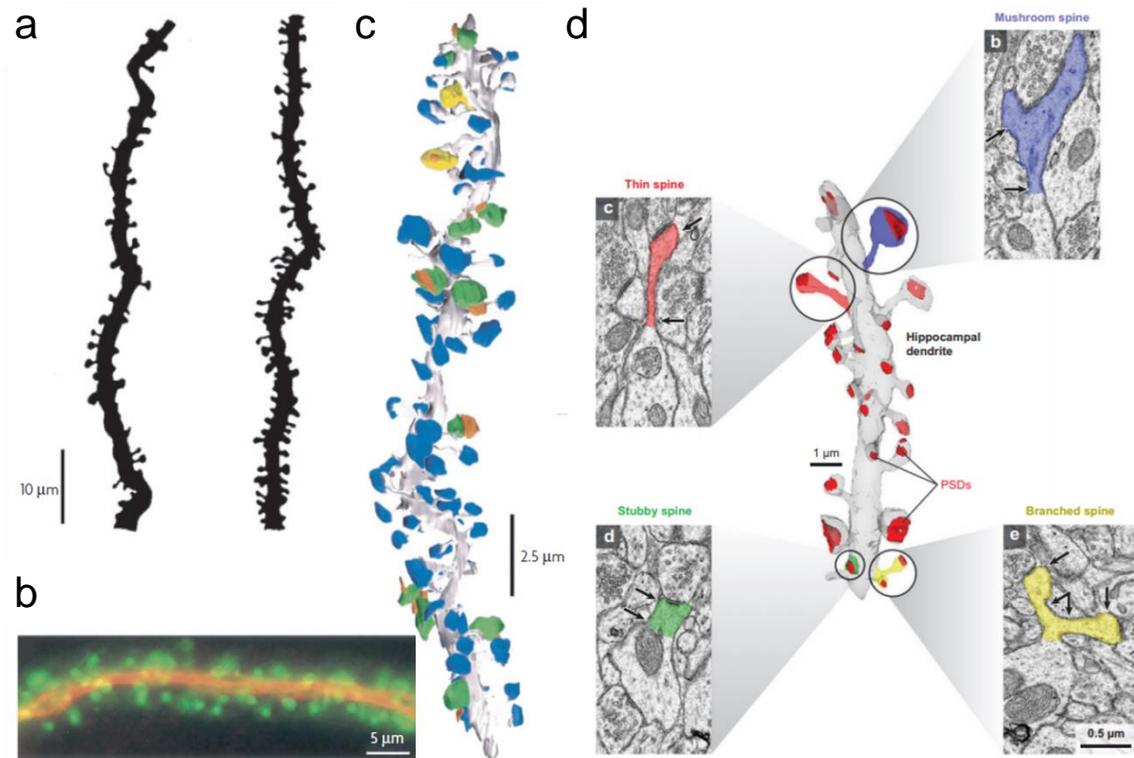


Figure 1.3. L'épine dendritique et synapse des neurones pyramidaux. a | Exemple de la variation du nombre d'épines dans deux dendrites épineuses d'un neurone pyramidal CA1. b | Cytosquelette dendritique marqué par la protéine 2 associée aux microtubules (MAP2; rouge) et l'actine (verte). MAP2 est concentré dans la dendrite et le cou de l'épine. Les filaments d'actine sont concentrés dans la tête de l'épine pour faciliter sa motilité. c | Reconstruction tridimensionnelle d'épines et de synapses dans un neurone pyramidal reconstruit à partir d'images de microscopie électronique d'un seul segment de dendrite. La dendrite et ses épines sont indiquées en gris; Les boutons synaptiques formant des synapses sont représentés en bleu; les boutons formant plusieurs synapses sur plusieurs neurones sont indiqués en vert; les boutons formant plusieurs synapses sur la même cellule sont représentés en jaune; les épines des autres dendrites apparaissent en orange⁸. d | Reconstruction tridimensionnelle d'une dendrite de neurone pyramidal reconstruit à partir d'image de microscopie électronique. Représentation de la variabilité de la taille et de la forme des épines ; une épine en forme de champignon est indiquée en bleu, une épine allongée est représentée en rouge, une épine trapue indiquée en vert, et une épine avec deux branches allongées représentée en jaune⁹.

1.3 Les récepteurs membranaires

Il existe deux types de récepteurs à la membrane postsynaptique; les récepteurs ionotropiques et métabotropiques. Mon projet de recherche portait principalement sur les récepteurs ionotropiques, aussi appelés récepteurs ligands dépendants. Ces récepteurs sont formés de plusieurs sous-unités formant un canal permettant l'entrée d'ions. Deux récepteurs importants sont concentrés sur l'épine postsynaptique : les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate) et les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Figure 1.3). Ces récepteurs possèdent un domaine de liaison extracellulaire au neurotransmetteur glutamate. La liaison du glutamate engendre un changement de conformation qui permet l'ouverture du canal. Le rAMPA est constitué de 4 sous unités GluA (1-4) formant un tétramère. La stœchiométrie de ce tétramère détermine sa perméabilité aux cations monovalents ou divalents. Dans les neurones pyramidaux, les rAMPA sont peu perméables au Ca^{2+} et génèrent plutôt une entrée de sodium qui engendre une dépolarisation de la membrane¹⁰.

Le rNMDA est formé d'une sous-unité NR1 et ses propriétés varient en fonction des types de sous-unités NR2 (A-D) qui lui est associé. Le rNDMA est également nommé le récepteur de coïncidence, car il nécessite deux procédés pour être activé. En plus de la liaison du glutamate par le relâchement présynaptique, l'activation du rNMDA nécessite une dépolarisation membranaire. Le rNMDA possède un ion Mg^{2+} bloquant son pore lorsque le potentiel de la membrane est au repos entre -70 et -60 mV. L'activation de plusieurs rAMPA suite à une forte transmission synaptique produit une dépolarisation membranaire et permet l'expulsion de l'ion Mg^{2+} menant à l'ouverture complète du récepteur. Son activation permet l'entrée de Ca^{2+} et entraîne une cascade de signalisation intracellulaire importante pour l'induction de la plasticité de la synapse. Lors de l'apprentissage et de la mémorisation, les synapses subissent des changements plastiques et biochimiques qui affectent le signal transmis et changent la force de la synapse.

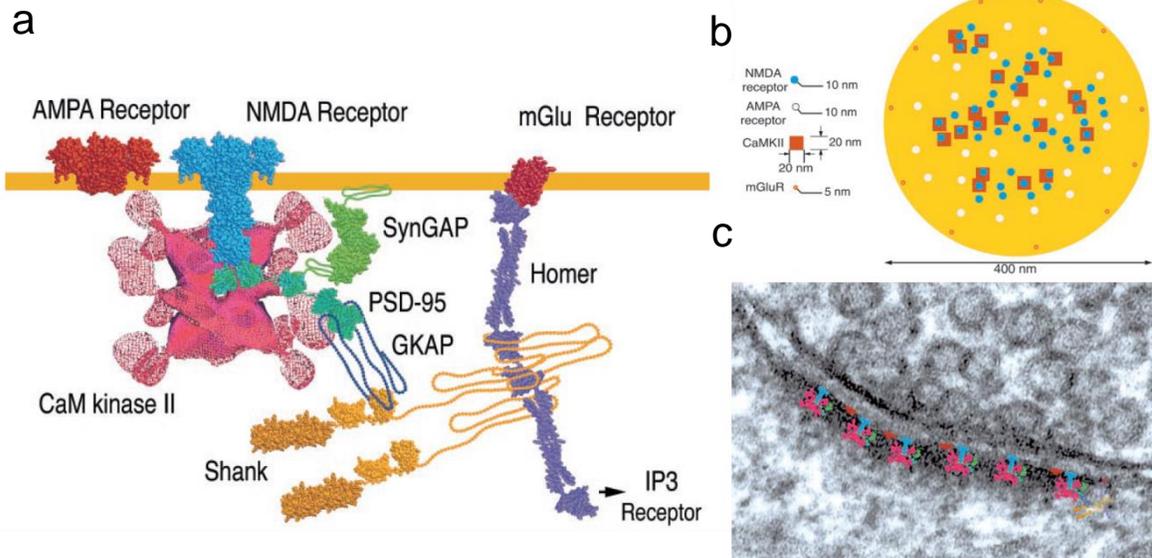


Figure 1.4. Récepteurs synaptiques impliqués dans la densité postsynaptique a | Représentation de la structure transmembranaire des rAMPA et rNMDA ainsi que différents types de protéines impliqués dans la densité postsynaptique. b | Distribution des rAMPA (beige), rNMDA (bleu), mGluR (orange) et CaMKII (rouge) sur une PSD de 400 nm de diamètre. Le nombre de rAMPA varie de 0 (épine silencieuse) à 50 pour une PSD de 400 nm en fonction de leur entrée et sortie du site postsynaptique. c | Superposition des complexes protéines (a) à l'échelle de la PSD sur une image de microscopie électronique⁶.

1.4 La plasticité synaptique et l'induction de la LTP

L'entrée de Ca^{2+} à l'intérieur de l'épine par le rNMDA est le signal précurseur pour l'induction de la potentialisation à long terme (long-term potentiation, LTP), un phénomène critique de la plasticité synaptique. Ce phénomène consiste en un renforcement persistant de la synapse à la suite d'une forte stimulation synaptique généralement courte (moins d'une seconde), mais de fréquence élevée¹¹ (plus de 100 Hz). Une fois à l'intérieur de l'épine postsynaptique, le Ca^{2+} active des kinases qui activeront à leur tour plusieurs sentiers protéiques responsables de l'augmentation de la force synaptique (Figure 1.4). Les récepteurs occupent un rôle important et sont régulés par des kinases, tels que la Ca^{2+} /Calmoduline-dépendante (CaMKII), une protéine régulatrice dépendante du Ca^{2+} . La potentialisation de la synapse peut survenir en variant le nombre ainsi que l'emplacement des rAMPA à la synapse. La variation du nombre de rAMPA a été découverte grâce aux synapses

dités silencieuses lors d'études électrophysiologiques. Certaines synapses ne démontraient que des courants médiés par le rNMDA, sans signe de réponse des rAMPA. Cependant, à la suite d'une LTP, ces mêmes synapses ont démontré des courants rapides venant des rAMPA, ce qui a permis de conclure que le nombre de récepteurs à la membrane n'est pas fixe et qu'il peut varier selon l'activité synaptique¹². De plus, cette variation des rAMPA est gérée par un processus de recyclage par endo/exocytose, permettant une réduction ou un enrichissement rapide des récepteurs à la synapse^{13,14}.

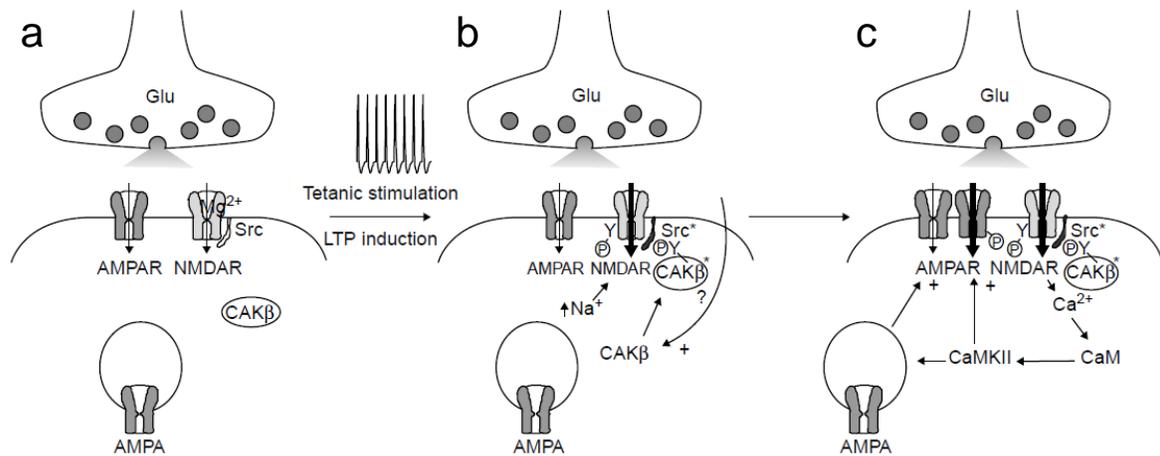


Figure 1.5. Transmission synaptique et potentialisation de l'épine postsynaptique a | Modèle pour l'induction de la LTP. Lors de la transmission synaptique normale, le glutamate (Glu), est libéré par les vésicules présynaptiques et agit à la fois sur les rNMDA et rAMPA. Le Na⁺ entre par le rAMPA mais pas dans le rNMDA en raison du Mg²⁺ qui bloque le canal. **b** | Lors d'une stimulation haute fréquence (stimulation tétanique), une grande quantité de Ca²⁺ entre dans l'épine dendritique via le canal du récepteur NMDA et plusieurs sentiers biochimiques sont activés. **c** | Le Ca²⁺ se lie à CaM et active préférentiellement la CaMKII. L'expression de la LTP se poursuit par l'insertion d'AMPA dans la densité postsynaptique ou par une activité accrue du canal AMPAR¹⁰.

De nouvelles recherches supportent l'idée que les rAMPA optent plutôt pour une relocalisation à l'intérieur des compartiments extrasynaptiques. La membrane cellulaire est une mosaïque fluide constituée de phospholipide qui permet la diffusion latérale des rAMPA sur le plan de la membrane. Lors d'une activité synaptique, les rAMPA qui interagissent avec la PSD se relocalisent et forment des

nanodomaines¹⁵. Ces nanodomaines s'alignent avec les sites de relâchement des vésicules présynaptiques et forment des nanocolonnes trans-synaptiques, augmentant considérablement l'efficacité du relargage des neurotransmetteurs¹⁶. L'ajout de rAMPA ou la relocalisation en nanodomaines aura comme conséquence de maintenir et moduler l'efficacité de la communication synaptique. Il n'existe que très peu d'information sur la localisation des synapses subissant des changements plastiques. Comme la plasticité synaptique peut être spécifique à la synapse, il est nécessaire de corréliser les changements de transmission synaptique avec des mécanismes moléculaires locaux.

1.5 Techniques pour l'étude de la communication synaptique

Pour arriver à étudier la communication synaptique, il est d'abord important de pouvoir identifier et observer la synapse, afin de pouvoir la caractériser. Il faut également être en mesure de contrôler son activité de manière précise dans le temps et l'espace afin de comprendre ce qui se passe avant, pendant et après la stimulation synaptique. Le défi est donc de pouvoir observer et de stimuler une synapse à la fois, et ce, sans affecter les synapses voisines. À l'échelle cellulaire et moléculaire, cinq techniques majeures permettent l'étude de la communication synaptique. Une brève description des avantages et limitations de ces techniques est nécessaire.

Aujourd'hui, la méthode de marquage individuel des neurones au nitrate d'argent a été remplacée par des marqueurs fluorescents. Combiné au génie génétique, la fluorescence devient un outil qui permet de cibler des sous-types de neurones afin de visualiser différentes structures ou compartiments cellulaires¹⁷. À l'aide de marqueurs fluorescents, il est possible d'étudier la localisation et la dynamique des protéines d'intérêts dans un contexte de plasticité synaptique. Après la découverte de la protéine fluorescente verte (GFP) en 1961, de nombreuses variantes de différentes couleurs ont été développées et couvrent maintenant l'ensemble du

spectre visible. L'excitation par émission laser à différentes longueurs d'onde permet l'imagerie de plusieurs protéines en simultanée en leur adressant un canal de fluorescence individuel. Un neurone pourrait donc être marqué en vert, son noyau en bleu et une protéine présente dans ses épines en rouge. Des indicateurs de neurotransmetteurs ou d'ions génétiquement encodés servent également d'outil optique pour observer l'activité des neurones. Ces indicateurs possèdent une faible fluorescence basale qui augmente fortement lors de la liaison à la molécule d'intérêt. La fluorescence est un des outils les plus performants en microscopie. Toutefois, l'utilisation prolongée de la lumière peut devenir néfaste pour les neurones. Une illumination prolongée mène à un phénomène appelé photoblanchiment, qui entraîne la diminution de la fluorescence. L'excitation à long terme d'une protéine fluorescente cause des modifications covalentes dans sa structure et produit des dérivés réactifs avec l'oxygène comme des radicaux libres. Ces radicaux libres sont toxiques pour les cellules. Il est donc important de limiter le temps d'illumination ou la quantité de photons envoyés sur les cellules lors de l'imagerie optique.

Une des principales difficultés dans l'étude de la communication synaptique est de relier les mécanismes biochimiques sous-jacents de la plasticité à l'activité de la synapse. L'électrophysiologie permet d'étudier l'activité électrique des neurones à différentes échelles, du potentiel d'action jusqu'à l'ouverture d'un canal ionique unique. Les neurones propagent l'information par un phénomène électrique. La membrane cellulaire joue un rôle de condensateur et l'échange d'ions de chaque côté de la membrane génère des courants électriques transitoires. Les techniques de patch-clamp permettent de mesurer ces courants internes à l'aide d'une pipette de verre insérée dans la membrane du corps cellulaire du neurone. La détection des courants sodiques et calciques générés dans une épine lors de la communication synaptique peut atteindre une résolution temporelle à l'échelle nanométrique. De plus, ces courants rapides enregistrés sont générés par une variété de récepteurs qui peuvent être répartis sur plusieurs épines post-synaptiques différentes. Cette grande précision temporelle vient alors au détriment de la résolution spatiale. Les enregistrements électrophysiologiques, bien que très précis dans le type et le nombre d'évènements, ne permettent pas d'identifier l'endroit où est survenue

l'activité, ni quelle synapse a réagi. Il est donc plus difficile d'obtenir l'information complète des mécanismes sous-jacents à la communication d'une seule synapse.

L'optogénétique est une technique qui relie l'optique à la génétique. Cette technique permet de rendre sensibles des neurones à la lumière en leur introduisant une protéine photo-activable. Cette méthode permet de stimuler un seul sous-type de neurone à la fois en n'affectant pas les neurones voisins¹⁸. L'optogénétique permet de contrôler l'activité neuronale par l'activité de ces protéines à l'aide de la lumière. À l'opposé de l'électrophysiologie, la possibilité d'induire ou d'inhiber l'activité dans le neurone sans l'utilisation de technique invasive est un puissant atout. En stimulant le corps cellulaire avec de la lumière, il est possible d'engendrer des potentiels d'action qui seront transmis dans l'ensemble du réseau neuronal, dans toutes les branches axonales, ce qui aura pour effet d'activer des centaines de synapses. Néanmoins, la stimulation à l'échelle micrométrique sur une région neuronale n'a pas été possible à ce jour compte tenu de la faible conductance des canaux photo-activables, nécessitant l'activation d'un grand nombre de récepteurs pour obtenir un ciblage possible. De plus, ces canaux sont très peu exprimés sur l'axone, ce qui rend difficile la stimulation synaptique contrôlée. L'étude de la communication synaptique et des processus de signalisation locaux reste alors un défi avec l'optogénétique.

Une des techniques permettant le mieux l'étude de la synapse unique est le glutamate encagé. Le glutamate encagé est une molécule dont l'activité est contrôlée par la lumière. Le neurotransmetteur est d'abord inactif en étant lié à un groupement chimique. L'illumination par la lumière ultraviolette ou 2-photons permet de changer la structure du glutamate encagé en brisant les liens qui le rendent inactif¹⁹. Cette technique est un outil précieux pour les neuroscientifiques, car l'activation par la lumière signifie qu'il existe un contrôle temporel et spatial de la libération des neurotransmetteurs. L'imitation d'une stimulation synaptique est très utile pour étudier les réponses du côté post-synaptique en contournant l'évènement présynaptique. Par contre, cette libération artificielle de glutamate n'est pas relâchée synaptiquement dans les quantités et dans l'espace correspondant à ce qui se passe

lors d'une vraie stimulation synaptique. Comme mentionné précédemment, la présence de nanodomains de récepteur présent du côté pré et postsynaptique joue un rôle d'alignement entre les sites de relâchement des vésicules du bouton présynaptique et les récepteurs de l'épine postsynaptique. Cet alignement pré et postsynaptique est à l'origine des nanocolonnes permettant d'augmenter l'efficacité de la communication synaptique¹⁵. La stimulation par glutamate encagée contourne ce phénomène, car le glutamate une fois libéré se retrouve à englober l'épine postsynaptique et active chaque récepteur présent, peu importe sa localisation.

En utilisant des impulsions de laser infrarouge, les neurones peuvent être stimulés en modifiant la capacitance de la membrane via un processus de chauffage local²⁰. En utilisant des longueurs d'onde proches de l'absorption de l'eau, entre 1400 et 2200 nm, il est possible de faire chauffer suffisamment l'eau pour induire des changements dans la conductance des canaux membranaires ou de stimuler le relâchement de Ca^{2+} via les mitochondries et le réticulum endoplasmique²¹. Cette technique permet une stimulation sans contact direct entre la source de stimulation et le neurone. Cependant, les simulations thermiques suggèrent que les avantages de la stimulation infrarouge sont réduits par des effets cumulatifs de chauffage et les stimulations répétées²¹. Le chauffage répété de l'eau perd en précision, car la chaleur a tendance à se dissiper sur un grand volume et prend du temps à se résorber. Le maintien d'une trop grande chaleur peut créer des dommages irréversibles à la membrane et au neurone. Il est donc très difficile, voire impossible de stimuler à répétition une petite région neuronale ou un axone pour étudier la communication synaptique locale. Finalement, un laser entre 1400 et 2200 nm est rarement présent sur un microscope conventionnel. L'utilisation de cette gamme de longueurs d'onde rend également difficile le couplage avec l'imagerie UV-visible standard.

En résumé, la fluorescence est une excellente technique pour l'observation de la dynamique de certains ions et protéines et peut être combinée à n'importe quelle technique. L'électrophysiologie permet une excellente résolution temporelle, mais une faible résolution spatiale. L'optogénétique permet de stimuler un seul neurone

à la fois, mais permet plus difficilement de stimuler une petite région. La stimulation synaptique par glutamate engagé permet de stimuler une seule épine à la fois, mais ne comporte pas tous les éléments d'une vraie stimulation synaptique. Finalement, la stimulation par laser infrarouge permet une bonne résolution spatiale et temporelle, mais ne permet pas de stimuler une petite région à répétition, car la chaleur a tendance à se dissiper lentement dans l'eau. Pour contourner ces difficultés, il existe une technique qui permet l'étude de l'activité neuronale et de la signalisation cellulaire avec une excellente résolution spatiale et temporelle. Elle permet de stimuler localement un neurone en faisant appel aux nanoparticules d'or.

1.6 Les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or (AuNPs) ont la caractéristique de pouvoir absorber la lumière et de la redistribuer sous différentes formes d'énergie. L'intensité, la longueur d'onde et la fréquence de la stimulation lumineuse sont des facteurs déterminants dans le type de redistribution de l'énergie par l'AuNP. À faible intensité, l'AuNP peut redistribuer l'énergie emmagasinée sous forme de chaleur, ce qui permet de générer une activation ou de l'inhibition neuronale²². Une excitation prolongée à l'aide d'un laser infrarouge est associée à une inhibition neuronale²³. Lorsque l'énergie lumineuse absorbée est élevée, la nanoparticule génère une bulle de pression qui se répand autour d'elle²⁴. Cette vague de pression peut causer une perforation de la membrane cellulaire lorsqu'elle est utilisée à proximité d'une cellule. Des impulsions laser femtosecondes à haute intensité ont auparavant été utilisées pour la transfection de gènes par le processus de nanoperforation membranaire^{25,26}. En utilisant un laser dans le visible, la stimulation par impulsion lumineuse de 1 ms à une répétition de 40 Hz a permis de déclencher des séries de potentiels d'action se rapprochant de la stimulation par optogénétique²⁷ (Fig.1.5b).

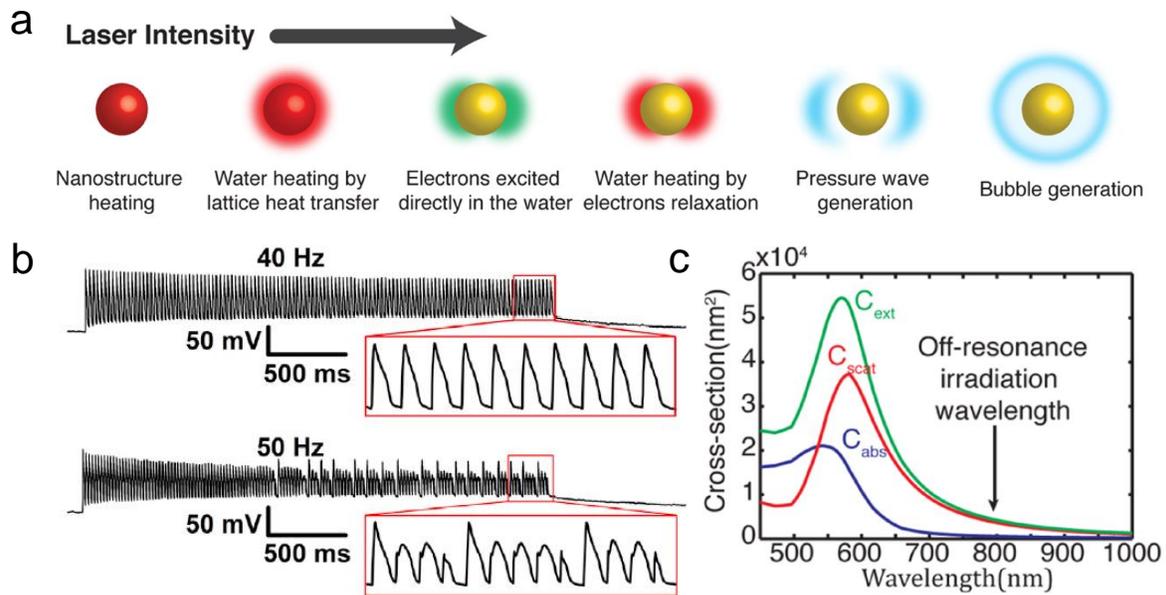


Figure 1.6. Stimulation optique induite par les AuNPs a | Schémas des différents phénomènes pouvant survenir à la suite d'une irradiation. Les phénomènes sont classés en fonction de l'intensité du laser qui caractérise leur apparition. b | Série d'impulsions laser 1 ms à 40 Hz stimulant un potentiel d'action pour chaque impulsion laser sur une période de 3s (trace supérieure). Une série d'impulsion de 50 Hz montre que certaines stimulations ne parviennent pas à déclencher des potentiels d'action vers la fin des séries d'impulsions. L'amplitude des potentiels d'actions est augmentée en raison de la diminution des niveaux d'inactivation des canaux Na⁺ et de la conductance des canaux K⁺ (trace inférieure). c | Spectre d'absorption, de diffusion et d'extinction pour une AuNP 100 nm en fonction de la longueur d'onde incidente en résonance ou hors résonance. La section d'extinction représente le total d'énergie perdu du faisceau incident. Cette perte est due à l'absorption et à la diffusion et est définie par la somme des deux^{24,28}.

Ces différentes réponses découlent en partie d'une propriété physique de l'AuNP. Il s'agit de l'excitation de l'AuNP en résonance ou hors résonance (Fig.1.5c). L'excitation par résonance consiste à exciter avec une longueur d'onde proche de la valeur maximale d'absorption plasmonique de la nanoparticule. La taille des nanoparticules d'or est d'une grande importance lors de l'excitation en résonance, car elle influence le spectre d'absorption de l'AuNP et l'efficacité du processus d'excitation pour une longueur d'onde donnée. L'augmentation de la taille de la nanoparticule a pour effet d'augmenter la longueur d'onde maximale d'absorption. Dans le cadre de mon projet, des nanoparticules de 100 nm ont été utilisées pour lesquelles l'absorption maximale se situe autour de 570 nm. L'excitation en résonance des AuNPs n'est pas compatible avec l'imagerie en simultanée de

marqueurs fluorescents visibles, car de l'interférence entre les deux processus (la fluorescence et l'excitation des nanoparticules) est observée. L'interférence peut mener à un effet de photoblanchiment de la fluorescence et une augmentation de la phototoxicité. La stimulation hors du spectre de résonance de l'AuNP apporte de nombreux avantages, notamment de travailler dans la fenêtre optique du matériel biologique et une utilisation plus efficace de l'énergie d'excitation²⁴. En effet, la stimulation des AuNPs hors résonance à une longueur d'onde de 800 nm permet l'utilisation de la fluorescence dans la fenêtre du visible.

Finalement, les nanoparticules ont la possibilité d'être fonctionnalisées. À l'aide d'anticorps, il est possible de cibler spécifiquement une protéine d'intérêt se retrouvant sur la membrane du neurone et de coupler ces anticorps aux nanoparticules. La photostimulation à l'aide de nanoparticules fonctionnalisées peut alors être ciblée à une structure neuronale, augmentant ainsi le contrôle et la précision de ce type de stimulation^{27,28}.

Pour mieux comprendre le potentiel de la stimulation neuronale à l'aide des nanoparticules d'or, il est primordial de se référer à une étude sur laquelle s'est basé mon projet de maîtrise. Dans ce mémoire, je présente une technique appelée stimulation optique localisée assistée par les nanoparticules¹ (NALOS) développée récemment dans le laboratoire. NALOS est une méthode entièrement optique utilisée pour déclencher une augmentation transitoire de Ca^{2+} sur un neurone. Un laser femtoseconde à une longueur d'onde de 800 nm est utilisé pour l'excitation plasmonique hors résonance. La stimulation d'une seule AuNP sur une dendrite par NALOS permet d'engendrer de faibles courants locaux capables d'induire des réponses Ca^{2+} mesurables avec GCaMP6s (Fig.1.6). L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire est confinée à quelques μm^3 et est fortement dépendante de l'intensité du laser. Le protocole d'incubation relève de la sédimentation passive des nanoparticules dans le milieu cellulaire. NALOS a également servi à explorer la dynamique spatiale et temporelle de la protéine kinase calmoduline dépendante aux Ca^{2+} (CaMKII) affectée par l'activité calcique de la

stimulation. NALOS permet donc l'étude de l'activité neuronale et de la signalisation cellulaire.

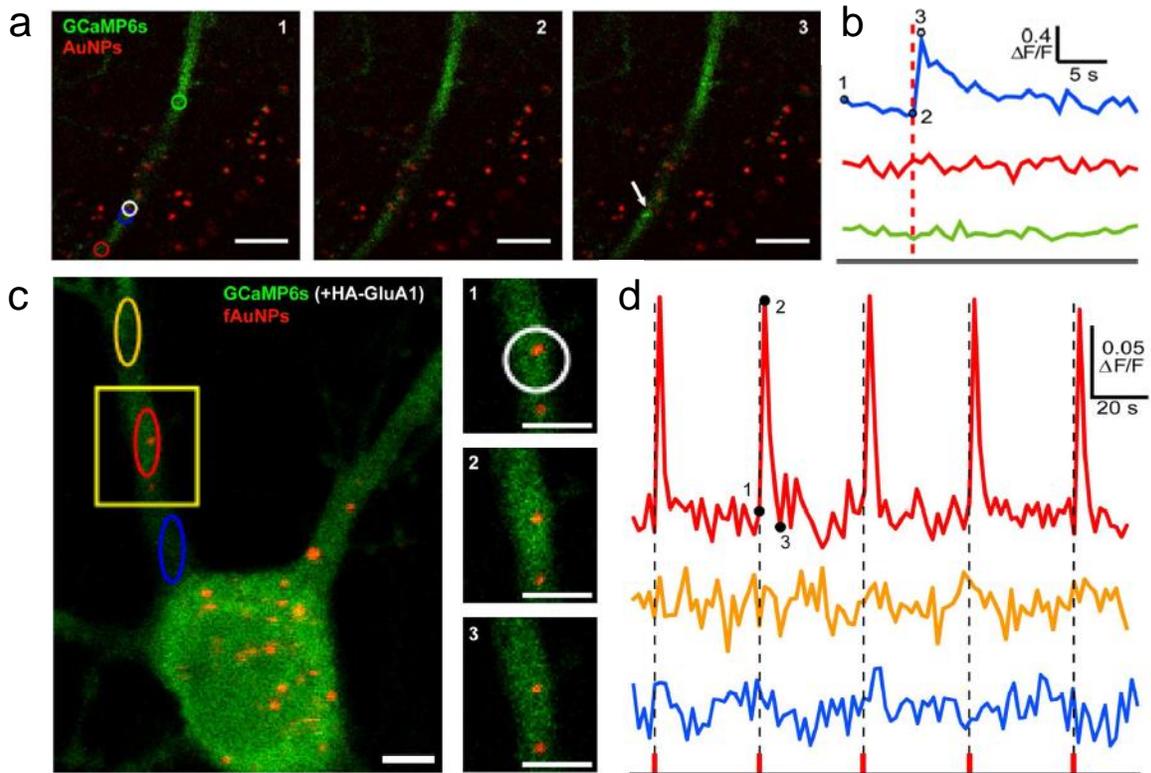


Figure 1.7. Stimulation neuronale avec NALOS a | Fluorescence de GCaMP6s (vert) et de la réflectance des AuNPs (rouge). Une stimulation à faible intensité avec NALOS sur une dendrite permet d'engendrer des réponses Ca²⁺ transitoires de hautement précision. Barres d'échelle 10 μm. b | Signal Ca²⁺ (ΔF / F₀) en fonction des régions colorées marquées en (a); la ligne pointillée rouge indique le moment de la stimulation laser. Les chiffres 1, 2 et 3 correspondent au moment d'acquisition des images. c | L'utilisation de NALOS avec des fAuNPs permet de déclencher des réponses Ca²⁺ transitoires localisées et reproductibles. d | Signal Ca²⁺ (ΔF / F₀) en fonction du des régions colorées marquées en (c); les lignes pointillées noires indiquent le moment de la stimulation laser. Barres d'échelle 5 μm¹.

1.7 Objectifs de recherche

À l'aide de NALOS, il sera possible d'investiguer davantage les changements moléculaires qui surviennent lors d'une stimulation synaptique. Il est toutefois nécessaire de bien comprendre le processus de stimulation neuronale par les nanoparticules d'or, de façon à transposer les stimulations dendritiques à la stimulation axonale. Malgré les preuves expérimentales démontrant la robustesse de NALOS, le mécanisme sous-jacent à la réponse calcique transitoire n'a toujours pas été décrit. Il est primordial de déterminer si la réponse observée est reliée à un phénomène de nanocavitation²⁹ ou un phénomène physiologique lié à l'ouverture de canaux sensibles à la chaleur^{27,28}.

Le premier objectif de mon projet a donc été de comprendre les mécanismes sous-jacents à NALOS en caractérisant les types de réponses calciques obtenues lors d'une stimulation dendritique. Qu'arrive-t-il aux réponses calciques pour différentes puissances laser de stimulation? Quels sont les récepteurs membranaires impliqués dans la réponse de NALOS? Pour répondre à ces questions, le second objectif de mon projet a été de développer un protocole de microscopie confocale me permettant de mesurer l'activité Ca^{2+} des neurones à l'aide de senseurs calciques fluorescents génétiquement encodés et d'agents pharmacologiques dans les neurones.

Une fois le processus de stimulation dendritique bien établi, la deuxième partie de mon projet a été de transposer les stimulations dendritiques à la stimulation axonale. Mon objectif principal a donc été de développer une technique de stimulation synaptique robuste à l'aide de la technique NALOS. Pour utiliser NALOS à l'étude de la communication et de la plasticité synaptique, il était important de bien comprendre quelle sorte de stimulation axonale pouvait être produite. Afin de mieux comprendre le type de réponse synaptique engendré, j'ai dû combiner la stimulation axonale de NALOS à la mesure électrophysiologique.

La communication synaptique et de la plasticité de la synapse sont encore bien mal comprises et les techniques utilisées pour comprendre ce phénomène sont incomplètes. Est-il possible de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la plasticité synaptique avec NALOS ? Connaître la portée scientifique et les limites de NALOS est en soi l'objectif final de mon projet de recherche.

Chapitre 2 - Méthodologie

2.1 Culture cellulaire et transfection

Les neurones hippocampiques de rats sont disséqués au jour post natal P0 et dissociés mécaniquement (trituration par pipette Pasteur) et enzymatiquement (Papain, 12 U/ml). Les neurones sont lavés et centrifugés dans du milieu Neurobasal. Ils sont ensuite déposés sur une lamelle de verre 12 mm enduite de poly-D-lysine selon une densité de ~ 1000 cellules/mm². Le milieu de culture est une solution de Neurobasal, complété avec B27, penicillin/streptomycin (50 U/ml; 50 μ g/ml), 0.5 mM L-glutamax (Invitrogen) et du sérum de fœtus de bovin (2 %; Hyclone). Afin d'éviter la prolifération des cellules non neuronales, la moitié du médium est changé par un milieu comportant de la cytosine β -D-arabinofuranoside (Ara-C 5 μ M; Sigma-Aldrich) à DIV 5 pour minimiser la croissance des cellules gliales. Après 4 jours en culture, la moitié du milieu de croissance est remplacé par une solution de Neurobasal sans sérum ni Ara-C, et ce, deux fois par semaine jusqu'aux expériences.

Les neurones sont transfectés à DIV 11-13 en utilisant un plasmide propre à l'expérience. La solution de transfection contient 0.5 μ g d'ADN plasmidique et 2 μ l de lipofectamine³⁰ (lipofectamine ® 2000) dans 100 μ l de Neurobasal. La transfection se fait dans 500 μ l de milieu de culture pour une durée d'incubation de 3 à 5 heures. Les lamelles de culture neuronale sont ensuite transférées dans un mélange contenant 500 μ l du milieu de culture original et 500 μ l de Neurobasal à 37°C. Un délai de 24h est prévu entre la transfection et la microscopie de fluorescence pour permettre l'expression des protéines transfectées. Pour l'imagerie Ca²⁺, des plasmides encodant GCaMP6s¹⁷ et NES-jRGECO1³¹ ont été utilisés. Pour identifier les axones, les protéines marqueur Vamp-SEP et neurofascin-HA ont été employés.

La majorité des expériences présentées dans ce mémoire a nécessité la transfection de GCaMP6s, un indicateur de Ca^{2+} génétiquement encodé. La structure de cette protéine est composée d'une fusion de la protéine fluorescente verte (GFP), de la protéine calmoduline et du peptide M13. GCaMP6s possède une affinité supérieure au Ca^{2+} (K_d : 152 ± 8 nM) en comparaison à son homologue GCaMP6f (K_d : 296 ± 8 nM), ce qui lui procure une cinétique plus lente¹⁷. La sensibilité de détection et la cinétique de GCaMP6s ont permis de mieux adapter la vitesse d'imagerie pour la détection d'événements calciques sur mon microscope confocal à balayage. NES-JRGECO1, un indicateur rouge de Ca^{2+} , possède la même sensibilité que GCaMP6s et est exprimé selon le même protocole de transfection. Vamp-SEP, un marqueur vert pour les protéines axonales responsables de l'association des vésicules à la membrane (VAMP), est utilisé en combinaison avec NES-JRGECO1 pour détecter les croisements entre les axones et les dendrites. Neurofascine-HA, un marqueur axonal, est utilisé en combinaison avec des tests immunologiques pour vérifier la spécificité d'un protocole de fonctionnalisation des nanoparticules d'or. Ces deux plasmides ont nécessité une surexpression de 48h pour augmenter le nombre d'axones exprimant le marqueur afin d'optimiser l'expérience.

2.2 Protocole d'imagerie

L'ensemble des manipulations effectuées durant ma maîtrise a nécessité la prise d'image sur un microscope confocal Zeiss LSM510 META équipé de lasers visibles 488 nm, 543 nm, 633 nm et d'un laser proche infrarouge femtoseconde pulsé de 80 MHz (Ti: Saphir, Caméléon, Coherent). La prise d'image se fait par balayage de l'échantillon avec le faisceau laser focalisé par l'objectif. La fluorescence émise par les molécules fluorescentes passe par une ouverture qui est située devant le détecteur. Seuls les photons provenant du plan focal passent par l'ouverture et participent à la formation de l'image. L'imagerie des cellules vivantes est réalisée à l'aide d'une chambre de perfusion ouverte et un objectif W Plan-Apochromat 63X / 1.0 VIS-IR $\infty/0$ (Carl Zeiss). Un objectif possédant une grande ouverture numérique ($NA = n \sin \alpha$) permet d'atteindre une meilleure résolution. L'utilisation d'un système

de perfusion multiple de type PTR-2000 (ALA Scientific Instruments) est utilisée et les neurones sont imagés à une température de 30°C.

La résolution du microscope confocal est déterminée théoriquement grâce à la loi d'Abbe qui définit la limite de la résolution optique. Cette loi donne la capacité maximale de mon microscope à pouvoir distinguer deux structures ou évènements qui correspondent environ à la moitié de la longueur d'onde de la lumière utilisée pour imager l'échantillon. Le critère de Nyquist permet de déterminer la taille des pixels nécessaire à la reconstruction du signal. Pour reconstruire un signal, l'échantillonnage doit correspondre à 2.3 fois la fréquence la plus haute du signal. Pour distinguer 2 structures ou évènements contigus, il est primordial d'obtenir au moins 3 pixels par fonction d'étalement du point (Point spread function – PSF). En fonction de mon microscope confocal et de l'objectif utilisé pour une longueur d'onde de 525 nm, nous devons utiliser une grosseur de pixel maximale de 87 nm. Il était également important d'ajuster le nombre de pixels "balayés" selon la taille des pixels nécessaire. Plus la région est grande et le nombre de pixels est élevé, plus le balayage de la région d'intérêt sera long. L'observation de GCaMP6s dans une région de 256x256 pixels et une durée totale de balayage de la région de 491.52 ms (3.2 us / pixel), nous obtenons une grosseur de pixel de 81 nm qui respect le critère de Nyquist (87 nm) et permet de discerner aisément les évènements calciques provenant des dendrites ou des épines. Pour permettre l'acquisition d'images multicolores et garder la même taille de pixel, nous avons réduit la taille de l'image et le nombre de pixels nécessaires.

L'excitation de GCaMP6s et Vamp-SEP ont été réalisées à l'aide d'un laser Argon à onde continue de 488 nm (intensité à la sortie de l'objectif < 5 μ W) et l'émission a été détectée à l'aide d'un filtre passe-bande 525/25. L'excitation de NES-jRGECO a été réalisée avec un laser Hélium/Néon à onde continue de 543 nm (intensité à la sortie de l'objectif < 5 μ W) et observées à travers un filtre passage long 560. Il est important de noter que la lumière bleue photoconvertit NES-JRGECO1a à un état fluorescent plus lumineux³². Pour obtenir la projection des axones (Vamp-SEP) sur

la dendrite (NES-JRGECO1a), une seule image est prise en début d'expérience, réduisant le temps d'excitation de NES-JRGECO par le 488 nm à un maximum de 500 ms.

Les nanoparticules d'or ont été observées en réflexion à l'aide d'un laser Hélium/Néon à onde continue à 633 nm (intensité à la sortie de l'objectif < 500 nW) et un filtre passage long 560. La stimulation des AuNPs se fait à l'aide d'un laser titane-saphir à 800 nm, 80MHz/impulsion laser femtoseconde. Lors de la stimulation, 5 balayages sur une région d'intérêt de 10 à 13 pixels² encerclant la nanoparticule ont été effectués. Afin d'observer l'imagerie calcique et les nanoparticules en simultané, le microscope est équipé de chemins de détection indépendante dans le visible. Comme le spectre d'absorption maximal des nanoparticules se situe dans le spectre du visible, l'intensité des lasers utilisés pour l'imagerie confocale se doit d'être inférieure au seuil d'excitation plasmonique. Il a été démontré que l'excitation par un laser en continu dans le spectre du visible à une intensité de 0,2 à 0,9 kW / cm² n'avait aucun effet mesurable sur les neurones en contact avec les AuNPs¹.

2.3 Solution d'imagerie et pharmacologie

La solution d'imagerie est une solution simulant le liquide cébrospinal (aCSF) composé d'un tampon HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acides) (119 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 1.2 mM dihydrate CaCl₂·2H₂O, 1.0 mM MgCl₂·6H₂O). L'osmolarité a été ajustée à 230 et le pH à 7.4. La solution de stimulation (cLTP) est une solution sans magnésium (0Mg²⁺) à laquelle y est ajouté 200 µM de glycine, un agoniste des rNMDA, et 10 µM de bicuculine, un antagoniste des récepteurs GABA_a. L'utilisation d'une solution sans Mg²⁺ permet de débloquent le pore des rNMDA³⁴ de leur Mg²⁺, laissant le canal ouvert pour un influx de Ca²⁺. La bicuculine a pour effet de bloquer l'inhibition Gabaergique, facilitant l'activité excitatrice du circuit neuronal.

Pour mieux comprendre l'implication de certains récepteurs membranaires, une solution standard aCSF à laquelle sont ajoutés différents inhibiteurs a été utilisée. Une solution de 0.5 μM de tétrodotoxine (TTX) permet d'inhiber les potentiels d'actions des neurones en bloquant les canaux voltage dépendant au sodium. L'ajout de 20 μM de NBQX permet de bloquer les rAMPA et rKainate, deux récepteurs répondant au neurotransmetteur glutamate. Une solution de 100 μM de Cd^{2+} permet d'inhiber le relâchement des vésicules présynaptique et l'entrée de Ca^{2+} postsynaptique des neurones en bloquant les canaux voltage dépendant au Ca^{2+} . Une solution de 50 μM d'APV permet de bloquer les rNMDA, principaux récepteurs responsables de la potentialisation à long terme. Une solution de 10 μM de SB703498 ou SB 366791, deux inhibiteurs des récepteurs TRPV1, permet de bloquer l'activation des neurones causé par une augmentation de la température locale³⁵.

2.4 Protocoles expérimentaux et analyse des résultats

Les expériences de photostimulation d'AuNP débutent par la prise d'image du neurone exprimant GCaMP6s et d'une image des nanoparticules en réflexion. La superposition de ces images permet d'identifier les nanoparticules se retrouvant en contact avec les dendrites. Des régions d'intérêt circulaires de 10 à 13 pixels de diamètre sont choisies autour de l'AuNP pour la photostimulation NIR telle qu'initialement montrée dans Lavoie-Cardinal, F. et al. (2016) à la figure 1.6a. Cinq balayages sur un même ROI sont effectués pour augmenter le taux de succès des réponses calciques locales. Le signal de base de fluorescence de GCaMP6s est mesuré durant 5 secondes (10 images) avant chaque stimulation et est suivi de la stimulation d'une nanoparticule (après la 10^e image). La réponse calcique est ensuite mesurée pendant 20 secondes (40 images). Lorsque la stimulation est répétée sur la même AuNP, l'acquisition d'une nouvelle image de la position de l'AuNP est primordiale pour valider qu'elle occupe toujours sa position de départ.

L'augmentation de l'intensité de la fluorescence sur une région d'intérêt est moyennée et soustraite à l'intensité moyenne de l'arrière-plan. Cette intensité moyenne de fluorescence obtenue (F) est ensuite normalisée par l'intensité moyenne de la même région lors des dix premières images (F_0) survenues avant l'augmentation de la fluorescence. Le résultat obtenu est alors une trace normalisée de l'augmentation de l'intensité de fluorescence exprimée sous la forme de $\Delta F / F_0$. Les traces calciques ont été analysées à l'aide du logiciel d'analyse de données ImageJ/Fiji⁴⁴.

Afin d'étudier la stimulation synaptique, j'ai transfecté le premier jour Vamp-SEP, un marqueur axonal vert fluorescent. Le second jour, j'ai transfecté NES-JRGECO1a, un indicateur de calcium rouge fluorescent. La double transfection sur deux jours permet d'obtenir deux populations distinctes de neurones transfectés dans la même culture de neurones (Fig2.1). L'expression de Vamp-SEP sur deux jours permet d'obtenir un plus grand ratio d'axone exprimant le plasmide, augmentant mes chances d'obtenir des croisements d'axone avec un neurone exprimant NES-JRGECO1a. Le troisième jour, j'ai déposé les nanoparticules par sédimentation passive 2h avant l'imagerie. Pour mener à bien cette expérience, deux critères importants doivent être respectés. En premier lieu, une AuNP doit être déposée sur un axone transfecté en vert. S'il y a lieu, cette AuNP doit se retrouver à une distance respectable des autres AuNPs présentes sur le même axone. Ensuite, l'axone pourvu de l'AuNP doit croiser une dendrite transfectée en rouge. Un axone qui longe une dendrite ne peut être sélectionné, car la proximité de l'AuNP avec la dendrite engendre une ambiguïté quant au type de stimulation directe ou synaptique obtenue. Pour trouver la puissance minimale nécessaire à l'obtention d'une réponse synaptique, j'ai augmenté graduellement l'intensité du laser 800 nm sur la AuNP jointe à un axone jusqu'à l'obtention d'une réponse calcique postsynaptique. L'élévation de Ca^{2+} est mesurée par la variation de l'intensité de fluorescence ($\Delta F / F_0$) expliquée précédemment.

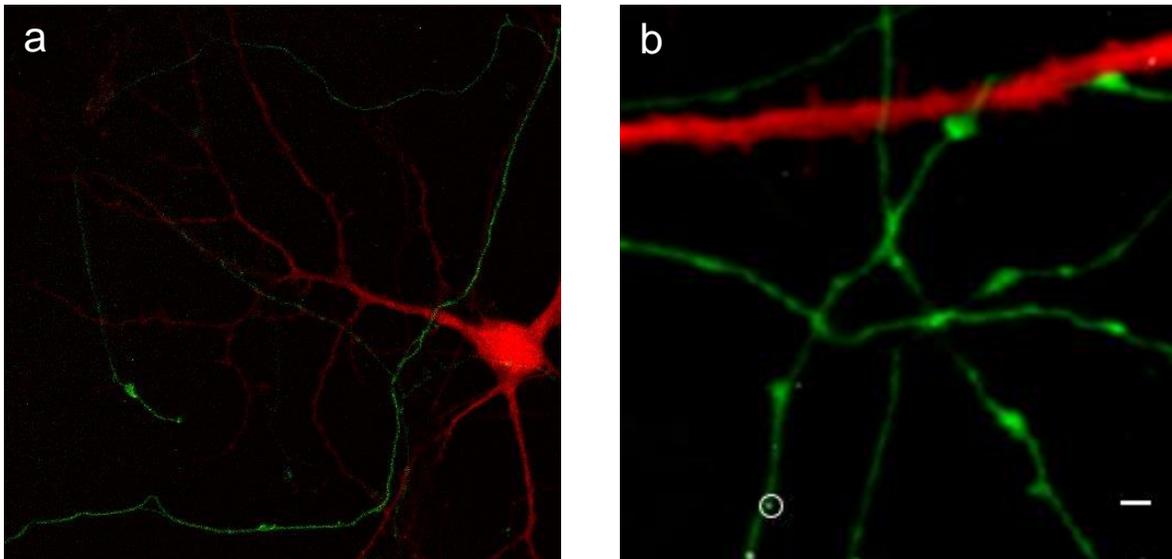


Figure 2.1. Images contextuelles des stimulations synaptiques avec NALOS. **a** | La réponse calcique est monitorée avec un indicateur de Ca^{2+} rouge NES-JRGECO et les axones sont localisés avec la protéine axonale transfectée Vamp-SEP (verte). **b** | Les AuNPs (gris) sont dispersés au hasard sur les neurones. Le cercle blanc représente la région d'intérêt pour la stimulation. La stimulation laser est effectuée sur une AuNP située près d'un axone marqué qui croise ou suit une dendrite transfectée. L'élévation de Ca^{2+} après la photostimulation est monitorée avec NES-JRGECO.

Malgré la surexpression sur 48h du marqueur axonal Vamp-SEP, la combinaison d'un axone avec une dendrite de même qu'une AuNP sur cet axone est très difficile à obtenir. Une fois la puissance minimale nécessaire pour l'obtention d'une stimulation synaptique déterminée, j'ai diminué la complexité de l'expérience en retournant avec GCaMP6s au détriment de la localisation des axones. J'ai ensuite testé s'il est possible de bloquer l'induction d'une élévation localisée de Ca^{2+} par NALOS axonal et d'observer son retour. L'expérience débute par trouver une AuNP qui génère une réponse Ca^{2+} postsynaptique à la suite de NALOS axonal. Une fois la première réponse observée, j'applique une solution d'aCSF contenant du NBQX dans la chambre d'imagerie à l'aide d'une perfusion en continu durant cinq minutes. Une fois les cinq minutes écoulées, je stimule l'AuNP de départ et j'observe la réponse en Ca^{2+} . Le NBQX est ensuite retiré à l'aide d'une perfusion en continu d'aCSF durant 5 min et la stimulation est répétée une troisième fois. Finalement,

NALOS est répété deux autres fois à des intervalles de 5 min dans une solution aCSF en continu.

Pour augmenter la stabilité et la précision de NALOS lors des stimulations répétées, j'ai eu recours à un protocole de fonctionnalisation établi par Bergeron, E. et al. (2015)³⁶. Neurofascin-HA, un marqueur axonal, est co-transfecté avec Vamp-SEP afin d'être exprimé dans les mêmes neurones. Les AuNPs sont fonctionnalisées (fAuNPs) avec un anticorps Anti-HA et le temps d'incubation ainsi que le volume de nanoparticule utilisé est varié pour déterminer les meilleures conditions. Les fAuNPs sont utilisées en combinaison avec un anticorps Anti-HA couplé à un fluorophore rouge pour vérifier la spécificité du protocole de fonctionnalisation. Une solution de neurobasal, une solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate buffered saline, PBS) et une solution régulière (aCSF) sont comparées. Les résultats sont analysés avec ImageJ en créant un masque binaire des images d'axones et des nanoparticules. Une colocalisation de plus de 3 pixels entre les AuNPs et l'axone permet de confirmer l'efficacité de la fonctionnalisation. Une fois le temps d'incubation et le volume d'AuNPs déterminés, le protocole est répété avec des anticorps Anti-Neurofascin. Les fAuNPs sont utilisées en combinaison avec des tests immunologiques pour vérifier la spécificité de l'anticorps Anti-Neurofascin. Anti-Tau couplé à un fluorophore rouge permet de marquer les axones et Anti-MAP2 couplés à un fluorophore vert permet de marquer les dendrites. Les résultats sont analysés par la même macro élaborée précédemment.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de NALOS et caractériser le type de réponse obtenue, nous avons couplé la photostimulation à des enregistrements électrophysiologiques. Des enregistrements en voltage clamp pour cellules entières ont été obtenus à partir de neurones pyramidaux exprimant GCaMP6s. La génération de potentiel d'action (PA) a été inhibée avec une solution de QX intracellulaire dans la pipette de patch (QX, 2 mM). Les neurones ont été sélectionnés en fonction de leur aspect général, la forme de leur soma et le nombre de nanoparticules présentes aux alentours de leurs dendrites. L'insertion dans le

soma de la micropipette de verre est réalisée en contraste de phase à l'aide d'une caméra infrarouge. Une faible pression positive est appliquée dans la pipette de patch et est relâchée lors du contact avec le corps cellulaire du neurone. Une pression négative est ensuite appliquée jusqu'à ce que la résistance atteigne 1 GΩ. La membrane est ensuite brisée et la configuration cellules entières est obtenue. Les enregistrements électrophysiologiques sont synchronisés au microscope confocal. La pipette de patch-clamp est remplie d'une solution contenant (en mM) 96 CsMeSO₃, 20 CsCl, 10 diNa-phosphocreatine, 10 HEPES, 2.5 MgCl₂, 0.6 EGTA, 4 ATP-TRIS, 0.4 mM GTP-TRIS. L'osmolarité a été ajustée à 245 mOsm/L et le pH à 7.25. L'acquisition des données (filtrée à 1,8–2 kHz et numérisée à 10 kHz) a été réalisée à l'aide d'un amplificateur Multiclamp 700B et du logiciel Clampex 10.6 (Molecular Devices). Les données ont été analysées avec Clampfit 10.2 (Molecular Devices).

Pour étudier la plasticité de la synapse, il est important de déceler un changement dans la force de la synapse. L'induction de la potentialisation à long terme s'exécute par un protocole de LTP chimique. Une solution d'aCSF sans Mg²⁺ permet de débloquent le pore du rNMDA. Une fois le magnésium retiré, le récepteur NMDA devient perméable au calcium, qui est le messager important de la potentialisation de la synapse. L'addition de glycine (200 μM) et de bicuculine (10 μM) permet d'accélérer le déclenchement de la stimulation sans réellement modifier la force de la LTP. L'expérience consiste à stimuler toutes les 5 minutes la même fAuNPs et d'observer l'amplitude de la réponse Ca²⁺ synaptique. Après la première réponse obtenue par NALOS axonal, une solution de 0Mg²⁺/Gly+Bic est perfusée dans la chambre d'imagerie pendant 5 minutes pour induire de la plasticité synaptique. Un lavage de 5 minutes est suivi avec de l'aCSF régulière et une seconde stimulation par NALOS axonal est produite. Cette stimulation est répétée toutes les 5 minutes pour un total de 4 stimulations et la réponse Ca²⁺ est analysée. Chaque réponse suivant le protocole de cLTP est comparée à la première stimulation par NALOS.

2.5 Nanoparticules d'or et fonctionnalisation

Le temps d'incubation dans le milieu de culture de neurone est un facteur clé pour éviter leur agrégation. La distinction entre les agrégations et les nanoparticules seules est assez complexe et relève de la forme, de la taille et de l'intensité du signal perçu. Lors d'expériences préliminaires, nous avons remarqué que les nanoparticules de 20 nm avaient tendance à s'agglomérer davantage. De plus, leur petite taille rendait difficile leur séparation dû à leur spectre d'absorption qui fait qu'elles ne réfléchissent pas bien la lumière à 633 nm. Une grosseur de 100 nm permet une meilleure distinction des nanoparticules seules et est moins sensible aux agglomérations. Un temps d'incubation maximal de 120 min permet de minimiser les agrégations.

Les nanoparticules se déposent sur les neurones par sédimentation passive. 50 µl de la solution de nanoparticule (50 µg/mL, 100 nm, Nanopartz, A11-100-CIT-100, 5.71×10^9 AuNPs/ml, $\epsilon = 1.1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) est mélangée à 50 µl de milieu de culture neurobasal à température pièce et ajouté dans les puits contenant 1 ml de milieu de croissance. L'utilisation de neurobasal à 37°C favorise l'agrégation des nanoparticules dans le tube de préassemblage. Ce protocole d'incubation donne entre 40 et 60 nanoparticules détectables dans une région de 50 µm² autour d'un neurone pyramidal observé dans une culture cellulaire. Il n'est pas nécessaire d'effectuer une étape de lavage avant l'imagerie.

Le protocole de fonctionnalisation a été obtenu par Bergeron, E. et al. (2015)³⁶. Des anticorps monoclonaux (anti-Pan-Neurofascin external) de souris (clone A12/18, 186 kDa, UC Davis/NIH NeuroMab Facility) ont été attachés à des agents de liaison OPSS-PEG (5 kDa)-NHS (Nanocs Inc). OPSS-PEG-NHS est un polyéthylène glycol linéaire hétérobifonctionnels. La partie OPSS (orthopyridyl disulfide) réagit avec les groupements thiol (SH) et permet de former une liaison covalente forte entre le soufre et l'or. La partie ester NHS (N-hydroxysuccinimide) réagit avec les amines primaires des anticorps lors de conditions physiologiques légèrement alcalines (pH

7 à 9) pour donner des liaisons amides. La conjugaison anticorps-PEG a lieu dans une solution aqueuse de Na_2CO_3 10 mM pH 8,5 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, anticorps/OPSS-PEG-NHS Rapport molaire : 1:1.88) à 4°C durant 3h. Cette solution peut par la suite être conservée à -20°C. Une solution de 2 ml AuNPs doit être mélangée à 212 μl d'une solution aqueuse Na_2CO_3 (10 mM, pH 8,5). Le complexe Anticorps-PEG se lie aux AuNPs en incubant 2 ml de la solution d'AuNPs avec 10 μl de la solution d'anticorps à 4°C durant 1h. Une solution aqueuse de 247 μl PEG-SH methoxy (50 μM , 5 kDa, Nanocs) est ensuite incubée avec la suspension AuNPs-PEG-Ac (fAuNPs) pour bloquer les sites libres restants sur la surface des nanoparticules à 4°C durant 1h.

La suspension est purifiée par centrifugation à 5 000 tr / min pendant 2 min et le surnageant est retiré et remplacé par Neurobasal, ddH₂O ou du NaCl à 10%. Des aliquotes des mélanges purifiés sont analysés par spectroscopie UV-visible-NIR dans une plaque à 96 puits. Les spectres d'absorption (de 400 à 800 nm, par bond de 2 nm) sont obtenus avec un spectrophotomètre à microplaques OptiPlate (PerkinElmer™ life sciences, Gen5 Data Analysis). Un spectre à blanc (Na_2CO_3 10 mM pH 8,5 sans AuNPs) a été soustrait de chaque spectre d'échantillon. Un spectre d'AuNPs sans protocole de fonctionnalisation a été obtenu pour comparaison.

Chapitre 3 – Résultats

3.1 Simulation thermique

Pour comprendre les mécanismes sous-jacents à NALOS et ses effets sur la membrane, j'ai travaillé en collaboration avec Nicolas Doyon et Frank Boahen qui ont modélisé l'augmentation de la température en fonction de l'intensité du laser et de la distance nanoparticule-membrane (Figure 3.1).

Les résultats des expériences de modélisation indiquent qu'une augmentation locale et rapide de la température est reliée à différents mécanismes biophysiques pouvant provoquer une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Figure 3.1). En assumant une température initiale de 303,15 K, des simulations à différentes distances (20 nm, 50 nm, 100 nm et 200 nm) entre la surface de la nanoparticule et la membrane plasmique ont été réalisées. Les résultats obtenus montrent que lorsque la nanoparticule est positionnée sur la membrane (distance de ≤ 20 nm), une intensité laser de stimulation supérieure à 3.5 mW augmente la température de l'eau localement de plus de 30K. Cette augmentation rapide de chaleur pourrait causer des dommages irréversibles à la membrane cellulaire et la faire fondre (Figure 2.1b, zone rouge). Cette fusion membranaire confirmerait l'hypothèse des nanocavitations²⁹. Des intensités laser de stimulation se situant entre 2.0 mW et 3.0 mW causeraient une augmentation locale de la température l'eau de 15k à 30K. À ce niveau d'énergie, les lipides de la membrane cellulaire pourraient entrer en transition de phase, ce qui mènerait à un changement local dans la perméabilité de celle-ci (Figure 3.1b, zone jaune). La fluctuation des lipides pourrait laisser passer certaines molécules et ions comme le Ca^{2+} , sans toutefois affecter la viabilité de la cellule. Une puissance entre 1.0 mW et 2.0mW aurait pour effet d'augmenter la température de 5K à 15K. Cette augmentation de la température aurait des effets relativement faibles sur la bicouche lipidique et agirait plutôt sur l'activation des récepteurs membranaire en modulant la conductance et la cinétique (Figure 3.1b,

zone grise). Étant donné la grande variabilité des mécanismes sous-jacents à l'augmentation de la température locale, j'ai confirmé ces hypothèses expérimentalement.

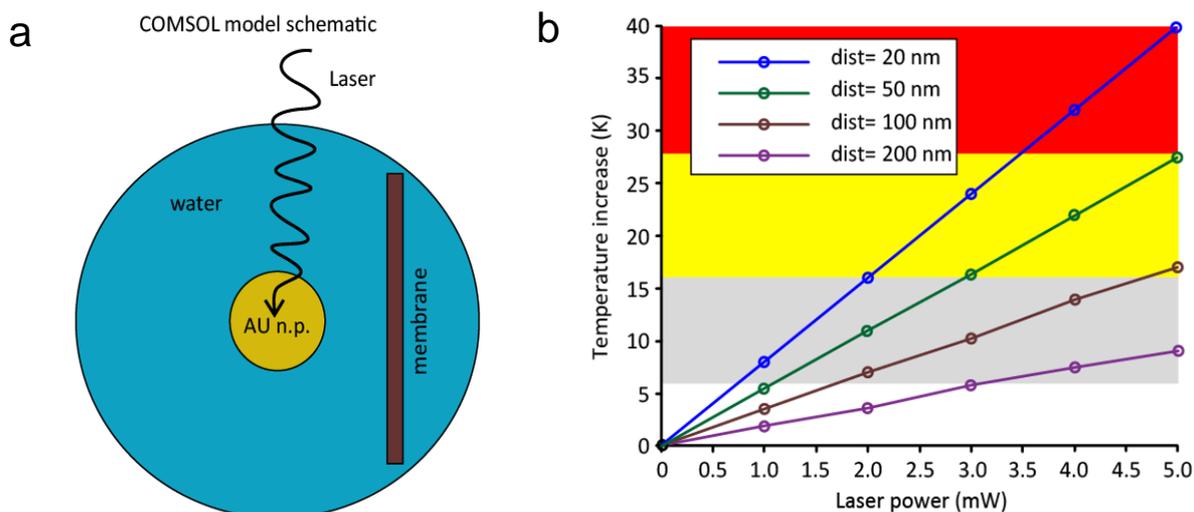


Figure 3.1. Caractérisation du mécanisme NALOS - Simulation. **a** | Modèle schématique implémenté dans l'environnement logiciel COMSOL utilisé pour la simulation de l'effet de l'excitation plasmonique d'une AuNP sur la membrane plasmique. **b** | Dépendance simulée de l'augmentation de la température au niveau de la nanoparticule pour des intensités laser de stimulation typiques utilisées pour NALOS. Des simulations à différentes distances (20 nm, 50 nm, 100 nm et 200 nm) entre la surface de la nanoparticule et la surface la plus proche de la membrane plasmique sont affichées. La température initiale avait peu d'impact sur l'augmentation de la température résultant du chauffage des nanoparticules, mais est déterminante pour la position de la zone ombrée décrivant les régions d'activation du canal (gris), de légers dommages membranaires ou une transition de phase lipidique (jaune) ou fusion de la membrane (rouge). Par Nicolas Doyon

3.2 Caractérisation de l'activité calcique des neurones

En premier lieu, j'ai caractérisé les réponses des neurones à NALOS afin de savoir si ces influx calciques correspondaient bien à ceux démontrés précédemment¹. Les réponses calciques transitoires observées lors de la photostimulation par NALOS sur une dendrite sont généralement localisées dans une région de quelques μm^2 et ont une cinétique qui leur est propre. En appliquant la photostimulation par NALOS

sur une dendrite, j'ai obtenu visuellement 3 cinétiques distinctes de réponse calcique. Le premier type de réponse avait comme caractéristique une entrée massive et irréversible de Ca^{2+} globalement répartie sur la dendrite et l'ensemble du neurone. L'impossibilité pour la cellule de gérer l'entrée massive de Ca^{2+} est un signe précurseur de la mort cellulaire. Ce type de réponse pourrait signifier la création d'une nanocavitation. Le second type de réponse obtenu était caractérisé par une entrée réversible de Ca^{2+} répandue globalement dans la dendrite pour laquelle le niveau de fluorescence de GCaMP6s revenait rapidement (environ 2 secondes) à son niveau basal. J'ai également remarqué un troisième type de réponse : à la fois très localisée sur une surface de quelques μm^2 , mais également répétable. Ce type de réponse suggère l'existence d'un processus biophysique non destructif respectant les conditions d'activité physiologique du neurone (Figure 3.2a).

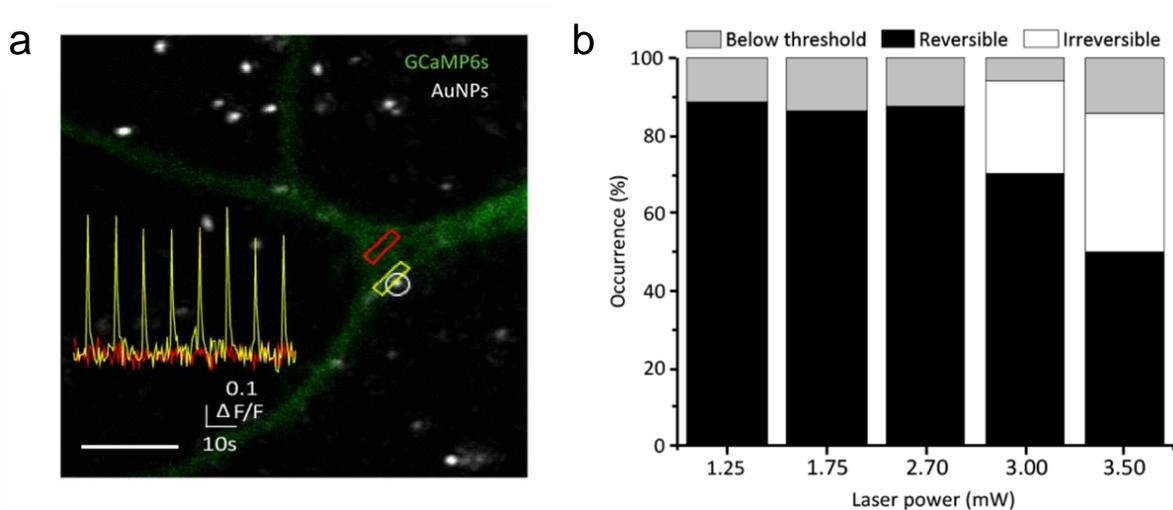


Figure 3.2. Caractérisation du mécanisme NALOS – Expérience. a | Exemple typique de la réponse Ca^{2+} observée (fluorescence de GCaMP6, vert) après NALOS (réflectance de AuNP, blanc). La photostimulation de l'AuNP est réalisée dans le cercle blanc. Encadré montrant les traces $\Delta F/F_0$ des régions marquées des rectangles jaune et rouge. b | Caractérisation de la réponse Ca^{2+} observée de GCaMP6s après NALOS pour différentes intensités laser. Comme prévu par les simulations (Fig.2.1), des réponses irréversibles au Ca^{2+} liées aux dommages à la membrane sont observées pour des intensités laser supérieures à 3 mW.

Dans le but de mieux caractériser ces influx calciques, j'ai appliqué une puissance laser femtoseconde aux AuNPs selon les intensités déterminées par les simulations (section 2.1) (Figure 2.2b). Une puissance laser de 3.50 mW à l'objectif engendre dans 40% des stimulations une réponse calcique irréversible et dans 50% une réponse réversible (N=12 neurones, n=4 cultures indépendantes). Une puissance laser de 3.00 mW génère des réponses irréversibles dans 25% des cas et des réponses réversibles dans 70% des cas (N=16, n=4). L'amplitude, l'étendue et le type de réponses calciques à 3.00 mW varient fortement en fonction de l'emplacement de la nanoparticule sur la dendrite. La stimulation sur des dendrites distales du corps cellulaire a tendance à générer plus souvent des réponses globales réversibles. Une puissance inférieure à 3.0 mW n'a causé aucune réponse irréversible (2.70 mW, N=14; 1.75mW, N=13; 1.25mW, N=16; n=4). Ces résultats suggèrent qu'une puissance supérieure à 3.00 mW peut causer une nanocavitation par la stimulation lumineuse d'une seule nanoparticule localisée sur la membrane dendritique.

3.3 Validation de l'hypothèse de la nanocavitation

Pour mieux valider l'hypothèse des nanocavitations, j'ai eu recours à SYTOX (SYTOX™ Orange; 5mM Thermo Fisher), une molécule fluorescente se liant aux acides nucléiques. SYTOX permet de déterminer la viabilité cellulaire, car elle est imperméable à la membrane, mais peut facilement la traverser lorsqu'elle est compromise. Parce qu'elle démontre une augmentation en fluorescence supérieure à 500 fois son niveau basal une fois lié à de l'ARN messager présent dans la dendrite, cette molécule est parfaitement adaptée pour déceler de petites nanocavitations causées par NALOS. Son pic d'absorption et d'émission maximal de fluorescence se situent à 547 nm et 570 nm respectivement, la rendant compatible avec l'imagerie calcique avec GCaMP6s.

Chaque puissance est testée sur 18 neurones différents provenant de deux cultures neuronales indépendantes. NALOS réalisé à une intensité laser faible (1,25 mW)

conduit à une réponse Ca^{2+} réversible et à aucune entrée de SYTOX mesurable (Figure 3.3b, haut). La réponse en SYTOX est mesurée par son augmentation en fluorescence au-dessus d'un seuil de $0,2 \Delta F/F$ après NALOS (Figure 3.3b). Comme prédit par les simulations, des intensités laser plus élevées entraînent une augmentation des dommages observés à la membrane, mesurés par une entrée de SYTOX dans la cellule. Pour une intensité laser supérieure (3,5 mW) (Figure 3.3a bas), on observe une réponse Ca^{2+} irréversible et une augmentation de la fluorescence de SYTOX dans 60% des réponses Ca^{2+} , liés à la formation de trous et à des dommages irréversibles de la membrane plasmique. Un résultat surprenant fut l'entrée de SYTOX lors d'une illumination à 2.70 mW. Lors des expériences précédentes de caractérisation, cette intensité lumineuse n'a causé aucune réponse irréversible en Ca^{2+} . Pourtant, une augmentation transitoire intracellulaire en SYTOX a été observée. Cette augmentation de fluorescence de SYTOX semblait très localisée, de courte durée et finissait par se dissiper à l'intérieur de la dendrite. L'hypothèse des transitions de phase suggérée par les simulations qui serait reliée à une augmentation dans la fluidité de la membrane pourrait expliquer le transport passif de SYTOX à l'intérieur de la cellule. Aucune augmentation de SYTOX intracellulaire n'était visible avec une puissance inférieure à 2.70 mW.

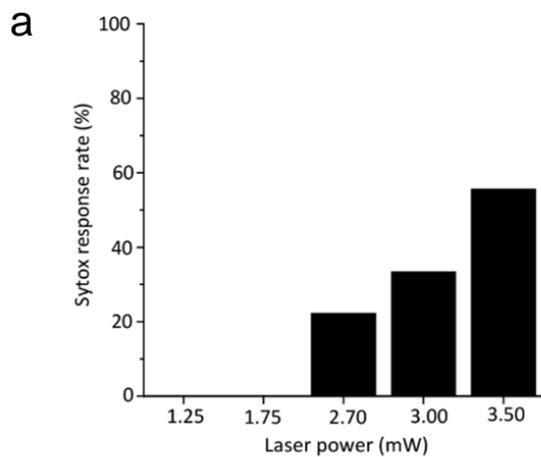
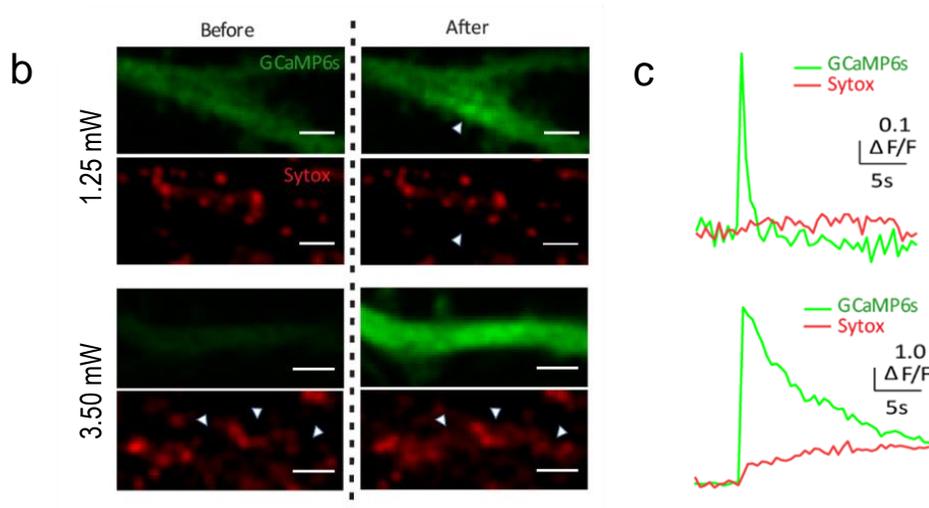


Figure 3.3. Caractérisation du mécanisme NALOS – SYTOX. **a** | Taux de réponse Sytox mesuré par l'augmentation de la fluorescence de Sytox au-dessus d'un seuil de $0,20 \Delta F/F_0$ après NALOS. **b** | Exemples représentatifs de la variation de la fluorescence des GCaMP6 (en vert) et du Sytox (en rouge) après une seule stimulation par NALOS. Barre d'échelle $2 \mu\text{m}$ **c** | Signale de Sytox et signal Ca^{2+} ($\Delta F/F_0$) en fonction du temps selon la fluorescence respective colorée.



3.4 Implication des récepteurs

NALOS réalisé à une intensité laser inférieure à 2.70 mW conduit à une réponse Ca^{2+} réversible transitoire et hautement localisée. À l'aide de SYTOX, il est possible de déduire qu'une faible augmentation de la température locale aura des effets relativement faibles sur la structure de la bicouche lipidique. Une faible augmentation de la température locale pourrait agir plutôt sur l'activation des récepteurs membranaires en modulant leur conductance et leur cinétique. Pour investiguer ce sous-type de réponse calcique transitoire impliquant les récepteurs membranaires,

j'ai utilisé des inhibiteurs pour différents récepteurs et caractérisé leur effet sur l'efficacité de NALOS.

La somme des évènements pour les trois catégories de réponse Ca^{2+} après NALOS selon les différents inhibiteurs a été calculée et comparée (Figure 3.4). Les réponses Ca^{2+} inférieures à un $\Delta F/F$ de 0,2 lors de NALOS ne sont pas considérées comme une réponse. Les expériences ont été effectuées à une température initiale de 303.15K (30°C). Lorsqu'aucun inhibiteur n'est appliqué à la culture de neurone, un taux de réponse calcique de 75% a été obtenu (N = 81 neurones; n = 10 cultures neuronales indépendantes).

L'inhibition des rTRPV1 s'activant lors d'une augmentation de la température entre 308 et 311 K³⁷ a permis de bloquer environ 50% des réponses calciques observées par GCaMP6s (N= 59 pour l'inhibiteur SB703498, N=48 pour l'inhibiteur SB366791; n = 3). Bien que les rTRPV1 ne soient pas les seuls récepteurs responsables de l'entrée de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule, ce blocage partiel est expliqué principalement par le fait que SB703498 et SB366791 bloquent uniquement un des trois sous-types de récepteurs TRPV présents sur les neurones. Une augmentation de la chaleur entre 302 et 318 K active graduellement le rNMDA³⁸. En utilisant l'inhibiteur des rNMDA APV (50 μM), j'ai mesuré une réponse calcique à la suite de NALOS pour seulement 30% des neurones (N=82, n=4). Pour les canaux calciques dépendants du voltage, une augmentation de la chaleur locale jusqu'à 310 K entraîne une augmentation significative des taux d'activation, d'inactivation, de la vitesse de retour de l'inactivation et augmente l'amplitude des courants. J'ai utilisé le cadmium comme inhibiteur de ces canaux ce qui a eu pour effet de diminuer le nombre de réponses observées avec NALOS à 30% (N=83, n=4). Une augmentation de la température entre 302 et 318 K permet d'activer les canaux sodiques dépendants du voltage³⁹. L'inhibition de ces canaux par le TTX n'a eu pratiquement aucun effet sur l'occurrence des réponses. Un taux de succès de plus de 70%, comparable au contrôle a été obtenu (N= 33; n=2).

Finalement, une augmentation de la température jusqu'à 308 K permet d'activer les rAMPA. En utilisant l'inhibiteur des rAMPA NBQX (20 μ M), j'ai obtenu une réponse calcique à la suite de NALOS pour environ 50% des neurones (N= 43; sur 2 semaines). Ces récepteurs sont les récepteurs ionotropiques les plus abondants de la densité postsynaptique et leur activation vient du relâchement de glutamate par les vésicules présynaptiques⁴⁰. Comme les cellules nerveuses sont reconnues pour faire de nombreuses connexions entre elles afin d'assurer la transmission du signal nerveux, il est possible que l'AuNP en apparence positionnée sur une dendrite soit plutôt déposée sur un axone longeant celle-ci. La technique d'expression par gène de protéines fluorescentes permet de ne cibler qu'une faible proportion de neurones, ce qui laisse la majorité des neurones dans le milieu de culture impossible à observer au microscope à fluorescence. Le blocage partiel des réponses calciques pourrait donc s'expliquer par la création d'une stimulation synaptique par NALOS où la réponse postsynaptique est bloquée par le NBQX.

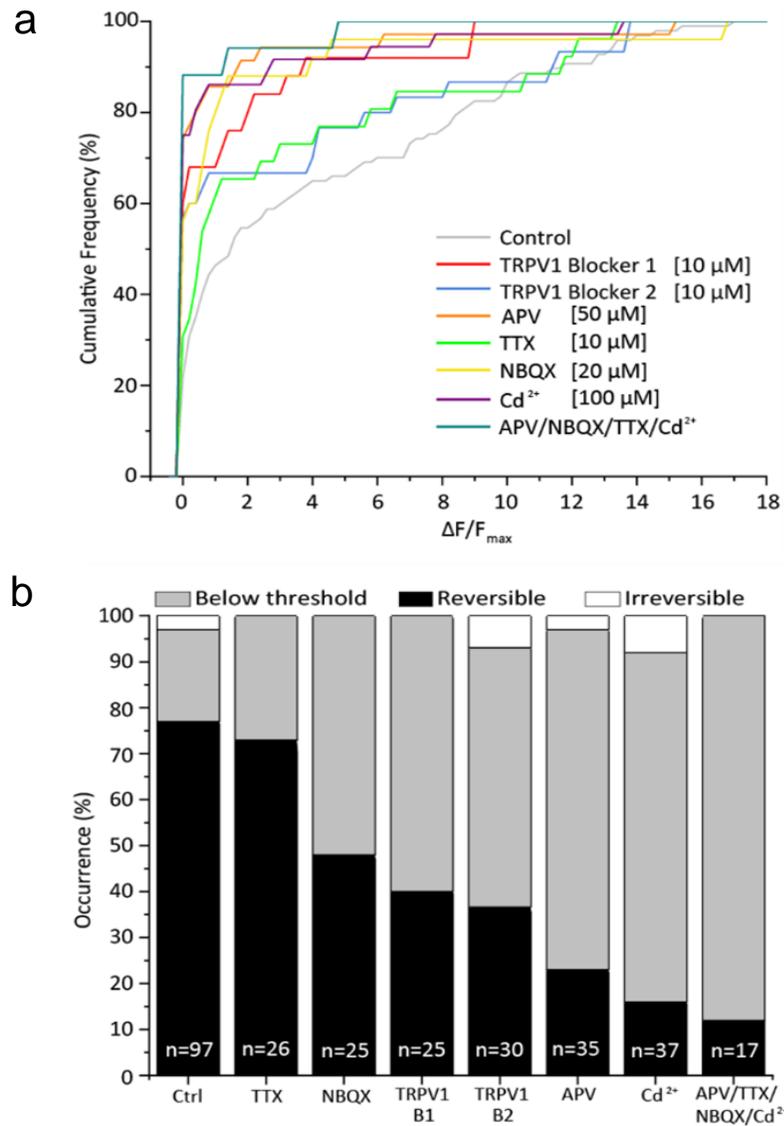


Figure 3.4. Caractérisation du mécanisme NALOS – Implication des récepteurs a | Courbes de fréquence cumulatives montrant l'amplitude $\Delta F/F_0$ mesurée des réponses GCaMP6s après NALOS. **b** | Taux d'occurrence pour trois catégories de réponse Ca^{2+} après NALOS pour différents inhibiteurs. Le seuil des réponses Ca^{2+} supérieures à un $\Delta F/F$ de 0,2 est considéré comme une réponse calcique.

3.5 Caractérisation des réponses axonales évoquées par NALOS

La possibilité de bloquer la réponse Ca^{2+} avec le NBQX nous amène à croire qu'il pourrait s'agir d'une stimulation différente de la précédente. La stimulation dendritique par NALOS pourrait en réalité être une stimulation indirecte de la dendrite engendrée par une stimulation axonale via NALOS.

Après avoir investigué les mécanismes sous-jacents à NALOS et ses effets sur la membrane, j'ai transposé la stimulation dendritique par NALOS à la stimulation axonale. Afin de cibler un axone pour la stimulation synaptique et d'observer la réponse Ca^{2+} sur une dendrite connectée, j'ai utilisé une double transfection de Vamp-SEP et NES-JRGECO1a sur deux jours consécutifs. Ce protocole permet d'obtenir deux populations distinctes dans la même culture de neurone, soit les axones en verts (Vamp-SEP) et les dendrites en rouges (NES-JRGECO1a). L'expression sur 48h de Vamp-SEP aide grandement à voir un plus grand nombre d'axones en contact avec les dendrites des neurones exprimant NES-JRGECO1a.

Pour mieux comprendre la stimulation axonale par NALOS, j'ai d'abord reproduit les expériences de photostimulation, mais cette fois en ciblant une nanoparticule sur l'axone. J'ai déterminé la puissance minimale nécessaire à la stimulation axonale en augmentant graduellement la puissance du laser de photostimulation jusqu'à l'obtention d'une réponse calcique dendritique au croisement entre l'axone stimulé et la dendrite marquée avec NES-JRGECO1a. Sur les 50 neurones testés, 58% ont répondu à une puissance de 1.25 mW, 22% à 1.5 mW, 12% à une puissance de 2.0 mW et 8% ont répondu à une puissance supérieure à 3 mW (Figure 3.5 d-e). Ces résultats indiquent que 80% des neurones ont répondu à une puissance inférieure à 2.0 mW. Selon les simulations thermiques, une puissance inférieure à 2.0 mW a pour effet d'augmenter la température entre 308 et 318K. Cette augmentation de la température a des conséquences relativement faibles sur la bicouche lipidique et agit plutôt sur l'activation des récepteurs membranaire en modulant la conductance et la cinétique.

Pour m'assurer que la réponse calcique observée dans la dendrite ou épine à proximité de l'axone stimulé provient d'un événement de transmission synaptique, j'ai utilisé des inhibiteurs de la propagation de potentiel d'action et de la transmission synaptique. La tétrodotoxine (TTX) est une molécule bloquant les canaux sodiques voltages dépendants responsables de la propagation de la dépolarisation membranaire de l'axone libérant les vésicules présynaptiques. En présence de TTX, aucun neurone n'a répondu à une puissance inférieure à 1.5 mW. Sur les 16 AuNPs, 19% des neurones ont répondu à 1.5 mW, 44% ont répondu à une puissance de 2 mW, 25% à une puissance de 2.7 mW, et 12% ont répondu à une puissance égale ou supérieure à 3 mW (Figure 3.5 d-e). En utilisant une puissance supérieure à 1.5 mW pour la stimulation des récepteurs, NALOS va au-delà de stimuler l'activité électrique de l'axone. À ce niveau d'énergie, les lipides de la membrane cellulaire entrent en transition de phase, ce qui mène à un changement local dans la perméabilité de la membrane (voir Section 3.1). Il est alors possible que NALOS ait causé une brève entrée de Ca^{2+} dans l'axone, causant un relâchement synaptique de neurotransmetteurs.

J'ai ensuite testé si l'ouverture des récepteurs NMDA était requise pour l'induction de la réponse dendritique par NALOS axonal. En présence d'APV, aucun neurone n'a répondu à une puissance inférieure à 2.0 mW. Ces résultats suggèrent que plus de 50% des neurones ont répondu à une puissance entre 2.0 et 3.0 mW (1.3 MW/cm² et 1.9 MW/cm²).

Finalement, bien que les rAMPA ne sont pas perméables au Ca^{2+} , ces récepteurs jouent un rôle important dans l'ouverture du rNMDA. L'activation de ces récepteurs permet de dépolariser la membrane postsynaptique et causer l'activation du rNMDA par l'expulsion de son ion magnésium. L'inhibition de ces récepteurs devrait alors fortement diminuer la réponse Ca^{2+} postsynaptique. En utilisant du NBQX, un inhibiteur des rAMPA, aucun neurone n'a répondu à une puissance inférieure à 3.5 mW (Figure 3.5 d-e). Ces résultats suggèrent qu'il est possible de bloquer

complètement la réponse Ca^{2+} générée dans la dendrite par NALOS axonal. Une intensité de plus de 3.5 mW produit une augmentation rapide de chaleur qui cause des dommages irréversibles à la membrane cellulaire (voir Section 3.1). Ces réponses sont reliées au phénomène de nanocavitation où l'entrée massive de calcium dans l'axone produit un relâchement maximal des vésicules présynaptiques, ce qui ne correspond pas à une réponse physiologique recherchée dans cette étude. Ces résultats tendent à confirmer l'hypothèse qu'il s'agit bien d'une stimulation synaptique par NALOS axonal, sachant que le blocage des rAMPA est suffisant pour éliminer la totalité des réponses calciques dendritique.

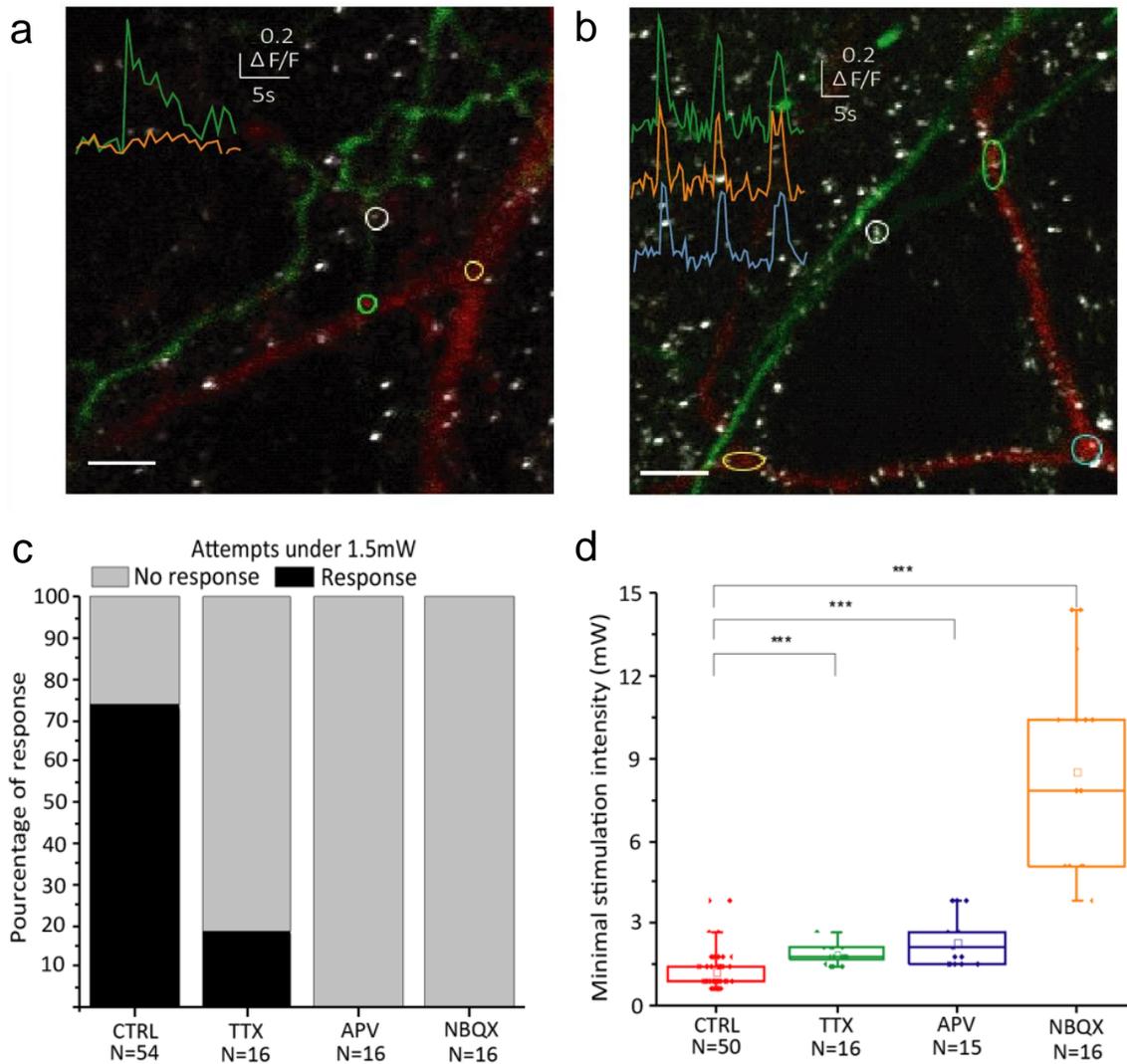


Figure 3.5. Caractérisation des réponses évoquées par NALOS axonal a | Exemple de réponse synaptique localisée après la stimulation synaptique AuNP. Une réponse Ca^{2+} n'est observée que sur une région dendritique de quelques μm^2 au voisinage de l'axone stimulé (ROI vert et trace de Ca^{2+} verte). Aucune élévation de Ca^{2+} sur la dendrite (ROI jaune et trace) n'est observée depuis l'axone. b | Exemple d'une stimulation synaptique localisée (cercle blanc) suivie d'une réponse dendritique globale (ROI jaune, vert et bleu). c | Taux d'apparition de réponses synaptiques après la stimulation axonale AuNP en présence de différents médicaments à une puissance inférieure ou égale à 1.5 mW. d | Augmentation de l'intensité de stimulation du laser NIR fs pour trouver la puissance minimale déclenchant la réponse Ca^{2+} transitoire dendritique localisée. Augmentation minimale de la puissance avec TTX et APV. Les réponses non physiologiques sont obtenues avec NBQX, bloquant toutes les réponses possibles.

3.6 Blocage réversible de NALOS axonal

Bien que le blocage de la réponse synaptique par le NBQX appuie l'hypothèse de la stimulation synaptique par NALOS, plusieurs mécanismes restent à comprendre avant d'utiliser cette technique pour étudier l'activité locale de la synapse. Pour observer la signalisation et le remodelage synaptique, il est primordial de pouvoir contrôler l'activité de la synapse. Pouvoir répéter une stimulation synaptique sur une synapse et regarder les changements dans la réponse Ca^{2+} postsynaptique est un pas dans la bonne direction. Pour la suite des expériences de NALOS axonal, une puissance de 1.25 mW a été utilisée, car cette puissance a permis d'obtenir précédemment une réponse synaptique dans plus de 50% des stimulations (voir Section 3.5).

Le croisement entre un axone et une dendrite de même qu'une densité élevée d'AuNP sur cet axone est très difficile à obtenir. Le temps que cette expérience a nécessité fut considérable. Pour diminuer la complexité des expériences suivantes, j'ai utilisé l'indicateur de calcium vert GCaMP6s en sacrifiant la localisation des axones par Vamp-SEP. En ne ciblant plus un axone transfecté en particulier, mais en considérant toutes les AuNPs disponibles autour de la dendrite pouvant potentiellement être déposées sur un axone, le nombre de possibilités pour tenter d'obtenir une photostimulation par NALOS axonal se trouvait augmenté.

Pouvoir répéter une stimulation synaptique est un élément crucial dans l'optique de contrôler l'activité de la synapse. J'ai donc testé la possibilité de répéter la stimulation sur une même synapse avec NALOS axonal. À la suite d'une première stimulation, j'ai bloqué l'induction de NALOS axonal avec une solution de NBQX 20 μM et validé son blocage par une seconde stimulation. Puis, j'ai tenté de retrouver la réponse synaptique par NALOS axonal en retirant le NBQX ajouté précédemment grâce à une perfusion continue d'une solution régulière d'aCSF (Figure 3.6).

Pour mener à bien cette expérience, une connexion entre un axone et une dendrite répondant à la photostimulation devait être trouvée en mesurant une réponse dendritique suite à NALOS axonal. Ensuite, une deuxième photostimulation était tentée après 5 min de perfusion avec une solution d'aCSF contenant 20 μ M de NBQX. Lors de cette stimulation, aucune réponse dendritique n'a été observée. Cinq minutes de lavage dans de l'aCSF sans inhibiteur a permis un retour de près de 50% des réponses synaptiques (Figure 3.6) mesurées suite à une troisième stimulation. Ce taux de réponse augmente pour chaque 5 minutes de lavage additionnel. Ces résultats démontrent qu'il est possible de restaurer l'activité des rAMPA inhibée par le NBQX et qu'il est possible d'engendrer une stimulation répétable avec NALOS à l'aide d'intervalles de 5 minutes entre chaque stimulation. Près de 90% des réponses sont revenues après 15 minutes de lavage (Figure 3.6). Ces résultats laissent croire qu'aucun dommage irréversible n'a été causé à l'axone lors de stimulations répétées d'une même AuNP. Il existe toutefois une grande variabilité dans ces expériences qui vient du manque de précision quant à la localisation exacte des AuNPs et de leurs distances des axones. Pour diminuer la variabilité, il serait idéal de fixer les AuNPs directement sur l'axone à l'aide d'anticorps. Pour augmenter la stabilité de l'AuNP et sa spécificité, j'ai eu recours à un protocole de fonctionnalisation qui avait été utilisé pour les stimulations dendritiques à l'aide de NALOS³⁶.

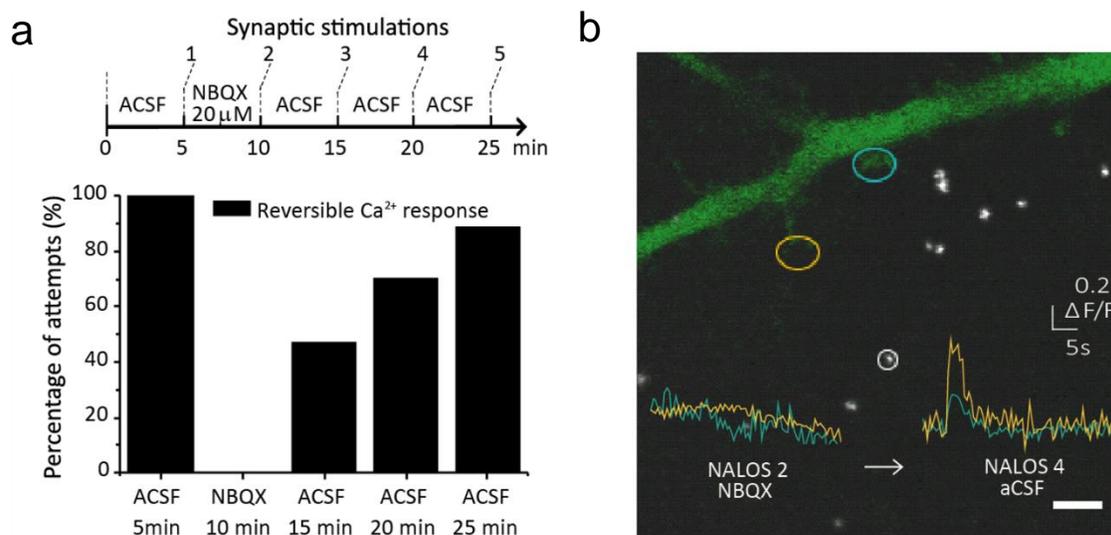


Figure 3.6. Blocage réversible de NALOS axonal par NBQX a | Protocole de la stimulation synaptique bloquant la réponse Ca^{2+} avec NBQX, un antagoniste de l'AMPA, et en mesurant la récupération dans le temps. Aucune réponse Ca^{2+} transitoire ne peut être obtenue en présence de NBQX lors d'une stimulation avec une puissance minimale sur des AuNPs à 100 nm. Récupération de la réponse dans le temps avec la solution de lavage aCSF sans NBQX. b | Imagerie Ca^{2+} (fluorescence de GCaMP6, vert) après une stimulation synaptique par AuNP (réflectance, blanc); barre d'échelle 5 μ m. Imagerie temporelle et stimulation optique de la ROI marquée par le cercle blanc et le signal de fluorescence $\Delta F/F_0$ quantifié dans le cercle jaune et bleu de la ROI au fil du temps. NALOS 2 montre des réponses Ca^{2+} complètement bloquées avec une stimulation minimale sur AuNP dans une solution de NBQX. NALOS 4 montre une récupération des réponses après 10 minutes de lavage en solution régulière sans NBQX.

3.7 Analyse de la spécificité des AuNPs fonctionnalisées

Lorsque les AuNPs sont déposées par sédimentations passives sur les neurones, le temps d'incubation et le volume déposé sont des facteurs très importants pour le succès des expériences. Un temps d'incubation trop long ou un volume d'AuNPs trop élevé amènent la formation d'agglomération entre les AuNPs. Sans le protocole de fonctionnalisation, un volume de 50 μ l et un temps d'incubation de 90 minutes par lamelle de culture neuronale (puits contenant 1 ml de milieu de culture) permettent de maximiser le nombre d'AuNP sur les axones sans augmenter le nombre d'agrégats³⁶.

Le protocole de fonctionnalisation des AuNPs (fAuNPs) élaboré par Bergeron, E. et al. (2015)³⁶ a été conçu pour limiter l'agglomération des AuNPs (Figure 3.7.1). Également, la fonctionnalisation permet d'augmenter la stabilité et la précision de l'emplacement des AuNPs, une caractéristique très recherchée lors des stimulations répétées par NALOS. La fonctionnalisation a donc principalement servi à cibler les axones pour faciliter la stimulation de ceux-ci.

Neurofascine-HA, un marqueur axonal, est d'abord co-transfecté avec Vamp-SEP afin d'être exprimé dans les mêmes neurones. Les AuNPs sont fonctionnalisées avec un anticorps Anti-HA et sont utilisées en combinaison avec un anticorps Anti-HA couplé à un fluorophore rouge pour vérifier la spécificité du protocole de fonctionnalisation. Dans le but d'optimiser le protocole de fonctionnalisation afin d'obtenir la méthode la plus robuste, j'ai tenté plusieurs temps d'induction des AuNPs (résultats non montrés). Alors qu'initialement j'utilisais un temps d'incubation de 90 minutes, j'ai fini par augmenter la durée de 120 à 180 minutes afin d'augmenter le temps de fixation des anticorps aux protéines membranaires. Également, une solution de neurobasal, une solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate buffered saline, PBS) et une solution régulière (aCSF) sont comparées lors de l'incubation des fAuNPs. Sans réellement modifier la spécificité de la fonctionnalisation des AuNPs, la solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate buffered saline, PBS) est la seule augmentant le nombre d'agrégats d'AuNPs (résultats non montrés).

Le protocole est répété avec des AuNPs fonctionnalisées avec des anticorps Anti-Neurofascine. Les fAuNPs sont utilisés en combinaison avec des contrôles de spécificité pour vérifier la spécificité de l'anticorps Anti-Neurofascine. Anti-Tau couplé à un fluorophore rouge permet de marquer les axones et Anti-MAP2 couplé à un fluorophore vert permet de marquer les dendrites (Figure 3.7.2). Les résultats sont analysés avec ImageJ en créant un masque binaire des axones et des nanoparticules. Une colocalisation de plus de 3 pixels entre l'image prise des AuNPs et l'image des axones permet de confirmer l'efficacité de la fonctionnalisation. Pour

l'ensemble des expériences, une colocalisation de plus de 75% entre les fAuNPs-Neurofascin et les axones marqués avec Anti-Tau-594 ont été observés (résultats non montrés). Le volume de fAuNPs utilisé peut-être réduit de 5 et 20 μ l par puits de 1ml, car la spécificité de la localisation des fAuNPs permet de ne plus dépendre du nombre d'AuNPs présent autour du neurone. Comme le protocole de fonctionnalisation est conçu pour limiter les agrégats entre les fAuNPs, une incubation durant la nuit est possible en utilisant un volume de 1 à 5 μ l de fAuNPs. La possibilité de fixer directement les AuNPs sur les axones permet d'améliorer la robustesse de la technique et stabiliser les AuNPs pour les stimulations synaptiques répétées.

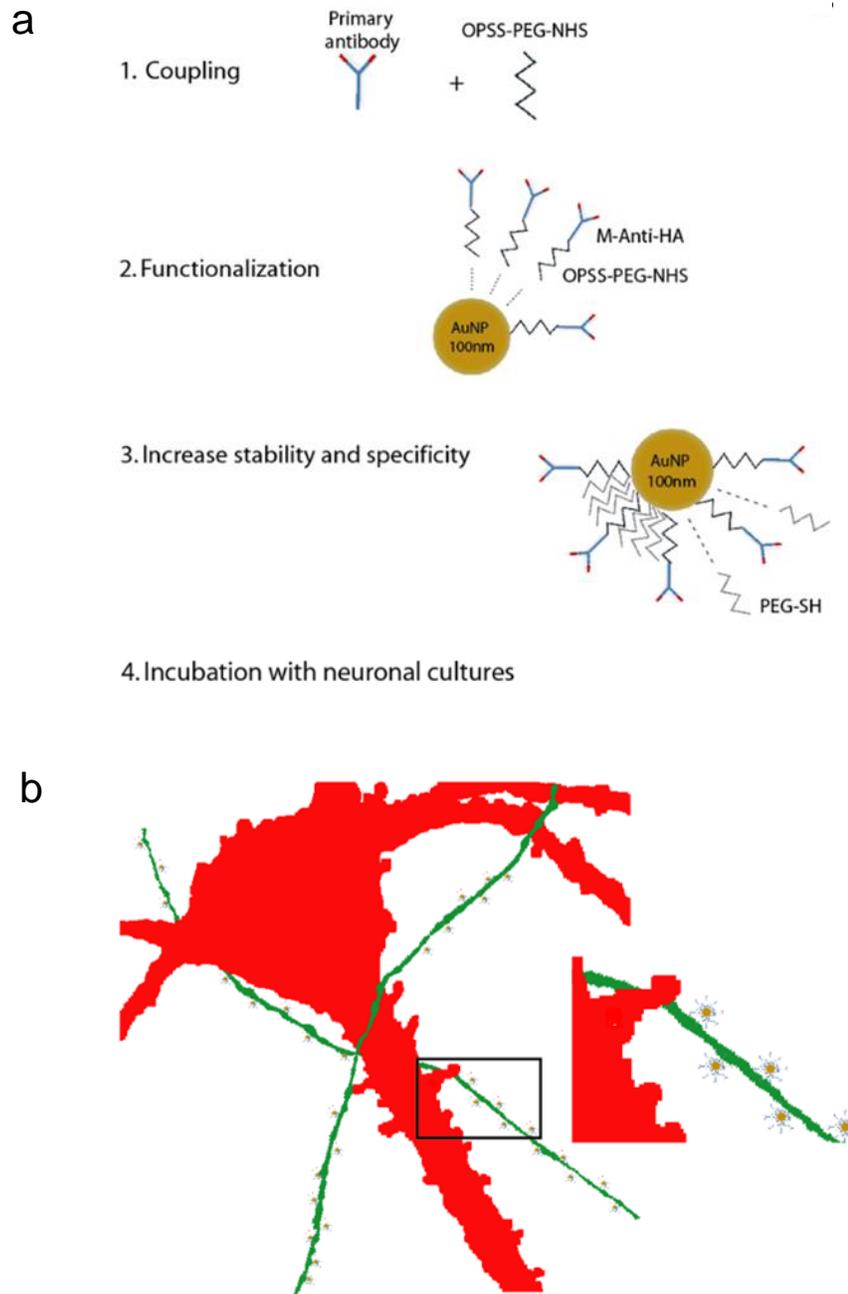


Figure 3.7. Fonctionnalisation des AuNPs (fAuNPs) a | Étapes et représentation schématique des AuNPs fonctionnalisés avec des couches de PEG et des anticorps. **b** | Représentation des fAuNP marquant spécifiquement les protéines axonales (fonctionnalisées avec des anticorps monoclonaux anti-Neurofascin).

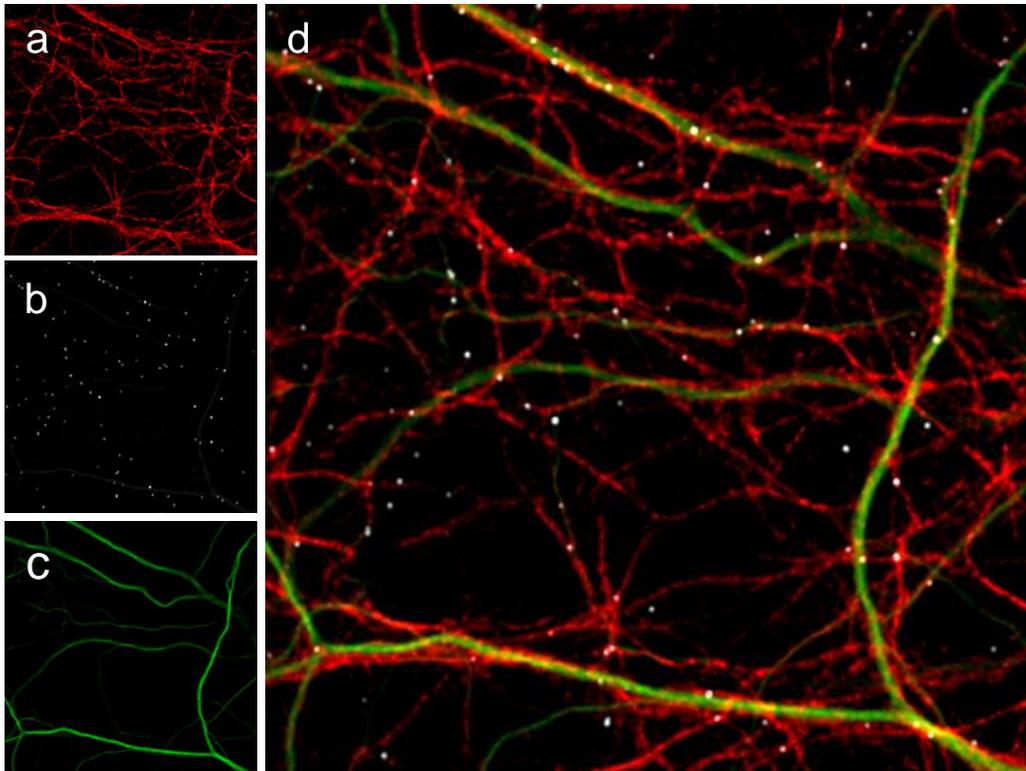


Figure 3.8. Tests de colocalisation des fAuNPs **a** | Marquage des protéines axonales TAU par Anti-Tau-594. **b** | Représentation des fAuNP fonctionnalisées avec des anticorps monoclonaux anti-Neurofascin. **c** | Marquage des protéines 2 associées aux microtubules dendritiques par Anti-MAP2-488. **d** | Superposition des images a, b et c démontrant la colocalisation des fAuNPs sur les axones (rouge). 112 des 118 fAuNPs sont colocalisées sur les axones.

3.8 Enregistrement électrophysiologique pendant NALOS

Afin de mieux comprendre le mécanisme de NALOS et de caractériser le type de réponse obtenu, nous avons combiné la photostimulation à des enregistrements électrophysiologiques. Les expériences se sont déroulées en patch-clamp sur cellules entières exprimant GCaMP6s. Pour isoler la réponse synaptique des potentiels d'action dans le neurone enregistré, le bloqueur de canaux sodique QX-314-chlorure a été inclus dans la solution intracellulaire de la pipette de verre (QX, 2 mM). Nous avons d'abord testé s'il existait une corrélation entre la réponse calcique et les courants obtenus par l'électrophysiologie. Pour induire une réponse synaptique, nous avons utilisé le protocole de photostimulation axonale développé

précédemment en utilisant une puissance laser de 1.25 mW. Une stimulation NALOS axonale peut induire à la fois une réponse calcique et un courant EPSC. Sur 12 neurones différents, les réponses Ca^{2+} vont de 0.2 à 1.1 $\Delta F/F_0$ et les courants évoqués de 10 à 100 pA (Figure 3.8). Ces résultats nous donnent un coefficient de corrélation de Pearson de 0.8367 entre le Ca^{2+} et les courants. Il s'agit d'une forte corrélation positive, ce qui signifie que les réponses calciques élevées sont proportionnelles à la réponse électrique mesurée. La même stimulation laser sur un axone sans nanoparticule n'induit ni réponse en Ca^{2+} , ni d'EPSC corrélée dans le temps, bien que l'activité synaptique spontanée a pu être mesurée.

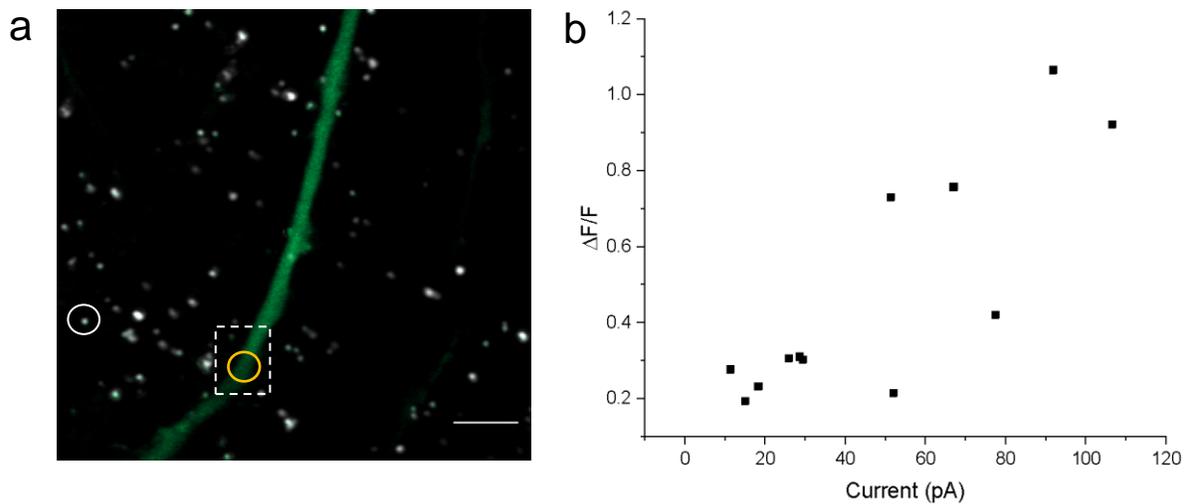


Figure 3.9. Corrélation des réponses uniques Ca^{2+} et des réponses électrophysiologiques a | Imagerie Ca^{2+} (fluorescence de GCaMP6, vert) après une stimulation synaptique par fAuNP (réflectance, blanc); barre d'échelle 5 μm . Imagerie temporelle et stimulation optique du ROI marquée par le cercle blanc et le signal de fluorescence $\Delta F/F_0$ quantifié dans le cercle jaune. La réponse Ca^{2+} s'étend dans la région délimitée par le carré blanc au fil du temps. b | Corrélation des réponses Ca^{2+} et des courants électrophysiologiques de 12 neurones différents.

Nous avons ensuite testé si la stimulation synaptique répétée par NALOS produit un EPSC constant lors des enregistrements électrophysiologiques. Les conditions expérimentales rendirent toutefois la détection des événements Ca^{2+} très complexe. De plus, en utilisant une intensité laser de 1.25 mW, il fut très difficile de répéter la réponse Ca^{2+} observée et ainsi la corrélérer aux courants enregistrés (46 stimulations synaptiques, 12 neurones, 3 cultures indépendantes). Des expériences supplémentaires et l'optimisation du protocole expérimental seront nécessaires afin de valider la corrélation entre les mesures optiques et électrophysiologiques.

Nous avons toutefois été en mesure de stimuler individuellement des synapses et d'observer des réponses. Ces réponses uniques observées en Ca^{2+} semblent correspondre à une activité synaptique électrophysiologique. Cependant, l'objectif n'est pas de continuer à utiliser l'électrophysiologie, puisqu'il existe toujours une incertitude entre la provenance de la réponse et la synapse qui a réagi. L'objectif est d'exploiter la partie d'optique afin de moduler localement l'activité de la synapse et d'observer les mécanismes à partir de cette technique optique.

3.9 Potentialisation à long terme et plasticité synaptique

Pour étudier la plasticité de la synapse, nous devons être en mesure de déceler un changement dans la force de la synapse. La potentialisation de la synapse devrait démontrer un changement dans la réponse calcique avant et après le protocole de potentialisation à long terme (long-term potentiation, LTP). Lors de l'induction de la LTP, des cascades biochimiques s'opèrent à l'intérieur de la synapse. Ces cascades mènent à des modifications biochimiques qui résultent en une augmentation de l'amplitude de la réponse calcique postsynaptique. L'augmentation de l'amplitude peut s'expliquer par un changement moléculaire ou par le recrutement de nouveaux rAMPA postsynaptique, mais également par le relâchement d'un plus grand nombre de neurotransmetteurs présynaptiques. Pour potentialiser les synapses dans un milieu de culture, j'ai utilisé un protocole de LTP chimique (cLTP) couramment utilisé dans le laboratoire⁴¹.

Les stimulations NALOS répétées en condition contrôle (aCSF) ont démontré des amplitudes constantes des réponses postsynaptiques observées (Figure 3.9). Deux neurones ont toutefois démontré une augmentation dans l'amplitude de leurs réponses, soit après 15 ou 20 min suivant la première stimulation. Ces résultats permettront de mesurer un réel changement dans la force des réponses Ca^{2+} lors de l'induction de la plasticité par le protocole de cLTP.

Une stimulation de 5 minutes dans une solution d'aCSF sans Mg^{2+} additionnée de glycine (200 μM) et bicuculline (10 μM) a augmenté significativement l'amplitude des réponses Ca^{2+} postsynaptiques induites par NALOS. Cette potentialisation s'est maintenue durant 15 minutes suivant les stimulations de NALOS axonal. Il est important de noter ici que les valeurs d'amplitudes utilisées proviennent de la même synapse ayant réagi à NALOS axonal avant et après le protocole de cLTP. Ces résultats suggèrent que la potentialisation de la synapse stimulée a pu être détectée par NALOS. NALOS permet de mesurer un réel changement dans la force de la synapse par une augmentation de l'amplitude des réponses calciques synaptiques. La stimulation de fAuNPs après une cLTP déclenche une réponse Ca^{2+} plus importante, validant ainsi la robustesse de la stimulation synaptique révélée par la potentialisation des composants synaptiques. L'augmentation de l'amplitude du Ca^{2+} au niveau des synapses suivant la cLTP suggère différents niveaux de réponses calciques transitoires.

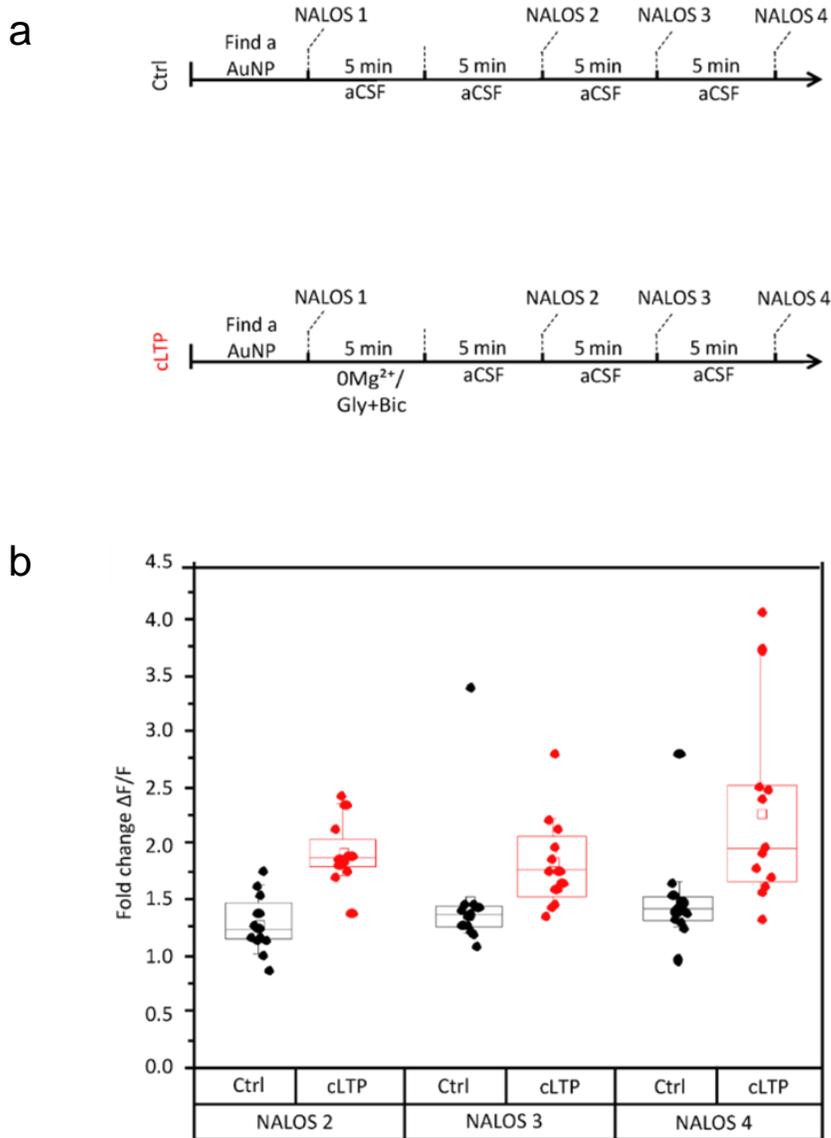


Figure 3.10. Potentialisation à long terme et plasticité synaptique a | Représentation du protocole utilisé pour enregistrer les réponses Ca^{2+} transitoires. Les fAuNPs ont déclenché des réponses Ca^{2+} reproductibles et localisées. Représentation du protocole de type cLTP utilisé pour enregistrer les réponses Ca^{2+} transitoires avant et après 5 min 0Mg^{2+} / Gly + bic. **b** | Comparaison du contrôle et du protocole cLTP sur l'augmentation de l'amplitude de la réponse calcique en fonction de l'amplitude de la première stimulation. Le signal Ca^{2+} ($\Delta F/F_0$) est resté similaire après la stimulation synaptique, ne montrant aucun dommage significatif à l'axone. L'expérience est répétée en ajoutant une solution de 0Mg^{2+} / Gly + bic après NALOS1. La stimulation de fAuNPs après une cLTP déclenche une réponse Ca^{2+} plus importante, validant ainsi la robustesse de la stimulation synaptique révélée par la potentialisation des composants synaptiques.

Chapitre 4 - Discussion

Dans ce projet de maîtrise, j'ai optimisé une technique de stimulation synaptique, et par le fait même tenté d'en comprendre les mécanismes sous-jacents. Le phénomène de communication entre les synapses est encore bien mal compris et les techniques utilisées pour investiguer ce phénomène sont incomplètes. Contrairement aux autres techniques modernes utilisées pour l'étude de la communication synaptique, NALOS a l'avantage de pouvoir générer une stimulation neuronale ou axonale avec une grande résolution spatiale et temporelle. La possibilité d'utiliser NALOS sans l'insertion d'instrument invasif pour mesurer l'activité d'un neurone fournit une approche d'imagerie reposant entièrement sur l'optique et pourrait servir de complément aux méthodes dépendantes de la lumière.

Pour mieux comprendre le potentiel de la stimulation neuronale à l'aide des AuNPs, il était important de se référer à l'étude sur laquelle s'est basé mon projet de maîtrise. Dans le passé, NALOS a permis de contrôler l'activité des neurones en contrôlant l'activité de la membrane et la signalisation intracellulaire des protéines localisée à la dendrite. L'idée était alors qu'avec une meilleure compréhension du fonctionnement cette technique, NALOS pourrait être utilisé pour investiguer davantage les changements moléculaires qui surviennent lors d'une stimulation synaptique. C'est après avoir mieux compris le processus de la stimulation dendritique par NALOS que mon projet a pris forme.

Dans ce mémoire, je démontre que NALOS permet de stimuler localement des cellules neuronales à l'aide d'une excitation hors résonance des AuNPs 100 nm par un laser pulsé 800 nm. L'utilisation de la lumière NIR pour l'excitation des AuNPs est avantageuse puisqu'elle peut être combinée à l'utilisation des protéines fluorescentes. Combinée à l'imagerie calcique, la stimulation sur de petites régions des neurones d'hippocampes en culture permet d'obtenir une réponse Ca^{2+} transitoire avec une grande précision spatiale et temporelle. En effet, la région stimulée ne dépend que de la présence de l'AuNP et n'est pas limité par la diffraction

comme la méthode de stimulation par lumière IR²¹. La taille de la région répondante dépend à la fois de l'emplacement de l'AuNP, mais également de l'intensité du laser utilisé. En variant l'intensité de la puissance laser, il est possible d'adapter les paramètres de stimulation selon le type de réponses désirées. NALOS peut produire des phénomènes très localisés, comme une augmentation locale de chaleur ou une onde de pression menant à des changements dans la capacitance de la membrane cellulaire⁴². Selon l'intensité laser, l'étendue de la réponse Ca²⁺ peut être rependue à l'ensemble des branches dendritiques du neurone, comme elle peut être restreinte à quelques μm^2 sur une dendrite uniquement. Cependant, une puissance laser trop élevée peut mener à la création de nanocavitation et causer des dommages irréversibles à la membrane. Cette nouvelle approche optique permet alors de varier les influx de Ca²⁺ transitoire pour l'étude de la signalisation Ca²⁺ dans divers compartiments cellulaires comme la synapse.

L'intensité du laser nécessaire pour obtenir une réponse Ca²⁺ transitoire (0.563-0.781 MW/cm²) est inférieure à celle nécessaire pour l'excitation des protéines fluorescentes en 2-photons³³. L'excitation à 488 et 543 nm des protéines fluorescentes (intensité inférieure à 5 μW dans l'ouverture arrière de l'objectif) ne génère pas une absorption suffisante par les AuNPs pour provoquer une réponse cellulaire détectable. De ce fait, aucune interférence entre la stimulation hors résonance des AuNPs et l'imagerie de la fluorescence n'a pu être observée.

NALOS repose entièrement sur des mesures optiques et n'est pas restreinte uniquement à l'imagerie Ca²⁺. Dans le passé, NALOS a permis de cibler l'effet de l'induction de réponse Ca²⁺ sur la signalisation de la CaMKII dans les dendrites neuronales. Aujourd'hui, elle se prête à l'étude de la communication synaptique.

NALOS peut être combiné à l'utilisation de deux canaux de détection en fluorescence indépendante. Une imagerie confocale multicolore associée à une stimulation optique infrarouge est possible sur la plupart des microscopes confocaux traditionnels équipés d'un trajet d'excitation à deux photons. Plus précisément, en

marquant une population de neurones en rouge et une sous-population d'axones en vert, ce nouveau protocole d'imagerie a permis à NALOS de produire une stimulation synaptique localisée à une seule synapse. Les réponses Ca^{2+} pouvaient être restreintes à l'épine postsynaptique, mais également s'étendre à la dendrite et au neurone en entier. La grande variabilité des réponses Ca^{2+} obtenues peut s'expliquer en partie par le nombre de connexions que fait l'axone avec la dendrite. Un axone faisant plusieurs connexions avec une dendrite pourrait produire des réponses synaptiques combinées, ce qui augmenterait le signal Ca^{2+} résultant à l'intérieur de la dendrite. Les variations des réponses Ca^{2+} obtenues pourraient également dépendre de la localisation de l'AuNP sur l'axone. Il est possible que l'AuNP puisse se retrouver à une distance plus éloignée de l'axone qu'il n'y paraît, réduisant ainsi la force de la dépolarisation membranaire lors de la photostimulation. La variation de l'intensité minimale nécessaire pour induire une stimulation synaptique pourrait également s'expliquer par ce principe. Une variation de la distance de quelques nanomètres nécessite une intensité laser légèrement plus grande afin de produire la même augmentation de chaleur localisée à la membrane (Fig.3.1b).

Le protocole pour produire et observer des réponses Ca^{2+} synaptiques était reproductible, mais toutefois compliqué, car la combinaison d'un axone croisant une dendrite de même que de retrouver une AuNP sur cet axone était un phénomène plutôt rare. La surexpression sur plusieurs jours de Vamp-SEP a permis de réaliser le nombre élevé d'axones cachés dans nos milieux de culture. Grâce à cette constatation, nous avons conclu qu'il y avait de fortes chances que les AuNPs se déposent sur des axones lors de la sédimentation. En transfectant uniquement GCaMP6s pour marquer les dendrites, l'expérience reposait alors principalement sur la détection des réponses Ca^{2+} et non plus sur la localisation des axones. Je pouvais donc stimuler au hasard une AuNP aux alentours des dendrites et tenter d'observer une réponse dans mon champ d'imagerie.

Au départ, la détection des influx Ca^{2+} transitoires à l'aide de NES-JRGECO était un procédé simple, car la localisation de la réponse devait coïncider avec le croisement

de l'axone exprimant Vamp-SEP. Cependant, malgré les conditions expérimentales simplifiées, ne plus voir l'orientation de l'axone ni ses connexions avec la dendrite a rendu la détection des réponses synaptiques plus complexe. Bien que l'AuNP stimulée se retrouve à proximité de la dendrite, il est possible que l'axone fasse connexion avec des régions éloignées du neurone et engendre une réponse sur une dendrite distale à mon champ d'imagerie. L'absence de réponse peut également être expliquée par le fait que l'axone stimulé n'est pas connecté avec la dendrite imagée ou que l'AuNP est simplement déposé ailleurs que sur un axone.

Cependant, sans la possibilité de prédire la localisation de la réponse à l'aide de l'axone, il est difficile de prédire hors de tout doute que la réponse Ca^{2+} postsynaptique observée vient d'un relâchement synaptique évoqué par NALOS et non spontané. Le relâchement spontané de neurotransmetteurs est différent de ceux évoqués par les potentiels d'action, dans la mesure où les neurotransmetteurs sont relâchés par quanta, ce qui représente une quantité relâchée par une seule vésicule présynaptique⁴³. Toutefois, bien qu'il existe une différenciation dans les processus moléculaires engendrés lors d'un relâchement spontané ou évoqué de neurotransmetteurs, la relâche spontanée d'un quanta peut générer un potentiel postsynaptique exciteur et entraîner une entrée Ca^{2+} pouvant s'apparenter à une réponse évoquée⁴³.

Pour confirmer que la réponse Ca^{2+} postsynaptique observée était bien une réponse synaptique évoquée par NALOS, il était important de pouvoir bloquer la réponse, mais également la reproduire à la même synapse. Cependant, il est important de prendre en considération que l'axone peut effectuer plusieurs connexions avec une même dendrite. La stimulation répétée par NALOS axonal peut alors produire des réponses Ca^{2+} postsynaptiques à différents endroits. Comme la communication synaptique est spécifique à la synapse, les différents emplacements ne peuvent être considérés comme un ensemble de synapses identiques, et ce même s'ils répondent au même type de stimuli. La stimulation répétée sur une même AuNP avait parfois comme conséquence de déplacer celle-ci de quelques μm . Une fois

que la AuNP s'est déplacée, il n'y a plus de garantie qu'elle se retrouve sur le même axone et l'expérience devait s'arrêter. Avant de caractériser la réponse postsynaptique évoquée par NALOS, il était important de rendre cette technique plus robuste et reproductible à volonté.

La caractéristique la plus utile de NALOS est sa capacité à cibler n'importe quels domaines cellulaires pour la photostimulation. Profitant de la fonctionnalisation, NALOS combiné à la fluorescence permet de sélectionner le type de compartiment cellulaire à étudier. Un avantage de la fonctionnalisation est la capacité à limiter l'agrégation des AuNPs. Auparavant, deux façons permettaient d'éviter les agrégats d'AuNP. En limitant le temps d'incubation, il était possible de réduire le ratio d'agglomération présente dans la culture de neurones. Si le temps d'incubation est une variable difficilement contrôlable, il est possible de détecter les agglomérations d'AuNPs à l'aide de la fonction d'étalement de point (Point spread function, PSF). En comparant l'intensité des PSF des AuNPs en réflexion avec une longueur d'onde à 543 et 633 nm, l'AuNP seule devrait présenter une réflexion plus forte à 543 nm et les agrégats une réflexion plus forte à 633 nm. Ce principe est dû au fait que les AuNPs diffusent la lumière vers des longueurs d'onde plus longues lorsqu'ils sont agglomérés. Bien que les gros agrégats d'AuNPs aient été exclus des expériences avec NALOS, il est possible que l'association de petits ensembles d'AuNPs impossible à distinguer en raison de la limite de la diffraction de la PSF ait pu être stimulée. Ceci aurait pu induire un biais dans les réponses Ca^{2+} transitoires lors des expériences de détermination de puissance laser. En stabilisant l'AuNP à la membrane axonale, la fonctionnalisation a su accroître la spécificité et la robustesse de la méthode ainsi que la reproductibilité des expériences. NALOS pouvait désormais se prêter à la stimulation synaptique répétée dans le but d'être caractérisée.

Afin d'étudier les réponses postsynaptiques évoquées par NALOS axonal, nous avons eu recours à l'électrophysiologie. L'étude de NALOS combinée à l'électrophysiologie va au-delà de la validation de la technique. Il s'agit d'une

caractérisation, de comprendre au niveau synaptique ce qui se passe réellement, car sans les mesures électrophysiologiques, il n'existe pas réellement de traduction directe entre réponses calciques et événement synaptique. La combinaison de NALOS avec l'électrophysiologie a permis de déterminer quels types d'événements synaptiques peuvent être obtenus et quelle est l'amplitude de ces réponses.

Lors de la planification de l'expérience d'électrophysiologie, il y avait un défi technique basé sur la synchronisation de la mesure optique et de la mesure électrophysiologique. Le microscope confocal utilisé durant mon projet ne permet pas de scanner l'AuNP uniquement. Pour former une image, le microscope exécute un balayage laser ligne par ligne, allant de gauche à droite avant de revenir au point de départ. Lors de l'excitation de l'AuNP, le laser 800 nm ouvre lorsque le balayage de l'image se retrouve dans la région déterminée pour la stimulation de l'AuNP, puis se referme et le balayage continue sa ligne avant de retourner au point de départ. Le microscope ne peut refaire le chemin inverse de droite à gauche.

Cette limitation inhérente au microscope a comme conséquence d'ajouter un temps additionnel entre les séries d'excitation de l'AuNP. De plus, 5 balayages d'excitation 800 nm sont produits sur l'AuNP, ce qui donne un temps d'excitation mesuré de 92.3 ms. De ce fait, une réponse synaptique mesurée par l'oscilloscope 92.3 ms après le début de la stimulation par NALOS doit alors être considérée comme une réponse synaptique potentiellement évoquée par NALOS. Comme l'électrophysiologie possède une résolution temporelle de l'ordre de la μ s voir de la ns, ce laps de temps peut sembler très long et peut comporter plusieurs réponses synaptiques en lien avec l'activité du neurone. En appliquant une solution de QX à l'intérieur de la pipette de patch, il était possible de bloquer les canaux Na^+ voltage dépendant et réduire l'activité du neurone pour faciliter la détection des événements extrinsèques produits par NALOS. Pour faciliter l'étude des événements Ca^{2+} synaptique, les électrophysiologistes ont généralement recours à une solution de TTX afin de bloquer les potentiels d'action, ne laissant que les entrées synaptiques visibles à l'oscilloscope. Toutefois, cette molécule a démontré précédemment qu'elle affectait

partiellement l'induction de la stimulation axonale par NALOS, également tributaire des potentiels d'action.

Une fois le protocole de l'expérience mis au point, je me suis posé la question à savoir s'il y avait un lien entre ce que je mesurais optiquement en Ca^{2+} et la transmission synaptique électrophysiologique. Excluant la difficulté de synchronisation, plusieurs défis sont survenus durant cette expérience. Tout d'abord, en utilisant une intensité laser de 1.25 mW au seuil de la propagation des réponses synaptiques, il fut très difficile d'observer des réponses calciques et des combinées aux courants enregistrés avec l'électrophysiologie. Également, comme la pipette de patch est connectée au niveau du soma et ne possède qu'un certain rayon de détection, les courants de faibles intensités qui surviennent sur les dendrites distales ne peuvent être mesurés par la pipette, car l'intensité du courant diminue avec la distance. Le choix des AuNPs était alors grandement réduit et restreint à une petite portion des dendrites. Lorsque la stimulation par NALOS axonal était répétée, il arrivait qu'on puisse observer une réponse mesurée électriquement, mais absente en Ca^{2+} . Nous avons observé que les plus petits évènements Ca^{2+} enregistrés pouvaient produire des EPSC d'aussi peu que 10 pA. Nous pouvons en conclure qu'à cette amplitude, nous sommes au seuil de la limite de résolution des évènements calciques par NALOS. Finalement, après l'insertion de la pipette de patch dans le soma, une proportion des neurones a démontré un signal globalement élevé et persistant en GCaMP6s. Le niveau élevé de la fluorescence chez ce sous-groupe de neurones rendait la détection des petits évènements synaptiques presque impossible. Ce niveau élevé de Ca^{2+} intracellulaire est généralement un signe précurseur de la mort cellulaire et n'était en rien représentatif de mes expériences précédentes lors de la stimulation par NALOS axonal. Cependant, la difficulté et le temps de préparation de l'expérience ne permettaient pas de recommencer les procédures à volonté.

Malgré tous ces défis, j'ai tout de même obtenu des résultats préliminaires encourageants. En résumé, j'ai été en mesure de stimuler individuellement des

synapses et d'observer des réponses Ca^{2+} et électrique. Ces réponses observées en Ca^{2+} ont semblé correspondre à une activité synaptique électrophysiologique. Contrairement aux mesures électrophysiologiques, la stimulation par NALOS permet de détecter la localisation de la réponse synaptique. Cette information spatiale, combinée à des techniques de fluorescence pour observer l'activité des neurones, a la capacité de devenir un outil optique très versatile.

Il existe toutefois une technique complémentaire à l'électrophysiologie permettant la stimulation neuronale et l'étude de la communication synaptique. La stimulation extracellulaire électrique d'un axone est une variante intéressante de l'utilisation de l'électrophysiologie, mais est-elle préférable à NALOS ? Afin de bien comprendre la stimulation électrique, une explication de la technique est nécessaire. Tout d'abord, cette méthode requiert une grande connaissance des propriétés électriques du tissu et du maniement des électrodes, car la forme et l'amplitude des courants électriques déterminent les effets de la stimulation de l'axone. Une attention particulière doit également être accordée à la conductance des tissus et à la distance de l'électrode. Généralement, les axones possédant un large diamètre sont plus facilement stimulables électriquement que ceux avec un petit diamètre.

Il est important de noter que le simple fait de trouver un axone dans un réseau de neurones est un travail laborieux. S'ajoute à cette difficulté la distinction entre les axones qui émergent d'un groupe de neurones distants ou ceux des corps cellulaires à proximité de l'électrode. Les axones doivent être d'abord marqués par fluorescence pour être visuellement ciblés. La stimulation électrique de l'axone requiert l'accès à une membrane intacte ce qui sous-entend qu'il n'est pas possible de déterminer à l'avance un axone afin de lui injecter un fluorophore intracellulaire. Sans la fluorescence, la stimulation électrique d'un axone ne permet pas de savoir quelle synapse a réagi ni à quel endroit la réponse synaptique a été produite. L'axone le plus proche de la pointe de l'électrode est activé et peut produire un potentiel d'action antidromique vers le soma, ainsi qu'un potentiel d'action orthodromique jusqu'à son extrémité, ce qui occasionne l'activation d'un grand

nombre de synapses. La stimulation électrique doit donc être combinée avec l'électrophysiologie sur un neurone adjacent à l'axone afin d'enregistrer son activité. Toutefois, rien ne garantit que cet axone fasse connexion avec le neurone enregistré. La possibilité d'utiliser NALOS sans l'utilisation de techniques invasives comme l'électrophysiologie pour mesurer l'activité d'un neurone est un avantage intéressant. L'objectif de la stimulation par NALOS n'est pas d'être combinée avec l'électrophysiologie, puisqu'il existe une incertitude sur le lien entre la réponse Ca^{2+} et électrique, mais bien d'exploiter la partie d'optique pour moduler localement l'activité et tenter d'en élucider certains mécanismes.

S'il s'agit bien d'une réponse synaptique et que l'on est en mesure de la modifier via la plasticité, nous devrions également être en mesure d'observer des changements dans la réponse synaptique. Dans ce cas, NALOS deviendrait vraiment un outil pour caractériser ce qui se passe dans la synapse. L'idée était donc de tester l'effet de l'induction d'une potentialisation synaptique sur le type de réponse Ca^{2+} transitoire local à la suite de NALOS. Les preuves suggèrent que cette potentialisation synaptique, médiée par un protocole de cLTP, favorise la plasticité synaptique locale. L'augmentation de l'intensité de la réponse synaptique dans une zone spécifiquement ciblée avec NALOS démontre l'utilité de l'approche et renforce le rôle de la stimulation synaptique et les réponses Ca^{2+} obtenues. Il aurait été intéressant d'analyser sur l'ensemble des synapses qui ont répondu, combien ont eu une augmentation dans l'amplitude de leur réponse Ca^{2+} , combien sont restées au même niveau et combien ont produit des amplitudes plus petites. Les événements Ca^{2+} sont un phénomène très variable, et leur plasticité l'est encore plus. Toutefois, l'ensemble des synapses ont répondu au même type de stimulation synaptique par NALOS, ce qui pourrait peut-être diminuer les chances d'obtenir un phénomène de plasticité différent dans cette population de synapses. En stimulant l'AuNP à différentes fréquences, NALOS pourrait servir à l'induction d'une forme de plasticité synaptique engendrée par l'optique et devenir une technique pour étudier la biochimie de la synapse en temps réel.

Conclusion

Le mot "mémoire" est un terme générique qui fait référence à un certain nombre de fonctions cérébrales. Sa caractéristique première est de recréer des expériences passées en synchronisant l'activité des neurones impliqués dans l'expérience d'origine. La plupart des expériences ne laissent aucune trace permanente. Cependant, certaines sont si marquantes qu'elles modifient la structure du cerveau en créant de nouvelles connexions entre les neurones. Comprendre le fonctionnement de ces connexions et le transfert d'informations qui en découlent représente le Saint Graal de la recherche sur la mémoire. Plusieurs techniques sont mises de l'avant pour élucider ce phénomène, mais les progrès et les découvertes amènent autant de questions que de réponse.

Afin de pouvoir investiguer le fonctionnement de la communication synaptique, les neuroscientifiques utilisent une variété de techniques pour étudier les mécanismes biochimiques ou les propriétés électriques de la synapse. À travers l'ensemble de ce mémoire, j'ai suivi les traces des chercheurs ayant utilisé dans le passé une nouvelle technique de stimulation neuronale faisant appel aux nanoparticules d'or (NALOS). Ce projet n'est qu'à ses débuts, mais représente une avancée vers la création d'une nouvelle technique optique pour l'étude de la communication synaptique. Mes expériences et résultats ont permis de valider nos objectifs de départ, comme quoi NALOS peut désormais induire une vraie stimulation axonale non dommageable et répétable à une seule synapse. À l'aide de la fluorescence, j'ai établi un protocole d'imagerie Ca^{2+} permettant de visualiser les réponses engendrées par NALOS axonal. Pour mieux caractériser le mécanisme de NALOS, j'ai combiné la stimulation optique et l'imagerie avec des enregistrements électrophysiologiques en patch-clamp sur des neurones transfectés par GCaMP6s. Mes résultats préliminaires obtenus avec l'électrophysiologie soulignent le fait que NALOS peut produire une réponse s'apparentant à une réponse synaptique électrophysiologique. Encore aujourd'hui, il me reste beaucoup à apprendre afin d'améliorer cet outil optique. Une meilleure compréhension des effets d'une variation

de la fréquence de stimulation sur les réponses neuronales pourrait éventuellement mener à de nouvelles applications. Combiné aux autres techniques modernes de stimulation neuronale, NALOS pourrait fournir des informations additionnelles sur les processus de remodelage synaptique au cours de la potentialisation à long terme. La possibilité de voir les changements moléculaires de la synapse, de comprendre ses changements structurels et fonctionnels; du mouvement de ses protéines jusqu'aux règles qui la régissent, pourrait permettre de lier certaines sortes de maladies au dérèglement du cerveau.

Bibliographie

1. Lavoie-Cardinal, F., Salessé, C., Bergeron, É., Meunier, M. & De Koninck, P. Gold nanoparticle-assisted all optical localized stimulation and monitoring of Ca²⁺ signaling in neurons. *Sci. Rep.* **6**, 20619 (2016).
2. DeFelipe, J. & Jones, E. G. Santiago Ramón y Cajal and methods in neurohistology. *Trends Neurosci.* **15**, 237–246 (1992).
3. Hebb, D. O. The organization of behavior; a neuropsychological theory. *A Wiley B. Clin. Psychol.* 62–78 (1949).
4. Kennedy, M. B., Beale, H. C., Carlisle, H. J. & Washburn, L. R. Integration of biochemical signalling in spines. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 423 (2005).
5. Chua, J. J. E., Kindler, S., Boyken, J. & Jahn, R. The architecture of an excitatory synapse. *J. Cell Sci.* (2010). doi:10.1242/jcs.052696
6. Kennedy, M. B. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science (80-)*. **290**, 750–754 (2000).
7. Rochefort, N. L. & Konnerth, A. Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep.* **13**, 699–708 (2012).
8. Spruston, N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 206 (2008).
9. Bourne, J. N. & Harris, K. M. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 47–67 (2008).
10. Ali, D. W. & Salter, M. W. NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 336–342 (2001).
11. Bliss, T. V. P. & Collingridge, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31 (1993).
12. Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. Silent synapses speak up. *Neuron* **19**, 473–476 (1997).
13. Turrigiano, G. G. AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity. *Neuron* **26**, 5–8 (2000).
14. Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. Long-term potentiation—a decade of progress? *Science (80-)*. **285**, 1870–1874 (1999).
15. Tang, A.-H. *et al.* A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors.

- Nature* **536**, 210 (2016).
16. Biederer, T., Kaeser, P. S. & Blanpied, T. A. Transcellular nanoalignment of synaptic function. *Neuron* **96**, 680–696 (2017).
 17. Chen, T.-W. *et al.* Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **499**, 295 (2013).
 18. Fenno, L., Yizhar, O. & Deisseroth, K. The development and application of optogenetics. *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, (2011).
 19. Matsuzaki, M. *et al.* Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* **4**, 1086 (2001).
 20. Wells, J. *et al.* Optical stimulation of neural tissue in vivo. *Opt. Lett.* **30**, 504–506 (2005).
 21. Shapiro, M. G., Homma, K., Villarreal, S., Richter, C.-P. & Bezanilla, F. Infrared light excites cells by changing their electrical capacitance. *Nat. Commun.* **3**, 736 (2012).
 22. Eom, K. *et al.* Enhanced infrared neural stimulation using localized surface plasmon resonance of gold nanorods. *Small* **10**, 3853–3857 (2014).
 23. Yoo, S., Hong, S., Choi, Y., Park, J.-H. & Nam, Y. Photothermal inhibition of neural activity with near-infrared-sensitive nanotransducers. *ACS Nano* **8**, 8040–8049 (2014).
 24. Boulais, E., Lachaine, R. & Meunier, M. Plasma mediated off-resonance plasmonic enhanced ultrafast laser-induced nanocavitation. *Nano Lett.* **12**, 4763–4769 (2012).
 25. Schomaker, M. *et al.* Characterization of nanoparticle mediated laser transfection by femtosecond laser pulses for applications in molecular medicine. *J. Nanobiotechnology* **13**, 10 (2015).
 26. Baumgart, J. *et al.* Off-resonance plasmonic enhanced femtosecond laser optoporation and transfection of cancer cells. *Biomaterials* **33**, 2345–2350 (2012).
 27. Carvalho-de-Souza, J. L. *et al.* Photosensitivity of neurons enabled by cell-targeted gold nanoparticles. *Neuron* **86**, 207–217 (2015).
 28. Nakatsuji, H. *et al.* Thermosensitive Ion Channel Activation in Single Neuronal Cells by Using Surface-Engineered Plasmonic Nanoparticles. *Angew. Chemie Int. Ed.* **54**, 11725–11729 (2015).
 29. Boutopoulos, C., Bergeron, E. & Meunier, M. Cell perforation mediated by plasmonic bubbles generated by a single near infrared femtosecond laser pulse. *J. Biophotonics* **9**, 26–31 (2016).
 30. Dalby, B. *et al.* Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons,

- siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **33**, 95–103 (2004).
31. Dana, H. *et al.* Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *Elife* **5**, e12727 (2016).
 32. Nguyen, C. *et al.* Simultaneous voltage and calcium imaging and optogenetic stimulation with high sensitivity and a wide field of view. *Biomed. Opt. Express* (2019). doi:10.1364/boe.10.000789
 33. Mütze, J. *et al.* Excitation spectra and brightness optimization of two-photon excited probes. *Biophys. J.* **102**, 934–944 (2012).
 34. Bloodgood, B. L., Sabatini, B. L. & Van Dongen, A. M. *NMDA receptor-mediated calcium transients in dendritic spines*. (Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2009).
 35. Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816 (1997).
 36. Bergeron, E. *et al.* Cell-specific optoporation with near-infrared ultrafast laser and functionalized gold nanoparticles. *Nanoscale* **7**, 17836–17847 (2015).
 37. Naeini, R. S., Witty, M.-F., Séguéla, P. & Bourque, C. W. An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. *Nat. Neurosci.* **9**, 93 (2006).
 38. Chunga, S.-H. & Kuyucak, S. Changes in the kinetics and conductance of N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor activated single channels with temperature. *Neurosci. Lett.* **187**, 181–184 (1995).
 39. Rosen, A. D. Nonlinear temperature modulation of sodium channel kinetics in GH3 cells. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* **1511**, 391–396 (2001).
 40. Henley, J. M. & Wilkinson, K. A. AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues Clin. Neurosci.* **15**, 11 (2013).
 41. Lemieux, M. *et al.* Translocation of CaMKII to dendritic microtubules supports the plasticity of local synapses. *J Cell Biol* **198**, 1055–1073 (2012).
 42. Boulais, E., Lachaine, R., Hatef, A. & Meunier, M. Plasmonics for pulsed-laser cell nanosurgery: Fundamentals and applications. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **17**, 26–49 (2013).
 43. Kavalali, E. T. The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 5 (2015).
 44. Fiji/ImageJ - chindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. *et al.* (2012), "[Fiji: an open-source](#)

platform for biological-image analysis", *Nature methods* **9(7)**: 676-682, PMID 22743772,
doi:[10.1038/nmeth.2019](https://doi.org/10.1038/nmeth.2019)