

Université de Montréal

**La régulation et la fonction des protéines Argonaute dans
les dendrites des neurones hippocampiques**

par Nicolas Paradis-Isler

Département de neurosciences
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ doctor*
en Sciences neurologiques

Avril, 2017

©Nicolas Paradis-Isler, 2017

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :
**La régulation et la fonction des protéines Argonaute
dans les dendrites des neurones hippocampiques**

présentée par:
Nicolas Paradis-Isler

A été évaluée par le jury composé des personnes suivantes :

Luc DesGroseillers, Ph.D., président-rapporteur

Jannic Boehm, Ph.D., directeur de recherche

Graziella Di Cristo, Ph.D., membre du jury

Sébastien Hébert, Ph.D., examinateur externe

Christine Vande Velde, Ph.D., représentante du doyen de la FESP

Résumé

Les processus contrôlant la traduction des ARN messagers en protéines jouent des rôles critiques dans la morphogenèse des neurones et à la plasticité de leurs synapses. La localisation de certains ARN messagers et leur traduction dans les dendrites sont orchestrées par une régulation particulièrement sophistiquée et adaptée à la morphologie compartimentée et à la nature excitable des neurones. Les microARN apparaissent comme des acteurs de premier plan dans les mécanismes de régulations impliqués. Les microARN sont de courts ARN non codants qui ciblent de façon spécifique les ARN messagers et régulent leur traduction en protéines. La voie des microARN est elle-même sous le contrôle d'une machinerie moléculaire au centre de laquelle se retrouvent les protéines Argonaute (AGO). Les mécanismes régulant les protéines AGO dans les neurones demeurent toutefois relativement peu connus.

La protéine Ago2, la protéine AGO la mieux caractérisée chez les organismes mammifères, subit différentes modifications qui modulent entre autres sa localisation, sa stabilité et son interaction avec l'ARN. Une telle régulation et ses impacts physiologiques n'ont cependant pas encore été décrits pour les neurones du système nerveux central. Ainsi, dans la première étude réalisée pour cette thèse, nous nous sommes penchés sur la régulation de l'état de phosphorylation et de la stabilité d'Ago2 par des récepteurs jouant un rôle de premier plan dans la transmission et la plasticité synaptiques, les récepteurs NMDA, dans des neurones provenant de l'hippocampe, une région cérébrale importante pour la mémoire. Nous avons trouvé que lors de l'activation de ces récepteurs, Ago2 est déphosphorylée et dégradée, notamment dans les dendrites. De plus, nous avons observé que cette régulation pouvait moduler la formation et la maturation des épines présentes sur les dendrites et qui constituent des sites synaptiques.

À part Ago2, l'autre forme prédominante de protéines AGO dans le cerveau est Ago1. Toutefois, très peu de données existent quant à la régulation et à la fonction de la protéine Ago1 dans les neurones. C'est pourquoi dans la deuxième étude réalisée pour cette thèse, nous nous sommes attardés à comparer la régulation et la fonction des protéines Ago1 et Ago2. Nous avons constaté que le niveau d'expression de la protéine Ago1 diminue de

façon marquée au cours du développement neuronal, alors que le taux protéique d'Ago2 apparaît plus stable. De plus, en manipulant le niveau d'expression de chacune de ces deux protéines à tour de rôle, nous avons mis en évidence une influence répressive d'Ago1 et une influence permissive d'Ago2 sur le développement et la maturation des dendrites.

En mettant en lumière le fonctionnement d'Ago1 et Ago2 dans les neurones hippocampiques, les résultats présentés dans cette thèse permettent de décrire de nouveaux mécanismes régulant les adaptations cellulaires nécessaires à l'homéostasie neuronale et la plasticité structurelle des dendrites. Dans une perspective plus large, les travaux effectués dans le cadre de ce projet de recherche contribuent à élucider certains des processus moléculaires sous-tendant le développement des fonctions cognitives.

Mots-clés : ARN messenger; dégradation; dendrite; épine; microARN, neurone; phosphorylation; protéine Argonaute (AGO); récepteur NMDA; traduction.

Abstract

The processes controlling the translation of messenger RNAs into proteins play a critical role in the morphogenesis of neurons and in the plasticity of their synapses. The localization of certain messenger RNAs and their translation in dendrites are orchestrated by a particularly sophisticated regulation which is adapted to the compartmentalized morphology and excitable nature of neurons. MicroRNAs appear to be key players in the regulation of mRNA translation and protein expression at synapses. MicroRNAs are short, non-coding RNAs that specifically target messenger RNAs and regulate their translation into proteins. The microRNA pathway is controlled by a molecular machinery at the center of which are Argonaute proteins (AGO). However, the mechanisms regulating AGO proteins in neurons remain largely unknown.

Ago2, the best characterized AGO protein in mammalian organisms, undergoes various modifications regulating, among other things, its localization, its stability, and its interaction with RNA. Such regulation and its physiological impact have not yet been described in neurons of the central nervous system. Thus, in my first study, we analyzed the regulation of Ago2 phosphorylation and stability by NMDA receptors, which play a central role in synaptic transmission and plasticity in neurons from the hippocampus, an important brain region for memory formation. We found that upon activation of NMDA receptors, Ago2 is dephosphorylated and degraded. Moreover, we observed that this regulation modulates the growth and maturation of spines found on dendrites and that represent synaptic sites.

Apart from Ago2, the other predominant form of AGO protein in the brain is Ago1. However, the regulation and function of Ago1 in neurons remains obscure. Therefore, in my second study, we focused on comparing the regulation and function of Ago1 and Ago2 proteins on neuronal development. We found that expression of Ago1 protein decreases during neuronal development, whereas Ago2 protein levels appear to be more stable. Moreover, by manipulating the expression rate for each of these two proteins, we demonstrated a repressive influence of Ago1 and a permissive influence of Ago2 on the development of dendrites.

By shedding light on how Ago1 and Ago2 function in hippocampal neurons, the results presented in this thesis define novel mechanisms regulating cellular adaptations necessary for neuronal homeostasis and structural plasticity of dendrites. In a wider scope, the work accomplished in the context of this research project contributes to elucidate the molecular processes underlying the development of cognitive functions.

Keywords : Ago1, Ago2, Argonaute (AGO) protein; degradation; dendrite; messenger RNA (mRNA); microRNA (miRNA); neuron; NMDA receptor, phosphorylation; spine, translation.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	xvi
Liste des figures.....	xvii
Liste des abréviations et sigles	xix
Remerciements	xxv
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1) Les bases cellulaires des fonctions nerveuses	2
1.1.1) Les caractéristiques fondamentales d'un système nerveux	2
1.1.1.1) L'évolution et la diversité des systèmes nerveux	2
1.1.1.2) L'organisation biologique du système nerveux.....	3
1.1.1.3) Les composantes cellulaires du système nerveux.....	4
1.1.2) Le neurone.....	5
1.1.2.1) La morphologie compartimentée des neurones	5
1.1.2.2) La structure cellulaire générale des neurones.....	7
1.1.2.3) Le caractère excitable des neurones	8
1.1.2.4) Principes généraux de la transduction intracellulaire des signaux extracellulaires	9
1.1.2.4.1) Le rôle de second messenger du calcium	11
1.1.2.5) L'expression génique.....	11
1.1.3) La synapse	13
1.1.3.1) Classification générale des synapses	13
1.1.3.1.1) Types d'arrangements synaptiques.....	13
1.1.3.1.2) Les deux grands types de transmission synaptique	13

1.2.2.2) La plasticité synaptique à long terme des neurones glutamatergiques de l'hippocampe.....	39
1.2.2.2.1) La potentialisation à long terme	39
1.2.2.2.2) La dépression à long terme.....	40
1.2.2.2.3) Le rôle des récepteurs AMPA et NMDA dans l'induction de la plasticité synaptique.....	41
1.2.2.3) Les adaptations postsynaptiques sous-jacentes à la plasticité synaptique à long terme	42
1.2.2.3.1) La régulation des récepteurs AMPA à la surface postsynaptique	43
1.2.2.3.2) La régulation des épines dendritiques	44
1.3) La régulation de l'expression génique dans les neurones	46
1.3.1) La régulation transcriptionnelle.....	46
1.3.1.1) La régulation transcriptionnelle de la morphogenèse dendritique et de la plasticité synaptique.....	47
1.3.1.1.1) Le rôle des facteurs de transcription dans la morphogenèse dendritique et de la plasticité synaptique	48
1.3.2) Le rôle de la synthèse protéique dans la morphogenèse neuronale et la plasticité synaptique.....	51
1.3.2.1) La régulation générale de la traduction dans les neurones	52
1.3.2.1.1) La régulation du complexe eIF4F.....	52
1.3.2.1.2) La régulation du complexe 43S.....	54
1.3.2.2) La synthèse protéique localisée dans les dendrites.....	56
1.3.2.2.1) La localisation et le transport d'ARN messagers dans les dendrites	59
1.3.2.2.2) La traduction d'ARN messagers dans les dendrites	60
1.3.2.2.3) Les mécanismes régulant la localisation et la traduction des ARNm dans les dendrites	61
1.3.2.2.3.1) La régulation en <i>cis</i> de la localisation et de la traduction des ARN messagers	62
1.3.2.2.3.2) La régulation en <i>trans</i> de la localisation et de la traduction des ARN messagers.....	63
1.3.3.2.3) Les protéines liant l'ARN.....	64

1.3.3.3.2.3.1) CPEB	65
1.3.3.3.2.3.2) ELAV(L)	65
1.3.3.3.2.3.3) FMRP.....	66
1.3.3.3.2.3.4) PABP	66
1.3.3.3.2.3.5) NOVA.....	67
1.3.3.3.2.3.6) Stau	67
1.3.3.3.2.3.7) TDP-43	68
1.3.3.3.2.3.8) ZBP.....	68
1.3.3.3.2.4) Les ARN non codants.....	69
1.3.3.3.2.2.1) Les longs ARN non codants	69
1.3.3.3.2.2.2) Les petits ARN non codants	69
1.4) La voie des microARN	70
1.4.1) Les microARN.....	70
1.4.1.1) La biogenèse des microARN.....	70
1.4.1.2) La régulation post-transcriptionnelle par les microARN	73
1.4.1.3) Le complexe de « mise sous silence » induit par les microARN	74
1.4.1.3.1) Les différents états/formes du complexe RISC	75
1.4.1.3.2) Les modes d'action du complexe miRISC	76
1.4.1.3.2.1) La déstabilisation et la dégradation des ARNm ciblés par le miRISC	76
1.4.1.3.2.2) La répression de la traduction des ARNm ciblés par le miRISC	77
1.4.2) Les protéines Argonaute	79
1.4.2.1) Les différences fonctionnelles parmi les protéines Argonautes	80
1.4.2.2) La régulation des protéines Argonaute.....	82
1.4.2.2.1) Les modifications post-traductionnelles des protéines Argonaute	82
1.4.2.2.1.1) La phosphorylation d'Ago2.....	83
1.4.2.2.1.2) L'ubiquitination et la dégradation des protéines AGO.....	84
1.4.3) La voie des microARN dans le système nerveux	86
1.4.3.1) La fonction des microARN dans les neurones	86
1.4.3.1.1) Le rôle des microARN dans le développement neuronal	89

1.4.3.1.2) Le rôle des microARN dans la plasticité synaptique et structurale ..	89
1.4.3.1.2.1) La régulation de l'expression des microARN par l'activité neuronale.....	90
1.4.3.1.2.2) La régulation de l'activité des microARN par l'activité neuronale	90
1.4.3.2) La fonction des protéines Argonaute dans les neurones.....	92
1.4.3.2.1) La régulation des protéines Argonaute durant le développement	93
1.4.3.2.2) La régulation des protéines Argonaute par l'activité neuronale.....	93
CHAPITRE 2 : SUJET ET BUTS DE LA THÈSE	97
2.1) La problématique sous-jacente.....	98
2.2) Le sujet de la thèse.....	99
2.3) Les buts du projet de doctorat.....	100
2.3.1) Les justifications et les objectifs spécifiques de la première étude.....	100
2.3.2) Les justifications et les objectifs spécifiques de la deuxième étude	102
CHAPITRE 3 : PREMIÈRE SECTION DES RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	104
3.1) Informations générales sur la première étude	105
3.1.1) Sujet de la première étude	105
3.1.2) Contenu du chapitre.....	105
3.1.3) Contributions des auteurs.....	105
3.1.3.1) Rôles pour l'article (section 3.2)	105
3.1.3.2) Rôles pour les données supplémentaire (section 3.3).....	105
3.2) Article	106
3.2.1) Article general information	106
3.2.1.1) Title.....	106
3.2.1.2) Authors	106
3.2.1.3) Keywords.....	106
3.2.2) Abstract	107
3.2.3) Significance statement.....	107
3.2.4) Introduction	108

3.2.5) Materials and Methods	109
3.2.5.1) DNA Constructs.	109
3.2.5.2) Primary neuronal cultures.....	110
3.2.5.3) Drugs and treatments	110
3.2.5.4) Fixation and Immunocytochemistry/Immunofluorescence	111
3.2.5.5) Transfections	111
3.2.5.6) Image acquisition and analysis	111
3.2.5.7) Western Blot	113
3.2.5.8) Data representation and statistics	114
3.2.6) Results.....	115
3.2.6.1) NMDA-R activity regulates proteasomal degradation of dendritic Ago2.	115
3.2.6.2) NMDA-R activation triggers dephosphorylation of Ago2 at S387.	118
3.2.6.3) S387 phosphorylation deficient Ago2 is readily degraded upon NMDA-R activation.....	124
3.2.6.4) Blocked Ago2 S387 phosphorylation leads to increased spine density and PSD-95 enrichment.	131
3.2.7) Discussion	135
3.2.7.1) NMDA receptor-dependent degradation of Ago2	137
3.2.7.2) NMDA-receptor dependent dephosphorylation of Ago2	137
3.2.7.3) Modulation of dendritic spines by Ago2 dephosphorylation	138
3.2.8) References.....	139
3.2.9) Additional information.....	148
3.3) Supplementary data	149
3.3.1) Supplementary materials and methods	149
3.3.1.1) Cell cultures and transfections.....	149
3.3.1.2) DNA constructs	149
3.3.1.3) Drugs and treatments	149
3.3.1.4) Fixation and Immunofluorescence/Immunocytochemistry	150
3.3.1.5) Image acquisition and analysis	150
3.3.1.6) Western Blot	150

3.3.1.7) Data representation and statistics	151
3.3.2) Supplementary results.....	151
3.3.2.1) Activity-dependent localization of Ago2 in dendrites.....	151
3.3.2.1.1) NMDA receptor-dependent redistribution of Ago2 in dendrites....	151
3.3.2.1.2) NMDA receptor dependent remodeling of Ago2 granules	154
3.3.2.2) NMDA receptor-dependent downregulation of Ago2 in dendrites	158
3.3.2.2.1) The immediate effect of NMDA receptor activation on endogenous Ago2.....	158
3.3.2.2.2) MG132 prevents NMDA receptor downregulation of Ago2 in dendrites.....	163
3.3.2.2.3) Validity of results obtained from Ago2 labeling with the polyclonal antibody.....	165
3.3.2.3) Ago2 function is regulated in part by its serine387 phosphorylation....	169
3.3.2.3.1) Validation of the phosphomimetic effect of the S387D mutation of Ago2.....	169
3.3.2.3.2) Ago2 phosphorylation at S387 increases surface expression of GluR1 and increases spine density.	171
3.3.3) Supplementary references	173

CHAPITRE 4 : DEUXIÈME SECTION DES RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

4.1) Informations générales sur la deuxième étude.....	177
4.1.1) Sujet de la deuxième étude.....	177
4.1.2) Contenu du chapitre.....	177
4.1.3) Contributions des auteurs.....	177
4.2) Article (en anglais) traitant de la deuxième étude	178
4.2.1) Article general information	178
4.2.1.1) Title.....	178
4.2.1.2) Authors	178
4.2.1.3) Keywords.....	178
4.2.2) Abstract	179
4.2.3) Introduction	179

4.2.4) Materials and methods	181
4.2.4.1) DNA Constructs	181
4.2.4.2) Fixation and Immunofluorescence/Immunocytochemistry	181
4.2.4.3) Image acquisition and analysis	181
4.2.4.4) Primary neuronal cultures and tranfections	182
4.2.4.5) Western Blot	182
4.2.4.6) Data representation and statistics	183
4.2.5) Results	184
4.2.5.1) Differential regulation of Ago1 and Ago2 protein levels during neuronal development	184
4.2.4.2) Influence of Ago1 and Ago2 expression on dendrite morphogenesis in immature neurons	186
4.2.4.3) Influence of Ago1 and Ago2 expression on dendrite morphogenesis in mature neurons	190
4.1.4.4) Influence of Ago1 and Ago2 expression on dendritic spine maturation	193
4.1.4.5) Influence of Ago2 phosphorylation on dendrite morphogenesis in mature neurons	196
4.2.6) Discussion	202
4.2.6.1) The role of Ago1 versus Ago2 in dendrite morphogenesis	202
4.2.5.2) A potential role for post-translational regulation of Ago2 in dendritic maturation	205
4.2.7) References	207
CHAPITRE 5: DISCUSSION	214
5.1) Discussion autour de la première étude	215
5.1.1) Rappel des principaux objectifs, résultats et conclusions de la première étude	215
5.1.2) Les résultats de la première étude et les données de la littérature	216
5.1.2.1) L'expression et le turnover de la protéine Ago2 dans les neurones	216
5.1.2.1.1) L'expression de la protéine Ago2 en fonction de l'activité des récepteurs NMDA	216

5.1.2.1.2) Le rôle des protéasomes dans le turnover d'Ago2 dans les neurones	217
5.1.2.1.2.1) Le lien potentiel entre la stabilité d'Ago2 et la dégradation....	217
5.1.2.1.2.2) L'ubiquitination d'Ago2.....	218
5.1.2.2) La régulation de la phosphorylation d'Ago2 S387 par l'activité des récepteurs NMDA.....	219
5.1.2.2.1) Les protéines phosphatases susceptibles de déphosphoryler Ago2 S387 en réponse à l'activation des récepteurs NMDA	219
5.1.2.2.2) Les protéines kinase susceptibles de phosphoryler Ago2 S387 dans les neurones	220
5.1.2.3) Les conséquences fonctionnelles de la régulation de la phosphorylation d'Ago2 S387 par l'activité des récepteurs NMDA.....	221
5.1.2.3.1) La régulation traductionnelle par Ago2 et les miARN.....	221
5.1.2.3.2) La régulation de l'activité endonucléotique d'Ago2	223
5.2) Discussion touchant la deuxième étude	225
5.2.1) Rappel des principaux objectifs, résultats et conclusions de la deuxième étude	225
5.2.2) Les résultats de la deuxième étude comparés aux données de littérature et les questions à approfondir	226
5.2.2.1) L'expression d'Ago1 et d'Ago2 dans les neurones.....	226
5.2.2.1.1) Les changements dans l'expression d'Ago1 et d'Ago2 durant le développement neuronal	226
5.2.2.1.2) L'influence respective des protéines Ago1 et Ago2 sur le développement neuronal	227
5.2.2.2) Les différences fonctionnelles entre Ago1 et Ago2 dans les neurones .	230
5.2.2.2.1) Le rôle de la phosphorylation d'Ago2 S387 dans la morphogenèse dendritique	230
5.2.2.2.2) L'association préférentielle d'Ago1 ou d'Ago2 avec certains miARN et ARNm	231
5.3) Liens entre les résultats de la première et de la deuxième étude	233
5.3.1) La régulation des protéines AGO dans les neurones	233

5.3.1.1) L'expression des protéines AGO dans les neurones	233
5.3.1.2) Régulation post-traductionnelle et turnover des protéines AGO dans les neurones	234
5.3.2) La fonction des protéines AGO dans les neurones	237
Conclusion	238
Bibliographie	240

Liste des tableaux

Tableau I. Les miARN impliqués dans les différents stades développement et les processus neuronaux chez les mammifères. 88

Liste des figures

Figure 1.	NMDA receptor activation leads to a rapid, proteasome dependent decrease of Ago2 levels in hippocampal neurons.	116
Figure 2.	NMDA receptor activation leads to a rapid decrease of S387 phosphorylation in Ago2.....	119
Figure 3.	NMDA receptor activation leads to both dephosphorylation of Ago2 S387 and Ago2 degradation.....	122
Figure 4.	The Ago2-S387D phosphomimetic mutant blocks NMDA induced Ago2 degradation.	126
Figure 5.	NMDA induced Ago2 decrease occurs to a greater extent in dendritic spines than in dendrites.	129
Figure 6.	Ago2 S387 phosphorylation affects dendritic spine density and morphology.	132
Figure 7.	Proposed model for the role of NMDA-R dependent Ago2 S387 dephosphorylation and Ago2 degradation in modulating dendritic spine density and morphology.....	136
Figure 8.	NMDA treatment is associated changes Ago2 distribution in dendrites of hippocampal neurons.....	152
Figure 9.	NMDA application leads to apparent disassembly of aggregated mEos2-Ago2.	156
Figure 10.	NMDA receptor activation leads an immediate decrease of endogenous Ago2 levels in hippocampal neurons dendrites.	159
Figure 11.	NMDA receptor activation upregulates turnover of Ago2 protein in hippocampal neurons.....	160
Figure 12.	Synaptic NMDA receptor activation leads to downregulation of Ago2 in dendrites.....	162
Figure 13.	NMDA induced downregulation of Ago2 in dendrites of cultured hippocampal is prevented by treatment with MG132	164
Figure 14.	Validation of rabbit polyclonal anti-Ago2 antibody.....	167
Figure 15.	Increased localization of Ago2S387D to P-body like structures validates the phosphomimetic effect of the S387D mutation.....	170

Figure 16.	Ago2 S387 phosphorylation modulates GluA1 expression.....	172
Figure 17.	Ago1 and Ago2 protein levels are differentially regulated during the development of cultured hippocampal neurons	185
Figure 18.	Influence of Ago1 and Ago2 expression in immature neurons on dendrite morphology.....	188
Figure 19.	Influence of Ago1 and Ago2 expression in mature neurons on dendrite morphology	191
Figure 20.	Influence of Ago1 and Ago2 expression on dendritic spine density and morphology	194
Figure 21.	Impact of blocked Ago2 S387 phosphorylation on dendrite morphology	197
Figure 22.	Impact of diminished Ago2 miRNA-binding on dendrite morphology .	200

Liste des abréviations et sigles

3'UTR	« 3' <i>untranslated region</i> »
5'UTR	« 5' <i>untranslated region</i> »
Ab	« <i>antibody</i> »
ADN	acide désoxyribonucléique (<i>DNA</i> : « <i>deoxyribonucleic acid</i> »)
ADNc	ADN complémentaire (<i>cDNA</i> : « <i>complementary DNA</i> »)
ADP	adénosine diphosphate
AGO	Argonaute
Ago1	protéine Argonaute 1
Ago2	protéine Argonaute 2
Akt	« <i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i> »
AMPA	acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (« <i>alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionic acid</i> »)
AMPc	adénosine monophosphate cyclique (<i>cAMP</i> : « <i>cyclic adenosine monophosphate</i> »)
ANOVA	« <i>analysis of variance</i> »
ARN	acide ribonucléique (<i>RNA</i> : « <i>ribonucleic acid</i> »)
ARNm	ARN messenger (<i>mRNA</i> : « <i>messenger RNA</i> »)
ARNnc	ARN non codant (<i>ncRNA</i> : « <i>non coding RNA</i> »)
ARNt	ARN de transfert (<i>tRNA</i> : « <i>transfer RNA</i> »)
ATP	adénosine triphosphate (« <i>adenosine triphosphate</i> »)
β -actine	<i>bêta</i> -actine (β - <i>actin</i> : « <i>beta-actin</i> »)
BDNF	« <i>brain-derived neurotrophic factor</i> »

Ca ²⁺	ion calcium
CamKII	« <i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II</i> »
CamKII α	sous-unité <i>alpha</i> de CamKII
CamKII β	sous-unité <i>bêta</i> de CamKII
CaRE	« <i>calcium responsive element</i> »
CHX	cycloheximide
CRE	« <i>cyclic AMP responsive element</i> »
CREB	« <i>CRE-binding protein</i> »
DGCR8	gène 8 de la région critique du syndrome de DiGeorge (« <i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i> »)
DLT	dépression à long terme (<i>LTP</i> : « <i>long-term depression</i> »)
eGFP	« <i>enhanced green fluorescent protein</i> »
eIF	« <i>eukaryotic initiation factor</i> »
endo-siARN	petits ARN interférents endogènes (« <i>endogenous small interfering RNA</i> »)
RE	reticulum endoplasmique
ERK	« <i>extracellular signal-regulated kinase</i> »
EVM	endosomes multivésiculaires (<i>MVEs</i> : « <i>multivesicular endosomes</i> »)
EXP5	protéine Exportine 5
F-actine	actine filamenteuse (<i>F-actin</i> : « <i>filamentous actin</i> »)
FMRP	« <i>Fragile X mental retardation protein</i> »
GABA	acide γ -aminobutyrique (« <i>gamma-aminobutyric acid</i> »)
GFP	« <i>green fluorescent protein</i> »
GluA1	sous-unité 1 de récepteur AMPA
Gly	glycine
GW182	« <i>glycine-tryptophan repeat-containing protein of 182 kDa</i> »
HEK293	« <i>human embryonic kidney cells 293</i> »

ICC	immunocytochimie
IF	immunofluorescence
K ⁺	ion potassium
K402	lysine 402
kDa	kiloDalton
Lacta.	lactacystine (« <i>lactacystin</i> »)
MAP1b	« <i>microtubule associated protein 1b</i> »
MAP2	« <i>microtubule associated protein 2</i> »
MAPK	« <i>mitogen-activated protein kinase</i> »
MG132	N – (benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal (« <i>N-Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal</i> »)
Mg ²⁺	ion magnésium
mGluR	récepteur métabotrope du glutamate (« <i>metabotropic glutamate receptor</i> »)
miARN	microARN (<i>miRNA</i> : « <i>microRNA</i> »)
<i>miRISC</i>	« <i>microRNA-induced silencing complex</i> »
MOV10	protéine du gène « <i>Moloney leukemia virus 10</i> »
Na ⁺	ion sodium
NMDA	<i>N</i> -méthyl- <i>D</i> -aspartate ou acide <i>N</i> -méthyl- <i>D</i> -aspartique (« <i>N-methyl-D-aspartate</i> »/« <i>N-methyl-D-aspartic acid</i> »)
P700	proline 700
PABP	« <i>poly(A)-binding protein</i> »
PAR	poly-ADP-rybosyle
PAZ	(domaine de type) Piwi-Argonaute-Zwille
P-body	« <i>processing body</i> »
PDZ	(domaine de type) PSD95-Dlg1-Zo1
piARN	ARN interagissant avec Piwi (<i>piRNA</i> : « <i>Piwi-interacting RNA</i> »)
PKA	protéine kinase A

PKC	protéine kinase C
PLT	potentialisation à long terme (<i>LTP</i> : « <i>long-term potentiation</i> »)
Pol II	ARN polymérase II
Pol III	ARN polymérase III
poly(A)	polyadénosine
pré-ARNm	ARN prémessager (<i>pre-mRNA</i> : « <i>pre-messenger RNA</i> »)
pré-miARN	précurseur de microARN (<i>pre-miRNA</i> : « <i>miRNA precursor</i> »)
pri-miARN	microARN primaire (<i>pri-miRNA</i> : « <i>primary miRNA</i> »)
PSD	« <i>postsynaptic density</i> »
PSD-95	« <i>PSD protein of 95 kDa</i> »
PTX	picrotoxine (« <i>picrotoxin</i> »)
RBP	« <i>RNA-binding protein</i> »
RE	réticulum endoplasmique (<i>ER</i> : « <i>endoplasmic reticulum</i> »)
RNP	ribonucléoprotéine (« <i>ribonucleoprotein</i> »)
S	Svelta
S387	sérine 387
S499	sérine 499
SEM	« <i>standard error of the mean</i> »
<i>shRNA</i>	« <i>short hairpin RNA</i> »
siARN	petit ARN interférent (<i>siRNA</i> : « <i>small interfering RNA</i> »)
Stau	Staufen
SUMO	« <i>small ubiquitin-like modifier</i> »
TDP-43	« <i>TAR DNA-binding protein of 43 kDa</i> »

tdTomato	« <i>tandem-dimer Tomato</i> »
TNRC6	« <i>trinucleotide repeat-containing 6 protein</i> »
Trk	« <i>tropomyosin receptor kinase or tyrosine receptor kinase</i> »
UPS	« <i>ubiquitin-proteasome system</i> »
VGCC	« <i>Voltage-gated calcium channel</i> »
XPO5	gène de l'exportine 5
Y393	tyrosine 393
Y529	tyrosine 529
ZBP	« <i>Zip-binding protein</i> »

*Je dédie cette thèse à la mémoire de mon grand-père, Dr Henri Isler,
qui fût professeur titulaire au Département de biologie de l'Université de Montréal
et chercheur spécialisé en endocrinologie ultra structurale.*

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier les membres du jury ayant évalué ma thèse, Dr Desgroseillers, Dr Boehm, Dre Di Cristo et Dre Vande Velde, de l'Université de Montréal, ainsi que Dr Hébert, de l'Université Laval à Québec.

Je veux également remercier Dr Boehm pour m'avoir proposé de travailler sur le rôle des protéines Argonaute dans les dendrites. Je suis reconnaissant envers Dre Di Cristo et Dr Roberto Araya pour leurs suggestions et leurs conseils dans le cadre de mon comité de parrainage. Je tiens aussi à souligner le soutien que j'ai reçu du Groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC) et de la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) de l'université

Je remercie Catherine Bourgeois, ancienne technicienne dans le laboratoire Boehm, qui m'a initié à la préparation des cultures de neurones, une technique cruciale à mon projet de thèse. Je remercie aussi tous les collègues du laboratoire Boehm que j'ai côtoyé au cours de mes études supérieures

Je tiens à remercier de plus Dr Raynald Bergeron, du département de kinésiologie de l'Université de Montréal, qui m'a initié à la recherche fondamentale lors de mes études au premier cycle et qui a toujours appuyé ma candidature à divers concours.

Je tiens à remercier tout particulièrement certains membres de famille : ma grand-mère, pour son intérêt pour mes études et mes travaux de recherche et ses encouragements, mon père, ma mère et ma compagne pour leur soutien pratique et moral.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1) Les bases cellulaires des fonctions nerveuses

1.1.1) Les caractéristiques fondamentales d'un système nerveux

1.1.1.1) L'évolution et la diversité des systèmes nerveux

Au cours de l'évolution, l'apparition des premières formes de systèmes nerveux serait intervenue durant la période édicarienne, il y a plus de 600 millions d'années, et précéderait ainsi « l'explosion du Cambrien », une période ayant vu une augmentation fulgurante de la diversité animale (Northcutt, 2012). Les organismes les plus simples qui possèdent des circuits neuraux appartiennent aux embranchements des cténophores (ex. : le cydippe) et des cnidaires (ex. : l'hydre et la méduse) formant le clade des radiaires (Holland, 2003; Northcutt, 2012). Les radiaires sont des animaux à symétrie radiale, tel que l'indique leur nom, et diploblastiques, c'est-à-dire se développant à partir de seulement deux feuilletts embryonnaires, l'endoderme et l'ectoderme (Holland, 2003). Chez ces organismes, les réseaux neuraux formés à partir de l'ectoderme sont diffus, c'est-à-dire qu'ils forment des filets s'étendant dans l'ensemble du corps, et la fonction nerveuse sert principalement au contrôle de l'activité contractile et expansive de la cavité gastro-vasculaire (s'apparentant à un sac digestif à ouverture unique) (Northcutt, 2012).

Une tendance à la centralisation des fonctions nerveuses au cours de l'évolution, un processus nommé céphalisation, s'est d'abord développée chez les animaux bilatériens, c'est-à-dire qui ont un seul plan de symétrie, qui se répartissent à travers un très grand nombre d'embranchements (Northcutt, 2012). Ces organismes, soit tous les invertébrés supérieurs et les vertébrés, sont de plus caractérisés par un développement triploblastique, c'est-à-dire qu'ils se développent à partir de trois feuilletts embryonnaires : l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme (Holland, 2003). Chez les bilatériens, tout comme chez les radiaires, le système nerveux est issu de l'ectoderme (Northcutt, 2012). Par contre, le système nerveux des bilatériens est constitué de circuits neuraux anatomiquement définis qui ont trois fonctions principales : sensorielle, motrice et associative (Kandel, Barres et Hudspeth, 2012). Le système sensoriel assure une représentation de l'état de l'organisme et de son environnement.

Le système moteur organise et produit les actions. Le système associatif relie le système sensoriel, dont il intègre les informations, et le système moteur, effecteur de ses réponses (Amaral et Strick, 2012). Les structures anatomiques distinctes jouant un rôle dominant dans la coordination de l'information et dans la direction des réponses forment ce qui est défini comme le système nerveux central (SNC).

La céphalisation encore plus marquée caractérise l'embranchement des cordés et a atteint son summum chez les vertébrés, un sous-embranchement incluant entre autres les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux et les mammifères (Northcutt, 2012). Les vertébrés ont un système nerveux central (SNC) constitué de l'encéphale et de la moelle épinière (Amaral et Strick, 2012). Chez l'humain, l'encéphale est responsable des fonctions dites « supérieures » telles que la perception, l'attention, les émotions et la cognition (Kandel et Hudspeth, 2012).

1.1.1.2) L'organisation biologique du système nerveux

Comme pour tout autre organe ou système physiologique au sein d'un organisme vivant, les réponses produites par le système nerveux découlent de l'interaction de plusieurs sous-composantes, elles-mêmes structurées en plusieurs niveaux d'organisation (Amaral et Strick, 2012). L'organisation biologique correspond à une hiérarchie de niveaux structuraux, eux-mêmes édifiés sur des niveaux d'organisation inférieurs (Mazzarello, 1999). De nouvelles propriétés émergent à chaque niveau d'organisation. Les molécules biochimiques s'agencent en complexes moléculaires. Ces complexes sont regroupés au sein d'organites, les structures fonctionnelles faisant partie des cellules. Chez les organismes multicellulaires complexes, les cellules semblables se regroupent en tissus (Schwann, 1839). Les arrangements particuliers de tissus forment des organes. Les organes sont reliés au sein de systèmes. Les systèmes physiologiques constituent ensemble un organisme (Mazzarello, 1999).

Les caractéristiques des cellules du système nerveux déterminent leurs interactions au sein des réseaux et des tissus nerveux qu'elles composent (Schwartz, Barres et Goldman, 2012b). À leur tour, les propriétés des réseaux et des tissus nerveux sous-tendent les fonctions des structures cérébrales et spinales qu'ils forment. Ces différentes fonctions nerveuses sont coordonnées au

sein du SNC (Kandel, Barres, et al., 2012). Finalement, le SNC coopère avec les autres grands systèmes physiologiques pour maintenir un équilibre au sein de l'organisme et en favoriser la survie.

1.1.1.3) Les composantes cellulaires du système nerveux

Tout organisme vivant, du plus simple au plus complexe, se développe à partir d'une cellule initiale unique (Mazzarello, 1999). Chaque cellule somatique, c'est-à-dire toute cellule d'un organisme multicellulaire qui n'est pas une cellule sexuelle, contient tout le bagage génétique propre à l'organisme auquel elle appartient, que cet organisme soit unicellulaire ou multicellulaire. De plus, les formes de vie les plus complexes sont issues de l'évolution d'organismes multicellulaires plus simples, dont l'apparition découle quant à elle de l'évolution d'organismes unicellulaires. La cellule est donc considérée comme unité fondamentale dans l'organisation du vivant, un concept identifié comme « théorie cellulaire » et d'abord proposé en 1838-39 par le botaniste Matthias Schleiden et le zoologiste Theodor Schwann (Mazzarello, 1999; Schleiden, 1838; Schwann, 1839).

Cependant, il a fallu attendre la fin du 19^e siècle pour qu'il soit avancé que le système nerveux et le cerveau en particulier sont constitués du même type d'unités fondamentales que tous les autres organes (Cajal, 1894; Mazzarello, 1999). Les travaux et les réflexions de plusieurs scientifiques de cette époque permirent de décrire les cellules nerveuses comme des entités morphologiques distinctes, mais on attribue généralement à Ramón y Cajal la première formulation exhaustive d'une théorie basée sur des observations directes et synthétisant un ensemble logique d'hypothèses fonctionnelles, correspondant à la « doctrine du neurone » (Lopez-Munoz, Boya et Alamo, 2006; Ramon, 1952). Dans les années qui suivirent la diffusion et la reconnaissance des travaux précoces de Cajal, plusieurs travaux, dont les études embryologiques de Harrison, vinrent appuyer la « doctrine du neurone » et permirent de l'étoffer davantage (Harrison, 1935; Harrison, Greenman, Mall et Jackson, 1907).

Toutefois, la « théorie réticulariste », une conception des circuits neuraux selon laquelle les neurones forment des éléments conducteurs continus et ne constituent donc pas des entités

fonctionnelles distinctes, s'est opposée pendant longtemps à la « doctrine du neurone » et a eu des tenants notables (Mazzarello, 1999). Un de ces derniers fut Camillo Golgi, auquel, paradoxalement, Cajal emprunta la technique de coloration et avec qui, ironiquement, il partagea le Prix Nobel en 1906 (Lopez-Munoz et al., 2006; Ramon, 1952).

Le développement dans la deuxième moitié du vingtième siècle de techniques de microscopie et d'électrophysiologie permettant une résolution cellulaire et subcellulaire donna lieu à des travaux générant une prépondérance de preuves en faveur du rôle fondamental des neurones en tant qu'entités fonctionnelles et mena au déclin de la « doctrine réticulariste » (Mazzarello, 1999). Depuis, de nombreuses versions de la « doctrine du neurone » ont été articulées et débattues, mais l'énoncé principal et central est demeuré le même et tient en ce que le neurone représente l'unité fondamentale dans tout circuit neural (Lopez-Munoz et al., 2006). Les perspectives développementale et évolutive de l'émergence des propriétés physiologiques et les connaissances plus récentes touchant les fonctions et les interactions des différents types de cellules composant les tissus nerveux permettent toutefois de nuancer certaines des interprétations les plus réductionnistes (Kandel, Barres, et al., 2012).

1.1.2) Le neurone

1.1.2.1) La morphologie compartimentée des neurones

La forme particulière des neurones varie grandement en fonction des types de neurones et des stades de développement (Lohmann et Kessels, 2014). Néanmoins, les neurones matures sont des cellules dont la morphologie peut être décrite de façon générale comme étant fortement polarisée et compartimentée (Alvarez-Castelao et Schuman, 2015; Craig et Banker, 1994). Le neurone peut ainsi être subdivisé en trois grands compartiments : le soma, l'axone et les dendrites (Kaech et Banker, 2006). Le soma a une forme semblable à celle d'une cellule non polarisée et il peut être considéré comme la région centrale du neurone (Rogerson et al., 2014). Cette dernière caractérisation ne correspondant toutefois pas toujours à la position géométrique exacte de cette région par rapport à l'axone et aux dendrites, mais elle illustre le

fait que ceux-ci émergent du soma pour se prolonger dans l'espace intercellulaire.

L'axone est une structure spécifique au neurone, hautement spécialisée dans la transmission d'information dans le système nerveux (Sanes et Jessell, 2012c). La région correspondant à l'origine de l'axone en bordure du soma, appelée le cône axonique, s'amincit pour former le segment initial de l'axone (Bartlett et Banker, 1984b). La composition protéique membranaire et intracellulaire de l'axone est distincte de celle du soma. Il en résulte des différences structurales fondamentales qui se traduisent en différences fonctionnelles intrinsèques (Arimura et Kaibuchi, 2007). Dépendant du type de neurone, l'axone peut être relativement court (moins d'un millimètre) ou long (plus d'un mètre) et se diviser en de multiples branches dénommées collatérales axoniques (Sanes et Jessell, 2012c). L'extrémité distale de l'axone (ou de chacune de ses collatérales) d'un neurone mature forme un bouton terminal, ou terminaison présynaptique, qui constitue un site de contact avec une autre cellule (typiquement un neurone, au sein du SNC) (Bartlett et Banker, 1984b; Harrington et Ginty, 2013).

L'origine du terme « dendrite », du grec ancien δένδρον, *déndron* (« arbre »), reflète la similitude entre ces prolongements ramifiés partant du soma et les branches d'un arbre (Bear, 2007). L'ensemble des dendrites d'un neurone est collectivement désigné comme arborisation dendritique, alors que chaque ramification est désignée comme branche dendritique (en dépit du caractère tautologique de cette terminologie d'un point de vue étymologique). La géométrie, la complexité et l'étendue des arborisations dendritiques présentent une grande variabilité entre différents types de neurones (Hanus et Schuman, 2013).

Dans le SNC des vertébrés, un grand nombre de neurones sont dits multipolaires et ont chacun plusieurs dendrites partant à même le soma. Bien qu'il existe certaines différences dans la composition et la fonction des dendrites et du soma, il n'y a pas de démarcation nette ou de ségrégation distinctive comme c'est le cas pour l'axone (Bartlett et Banker, 1984a, 1984b; Jan et Jan, 2010). Dans les dendrites, les différences par rapport au soma apparaissent plutôt graduellement et s'amplifient en s'éloignant du soma, avec le degré croissant de ramification et le diamètre décroissant des branches dendritiques (Hanus et Schuman, 2013; Sakarya et al., 2007). Néanmoins, les dendrites se démarquent par l'abondance des contacts formés avec des terminaisons axoniques (provenant généralement d'autres neurones) et sont riches en diverses

protéines membranaires spécialisées dans la transduction des signaux en provenance de ces terminaisons (Kosik, 2016; McAllister, 2000; Valnegri, Puram et Bonni, 2015).

1.1.2.2) La structure cellulaire générale des neurones

Les neurones possèdent les mêmes composantes fondamentales permettant à toute cellule de réguler son métabolisme interne : la membrane, le noyau et le cytoplasme contenant les organites cellulaires (autres que le noyau), le cytosquelette et le cytosol. Le soma contient beaucoup d'organites et en particulier, en son centre, le noyau, qui est délimité par une double membrane appelée enveloppe nucléaire, présentant une multitude de minuscules pores (d'environ 0,1 μm) (Schwartz, Barres et Goldman, 2012a).

La membrane cellulaire repose sur un cytosquelette qui détermine la forme qu'une cellule adopte et stabilise les différentes structures qu'elle renferme (Bartlett et Banker, 1984a, 1984b; Luo, 2002; Lyford et al., 1995). Bien que toutes les cellules animales aient un cytosquelette composé en grande partie des mêmes protéines, telles l'actine et la tubuline, celui des neurones est particulièrement enrichi des formes filamenteuses et tubulaires de ces protéines et comprend aussi d'autres protéines spécifiques aux neurones, telles certaines protéines *MAP* (pour « *microtubule associated protein* ») comme tau et *MAP2* (Schwartz et al., 2012a).

Par ailleurs, la morphologie polarisée et très compartimentée des neurones entraîne une distribution différentielle des organites et d'autres structures entre les régions du neurone (Bartlett et Banker, 1984a, 1984b). La quantité et l'éloignement des structures distantes du centre de la cellule sont beaucoup plus importants dans le cas des neurones que pour quasiment tous les autres types de cellules (Schwartz et al., 2012a). Par conséquent, la morphologie des neurones fait en sorte que dans la plupart la surface délimitée par la membrane cellulaire est beaucoup plus grande et le cytosquelette est beaucoup plus étendu que pour la plupart des cellules (Hanus et Schuman, 2013). Toutes ces caractéristiques impliquent une charge métabolique supplémentaire, soumise à une régulation d'une complexité accrue.

1.1.2.3) Le caractère excitable des neurones

La transmission de l'information dans le système nerveux s'opère par des signaux électriques générés par les neurones et se propageant le long de leur axone (Hodgkin et Katz, 1949). Bien que de prime abord cette fonction puisse sembler analogue à celle d'un fil dans un circuit électrique, les propriétés du milieu intracellulaire du neurone et son environnement extracellulaire ne permettent pas à l'axone d'agir comme un élément conducteur passif des signaux nerveux (Mayford, Siegelbaum et Kandel, 2012). En effet, les solutions électrolytiques à l'intérieur (cytosol) et à l'extérieur (milieu interstitiel) de l'axone favorisent davantage une dispersion qu'une conduction des charges électriques. L'excitabilité de la membrane de l'axone permet de surmonter ces contraintes biologiques par la génération d'impulsions nerveuses dénommées potentiels d'action (Hodgkin et Katz, 1949).

Le caractère excitable de la membrane neuronale découle d'adaptations spécifiques modulant deux caractéristiques par ailleurs communes aux membranes cellulaires de tous les types de cellules : (1) la perméabilité sélective de la membrane à certains de ces ions et (2) des différences de concentration d'ions spécifiques de part et d'autre de la membrane (Koester et Siegelbaum, 2012a). La membrane cellulaire, en raison de sa composition (bicouche lipidique), ne permet pas la diffusion libre (selon le gradient chimique et électrique) des ions entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule (Mazzarello, 1999). Les composantes protéiques dans la membrane régulent ces échanges entre les milieux intracellulaires et extracellulaires. La perméabilité sélective de la membrane aux ions découle principalement de la présence de canaux ioniques, des complexes protéiques formant des pores permettant spécifiquement à certains ions (potassium, sodium, calcium, chlore) de franchir la membrane cellulaire suivant leur gradient électrochimique respectif (Koester et Siegelbaum, 2012a). Les gradients de concentration ionique sont par contre établis par des complexes protéiques (les pompes sodium-potassium et les pompes calcium), transportant activement, c'est-à-dire au coût d'une dépense énergétique, certains ions contre leur gradient de concentration, vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule. En somme, les transporteurs et les canaux ioniques ont des effets opposés dont la résultante est le potentiel membranaire. Dans les neurones au repos, le flux sortant net d'ions potassium (K^+) engendre un potentiel de membrane négatif, correspondant

au potentiel de repos (Koester et Siegelbaum, 2012a).

Les neurones possèdent par ailleurs une grande variété de canaux ioniques dont l'ouverture est régulée, soit par des facteurs externes soit par des signaux internes au neurone (Citri et Malenka, 2008; Hausser, Spruston et Stuart, 2000; Lohmann et Kessels, 2014). En fonction du type de canaux activés, le flux ionique engendré contribuera soit à dépolariser, soit à hyperpolariser le neurone (Siegelbaum et Koester, 2012). Si la membrane neuronale est suffisamment dépolarisée, le potentiel seuil est atteint au niveau du cône axonique et des canaux sodiques régulés par le voltage (potentiel) membranaire sont ouverts. Cette ouverture permet l'entrée massive d'ions sodium (Na^+), suivant leur gradient électrochimique (Koester et Siegelbaum, 2012a). Le flux de charges positives ainsi engendré amplifie et étend la dépolarisation locale de la membrane de l'axone, de sorte que les canaux sodiques voltage-dépendants en aval sont à leur tour ouverts. C'est ainsi que le potentiel d'action est généré (Koester et Siegelbaum, 2012b). L'augmentation momentanée de la perméabilité membranaire au Na^+ est suivie d'un accroissement transitoire de la perméabilité au K^+ entraînant en une repolarisation de l'axone. Cette repolarisation en amont assure entre autres la propagation unidirectionnelle du potentiel d'action le long de l'axone.

1.1.2.4) Principes généraux de la transduction intracellulaire des signaux extracellulaires

La communication chimique coordonne le comportement des cellules au sein des organes et des organismes (Mazzarello, 1999). Les modalités de cette signalisation se sont diversifiées et complexifiées au cours de l'évolution. La signalisation paracrine repose sur la sécrétion de signaux chimiques ciblant des cellules de l'environnement immédiat. La signalisation endocrine utilise des hormones déversées dans la circulation systémique pouvant affecter de multiples organes distants. La transmission synaptique est une forme particulière de signalisation chimique propre aux neurones (Siegelbaum et Kandel, 2012a).

Les étapes de la signalisation se déroulant dans la cellule cible constituent la transduction intracellulaire. Ce processus comprend trois phases fondamentales : la réception du stimulus, la conversion-amplification du stimulus et la production de la réponse (Siegelbaum, Clapham

et Schwartz, 2012). Tous les récepteurs de transmetteurs chimiques ont deux caractéristiques moléculaires en commun : ce sont des structures protéiques transmembranaires et ils ont une fonction effectrice au sein de la cellule (Siegelbaum et Kandel, 2012a). La réception du stimulus correspond donc à la liaison d'une molécule de signalisation sur une portion d'un récepteur spécifique exposée à l'environnement extracellulaire. Cette liaison entraîne l'activation de ces récepteurs, qui correspond généralement à un changement de conformation. Ce changement déclenche des mécanismes convertissant le signal chimique d'origine extracellulaire en signaux intracellulaires. Ces signaux intracellulaires correspondent aux seconds messagers, des molécules ayant un rôle d'intermédiaires et dont la concentration engendre généralement un effet d'amplification du signal. Les seconds messagers régulent l'activité de protéines effectrices responsables de fonctions cellulaires spécifiques et produisant une réponse précise dans la cellule ciblée. La transduction d'un signal moléculaire peut réguler plusieurs voies de signalisation intracellulaire, en parallèle ou de façon successive (à travers une « cascade » de signalisation) de sorte que les conséquences sur l'activité cellulaire peuvent être multiples et distribuées temporellement (Siegelbaum, Clapham, et al., 2012).

Une grande proportion de ces protéines effectrices sont des enzymes régulant des modifications post-traductionnelles d'autres protéines (Bingol et Sheng, 2011; Citri et Malenka, 2008; Rosenberg et al., 2014; Thomas et Haganir, 2004). Une modification post-traductionnelle correspond à l'ajout d'un groupement chimique sur un site (acide aminé) spécifique d'une protéine une fois celle-ci synthétisée. Il existe plusieurs types de modifications post-traductionnelles. Une même protéine peut subir différents types de ces modifications ou le même type de modification à différents sites régulant son activité, ses interactions et son métabolisme. La phosphorylation, la liaison d'un groupe phosphate sur un acide aminé (sérine, thréonine ou tyrosine), est la plus répandue des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation d'une protéine est régulée par des protéines kinase, qui catalysent l'ajout d'un groupe phosphate, et des protéines phosphatases, qui catalysent le retrait d'un groupe phosphate, à des sites spécifiques (Lee, 2006; Woolfrey et Dell'Acqua, 2015).

1.1.2.4.1) Le rôle de second messenger du calcium

Au repos et en temps normal, les pompes à Ca^{2+} expulsant ces ions hors de la cellule et celles transférant ces ions dans le réticulum endoplasmique (RE) font tendre la concentration cytosolique de Ca^{2+} vers un minimum (Wang, Denk et Hausser, 2000). Outre son implication dans l'équilibre électrochimique entre les environnements extracellulaires et intracellulaires, le Ca^{2+} agit en tant que second messenger à l'intérieur de la cellule (Greer et Greenberg, 2008; Li, Stefan et Le Novere, 2012; Zieg, Greer et Greenberg, 2008).

La concentration de Ca^{2+} régule notamment l'activité de plusieurs protéines kinase et phosphatases et module l'ouverture de plusieurs canaux ioniques (Citri et Malenka, 2008; Malenka et Bear, 2004; Thomas et Huganir, 2004; Woolfrey et Dell'Acqua, 2015; Ziv et Smith, 1996). D'ailleurs, une élévation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} , même relativement brève et localisée, peut favoriser une libération de Ca^{2+} des stocks internes contenus dans le RE par des canaux Ca^{2+} -dépendants (Wang et al., 2000). C'est un des mécanismes importants faisant qu'une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} peut être maintenue ou amplifiée et propagée dans le soma et les dendrites (Hausser et al., 2000; Sala et Segal, 2014; Spruston et McBain, 2009).

1.1.2.5) L'expression génique

Comme c'est le cas pour toutes les cellules eucaryotes, le noyau renferme les chromosomes, contenant l'acide désoxyribonucléique (ADN) où sont inscrits les gènes correspondant au matériel héréditaire (Alberini et Kandel, 2014; Mazzarello, 1999). Ce matériel est, à la base, le même pour chaque neurone ainsi que pour toutes les cellules somatiques du même organisme ou du même individu (Bargmann et Gilliam, 2012). Ainsi, ce n'est pas la présence ou non de certains gènes qui distingue les neurones des autres cellules et qui en détermine les propriétés spécifiques, mais plutôt le profil particulier d'expression des gènes (Guillemot, 2007; Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009). L'expression génique correspond ultimement à la synthèse des protéines composant les structures cellulaires et opérant les fonctions cellulaires (Hanus et Schuman, 2013; Kosik, 2016; Rosenberg et al., 2014).

Bien que les chromosomes soient confinés au noyau, la synthèse des protéines se déroule dans le cytoplasme. C'est un troisième type de molécules qui fait le lien entre le noyau et le cytoplasme et sert d'intermédiaire entre l'ADN génomique et son produit protéique : l'acide ribonucléique (ARN) messenger. L'ARN messenger est lui-même produit en plusieurs étapes. L'ARN est généré par le processus de transcription de l'ADN, catalysé par une enzyme de type ARN polymérase (Ha et Kim, 2014). Plus précisément, l'ARN polymérase II (Pol II) assure la transcription produisant les ARN dits pré-messagers (Lee et al., 2004). Toutefois, les séquences codantes pour les protéines sont flanquées de nombreuses séquences non codantes au sein de l'ADN chromosomique (Alberini et Kandel, 2014). Certaines des séquences non codantes ne sont pas sujettes elles-mêmes à la transcription, mais la régulent. Tel est le cas de la région qualifiée de promoteur du gène, permettant la liaison de la Pol II, et de sites de liaison des facteurs de transcription, régulant entre autres l'activité de la Pol II (Lee et al., 2004).

Par ailleurs, certaines séquences non codantes sont transcrites avec les séquences codantes et se retrouvent dans l'ARN pré-messager (Ha et Kim, 2014). Parmi celles-ci, certaines sont intercalées entre les séquences codantes et sont retirées lors d'un processus appelé l'épissage de l'ARN. Les portions de l'ARN pré-messager exclues de l'ARN messenger sont appelées introns et celles qui peuvent être conservées sont appelées exons (Westholm et Lai, 2011). Le réarrangement des exons durant l'épissage forme une séquence ininterrompue codant pour une protéine, appelée segment codant, « cadre de lecture ouverte » ou *ORF* (pour « *open reading frame* »), au sein de l'ARN messenger (Jackson, Hellen et Pestova, 2010). Certains exons particuliers peuvent aussi être retirés dans des cas d'épissage qualifié d'« alternatif », produisant une version particulière d'un ARN messenger, nommée isoforme (Ha et Kim, 2014). Par ailleurs, de part et d'autre de l'*ORF*, des séquences non codantes (contenus dans certains exons) sont conservées dans l'ARN messenger et contribuent à en réguler la destinée par divers mécanismes, certains desquels seront abordés en détail ultérieurement dans le présent ouvrage (Buxbaum, Haimovich et Singer, 2015; Fritzsche et al., 2013; Jung, Gkogkas, Sonenberg et Holt, 2014; Kosik, 2016; Stark, Brennecke, Bushati, Russell et Cohen, 2005).

1.1.3) La synapse

C'est suivant des descriptions histologiques découlant des observations au microscope optique par Cajal à la fin du 19^e siècle qu'il fût avancé que le transfert de l'information d'un neurone à un autre neurone ou à une fibre musculaire s'effectue au niveau de sites de contacts spécifiques (Siegelbaum et Kandel, 2012a). C'est le physiologiste Charles Sherrington qui cristallisa ce concept en adoptant le terme de « synapse », qui aurait été proposé initialement par un certain Verrall, étudiant de Foster, un collaborateur de Sherrington (Lopez-Munoz et al., 2006; Sherrington, 1910; Sherrington, 1894, 1897). Les notions touchant la synapse neuronale renvoient à certaines des questions de la neurophysiologie cellulaire les plus fondamentales. Ces questions furent au cœur de débats marquant l'histoire des neurosciences, s'étalant sur plusieurs décennies (Bodian, 1942; Harrison, 1910; Harrison, 1935; Palay, 1956; Palay et Palade, 1955; Ramon, 1952; Siegelbaum et Kandel, 2012a).

1.1.3.1) Classification générale des synapses

1.1.3.1.1) Types d'arrangements synaptiques

Les synapses du SNC peuvent être caractérisées entre autres sur la base de leur localisation. Suivant cette catégorisation, les deux types de synapses les plus fréquentes sont les synapses axodendritiques et axosomatiques, dont les sites postsynaptiques sont sur les dendrites et le corps des neurones respectivement (Spruston et McBain, 2009). Dans certains cas, une terminaison axonale peut faire synapse avec une branche axonale : on parle alors d'une synapse axoaxonique. Plus rarement, les dendrites de certains neurones forment des synapses entre eux : on parle alors de synapses dendrodendritiques (Siegelbaum et Kandel, 2012a).

1.1.3.1.2) Les deux grands types de transmission synaptique

Les synapses neuronales peuvent aussi être distinguées en fonction de la nature de la communication qu'elles permettent. Plusieurs chercheurs de la fin du 19^e siècle et du début du

20^e siècle voyaient dans la rapidité de la transmission synaptique observée le signe que le phénomène constituait une forme de conduction électrique (Lopez-Munoz et al., 2006). Cette théorie prévoyait donc des contacts directs entre les membranes cellulaires des neurones connectés (ainsi qu'entre les membranes des neurones et les cellules de leurs cibles musculaires et endocriniennes) et une continuité entre leurs domaines intracellulaires.

L'existence de la synapse électrique fut démontrée pour la première fois chez l'écrevisse en 1959 par les physiologistes Edwin Furshpan et David Potter (Connors et Long, 2004; Furshpan et Potter, 1959). Nous savons aujourd'hui que les synapses électriques prennent la forme de jonctions étroites ou communicantes (« *gap junctions* ») où sont formés des pores (connexons), permettant le passage passif d'un courant ionique du cytoplasme d'une cellule à celui d'une autre, essentiellement sans délai (Connors et Long, 2004; Kumar et Gilula, 1996). Ainsi, ces cellules sont couplées électrotoniquement, c'est-à-dire que leur activité électrique est synchronisée et peut se propager même lorsqu'en dessous du seuil de déclenchement des potentiels d'action et, en général, de façon bidirectionnelle (Connors et Long, 2004). Les jonctions étroites permettent l'échange non seulement de signaux électriques, mais aussi chimiques, notamment plusieurs molécules ayant des rôles de seconds messagers (Connors et Long, 2004; Kumar et Gilula, 1996). Finalement, les jonctions étroites ne sont pas uniquement présentes à certaines synapses formées par des terminaisons axonales et dendritiques; elles peuvent aussi interconnecter des cellules non neuronales, telles que les cellules gliales (formant un syncytium), épithéliales, musculaires du cœur ou des muscles lisses (Kumar et Gilula, 1996). Bien que la théorie réticulaire soit dans l'ensemble aujourd'hui invalidée, les synapses électriques constituent une exception majeure pour la théorie neuronale et il est aujourd'hui admis qu'elles sont relativement communes dans le système nerveux des mammifères, en particulier durant les stades développementaux précoces (Connors et Long, 2004).

Les tenants de la doctrine du neurone à la fin du 19^e siècle et du début du 20^e siècle, concevaient plutôt la synapse comme un espace séparant les domaines cellulaires des neurones, mais assez étroit et structuré pour assurer une interaction propice à la transmission nerveuse ou, tel qu'articulé par Cajal, faisant que « les éléments nerveux ont des relations

réciproques *en contiguïté* et non *en continuité* » (Bodian, 1942; Lopez-Munoz et al., 2006; Ramon, 1952). Cette hypothèse suggérait l'existence de messagers chimiques assurant le transfert de l'information d'un neurone à l'autre au niveau de la synapse (Lopez-Munoz et al., 2006). Le concept de synapse chimique fut d'abord validé dans les années 1920 avec la démonstration par le pharmacologiste Otto Loewi de la nature chimique de la transmission entre le nerf vague et le cœur chez la grenouille (Loewi, 1921; Loewi et Navratil, 1926). Il montra que la stimulation des axones de l'innervation vagale libérait une substance chimique responsable du ralentissement du rythme cardiaque et que cette substance était suffisante pour mimer la stimulation électrique. Une trentaine d'années plus tard, l'équipe de Bernard Katz démontra aussi chez la grenouille que la transmission synaptique entre les axones de neurones moteurs et les fibres de muscles squelettiques dépendait d'un médiateur chimique (Fatt et Katz, 1951, 1952; Katz, 1950). L'avènement de la microélectrode de verre permit de s'attaquer à la question dans le SNC de mammifères et de démontrer l'utilisation de neurotransmetteur aux synapses du SNC (Brock, Coombs et Eccles, 1952).

C'est l'avènement de la microscopie électronique autour du milieu du 20^e siècle qui permit finalement d'apporter la preuve incontestable d'une fente synaptique et d'une spécialisation des membranes et structures pré et postsynaptiques pour les contacts neuronaux d'une majorité de régions du système nerveux des vertébrés (Palay, 1956; Palay et Palade, 1955). Depuis, plusieurs autres innovations ont permis de détailler les caractéristiques fonctionnelles, structurelles et moléculaires des synapses. Il est aujourd'hui bien établi qu'une majorité des synapses du cerveau sont « chimiques », mais leur fonctionnement est d'une complexité qui est loin d'avoir livré tous ses mystères.

1.1.3.2) La synapse chimique

Tout en étant le lieu d'une communication étroite, voire de contact, la synapse chimique constitue aussi une frontière structurelle et fonctionnelle entre cellules devant être franchie par le signal nerveux pour permettre sa transmission en aval dans le circuit. En effet, la membrane présynaptique et la membrane postsynaptique sont séparées par la fente synaptique, un espace

de 20 à 40 nanomètres (nm), soit plusieurs fois la largeur de l'espace entre les membranes à une jonction étroite (environ 4 nm) (Siegelbaum et Kandel, 2012b). Cet espace est rempli d'une matrice de protéines extracellulaires fibreuses favorisant l'adhérence entre les deux membranes et stabilisant les structures qui y sont associées (Bear, 2007).

L'élément présynaptique correspond en général à un bouton axonique. Cette terminaison contient des dizaines de vésicules synaptiques, des organites sphériques contenant un neurotransmetteur assurant la communication chimique avec l'élément postsynaptique. De nombreux boutons axoniques contiennent aussi d'autres vésicules plus larges et d'apparence plus dense au microscope électronique : ce sont les vésicules à cœur dense, aussi appelées granules de sécrétion. La membrane présynaptique et les microstructures associées à sa face intracellulaire constituent les zones actives, c'est-à-dire les sites de libération des neurotransmetteurs (Bear, 2007; Purves, 2005; Siegelbaum, Kandel et Südhof, 2012). Face à une zone active de la terminaison présynaptique, se situe généralement une zone de la membrane postsynaptique, correspondant à une région le plus souvent située sur un dendrite ou le soma, où se concentrent un grand nombre de protéines, en particulier les récepteurs de neurotransmetteurs (Sanes et Jessell, 2012b; Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012).

Le système nerveux met en jeu deux classes principales de substances pour la communication intercellulaire chimique : les neurotransmetteurs (ou transmetteurs à petites molécules) et des neuropeptides (ou peptides neuroactifs) (Schwartz et Javitch, 2012). Les neuropeptides sont contenus dans les larges vésicules à cœur dense alors que les neurotransmetteurs sont contenus typiquement dans les petites vésicules synaptiques. Les vésicules à cœur dense peuvent toutefois renfermer à la fois des neuropeptides et des neurotransmetteurs (Schwartz et Javitch, 2012). Les larges vésicules à cœur dense sont caractéristiques des neurones utilisant une catécholamine ou la sérotonine comme principal neurotransmetteur. L'acétylcholine (ACh), le glutamate (Glu), l'acide γ -aminobutyrique (*GABA*, pour *gamma-aminobutyric acid*) et la glycine sont quant à eux des neurotransmetteurs généralement contenus dans des petites vésicules synaptiques.

Quatre critères permettent de définir un neurotransmetteur (Schwartz et Javitch, 2012). Premièrement, la substance en question doit être synthétisée par et dans le neurone

présynaptique. Deuxièmement, elle doit être présente dans la terminaison présynaptique et être relâchée en quantité suffisante pour pouvoir exercer une action particulière sur la cellule postsynaptique. Troisièmement, lorsqu'appliquée de façon exogène en concentration d'ordre physiologique, elle mime l'action du transmetteur endogène. Quatrièmement, il existe généralement un mécanisme spécifique pour dissiper ou retirer la substance de la fente synaptique. Les substances répondant à ces critères incluent entre autres l'ACh, les amines biogènes (dont les catécholamines et la sérotonine) et les acides aminés (dont le glutamate, le *GABA* et la glycine) (Schwartz et Javitch, 2012).

Les neurotransmetteurs modifient le potentiel membranaire postsynaptique en régulant, soit de façon directe ou indirecte, l'ouverture de canaux ioniques dans la cellule postsynaptique, selon le type ou les types de récepteurs activés. Les récepteurs formant des canaux ioniques et dont la liaison de neurotransmetteur contrôle leur ouverture sont qualifiés d'ionotropes. Les récepteurs ionotropes influencent ainsi le potentiel membranaire postsynaptique de façon rapide et localisée puisqu'ils contrôlent directement l'entrée (ou la sortie) de certains ions. Les récepteurs qui régulent indirectement l'ouverture de canaux ioniques en altérant les réactions métaboliques intracellulaires par le recrutement de seconds messagers sont qualifiés de métabotropes (Siegelbaum et Kandel, 2012a). Dans de nombreux cas, l'activation de ces récepteurs stimule les protéines kinase qui phosphorylent des canaux ioniques pour en réguler l'ouverture. L'action des récepteurs métabotropes est donc typiquement beaucoup plus lente et distribuée puisqu'elle est médiée par des mécanismes intracellulaires produisant ou libérant des seconds messagers diffusibles dans le cytosol. En conséquence, les récepteurs métabotropes ont le potentiel de moduler l'ouverture d'une variété et d'un grand nombre de canaux (Siegelbaum, Clapham, et al., 2012).

1.1.3.3) L'intégration synaptique

Les neurones du SNC reçoivent chacun des connexions provenant de centaines de neurones différents (Siegelbaum, Clapham, et al., 2012). Un seul neurone peut recevoir différents types d'afférences, chaque type relâchant un neurotransmetteur particulier. Chaque

neurotransmetteur lie des types de récepteurs spécifiques qui peuvent être ionotropes ou métabotropes. Certains neurotransmetteurs, tel le glutamate, activent à la fois des récepteurs ionotropes et des récepteurs métabotropes. Les neurones du SNC intègrent ainsi des signaux variés provenant d'une multitude de synapses.

Une caractéristique importante d'une majorité de neurones dans le SNC est qu'ils reçoivent à la fois des afférences excitatrices et inhibitrices (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012). La libération d'un neurotransmetteur excitateur entraîne dans le neurone postsynaptique un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE), soit une dépolarisation. L'activité d'un seul neurone excitateur présynaptique produit dans le neurone postsynaptique une dépolarisation qui est largement insuffisante pour déclencher un potentiel d'action. Pour qu'un potentiel d'action soit engendré dans le neurone postsynaptique, ce dernier doit donc en général être stimulé par des dizaines de neurones excitateurs de façon simultanée ou extrêmement rapprochée, de sorte que les PPSE se cumulent et que la dépolarisation au niveau du cône axonique atteigne le potentiel-seuil (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012).

À l'inverse, la libération d'un neurotransmetteur inhibiteur par une afférence entraîne dans le neurone postsynaptique un potentiel postsynaptique inhibiteur (PPSI), c'est-à-dire une hyperpolarisation. L'activité des interneurons, ou neurones inhibiteurs, présynaptiques vient donc s'opposer à celle des neurones excitateurs présynaptiques au niveau du neurone postsynaptique. C'est ainsi la balance entre les PPSE et les PPSI qui détermine si le potentiel-seuil est atteint (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012).

1.1.3.4) La synapse glutamatergique

Le glutamate agit comme neurotransmetteur pour plus de la moitié des synapses cérébrales et presque tous les neurones excitateurs du SNC sont glutamatergiques (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012). Les synapses glutamatergiques sont formées entre neurones excitateurs, mais aussi entre neurones excitateurs présynaptiques et neurones inhibiteurs postsynaptiques. Ces synapses sont typiquement axodendritiques et le plus souvent situées sur les épines dendritiques, des protubérances spécialisées formant des sous-compartiments sur les dendrites

des neurones matures (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012).

1.1.3.4.1) Les récepteurs du glutamate

Il existe deux grandes classes de récepteurs du glutamate : des récepteurs métabotropes et récepteurs métabotropes ionotropes. Chacune de ces deux catégories regroupe plusieurs types de récepteurs différents. La classe des récepteurs métabotropes du glutamate (mGluR, pour « *metabotropic Glutamate Receptor* ») compte huit sous-types (mGluR1-8) se répartissant en trois types, les groupes I, II et III (Andersen, Morris, Amaral, Bliss et O'Keefe, 2009; Kandel, Schwartz et Jessell, 2012). Les mGluR du groupe II et III ont une localisation présynaptique et modulent ainsi la libération de neurotransmetteur. Les récepteurs mGluR1 et mGluR5 appartiennent au groupe I et sont situés sur les dendrites et leurs épines, typiquement dans les zones pérисynaptiques. L'activation de mGluR1 et 5 déclenche une cascade de signalisation intracellulaire impliquant la phospholipase C (PLC) menant à la production du second messenger inositol triphosphate (IP₃). IP₃ stimule une libération d'ions calcium (Ca²⁺) par le réticulum endoplasmique. Il en résulte une élévation de la concentration cytosolique de Ca²⁺ ayant un certain effet dépolarisant qui module l'ouverture de canaux ioniques voltage-dépendants.

Il existe par ailleurs trois types de récepteurs ionotropes du glutamate, portant chacun le nom des agonistes artificiels qui ont servi à les caractériser : *N*-méthyl-*D*-aspartate (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) et kaïnate. Tous les récepteurs ionotropes du glutamate sont des canaux laissant passer certains cations (ions de charge positive) de façon non sélective : les ions sodium (Na⁺), entrants, et potassium (K⁺), sortants. L'activation des récepteurs ionotropes du glutamate, en permettant l'entrée de Na⁺ et parfois de Ca²⁺, produit toujours un potentiel dépolarisant. Lors de la transmission glutamatergique, les récepteurs NMDA, AMPA et du kaïnate présents à la membrane postsynaptique produisent donc des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE), dont l'ampleur et l'étendue varient en fonction du nombre et des types spécifiques de récepteurs activés.

1.1.3.4.1.1) Le récepteur AMPA

L'activation des récepteurs AMPA provoque typiquement une entrée brève mais massive de

Na⁺ menant à une dépolarisation rapide et forte (Bear, 2007). Les récepteurs AMPA sont considérés comme les vecteurs postsynaptiques prioritaires de la transmission excitatrice aux synapses du SNC, car ils sont dans bien des cas suffisants, du moins dans un contexte expérimental ou d'un point de vue théorique, pour mener à une dépolarisation dans le neurone postsynaptique atteignant le seuil de déclenchement du potentiel d'action.

Certaines synapses ont des récepteurs AMPA, mais pas de récepteurs NMDA, alors que d'autres ont des récepteurs NMDA, mais pas de récepteurs AMPA (Bliss, Collingridge et Morris, 2014). Néanmoins, la grande majorité des synapses glutamatergiques du SNC mature possèdent ces deux types de récepteurs et ces derniers sont souvent impliqués ensemble dans la génération de PPSE.

1.1.3.4.1.2) Le récepteur NMDA

Le récepteur NMDA archétype possède trois caractéristiques majeures le démarquant des autres récepteurs ionotropes du glutamate (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012). La première singularité est que, en plus de devoir être lié par le glutamate, le récepteur NMDA a aussi besoin de la présence d'un co-agoniste, la glycine, pour que son canal ionique puisse s'ouvrir (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012). Dans des conditions normales, la concentration de glycine extracellulaire est suffisante pour assurer l'activation du récepteur lié par du glutamate. La deuxième particularité du récepteur NMDA est le blocage de son pore par l'ion magnésium (Mg²⁺) dépendant du potentiel membranaire. Les concentrations physiologiques du Mg²⁺ extracellulaire assurent sa présence dans les canaux ioniques formés par les récepteurs NMDA. Au potentiel de repos, le gradient électrochimique du Mg²⁺ le tire vers l'intérieur du neurone, mais la conformation du récepteur crée un rétrécissement du canal vers l'intérieur de la cellule et le Mg²⁺ y reste pris. Ce faisant, le Mg²⁺ forme un « bouchon » hermétique empêchant tout flux ionique. Ce « bouchon » n'est retiré que lorsqu'une dépolarisation suffisante de l'élément postsynaptique engendre une force électrostatique répulsive sur le Mg²⁺, de sorte qu'il soit expulsé hors du canal. Cette dépolarisation doit donc d'abord être engendrée par l'activation d'autres récepteurs ou canaux ioniques, le plus souvent des récepteurs AMPA. Le récepteur NMDA constitue donc une forme particulière de canal ionique voltage-dépendant (Kandel, Schwartz, et al., 2012). En somme, pour permettre la

conductance ionique optimale du récepteur NMDA, deux conditions doivent être réunies (en plus de la présence normale de glycine extracellulaire) : le glutamate doit se lier au récepteur alors que l'élément postsynaptique est dépolarisé. Ainsi, le récepteur agit comme un « détecteur de coïncidence » entre l'activité présynaptique, qui se traduit par la libération de glutamate, et l'activité postsynaptique, qui génère une dépolarisation.

La troisième des caractéristiques distinctives du récepteur NMDA par rapport aux autres récepteurs ionotropes du glutamate est sa perméabilité au Ca^{2+} . L'ouverture du canal du récepteur NMDA engendre donc, en plus d'un PPSE (découlant de l'entrée conjointe de Na^+ et de Ca^{2+}), une augmentation localisée de Ca^{2+} intracellulaire qui peut agir comme second messenger activant diverses cascades de signalisation, incluant notamment celle de l'enzyme CaMKII (pour « *calcium-calmodulin-dependent protein kinase II* ») (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012).

1.1.3.4.1.3) Variété structurale et fonctionnelle de chaque type récepteur ionotrope du glutamate

Les canaux ioniques correspondant aux récepteurs NMDA, AMPA et du kaïnate sont chacun formés par l'association de quatre sous-unités protéiques, se combinant de multiples façons pour donner plusieurs variantes (sous-types) pour chaque type de récepteurs aux propriétés similaires, mais tout de même distinctives (Lohmann et Kessels, 2014; Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012). En général, ces différences sont subtiles, mais il existe certains sous-types de récepteurs NMDA ou AMPA aux propriétés « atypiques » : certains sous-types de récepteurs AMPA sont perméables au Ca^{2+} et certains sous-types de récepteurs NMDA ne le sont pas (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012).

1.1.3.4.2) L'organisation postsynaptique à la synapse glutamatergique

1.1.3.4.2.1) La densité postsynaptique

Les synapses glutamatergiques matures sont dites asymétriques (ou type I de Gray), car la membrane postsynaptique présente habituellement un épaissement distinctif au microscope électronique (Andersen et al., 2009; Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012). Cet épaissement

correspond à la densité postsynaptique (PSD, pour « *postsynaptic density* »), un complexe où se concentre un grand nombre de protéines, en particulier les récepteurs AMPA et NMDA. À titre indicatif, il est estimé qu'une PSD typique (d'un diamètre d'environ de 0,35 µm) compte une vingtaine de récepteurs NMDA en son centre et de 10 à 50 récepteurs AMPA avec une localisation plus distribuée.

Plusieurs protéines spécifiques à la PSD favorisent ce regroupement des récepteurs NMDA et AMPA dans la zone postsynaptique et leur stabilisation à la surface cellulaire (Huganir et Nicoll, 2013; Sanes et Jessell, 2012b; Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012). Parmi ces protéines, une des plus importantes et probablement la mieux caractérisée est la PSD-95 (« *postsynaptic density protein of 95 kiloDalton molecular weight* »). La PSD-95 appartient à la famille des protéines à domaines PDZ (nommé ainsi pour les trois premières protéines de cette famille à être identifiées : PSD-95, DLG et ZO-1), impliqués dans des interactions entre protéines (par la liaison de séquences dans la région C-terminale de plusieurs protéines cellulaires). Les domaines PDZ de la PSD-95 se lient notamment aux récepteurs NMDA (ainsi qu'aux canaux potassiques voltage-dépendants de types Shaker), contribuant ainsi à les localiser et les concentrer aux sites postsynaptiques (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012). Bien que la protéine PSD-95 ne lie pas directement les récepteurs AMPA, elle interagit avec des sous-unités auxiliaires, les protéines de type TARP (pour « *transmembrane AMPA receptor regulatory protein* »), qui régulent le trafic et la localisation des récepteurs AMPA. La PSD-95 participe aussi à la stabilisation des structures synaptiques en interagissant avec la neuroligine (« *neuroligin* »), une protéine membranaire postsynaptique formant un contact extracellulaire dans la fente synaptique avec la neurexine, une protéine membranaire présynaptique.

Par ailleurs, d'autres protéines à domaines PDZ contribuent à organiser des récepteurs du glutamate autour des sites postsynaptiques (par exemple, la protéine GRIP pour les récepteurs AMPA, la protéine Homer pour les récepteurs mGluR du groupe I). En plus d'interagir avec des récepteurs et des protéines membranaires, les protéines à domaines PDZ interagissent avec de nombreuses protéines intracellulaires, notamment des protéines liant l'actine, pour former une sorte d'échafaud permettant de structurer la zone postsynaptique (Siegelbaum, Kandel et

Yuste, 2012).

1.1.3.4.2.2) Les épines dendritiques

Les épines dendritiques sont des protubérances présentes en grand nombre sur les dendrites. Elles ont pu être observées pour la première fois grâce à la coloration de Golgi et Ramón y Cajal fût le premier à en faire une description et une caractérisation détaillées (Cajal, 1894; Sala et Segal, 2014). Ces structures morphologiques sont présentes sur de nombreux types de neurones du SNC, excitateurs et inhibiteurs. Les épines sont par contre typiques de synapses formées par des terminaisons axoniques glutamatergiques (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012). La densité des épines dendritiques (correspondant au nombre d'épines par unité de longueur) peut varier de 0,2 à 3,5 épines par micromètre (μm) et s'accroît avec le degré de ramification des branches dendritiques et la distance par rapport au soma (Sala et Segal, 2014).

La grosseur et la forme des épines dendritiques varient beaucoup, mais à maturité elles peuvent généralement être décrites comme ayant deux sections : un cou (ou col) et une tête. Le cou de l'épine part de la branche dendritique et porte à son extrémité distale la tête de l'épine, dont la forme tend à être plutôt globulaire. Il existe plusieurs façons de catégoriser les épines. La caractérisation de la forme des épines la plus simple, et peut-être la plus commune, emploie trois catégories définies en fonction de l'aspect général de la tête et du col (Takeuchi, Duzkiewicz et Morris, 2014). Les épines en forme de « champignons » (« *mushroom spines* ») ont une tête de circonférence nettement plus large que celle du cou. Les épines fines (« *thin spines* ») sont, comme leur nom l'indique, les plus minces, souvent plus longues que les épines « champignons » et leur tête est difficilement distinguable. Les épines en forme de « moignons » (« *stubby spines* ») sont les plus courtes et n'ont pas de tête comme telle.

Une majorité des épines dendritiques présente une PSD (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012; Spruston et McBain, 2009). Les PSD sont les plus fréquentes et les plus développées sur les grosses épines de type « champignon » (Sala et Segal, 2014). Certaines de ces épines peuvent d'ailleurs comporter plus d'une PSD si elles accommodent plusieurs terminaisons présynaptiques. La taille, la forme et la position des PSD sur les épines peuvent donc varier tout comme les épines elles-mêmes.

Selon leur caractéristique morphologique, certaines épines dendritiques peuvent constituer des « microcompartiments », ou sous-compartiments relativement isolés du reste des dendrites (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012; Spruston et McBain, 2009). En effet, lorsque le volume de la tête de l'épine est assez important et que le cou est suffisamment étroit, ce dernier exerce un effet d'entonnoir limitant la diffusion de certains ions et seconds messagers impliqués dans la transduction et la signalisation (Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012). C'est ainsi que l'entrée rapide de Na^+ par les récepteurs AMPA présents sur une épine « champignon » peut dans certains cas dépolariser suffisamment l'épine pour permettre l'ouverture des récepteurs NMDA qui y sont aussi situés. De plus, même une entrée modeste de Ca^{2+} par des récepteurs NMDA ou des canaux calciques voltage-dépendants peut mener à une importante augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans la tête des épines, favorisant l'ouverture de davantage de récepteurs NMDA et de canaux ioniques voltage-dépendants présents sur l'épine (Sala et Segal, 2014; Siegelbaum, Kandel et Yuste, 2012). De plus, une augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans l'épine peut provoquant la libération de Ca^{2+} des stocks internes contenus dans les prolongements du RE lisse présents à la base de l'épine ou s'immiscant même dans l'épine lorsqu'elle est suffisamment grosse (Spruston et McBain, 2009).

Les épines dendritiques contiennent plusieurs autres organelles ou structures cellulaires contribuant à leur conférer une certaine autonomie fonctionnelle (Spruston et McBain, 2009). La présence d'ARN messagers et de polyribosomes (des ARN messagers portant chacun plusieurs ribosomes prêts à initier ou effectuant leur traduction) à la base des épines dendritiques ou même des fois dans la tête de certaines épines a d'ailleurs mené à l'hypothèse selon laquelle certaines protéines peuvent être synthétisées sur place et « sur demande » dans les épines dendritiques (Spruston et McBain, 2009; Steward, Falk et Torre, 1996).

1.2) La plasticité neuronale

Tout au long de la vie d'un individu, le cerveau subit des changements fonctionnels et structurels mettant en jeu différentes formes de plasticité neuronale, c'est-à-dire des processus d'adaptation cellulaire spécifiques aux neurones (Mayford et al., 2012). De tels changements sont d'abord responsables de la formation du SNC lors du développement précoce (Lohmann et Kessels, 2014). Une succession et une combinaison d'influences mécaniques et moléculaires entraînent alors des modifications qualitatives dans la fonction et la structure des cellules, qui permettent l'établissement d'une multitude de connexions spécifiques entre neurones constituant des réseaux bien définis et coordonnant des fonctions complexes (Jessell et Sanes, 2012).

Après la naissance, le cerveau subit d'autres changements, ceux-ci modulés par les expériences vécues par l'individu et lui permettant de s'adapter à son environnement. Ces changements sont les plus prononcés au début de la période postnatale, durant des phases développementales appelées périodes critiques (Lohmann et Kessels, 2014). Mais, même chez l'animal arrivé à maturité, les connexions synaptiques au sein de certains circuits neuraux continuent d'être façonnées par l'expérience individuelle (Mayford et al., 2012). Cette plasticité synaptique ayant cours chez l'animal adulte, bien que plus restreinte et sélective, met toutefois à contribution certains mécanismes impliqués dans des formes de plasticité développementale (Lohmann et Kessels, 2014). Les diverses formes de plasticité neuronale dépendent ainsi en général de l'interaction entre des signaux intercellulaires, leurs récepteurs, les voies de transduction intracellulaire et des mécanismes de régulation de l'expression génique (Bailey, Kandel et Harris, 2015; Lohmann et Kessels, 2014; Mayford et al., 2012; Takeuchi et al., 2014; Thalhammer et Cingolani, 2014; Valnegri et al., 2015).

1.2.1) La plasticité développementale

Le développement précoce du SNC implique la formation initiale des structures neurales, puis

le développement de projections axoniques vers des cibles spécifiques et finalement la formation d'une multitude de synapses à la base des circuits neuraux (Lohmann et Kessels, 2014). Durant le développement embryonnaire, les signaux inductifs locaux modulent la formation du SNC primitif (correspondant au tube neural chez les mammifères) et établissent ses subdivisions régionales (chez les mammifères : d'abord les vésicules primitives; puis les vésicules secondaires; ensuite la moelle épinière et les cerveaux postérieur, médian et antérieur).

1.2.1.1) L'origine développementale des neurones

La constitution des différentes populations neuronales comprises dans le SNC dépend principalement de trois processus : la prolifération cellulaire, la différenciation neuronale et la survie neuronale (Aimone et al., 2014; Jessell et Sanes, 2012). De plus, d'autres processus, tels que la migration et la mort cellulaires, contribuent à une organisation cellulaire fonctionnelle au sein des structures neurales.

1.2.1.1.1) La prolifération des précurseurs neuraux et la neurogenèse

Lors du développement embryonnaire précoce, la majorité des précurseurs neuraux, des cellules pluripotentes de la zone ventriculaire (chez les mammifères), connaissent une intense activité mitotique, c'est-à-dire de division cellulaire, menant à une expansion importante de cette population de cellules (Guillemot, 2007; Qian, Goderie, Shen, Stern et Temple, 1998). De nombreuses cellules qualifiées de précurseurs neuraux exhibent lors du développement embryonnaire précoce des propriétés de cellules souches : elles peuvent soit se multiplier par division symétrique, soit engendrer par division asymétrique des cellules qui ont le potentiel de se différencier (Guillemot, 2007; Hamburger et Levi-Montalcini, 1949; Qian et al., 1998). La division cellulaire symétrique est une répllication produisant deux cellules filles identiques entre elles et à la cellule mère (Qian et al., 1998).

Dans les étapes plus tardives du développement, les précurseurs neuraux perdent peu à peu leur capacité à la division symétrique au profit de la division asymétrique (Guillemot, 2007).

Cette dernière produit deux cellules filles différentes entre elles et où l'une d'elles peut, ou non, en fonction des conditions, conserver les mêmes caractéristiques que la cellule mère (Qian et al., 1998). Les cellules vouées à se différencier en neurones ou en cellules gliales sont générées par division asymétrique. L'incidence relative de la division symétrique et de la division asymétrique des précurseurs neuraux, et donc leur probabilité de se régénérer (« *self-renewal* ») ou bien de se différencier, dépend en grande partie de signaux présents dans l'environnement des précurseurs neuraux (Guillemot, 2007).

Dans le SNC, les cellules gliales radiales constituent les principaux précurseurs pour la génération de neurones et d'astrocytes (Aimone et al., 2014; Guillemot, 2007; Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009). La neurogenèse produit d'abord des neuroblastes, des cellules post-mitotiques, c'est-à-dire des cellules ayant perdu leur capacité à se diviser, qui sont vouées à se différencier en neurones après migration vers la région à laquelle elles sont destinées (Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009). Par ailleurs, les cellules gliales radiales, en plus de générer les neuroblastes, offrent aussi un support structural à la migration des neuroblastes vers la région à laquelle ces derniers sont destinés.

Il fut longtemps considéré que la neurogenèse était restreinte aux stades embryonnaire et postnatal précoce chez les mammifères (Aimone et al., 2014). Il est cependant maintenant établi que la neurogenèse se poursuit à l'âge adulte dans certaines structures du cerveau chez une variété d'espèces mammifères, incluant l'humain (Aimone et al., 2014; Cameron et McKay, 2001; Eriksson et al., 1998; Ernst et al., 2014). Une de ces structures est le gyrus dentelé de l'hippocampe et des milliers de cellules granulaires (un type de neurones) y sont produites chaque jour chez le rat adulte (Cameron et McKay, 2001). Plusieurs des conséquences fonctionnelles de la neurogenèse chez l'animal adulte demeurent incertaines et sujettes à la controverse, mais ce phénomène implique à tout le moins des changements structuraux dans les régions accommodant les nouveaux neurones et l'intégration de ces derniers dans les circuits en place (Aimone et al., 2014).

1.2.1.1.2) La différenciation neuronale

Bien que l'ensemble des neurones partage un ensemble de propriétés cellulaires communes et soit généré par les mêmes processus de base, des programmes moléculaires distincts établissent le phénotype spécifique à chacune des classes de neurones (Jessell et Sanes, 2012). Le neurotransmetteur principal sécrété est une des caractéristiques majeures comprises dans le phénotype qui détermine les fonctions que chaque neurone remplira une fois intégré dans un circuit neural (Aimone et al., 2014). La très grande majorité des neurones qui peuplent le cerveau utilisent l'un ou l'autre des deux neurotransmetteurs suivant : le glutamate et le GABA (Osten, Wisden et Sprengel, 2009). Au sein du SNC développé, le glutamate est le principal transmetteur excitateur et le GABA est le principal transmetteur inhibiteur (Aimone et al., 2014; Osten et al., 2009; Sik, Hajos, Gulacsi, Mody et Freund, 1998). Les neurones glutamatergiques et GABAergiques voisins ou interconnectés au sein des mêmes structures sont toutefois issus de zones prolifératives, ou niches de progéniteurs, distinctes (Kriegstein et Alvarez-Buylla, 2009; Sur et Rubenstein, 2005). L'expression de leur neurotransmetteur caractéristique, le glutamate ou le GABA, est notamment déterminée par des facteurs de transcription différents (Hevner, Hodge, Daza et Englund, 2006).

Par ailleurs, pour une même structure, l'ordre dans lequel différents types de neurones sont produits et intégrés est généralement semblable entre les espèces (Guillemot, 2007). Cependant, le moment précis de ces événements peut correspondre à des stades développementaux différents selon les espèces et la durée de leur développement embryonnaire et postnatal propre à chacune (Frotscher et Seress, 2009). À titre d'exemple, les neurones pyramidaux, un sous type de neurones excitateurs, de l'hippocampe sont générés dans les derniers jours du développement embryonnaire chez les rongeurs (Bayer, 1980). Plus précisément, cette phase se situe entre le dixième et le dix-huitième jour du développement embryonnaire chez la souris, pour laquelle la gestation est typiquement de 19 jours, et entre le seizième et le vingt-et-unième jour du développement embryonnaire pour le rat, pour lequel la gestation est habituellement de 21 jours (Angevine, 1965; Bayer, 1980). Chez les primates tels que le singe rhésus et l'humain par contre, les neurones pyramidaux de l'hippocampe sont générés dans la première moitié de la gestation, donc bien avant la naissance (Rakic et

Nowakowski, 1981).

Par ailleurs, les premières cellules (neurones) granulaires, un autre sous type de neurones excitateurs, du gyrus dentelé (de l'hippocampe) sont générées approximativement au même moment que les premiers neurones pyramidaux dans l'hippocampe chez les rongeurs (Angevine, 1965; Bayer, 1980). Chez le singe rhésus et l'humain par contre, la production des cellules granulaires se poursuit durant la deuxième moitié de la gestation (Rakic et Nowakowski, 1981). La production des cellules granulaires du gyrus dentelé se poursuit durant le développement postnatal de façon prédominante chez les rongeurs (environ 85 % chez le rat) et de façon plus réduite chez les primates (environ 15 % pour les singes rhésus) (Frotscher et Seress, 2009).

1.2.1.1.3) La survie neuronale

Après l'émergence de l'identité cellulaire et des propriétés fonctionnelles d'un neurone, des processus supplémentaires déterminent si ce neurone survivra ou mourra (Aimone et al., 2014). Durant le développement embryonnaire tardif et le développement postnatal précoce des vertébrés, une majorité de régions du système nerveux connaissent une surproduction neuronale suivie d'une phase d'élimination (Jessell et Sanes, 2012). C'est ainsi que près de la moitié des neurones générés dans le système nerveux des mammifères durant le développement subissent l'apoptose, un processus de mort cellulaire programmée (Becker et Bonni, 2004). Même dans l'animal adulte, la neurogenèse est associée de façon importante à l'apoptose (Biebl, Cooper, Winkler et Kuhn, 2000; Sierra et al., 2010).

Pour échapper à l'apoptose, les neurones doivent être intégrés dans un circuit et se connecter à d'autres cellules (Aimone et al., 2014; Esposito et al., 2005). En effet, la survie des neurones nouvellement générés dépend en grande partie de la présence de facteurs neurotrophiques, des facteurs sécrétés par les cellules cibles (Becker et Bonni, 2004; Harrington et Ginty, 2013). Ainsi, alors que la production de neurones repose à la base davantage sur un programme cellulaire intrinsèque, la survie des neurones dépend quant à elle avant tout de signaux extrinsèques (Jessell et Sanes, 2012).

1.2.1.2) La morphogenèse neuronale

L'étude de la morphogenèse neuronale a révélé que les axones et les dendrites forment et définissent ensemble la connectivité neuronale (Bodian, 1942; Harrison, 1935; Puram et Bonni, 2013). La forme particulière que prennent les dendrites de différents neurones à la fois influence et est modulée par l'assemblage et le fonctionnement des circuits neuronaux (Bar-Ilan, Gidon et Segev, 2012; Branco et Hausser, 2010; Gidon et Segev, 2012; Parrish, Emoto, Kim et Jan, 2007).

1.2.1.2.1) Les premiers stades de la morphogenèse

En sortant du cycle cellulaire (commun à toute cellule pouvant se diviser et se multiplier), le neuroblaste, développe un lamellipode, une forme d'excroissances motiles (Sanes et Jessell, 2012c). *In vivo* ou dans des tissus neuronaux dont l'architecture est préservée, les lamellipodes permettent aux neuroblastes de migrer le long des cellules gliales radiales, vers la région où ils se différencieront en neurone (da Silva et Dotti, 2002). Cependant, ces structures apparaissent aussi au stade le plus précoce de développement de neurones dissociés (isolés) en culture, c'est-à-dire en l'absence d'un tissu structuré (Craig et Banker, 1994; Kaech et Banker, 2006). Dans ces conditions où un grand nombre des repères structuraux et moléculaires sont absents, ou du moins désorganisés, les lamellipodes se forment toutefois d'abord de façon non polarisée, c'est-à-dire tout autour de son soma (da Silva et Dotti, 2002; Kaech et Banker, 2006).

La rupture de la symétrie initiale du neuroblaste par l'émergence des neurites, les premiers prolongements partant du corps cellulaire, qui deviendront plus tard les axones et les dendrites, est un événement important dans la différenciation neuronale, commençant immédiatement après l'engagement du neuroblaste dans le processus de différenciation neuronale (Sanes et Jessell, 2012c). Ce processus, nommé neuritogenèse, est initié par des signaux extracellulaires activant notamment des récepteurs membranaires et déclenchant des cascades intracellulaires (da Silva et Dotti, 2002; Valnegri et al., 2015). Plusieurs de ces cascades de signalisation convergent sur des mécanismes engendrant des changements dans le cytosquelette d'actine (da Silva et Dotti, 2002; Luo, 2002).

Le développement des neurites est dirigé par une extrémité distale spécialisée, appelée cône de croissance, possédant un ou des lamellipodes desquels surgissent les filipodes, des structures filiformes encore plus dynamiques que des lamellipodes, s'élançant dans le milieu extracellulaire (Craig et Banker, 1994; Kaech et Banker, 2006; Luo, 2002). L'observation de ces phénomènes dans des neurones isolés en culture reflète le fait que les lamellipodes et les filipodes, en plus de leur rôle dans la migration des neuroblastes en contexte physiologique, permettent aux neurones en devenir de sonder leur environnement pour y détecter des signaux extracellulaires attractifs et répulsifs (Antar, Afroz, DICTENBERG, Carroll et Bassell, 2004; da Silva et Dotti, 2002).

La majorité des neurones *in situ* développent d'abord chacun un seul neurite, voué à devenir l'axone, et ensuite les dendrites (da Silva et Dotti, 2002). Cependant, dans les neurones dissociés, plusieurs neurites émergent en même temps et se développent d'abord de façon indistincte (Kaech et Banker, 2006). Peu de temps après, les signaux moléculaires présents dans l'environnement du neurone entraînent un allongement marqué d'un des neurites, se spécialisant alors en axone, pendant que le développement des autres neurites traverse une phase stationnaire (da Silva et Dotti, 2002; Esch, Lemmon et Banker, 1999; Valnegri et al., 2015).

1.2.1.2.2) Le développement des dendrites

Après la spécialisation axonale, les autres neurites adoptent une identité dendritique et entrent dans une phase de développement rapide (Craig et Banker, 1994; Valnegri et al., 2015). Durant cette période, les dendrites développent des caractéristiques structurales et moléculaires qui les distinguent nettement des axones (Kaech et Banker, 2006; Puram et Bonni, 2013). La structure des dendrites se complexifie par la formation de ramifications selon deux modes différents (Puram et Bonni, 2013). D'une part, en s'allongeant et en se distançant du soma, les dendrites se divisent en deux ou plusieurs branches dendritiques (Craig et Banker, 1994). D'autre part, sur les segments dendritiques déjà établis, émergent des filipodes qui, lorsque suffisamment stabilisés, continuent à croître en longueur et en diamètre pour devenir des ramifications dendritiques additionnelles (Dailey et Smith, 1996; Puram et Bonni, 2013).

La croissance des dendrites est d'abord rapide et donne lieu à la formation d'une arborescence foisonnante. Cependant, lorsque l'arbre dendritique atteint une taille proche de sa taille maximale, son développement ralentit de façon marquée (Dailey et Smith, 1996; Gao, Brenman, Jan et Jan, 1999; Puram et Bonni, 2013). Les ramifications qui ne sont alors pas stabilisées par des projections axonales, et donc fonctionnellement superflues sont éliminées. En contraste, les dendrites conservées subissent des processus additionnels de croissance et de différenciation. Les contacts formés avec des terminaisons axoniques permettent la formation de synapses et favorisent alors la maturation dendritique (Valnegri et al., 2015). Le développement de synapses fonctionnelles implique notamment la formation de densités postsynaptiques et d'épines dendritiques sur les dendrites (Lohmann et Kessels, 2014; Sala et Segal, 2014).

1.2.1.2.2.1) Les facteurs intrinsèques régulant la morphogenèse dendritique

Les nombreux facteurs régulant la morphogenèse dendritique peuvent être grossièrement départis comme étant soit intrinsèques ou extrinsèques au neurone en développement (da Silva et Dotti, 2002; Puram et Bonni, 2013; Valnegri et al., 2015). La régulation cellulaire intrinsèque correspond aux mécanismes ne dépendant pas strictement de signaux extracellulaires : ces mécanismes peuvent subir une influence externe, mais ils opèrent à l'intérieur de la cellule, en aval de récepteurs à la surface cellulaire et indépendamment d'autres neurones (Puram et Bonni, 2013). Parmi les facteurs intrinsèques on compte des facteurs de transcription, des protéines motrices et du cytosquelette, les voies sécrétoires et endocytiques, ainsi que nombreuses autres composantes intervenant dans d'autres voies de signalisation (Puram et Bonni, 2013).

1.2.1.2.2.2) Les facteurs extrinsèques régulant la morphogenèse dendritique

Les facteurs extrinsèques peuvent être catégorisés selon le type de molécules assurant la communication intercellulaire (Valnegri et al., 2015). Ainsi, une première catégorie comprend les molécules de signalisation présentes dans la membrane cellulaire ou à la surface des cellules avec lesquelles le neurone se développant est en contact. On compte parmi ces facteurs les protéines BMP (pour « *bone morphogenetic protein* »), stimulant la croissance

dendritique, la protéine DSCAM (pour « Down syndrome *cell adhesion molecule* ») et des ligands d'intégrines (ex. laminine), favorisant l'adhésion cellulaire (da Silva et Dotti, 2002; Valnegri et al., 2015). Parmi les molécules de contacts cellulaires impliquées dans la morphogenèse dendritique, on compte aussi les éphrines et leurs récepteurs (Eph) (Klein et Kania, 2014). Alors que la signalisation « classique » éphrine-Eph, où les éphrines des autres cellules activent les récepteurs Eph du neurone en développement, est davantage impliqué dans le guidage axonal et a généralement un effet répulsif, la signalisation éphrine-Eph « inverse », où les récepteurs Eph des autres cellules constituent des signaux extracellulaires interagissant avec les éphrines présentes sur les dendrites du neurone en développement, favorise en général l'adhésion cellulaire (Klein et Kania, 2014).

La deuxième catégorie de facteurs extrinsèques régulant le développement des dendrites est celle des facteurs sécrétés comptant entre autres des neurotrophines (BDNF, NGF, NT-3, NT-4) et des sémaphorines (Sema 3A, Sema 6A) favorisant à des degrés variables l'élongation ou la ramification des dendrites (Harrington et Ginty, 2013; Valnegri et al., 2015). La dernière catégorie de facteurs extrinsèques est celle des signaux liés à l'activité neuronale tels que les neurotransmetteurs activant des récepteurs ionotropes et les flux ioniques, particulièrement calciques, entrants par les canaux voltage-dépendants (Bar-Ilan et al., 2012; Valnegri et al., 2015).

1.2.1.3) Le développement des connexions neuronales

Suivant la formation du SNC primitif, la genèse et la différenciation des neurones et des cellules gliales, le développement des connexions neuronales permet l'établissement des circuits neuraux (Sur et Rubenstein, 2005). Le développement des connexions neuronales au sein des tissus nerveux nécessite trois grands processus successifs (Frotscher et Seress, 2009). Premièrement, l'axone croit et se dirige vers la région qu'il doit cibler. Deuxièmement, lorsque l'axone atteint cette région, il doit la reconnaître pour freiner sa croissance et cibler une ou des cellules(s) en particulier. Finalement, l'axone en question forme des synapses avec la ou les cellules(s) ciblées.

1.2.1.3.1) Croissance et guidage des axones

Différents facteurs cellulaires et moléculaires, à l'œuvre seulement durant certains stades développementaux, sont impliqués dans la formation des différentes projections nerveuses vers une structure ou région particulière du système nerveux (Sanes et Jessell, 2012c). Durant la croissance de l'axone, sa trajectoire est déterminée à la fois par des signaux attractifs et répulsifs correspondant soit à des molécules diffusées dans le milieu et y formant des gradients, soit à des molécules présentes dans la matrice extracellulaire ou à la surface des cellules rencontrées ou encore sécrétées par ces dernières (da Silva et Dotti, 2002; Esch et al., 1999; Harrington et Ginty, 2013; Klein et Kania, 2014).

À titre d'exemple, chez le rat, l'arrivée des afférences à l'hippocampe coïncide avec le développement de leurs cellules cibles dans cette structure, durant les périodes périnatale et postnatale précoce (Frotscher et Seress, 2009). Par ailleurs, l'établissement de ces circuits dépend de sémaphorines (interagissant avec les récepteurs neuropilines 1 et 2), de la nétrine 1 (interagissant avec le récepteur *DCC*, pour « *deleted in colon cancer* »), les éphrines (interagissant avec les récepteurs tyrosine kinases *Eph*) et de Slit (interagissant avec Robo) (Skutella et Nitsch, 2001).

1.2.1.3.2) La synaptogenèse

Les étapes initiales de la synaptogenèse, ou formation des synapses semblent être fixées par des programmes moléculaires intrinsèques (Sanes et Jessell, 2012b). Cependant, dès que les synapses se forment, l'activité des circuits neuraux joue un rôle critique dans le développement subséquent (Ghosh, Carnahan et Greenberg, 1994; Harrington et Ginty, 2013). Trois processus clés dirigent donc la synaptogenèse : premièrement, la formation initiale des contacts synaptiques; deuxièmement, la différenciation des zones présynaptiques et postsynaptiques; troisièmement, l'élimination des synapses superflues conjointe à la maturation des synapses conservées (Sanes et Jessell, 2012b).

Une fois que les axones atteignent les régions qu'ils doivent innover, ils sélectionnent tout d'abord les partenaires postsynaptiques appropriés parmi les nombreuses cellules constituant des cibles potentielles. En formant des connexions synaptiques avec seulement certaines

cellules et non d'autres, les neurones créent des circuits ordonnés pouvant traiter l'information ou diriger une réponse (Kandel, Barres, et al., 2012). Habituellement, les synapses doivent être formées à des sites spécifiques sur la cellule postsynaptique; certains axones forment des synapses sur des dendrites, d'autres sur le soma, et encore d'autres sur des axones ou des terminaisons nerveuses. Une telle spécificité découle, du moins en partie, de molécules de signalisation présentes à la surface des cellules postsynaptiques (Craig, Graf et Linhoff, 2006). Certaines molécules d'adhésion peuvent d'ailleurs aussi constituer des signaux de reconnaissance pour des domaines particuliers d'un neurone. De plus, un neurone peut le plus souvent former des synapses avec différentes classes de cellules présynaptiques et postsynaptiques et chaque sous-type neuronal exprime une combinaison caractéristique de molécules de reconnaissance synaptique (Sanes et Jessell, 2012b). En somme, la synaptogenèse est un processus sélectif à la fois au niveau cellulaire et au niveau subcellulaire.

Après que les contacts intercellulaires ont été formés, la portion de l'axone qui contacte une cellule cible se différencie en terminaison nerveuse, et le domaine de la cellule cible contactée par l'axone se différencie en appareillage postsynaptique spécialisé (Craig et al., 2006). La synapse se développe progressivement à travers une série d'étapes où les interactions entre l'élément présynaptique et l'élément postsynaptique régulent de façon réciproque et coordonnée la différenciation de ces éléments (Sanes et Jessell, 2012b).

La présence accrue de récepteurs de neurotransmetteur à la membrane postsynaptique est une caractéristique partagée par de nombreuses synapses. Dans le SNC, les récepteurs du glutamate, du *GABA* ainsi que d'autres neurotransmetteurs sont typiquement concentrés dans des zones de la membrane de la cellule postsynaptique alignées avec les terminaisons présynaptiques. Par ailleurs, il semble que même dans certains systèmes où les circuits neuronaux ne sont pas structurés physiologiquement, les terminaisons axonales exercent une influence semblable sur la composition de la membrane des neurones contactés (Bartlett et Banker, 1984b). En effet, dans les cultures de neurones de l'hippocampe dissociés, les récepteurs du glutamate et du *GABA* sont initialement dispersés ensemble (Kaeck et Banker, 2006). En contactant les dendrites, souvent sur des régions adjacentes, les axones glutamatergiques et GABAergiques entraînent l'accumulation de récepteurs du glutamate et

du *GABA* respectivement à la membrane postsynaptique (Craig et al., 2006). L'expression des récepteurs de neurotransmetteur est régulée à la fois par les contacts cellulaires et l'activité synaptique (An et al., 2008; Klein et Kania, 2014; Lu et al., 2001; Sala et Segal, 2014; West et Greenberg, 2011).

1.2.1.3.3) Réarrangements et maturation synaptiques

La connectivité au sein du SNC embryonnaire peut être considérée comme une ébauche des circuits neuraux qui existent chez les individus adultes (Sanes et Jessell, 2012a). Ainsi, après la naissance, les circuits embryonnaires sont affinés par les stimulations sensorielles. Cette séquence en deux parties correspondant à l'établissement d'une connectivité déterminée génétiquement suivie par une réorganisation dépendante de l'expérience caractérise le développement neural des mammifères. L'importance de la durée de cette deuxième phase chez l'humain et le degré de la réorganisation y ayant cours font que cette espèce est un cas évolutif extrême (Sanes et Jessell, 2012a).

Par ailleurs, l'hippocampe offre un bon exemple, parmi nombre d'autres, d'une structure où une connectivité interne, plus complexe et variable, est formée durant une phase suivant l'établissement d'une connectivité plus élémentaire et fixe assurant le lien avec d'autres structures du SNC (Frotscher et Seress, 2009). En effet, le développement des connexions entre neurones de l'hippocampe est relativement tardif en comparaison à celui des connexions formées par les afférences externes et coïncide avec le développement postnatal prolongé des fonctions de l'hippocampe (Nadel et Willner, 1989).

Une fois formées, les synapses continuent leur processus de maturation tout en subissant souvent des réarrangements majeurs (El-Husseini, Schnell, Chetkovich, Nicoll et Brecht, 2000). L'activité neurale au sein d'un circuit joue un rôle critique dans le raffinement des patrons synaptiques qui implique l'élimination d'une grande proportion des synapses nouvellement formées accompagnée d'une croissance et d'un renforcement des synapses conservées (Sanes et Jessell, 2012b). D'ailleurs, l'observation en temps réel par microscopie à deux photons a révélé que les épines dendritiques peuvent se former et se résorber de façon rapide dans le néocortex (et vraisemblablement, dans l'hippocampe aussi) lors du développement (Bailey et

al., 2015). Par contre, alors que l'animal arrive à maturité, les épines tendent à se stabiliser (Lohmann et Kessels, 2014; Sala et Segal, 2014).

Pour expliquer les bases cellulaires de la mémoire et de l'apprentissage, le psychologue Donald Hebb proposa en 1949 que l'activité synchronisée ou quasi simultanée d'un neurone présynaptique et d'un neurone postsynaptique renforce les connexions synaptiques entre ces deux neurones (Hebb, 1949 (2002)). Cette hypothèse a depuis été validée maintes fois en tant que mécanisme par lequel la force synaptique peut être modulée au sein des circuits neuraux chez l'adulte et sous-jacent à certaines formes de mémoire (tel qu'il en sera discuté à la section 2.2.2) (Vitureira et Goda, 2013). Toutefois, le postulat de Hebb s'applique aussi aux modifications que subissent les synapses au cours du développement. Ainsi, l'activité corrélée entre les éléments présynaptique et postsynaptique stabilise et renforce les nouvelles synapses, alors que l'activité non corrélée tend à affaiblir ces dernières et à favoriser leur élimination (Sanes et Jessell, 2012a). Les mécanismes moléculaires sous-jacents demeurent néanmoins peu connus, mais une hypothèse plausible est que le degré et la distribution de l'activité neuronale régulent l'expression de certaines molécules de reconnaissance et d'adhérence cellulaires ainsi que d'autres molécules impliquées dans la différenciation des membranes synaptiques (Alves-Sampaio, Troca-Marin et Montesinos, 2010; Sala et Segal, 2014; Scheetz, Nairn et Constantine-Paton, 2000).

En somme, les programmes moléculaires et l'activité neurale ou, encore, les gènes et l'environnement interagissent pour définir la connectivité des neurones et consolider les circuits fonctionnels (Sanes et Jessell, 2012a). La capacité des circuits du système nerveux à traiter l'information est ainsi modulée par leur activité. Cette caractéristique est à l'œuvre de la façon la plus importante durant la période postnatale précoce, mais persiste dans certaines régions du système nerveux, tel que l'hippocampe, à l'âge adulte (Frotscher et Seress, 2009).

1.2.2) La plasticité synaptique

La plasticité du système nerveux est la plus importante lors du développement des circuits neuronaux, mais elle subsiste en partie à l'âge adulte, permettant les apprentissages et la formation de souvenirs (Lohmann et Kessels, 2014). Les changements dans le système nerveux mature peuvent découler entre autres de la formation de prolongements dendritiques ou de branches terminales d'axones, de façon semblable à ce qui se produit dans le système nerveux en développement, mais plus localisée et circonscrite (Mayford et al., 2012; Ziv et Smith, 1996). Toutefois, la plasticité des circuits nerveux chez l'adulte dépend en général davantage de modifications relativement subtiles de la force des synapses (Citri et Malenka, 2008; Malenka et Bear, 2004).

L'hypothèse que des changements dans l'efficacité des synapses au sein de divers circuits neuronaux peuvent sous-tendre le stockage d'informations acquises durant l'apprentissage semble avoir émergé avec le concept même de la synapse neuronale à la fin du 19^e siècle (Bliss et al., 2014; Takeuchi et al., 2014). Des expériences s'étendant sur des décennies, employant une vaste gamme d'approches expérimentales et conduites sur diverses structures nerveuses et une variété d'espèces ont depuis démontré que l'activité neuronale peut altérer la force de la transmission synaptique et que c'est un des mécanismes majeurs par lequel les traces mnésiques seraient formées et conservées dans le SNC (Mayford et al., 2012).

1.2.2.1) L'échelle temporelle de la plasticité synaptique

Le recrutement de seconds messagers intracellulaires par l'activité neuronale peut engendrer des changements dans la force de la transmission synaptique des neurones impliqués (Mayford et al., 2012). Cette plasticité synaptique peut se manifester sur une échelle temporelle pouvant varier de l'ordre de millisecondes jusqu'à l'ordre de semaines, voire davantage (Malenka et Bear, 2004). On qualifie les modifications transitoires de l'efficacité synaptique ne durant pas plus que quelques minutes de plasticité synaptique à court terme (Citri et Malenka, 2008). Ces formes de plasticité dépendent largement de mécanismes présynaptiques causant des changements dans la quantité de neurotransmetteur libéré (Bliss et al., 2014). La force de la

transmission s'effectuant aux synapses chimiques peut ainsi être modulée de façon quasi immédiate, ou du moins très rapidement, par le patron de décharge des neurones présynaptiques.

Par ailleurs, il existe une proportion importante de synapses, en particulier dans le SNC des mammifères, pouvant subir des formes de plasticité prolongée ayant le potentiel de changer de façon relativement durable les fonctions d'intégration nerveuse (Bailey et al., 2015; Mayford et al., 2012). Toutefois, d'après les analyses électrophysiologiques, structurales et moléculaires, les propriétés durables conférées aux synapses sont en grande partie différentes de celles observées peu de temps après l'induction de la plasticité synaptique (Bailey et al., 2015; Citri et Malenka, 2008). Ces phénomènes sont qualifiés collectivement de plasticité synaptique à long terme et sont considérés comme les corrélats cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire (Malenka et Bear, 2004; Mayford et al., 2012).

1.2.2.2) La plasticité synaptique à long terme des neurones glutamatergiques de l'hippocampe

L'hippocampe est une aire cérébrale particulièrement importante pour la mémoire dite « explicite », tel que l'apprentissage spatial et, plus spécifiquement chez l'humain, la mémoire déclarative (Siegelbaum et Kandel, 2012b). Des changements de la force des connexions synaptiques sont les principaux mécanismes avancés pour expliquer l'implication de cette structure dans la formation de souvenirs.

1.2.2.2.1) La potentialisation à long terme

En 1973, Timothy Bliss et Terje Lomo ont trouvé, en utilisant le lapin comme modèle expérimental, qu'une partie du circuit trisynaptique, le circuit central formé par les neurones excitateurs de l'hippocampe, était particulièrement sensible à l'activité de la voie perforante, un groupe d'afférences excitatrices en provenance du cortex (Bliss, Collingridge et Morris, 2009; Bliss et al., 2014; Bliss et Lomo, 1973; Siegelbaum et Kandel, 2012b). Ils avaient découvert qu'une brève stimulation tétanique, c'est-à-dire à haute fréquence, de cette voie

induisait une potentialisation à long terme (PLT), c'est-à-dire une augmentation durable de l'amplitude des potentiels excitateurs postsynaptiques, dans les neurones granulaires du gyrus dentelé (Bliss et Lomo, 1973). Des études ultérieures démontrèrent que de brefs trains de stimulation à haute fréquence peuvent aussi induire une PLT à tous les trois types de synapses glutamatergiques constituant les relais principaux du circuit trisynaptique, ainsi que les synapses formées par la voie perforante directe et les neurones pyramidaux de la région 1 de la corne d'Amon (CA1) (Bliss et al., 2009; Bliss et al., 2014; Siegelbaum et Kandel, 2012b).

Bien que sa durée peut varier, la PLT peut être induite *in vivo* avec des électrodes implantées dans le cerveau d'un animal, mais aussi *in vitro* dans des tranches d'hippocampe ou dans des neurones dissociés en culture (Siegelbaum et Kandel, 2012b). Par ailleurs, une même synapse peut subir différentes formes de PLT, induites par différents patrons d'activité synaptique. La possibilité de générer la PLT de différentes façons, à différents types de synapses glutamatergiques et dans différents systèmes expérimentaux indique qu'il ne s'agit pas d'une forme unique de plasticité synaptique, mais plutôt d'un ensemble de processus renforçant la transmission synaptique à travers différents mécanismes cellulaires et moléculaires. Toutefois, ces processus distincts partagent des similarités importantes (Siegelbaum et Kandel, 2012b). Notamment, toutes les formes de PLT sont homosynaptiques, c'est-à-dire qu'elles sont induites aux synapses mêmes qui sont activées de façon prédominante.

1.2.2.2.2) La dépression à long terme

Les contraintes métaboliques régulant l'homéostasie cellulaire des neurones restreignent la capacité de potentialisation synaptique. Ainsi, on peut supposer que si la force des connexions synaptiques ne pouvait être qu'augmentée, il y aurait une tendance à la saturation qui limiterait, voire empêcherait, rapidement la possibilité de former des traces mnésiques durables et de consolider les expériences chez l'individu arrivé à maturité. En effet, de façon semblable aux formes de potentialisation synaptique à court terme (la facilitation synaptique et la potentialisation post-tétanique), la PLT peut s'estomper avec le temps. Toutefois, cette atténuation passive est trop lente et graduelle pour permettre la régulation flexible et dynamique des adaptations neuronales requise pour les formes de mémoire et d'apprentissage plus complexes. En effet, il existe des processus actifs d'atténuation durable de la force

synaptique contrôlés par l'activité neuronale : ils sont qualifiés collectivement de dépression à long terme (DLT).

La DLT fut d'abord découverte dans le cervelet et impliquée dans l'apprentissage moteur, mais elle a ensuite aussi été observée dans l'hippocampe (Siegelbaum et Kandel, 2012b). L'induction expérimentale de la DLT, en contraste avec la PLT, se fait par des stimulations à basse fréquence et de longue durée ou par une activité non synchronisée entre les neurones présynaptiques et postsynaptiques.

1.2.2.2.3) Le rôle des récepteurs AMPA et NMDA dans l'induction de la plasticité synaptique

Les récepteurs NMDA postsynaptiques sont impliqués dans l'induction de plusieurs formes de plasticité synaptique (Siegelbaum et Kandel, 2012b). À cause du blocage par le Mg^{2+} , l'ouverture des canaux formés par les récepteurs NMDA requiert que deux conditions soient satisfaites simultanément : la liaison du glutamate aux récepteurs et une dépolarisation membranaire dans la proximité immédiate des récepteurs activés. À cause de cela, quand le potentiel membranaire est proche du potentiel de repos, l'activation des récepteurs AMPA est très majoritairement responsable des PPSE générés. C'est pourquoi l'activation des récepteurs AMPA précède et est souvent nécessaire à l'ouverture des canaux NMDA.

La conductance des récepteurs AMPA peut contribuer à une dépolarisation permettant l'ouverture des canaux NMDA de deux façons. D'une part, lorsqu'assez de récepteurs AMPA sont activés de façon rapprochée dans l'espace et le temps, les PPSE générés s'additionnent pour produire une forte dépolarisation locale. Par ailleurs, lorsqu'assez de synapses sur un même neurone postsynaptique sont impliquées, l'activation des récepteurs AMPA peut être suffisante pour déclencher un potentiel d'action dans ce neurone (Siegelbaum et Kandel, 2012b). La forte dépolarisation engendrée lorsqu'un potentiel d'action est déclenché dans l'axone peut se propager de façon rétrograde dans les dendrites. Qu'elle soit générée localement ou non, une forte dépolarisation permet l'expulsion du Mg^{2+} hors des canaux NMDA.

L'entrée de Ca^{2+} par les récepteurs NMDA postsynaptiques s'avère un facteur déterminant

pour l'induction de certaines formes de PLT (notamment aux synapses formées par les collatérales de Schaffer et les neurones pyramidaux du CA1), puisque l'inhibition pharmacologique des récepteurs NMDA ou le blocage (par chélation) de l'élévation de la concentration de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique inhibent ces formes de PLT (Bliss et al., 2009; Siegelbaum et Kandel, 2012b). L'augmentation forte et rapide de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} active notamment et la protéine kinase C (PKC) et la CaMKII (pour « *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* ») dans les neurones postsynaptiques (Siegelbaum et Kandel, 2012b). L'inhibition pharmacologique de l'une ou l'autre de ces kinases bloque d'ailleurs l'induction de la PLT dépendante des récepteurs NMDA et de l'entrée de Ca^{2+} . L'activation de la PKC et de la CaMKII lors de l'induction de la PLT entraîne entre autres la phosphorylation des récepteurs AMPA, induisant des changements de conformation de ces récepteurs qui tendent à augmenter leur conductance ionique (Bear, 2007).

Paradoxalement, l'activation des récepteurs NMDA postsynaptiques peut aussi contribuer à l'induction de certaines formes de DLT. Ainsi, lorsque le neurone postsynaptique n'est que faiblement dépolarisé, un blocage partiel du canal ionique des récepteurs NMDA est maintenu par le Mg^{2+} et empêche une entrée massive de Ca^{2+} . Ces élévations plus modestes de la concentration de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique ne sont généralement pas suffisantes pour activer les protéines kinase impliquées dans l'induction de la PLT, mais elles stimulent l'activité de plusieurs protéines phosphatases. Ces phosphatases ont le potentiel de déphosphoryler un très grand nombre de protéines dans les dendrites et leurs épines. Les récepteurs AMPA pourraient d'ailleurs être déphosphorylés lors de l'induction de certaines formes de DLT (Bear, 2007).

1.2.2.3) Les adaptations postsynaptiques sous-jacentes à la plasticité synaptique à long terme

Les adaptations pouvant entraîner une modification de l'efficacité synaptique sont multiples, divergent entre les différentes formes de plasticité synaptique à long terme et peuvent varier

pour un même type de plasticité (par exemple, la PLT) selon les conditions particulières de son induction et les connexions synaptiques en cause (Siegelbaum et Kandel, 2012b). Certaines formes de plasticité synaptique à long terme découlent de changements présynaptiques, altérant principalement la quantité de neurotransmetteur libéré, d'autres découlent de changements postsynaptiques, altérant principalement l'amplitude de la réponse engendrée pour une même quantité de neurotransmetteur (Siegelbaum et Kandel, 2012b). Dans certains cas, une combinaison d'effets présynaptiques et postsynaptiques est en cause. Les diverses formes de plasticité divergent aussi dans l'importance relative de différents récepteurs et canaux ioniques, ainsi que de seconds messagers et des voies de signalisation qui y sont associés (Siegelbaum et Kandel, 2012b). Néanmoins, un certain nombre d'adaptations postsynaptiques sont très largement répandues aux synapses glutamatergiques subissant de la plasticité à long terme dans les structures impliquées dans la mémoire et l'apprentissage telles que le néocortex et l'hippocampe (Bear, 2007).

1.2.2.3.1) La régulation des récepteurs AMPA à la surface postsynaptique

Les synapses excitatrices peuvent opérer une régulation du nombre de récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique (Huganir et Nicoll, 2013). Outre les récepteurs AMPA à la surface cellulaire (Henley et Wilkinson, 2016; Siegelbaum, 2012), il existe une réserve intracellulaire de ces récepteurs présents dans la membrane de vésicules. Cela permet un processus dynamique et bidirectionnel puisque, selon les signaux inductifs, les récepteurs AMPA des vésicules peuvent être externalisés et, inversement, les récepteurs AMPA à la surface peuvent être internalisés pour rejoindre la réserve vésiculaire. En effet, la PLT est associée à une exocytose de récepteurs AMPA, c'est-à-dire que les vésicules internes portant ces récepteurs sont poussées vers la surface cellulaire où elles se fusionnent à la surface, permettant ainsi l'insertion de récepteurs supplémentaires (Ehlers, 2000; Henley et Wilkinson, 2016; Huganir et Nicoll, 2013; Kopec, Li, Wei, Boehm et Malinow, 2006; Lu et al., 2001). Inversement, la DLT est associée à une endocytose de récepteurs AMPA, c'est-à-dire que des invaginations de la membrane cellulaire mènent à la formation de vésicules englouties à l'intérieur de la cellule, permettant ainsi le retrait de récepteurs (Beattie et al., 2000; Siegelbaum, 2012).

La régulation du nombre de récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique peut être

considérée comme la plus déterminante des adaptations postsynaptiques impliquées dans la plasticité synaptique vu son incidence et ses conséquences fonctionnelles. De plus, cette modulation est aussi bien impliquée dans les phases précoces que dans les phases tardives de l'expression de la plasticité synaptique. Par ailleurs, de nombreuses autres adaptations postsynaptiques contribuent à cette modulation ou en découlent (Kopec et al., 2006; Kopec, Real, Kessels et Malinow, 2007; Siegelbaum, 2012).

1.2.2.3.2) La régulation des épines dendritiques

Dans leurs phases initiales, la potentialisation et la dépression synaptiques peuvent dépendre d'un changement du nombre de récepteurs ionotropes du glutamate, en particulier des récepteurs AMPA (Bailey et al., 2015). Par contre, une potentialisation ou une dépression synaptique durable impliquent des modifications de la structure des épines dendritiques et de leur composition. De nombreuses études ont démontré que les épines dendritiques ont une structure dynamique, à la fois dans des conditions physiologiques normales *in vivo* et en réponse à des conditions expérimentales induisant de la plasticité synaptique (Bailey et al., 2015).

Dans l'ensemble, les changements de la densité et de la taille des épines reflètent ceux touchant le nombre et la localisation des récepteurs AMPA (Huganir et Nicoll, 2013; Kopec et al., 2007; Matsuzaki et al., 2001). Bien qu'en partie distincts, les mécanismes régulant ces aspects des sites postsynaptiques sont déclenchés par la même signalisation en amont. D'ailleurs, l'entrée de Ca^{2+} par les récepteurs NMDA joue aussi un rôle critique dans la régulation de la taille et la densité des épines dendritiques (Matsuzaki et al., 2001; Sala et Segal, 2014; Zhou, Homma et Poo, 2004).

De façon générale, le nombre ou le volume des épines dendritiques sont augmentés dans le cadre de la potentialisation synaptique (Bosch et al., 2014; Engert et Bonhoeffer, 1999; Hamilton et al., 2012; Hosokawa, Rusakov, Bliss et Fine, 1995; Kopec et al., 2006; Kopec et al., 2007; Maletic-Savatic, Malinow et Svoboda, 1999; Matsuzaki, Honkura, Ellis-Davies et Kasai, 2004; Meyer, Bonhoeffer et Scheuss, 2014). À l'inverse, le nombre et le volume des épines tendent à être réduits suivant une dépression synaptique (Oh, Hill et Zito, 2013; Zhou et

al., 2004).

Le volume d'une épine dendritique peut même être modifié lorsqu'elle stimulée de façon individuelle, par photolyse de 4-méthoxy-7-nitro-indolyl-glutamate (MNI-glutamate) (Sala et Segal, 2014). La photolyse de MNI-glutamate dans le cadre de la microscopie à deux photons (2p) permet la libération de glutamate avec une très grande précision spatiale et temporelle, de sorte qu'une épine unique peut être soumise sélectivement à une forme de plasticité synaptique. Le volume de la tête d'une épine ainsi potentialisée est typiquement augmenté (Bosch et al., 2014; Matsuzaki et al., 2004; Meyer et al., 2014). Lorsque les paramètres de photololyse sont ajustés de façon à obtenir un paradigme induisant une dépression synaptique spécifique à une épine, le volume de cette épine est le plus souvent réduit, des fois à un point tel que l'épine apparait se résorber jusqu'à sa disparition (Oh et al., 2013; Stein, Gray et Zito, 2015).

1.3) La régulation de l'expression génique dans les neurones

Comme toutes les cellules, les neurones sont constitués de protéines, chacune soumise à des processus spécifiques déterminant leur quantité et leur disponibilité. Ce phénomène est qualifié de protéostase, c'est-à-dire l'homéostasie protéique, et implique l'ensemble des mécanismes régulant la synthèse, le transport et la dégradation des protéines (Alvarez-Castelao et Schuman, 2015; Hanus et Schuman, 2013; Rosenberg et al., 2014). En raison des distances couvertes par les dendrites, du nombre élevé de synapses et de la plasticité de ces dernières, tous ces processus prennent une ampleur inégalée dans les dendrites des neurones. Parmi les trois grands types de processus déterminant la quantité et la disponibilité des protéines, la synthèse constitue celui qui inclut le plus de niveaux et de mécanismes de régulation, engendrant une immense gamme de combinaisons possibles qui est particulièrement mise à profit pour l'homéostasie neuronale et la plasticité synaptique (Alberini et Kandel, 2014; Schwanhauser et al., 2011).

1.3.1) La régulation transcriptionnelle

Le génome des cellules eucaryotes contient des milliers de gènes disséminés dans l'ensemble de l'ADN chromosomique qui inclut de vastes quantités de séquences non codantes (Ha et Kim, 2014). Toutefois, en fonction du type de cellules et des conditions physiologiques, certains gènes sont activés et d'autres sont désactivés (Zieg et al., 2008). En fait, cette régulation n'est généralement pas binaire et le degré d'expression d'un gène varie en fonction d'une combinaison de signaux extracellulaires et intracellulaires (Hevner et al., 2006).

Le premier point de contrôle de l'expression génique se situe au niveau de la transcription de l'ADN en ARN (Alberini et Kandel, 2014). Les régulateurs de la transcription sont nombreux et variés. Ils incluent les facteurs de transcription (des protéines liant l'ADN déterminent le taux de transcription de gènes particuliers), des cofacteurs (interagissant avec les facteurs de transcription), les régulateurs de la chromatine, la machinerie de base de la transcription et ses

régulateurs (Alberini et Kandel, 2014).

Par ailleurs, la transcription génère non seulement des ARN messagers traduits en protéines, mais aussi des ARN non codants (ARNnc), qui ont eux-mêmes des rôles régulateurs ou effecteurs dans l'expression génique (au niveau de la transcription ou de la traduction selon le type d'ARNnc) (Alberini et Kandel, 2014; Bliss et al., 2009; Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014; Lee et al., 2004).

1.3.1.1) La régulation transcriptionnelle de la morphogenèse dendritique et de la plasticité synaptique

La transcription *de novo* de l'ADN est nécessaire pour maintenir les adaptations caractérisant la phase tardive de la PLT (ou *L-LTP*, pour « *late long-term potentiation* ») et à la formation de la mémoire à long terme (Alberini et Kandel, 2014; Bliss et al., 2009; Rosenberg et al., 2014). La durée de la phase tardive de la PLT est d'ailleurs réduite en présence d'inhibiteurs de la transcription, tels que l'actinomycine, dans les neurones pyramidaux de la région CA1 dans des tranches d'hippocampes (Frey, Krug, Reymann et Matthies, 1988).

La régulation transcriptionnelle dans le cadre de la plasticité synaptique repose sur des mécanismes assurant une signalisation entre les dendrites et le noyau (Bliss et al., 2009; Greer et Greenberg, 2008). Cette régulation peut être répartie en deux phases suivant l'activité synaptique. Lors d'une forte stimulation synaptique, la sommation spatiale et temporelle des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) engendre une dépolarisation qui se propage au soma et constitue la première vague de signaux en provenance des dendrites. La deuxième vague de signaux est beaucoup plus disparate et étalée et fait intervenir des cascades de signalisation déclenchées par l'activité synaptique et les augmentations locales de concentration de Ca^{2+} (Citri et Malenka, 2008; Li et al., 2012). Dans ces cascades, des protéines à localisation postsynaptique sont acheminées au noyau ou alors interagissent avec des protéines dendritiques ou somatiques pour relayer le signal au noyau. À l'intérieur de ce dernier, les facteurs de signalisation interagissent avec d'autres facteurs régulant la transcription (Rosenberg et al., 2014).

1.3.1.1.1) Le rôle des facteurs de transcription dans la morphogenèse dendritique et de la plasticité synaptique

Les facteurs de transcription ont un rôle déterminant dans la morphogenèse des dendrites. Une des conclusions découlant d'un nombre important d'études dans ce domaine est que différents facteurs de transcription régulent des phases ou des aspects différents de la morphogenèse dendritique (Puram et Bonni, 2013). Par exemple, le facteur de transcription Foxo6, en stimulant entre autres l'expression de la protéine Pak1, contribue à l'établissement de la polarité neuronale (de la Torre-Ubieta et al., 2010). La protéine neurogénine (Ngn2), un facteur de transcription de type *bHLH*, apparaît, quant à elle, moduler la géométrie des dendrites de neurones pyramidaux (Hand et al., 2005). NeuroD est un autre facteur de transcription de type *bHLH*. NeuroD est recruté par la protéine kinase CaMKII α , qui est stimulée l'activité neuronale et la signalisation calcique, et favorise alors la croissance et la ramification des dendrites (Gaudilliere, Konishi, de la Iglesia, Yao et Bonni, 2004).

La protéine nucléaire *CREST* (pour « calcium-responsive transactivator ») est un autre facteur intervenant dans la régulation Ca²⁺-dépendante du développement des dendrites (Puram et Bonni, 2013). *CREST* agit comme régulateur transcriptionnel en servant d'intermédiaire entre les signaux calciques et d'autres facteurs régulant la transcription, tel que ceux d'un complexe impliqué dans le remodelage de la chromatine, *nBAF* (pour « *neuron-specific chromatin remodeling Brg/Brm-associated factor complex* ») (Puram et Bonni, 2013; Vogel-Ciernia et Wood, 2014). *nBAF* régule la morphogenèse dendritique en fonction de l'activité neuronale ainsi que la plasticité synaptique et la mémoire à long terme (Vogel-Ciernia et al., 2013; Wu et al., 2007).

Un autre facteur de transcription régulé par l'activité neuronale et très important à la fois pour la morphogenèse dendritique, la plasticité synaptique et la mémoire à long terme, est la protéine *CREB* (pour « *cAMP responsive element binding protein* ») (Puram et Bonni, 2013). Cette dernière fait d'ailleurs partie d'une des voies de signalisation régulant l'expression génique et qui se démarque en particulier, car requise pour un large éventail de formes de plasticité à long terme, dans des structures et des systèmes différents, chez diverses espèces (Alberini et Kandel, 2014). Il s'agit de la signalisation déclenchée par l'adénosine

monophosphate cyclique (AMPc ou *cAMP*), relayée au noyau par la PKA et stimulant l'activité transcriptionnelle de *CREB*. *CREB* est liée aux éléments CRE (pour « *cAMP response element* ») et lorsque la PKA se déplace au noyau phosphoryle *CREB*, ce dernier stimule la transcription de plusieurs gènes qui, d'une part, maintiennent la PKA active, et d'autre part, favorise le développement des structures synaptiques. Cependant, *CREB* est aussi régulée par plusieurs autres voies de signalisation et peut être phosphorylée par différentes protéines kinase (Cortes-Mendoza, Diaz de Leon-Guerrero, Pedraza-Alva et Perez-Martinez, 2013). L'entrée massive de Ca^{2+} dans le neurone postsynaptique par les récepteurs NMDA et les canaux calciques voltage-dépendants dans le cadre de la PLT engendres des signaux calciques qui se propagent au soma et y activent notamment la protéine kinase CamKIV, qui peut alors être transférée au noyau pour y activer *CREB* lorsque cette dernière est liée aux éléments CaRE (pour « *Ca2+ response element* ») (Cortes-Mendoza et al., 2013; Puram et Bonni, 2013).

Dans ces conditions, *CREB* déclenche l'expression de gènes dits « à réponse immédiate » ou nommés *IEG* (pour « *immediate early gene* ») à l'intérieur de quelques minutes (Rosenberg et al., 2014). Parmi les gènes *IEG* activés par *CREB*, il y a le gène *c-fos*, codant pour le facteur de transcription Fos (Cortes-Mendoza et al., 2013). Fos stimule la transcription de gènes à réponse retardée dont l'expression est importante pour le maintien de la phase tardive de la PLT et la consolidation de la mémoire. En réponse à l'activité neuronale et aux signaux calciques, *CREB* stimule aussi la transcription du gène du facteur neurotrophique *BDNF* (pour « *brain-derived neurotrophic factor* ») qui favorise le développement et la maturation dendritiques ainsi que l'expression et le maintien de la phase tardive de la PLT et la consolidation de la mémoire (Cortes-Mendoza et al., 2013; Puram et Bonni, 2013).

1.3.2) La synthèse protéique dans les neurones

La régulation dynamique de la synthèse protéique est essentielle pour toutes les cellules, incluant les neurones. D'ailleurs, de nombreux travaux, *in vitro* dans différents systèmes

expérimentaux, ainsi qu'*in vivo* dans une variété d'espèces, ont permis de démontrer que la synthèse *de novo* de protéines est nécessaire pour les modifications cellulaires durables sous-tendant certaines formes de plasticité synaptique et de mémoire à long terme (Buxbaum, Haimovich, et al., 2015; Holt et Schuman, 2013). La synthèse des protéines découle d'une succession d'étapes relayant l'information génétique à la machinerie cellulaire produisant les protéines et ces étapes présentent autant de points de régulation (Alberini et Kandel, 2014; Schwanhausser et al., 2011).

1.3.2.1) La synthèse protéique de base dans les neurones

On considère que la majorité des protéines neuronales sont synthétisées dans le soma et qu'un grand nombre de protéines axoniques et dendritiques y sont transportées suivant leur synthèse (Jung et al., 2014; Rosenberg et al., 2014). Des exemples importants de telles protéines sont des enzymes synthétisant des neurotransmetteurs, des composantes membranaires des vésicules synaptiques et des neuropeptides sécrétoires. Les protéines synthétisées dans le soma, mais dont les destinations sont axoniques ou dendritiques sont réparties dans des vésicules distinctes dans le système *trans*-Golgi en fonction de différents motifs présents sur ces protéines, constituant des signaux instructifs pour leur distribution, et de la liaison de ces dernières à des protéines adaptatrices ou organisatrices (Rosenberg et al., 2014).

Les ARN messagers codants pour les protéines membranaires et sécrétoires sont traduits à la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (RER) (Reid et Nicchitta, 2015). Les chaînes polypeptidiques nouvellement synthétisées sont transférées à l'intérieur de la lumière du RER, le plus souvent durant leur élongation en cours de traduction (« transfert cotraductionnel »), et y sont modifiées de façon extensive par plusieurs enzymes (Reid et Nicchitta, 2015; Rosenberg et al., 2014). Lorsque le transfert dans la lumière du réticulum est complet, la protéine produite est souvent vouée à être sécrétée puisque la lumière du système réticulaire/vésiculaire est assimilée à l'environnement extracellulaire lors de l'exocytose et de la fusion membranaire. Par contre, lorsque la translocation est partielle, le polypeptide produit demeure pris dans la membrane, avec une extrémité (N-terminale) exposée à la lumière

vésiculaire et l'autre (C-terminale) exposée au cytoplasme. De nombreux polypeptides transmembranaires peuvent être repliés plusieurs fois à travers la membrane et plusieurs peuvent être regroupés (entre polypeptides semblables) ou combinés (avec des polypeptides différents) (Schwartz et al., 2012a). Les récepteurs de neurotransmetteurs et les canaux ioniques sont des exemples de telles protéines (Rosenberg et al., 2014).

La diffusion passive est un processus trop lent et pas assez dirigé pour assurer la livraison sélective de macromolécules, de particules ou de vésicules aux régions axoniques et dendritiques distales (Rosenberg et al., 2014). Les protéines à destination synaptique doivent donc être transportées activement. Ce transport s'effectue le long des microtubules et des filaments d'actine et est assuré par des moteurs moléculaires (ou protéines motrices), incluant les kinésines et les dynéines qui reconnaissent entre autres les protéines adaptatrices ou organisatrices présentes sur les vésicules (Rosenberg et al., 2014).

1.3.2) Le rôle de la synthèse protéique dans la morphogénèse neuronale et la plasticité synaptique

De nombreuses observations ont permis d'établir que l'activité synaptique entraîne ou augmente la synthèse de plusieurs protéines affectant l'homéostasie neuronale et participant à la plasticité synaptique (Buxbaum, Haimovich, et al., 2015; Holt et Schuman, 2013; Kosik, 2016). Cette synthèse est toutefois nécessaire à l'expression ou au maintien de certains types de plasticité synaptique en particulier, à des phases particulières (Kosik, 2016). De plus, les mécanismes précis régulant la synthèse protéique varient en fonction du type d'activité inductive, du temps et des formes de plasticité synaptique (Alberini et Kandel, 2014; Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014; Kosik, 2016; Rosenberg et al., 2014). Ainsi, l'augmentation de la synthèse de certaines protéines avec un délai en réponse à l'activité synaptique implique généralement une activation transcriptionnelle (Alberini et Kandel, 2014). À titre d'exemple, dans les neurones pyramidaux de la région CA1 de tranches d'hippocampe, la durée de la phase tardive de la PLT est réduite de façon semblable par l'inhibition pharmacologique de la synthèse protéique (avec l'anisomycine ou l'émétine) ou de la transcription (avec

l'actinomycine D), une preuve indiquant que la phase tardive de la PLT implique une synthèse protéique en partie dépendante de la transcription (Frey et al., 1988). En contraste, dans le même type de neurones et de préparation, l'expression de la DLT dépendante des récepteurs mGluR, est grandement réprimée par l'inhibition pharmacologique de la synthèse protéique (avec l'anisomycine ou le cycloheximide), mais est insensible à l'inhibition de la transcription (avec l'actinomycine D), des indications que cette forme particulière de DLT requière une synthèse protéique rapide indépendante de la transcription (Huber, Kayser et Bear, 2000).

1.3.2.1) La régulation générale de la traduction dans les neurones

Le contrôle de la traduction constitue un moyen important pour les cellules d'induire des changements rapides de la quantité de protéines (Jung et al., 2014). D'ailleurs, l'abondance d'une protéine donnée est davantage corrélée avec le taux de traduction de son ARNm correspondant qu'avec l'abondance de ce dernier (Schwanhauser et al., 2011). La traduction est régulée par un large éventail de mécanismes, incluant des changements dans la quantité et l'activité des composantes traductionnelles de bases : les ribosomes, les facteurs de traduction et les ARN de transfert (ARNt) (Jung et al., 2014).

Une des étapes de contrôle de la traduction les mieux connues est la phosphorylation des facteurs de traduction et des facteurs régulateurs associés, particulièrement des facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction nommés *eIF* (pour « *eukaryotic (translation) initiation factor* ») (Jung et al., 2014). Tous les ARNm transcrits dans le noyau possèdent chacun une structure de coiffe à leur extrémité 5' (« 5' *cap* », en amont de la région 5' *UTR*), nécessaire à la stabilité de l'ARNm dans le cytoplasme et permettant l'initiation de la traduction (Sonenberg et Hinnebusch, 2009). Deux complexes macromoléculaires sont impliqués dans l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe (« *cap-dependent* »), le complexe eIF4F liant la coiffe et le complexe 43S de préinitiation.

1.3.2.1.1) La régulation du complexe eIF4F

Le complexe eIF4F lie la coiffe 5' et est composé des facteurs eIF4A (une enzyme hélicase

d'ARN), eIF4E (une protéine liant la coiffe) eIF4G (une protéine organisatrice ou d'« échafaudage » reliant eIF4A et eIF4E) (Jackson et al., 2010; Sonenberg et Hinnebusch, 2009). Ainsi, après avoir reconnu et lié la coiffe de l'ARNm (par l'entremise d'eIF4E), le complexe eIF4F défait (avec l'activité hélicase d'eIF4A) la structure secondaire près de l'extrémité 5' et favorise ainsi la liaison du complexe de préinitiation 43S (43 *Svelta* : poids moléculaire de la sous-unité ribosomale de 40S associée aux facteurs eIF1A, eIF2 et eIF3).

La formation du complexe eIF4F est régulée par l'état de phosphorylation des protéines de la famille *4E-BP* (pour « *eIF4E-binding protein* ») (Jackson et al., 2010; Sonenberg et Hinnebusch, 2009). Les protéines *4E-BP* et eIF4G ont en commun le même motif permettant la liaison à eIF4E. Puisqu'eIF4E est généralement moins abondant que les autres protéines eIF, les protéines *4E-BP* sont en compétition avec eIF4G pour la liaison à eIF4E (Jung et al., 2014). Toutefois, lorsque les protéines *4E-BP* sont phosphorylées, elles perdent leur affinité pour eIF4E, laissant la place à eIF4G et permettant l'assemblage du complexe eIF4F (Sonenberg et Hinnebusch, 2009). La phosphorylation des protéines *4E-BP* est contrôlée principalement par le complexe enzymatique *mTORC1* (pour « *mTOR complex 1* ») contenant la protéine kinase *mTOR* (pour « *mammalian/mechanistic target of rapamycin* ») (Lipton et Sahin, 2014; Sonenberg et Hinnebusch, 2009). *mTORC1* phosphoryle et contrôle aussi les protéines kinase phosphorylant la protéine ribosomale S6 (*S6K*, pour « *S6 kinase* ») qui elles-mêmes phosphorylent plusieurs autres facteurs régulant l'initiation de la traduction (S6, eIF4B et PDCD4) (Costa-Mattioli et Monteggia, 2013). Ainsi, l'activité de *mTORC1* stimule à travers plusieurs mécanismes la traduction (Bockaert et Marin, 2015; Jung et al., 2014; Lipton et Sahin, 2014; Sonenberg et Hinnebusch, 2009).

L'activité de *mTORC1* est quant à elle stimulée par la petite GTPase *Rheb* (pour « *Ras homology enriched in brain* ») (Bockaert et Marin, 2015; Costa-Mattioli et Monteggia, 2013; Lipton et Sahin, 2014). *Rheb* est inhibée par les protéines stimulant son activité GTPase, les protéines *TSC* (pour « *tuberous sclerosis complex* »). Les protéines *TSC* constituent un point de convergence pour plusieurs voies de signalisation intracellulaire et elles sont inactivées lorsque phosphorylées, entre autres par les protéines kinase Akt, MAPK/ERK (pour « *mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase* ») ou RSK1 (pour

« *ribosomal S6 kinase* ») (Bockaert et Marin, 2015; Costa-Mattioli et Monteggia, 2013; Lipton et Sahin, 2014).

Ainsi, l'activité des protéines kinase Akt, MAPK/ERK et RSK1 stimule de façon générale la traduction dépendante de la coiffe (Jung et al., 2014; Lipton et Sahin, 2014). Dans les neurones, les voies de signalisation associées à ces kinases sont activées notamment par la liaison de neurotrophines à des récepteurs de type tyrosine kinase, par les influx de Ca^{2+} à travers les récepteurs NMDA et canaux calciques voltage-dépendants ainsi que les récepteurs du mGluR (Bockaert et Marin, 2015; Costa-Mattioli et Monteggia, 2013). En somme, la présence de certaines neurotrophines et la transmission synaptique peuvent déclencher des voies de signalisation qui mènent à la phosphorylation des protéines *4E-BP* permettant la formation de complexes eIF4F sur les ARNm et favorisant ainsi de façon générale leur traduction (Jung et al., 2014).

1.3.2.1.2) La régulation du complexe 43S

Pour une très grande majorité d'ARNm, le début de la séquence codante traduite en chaîne polypeptidique est indiqué par le triplet de nucléotides (codon) AUG (situé à l'intérieur d'un motif nommé séquence de Kozak) auquel correspond un ARN de transfert (ARNt) portant l'acide aminé méthionine (Buffington, Huang et Costa-Mattioli, 2014; Jackson et al., 2010). Ainsi, le premier acide aminé de la presque totalité des chaînes peptidiques est la méthionine apportée par un ARNt initiateur (Mét-ARNt^{Mét}). Le facteur eIF2, lié à un groupement guanosine-5'—triphosphate (GTP), forme un complexe (structure ternaire) avec le Mét-ARNt^{Mét}. Ce complexe, avec d'autres facteurs eIF, lie la petite sous-unité ribosomale 40S (S : *Svelta*, unité de poids moléculaire) pour former le complexe 43S de préinitiation (Jackson et al., 2010; Sonenberg et Hinnebusch, 2009).

Le complexe eIF4F liant la coiffe recrute le complexe 43S de préinitiation, formant alors le complexe 48S d'initiation (Jung et al., 2014). Débutant près de la coiffe 5' (et progressant en direction 3'), le complexe 48S d'initiation parcourt la région non traduite 5', appelée 5'UTR (pour « *5' untranslated region* »), en amont de la séquence codante de l'ARNm. Lorsque le complexe 48S rencontre le codon d'initiation, eIF2, une enzyme GTPase, hydrolyse la GTP

qui y est liée en guanosine diphosphate (GDP) et phosphate inorganique (P_i) (Jackson et al., 2010; Sonenberg et Hinnebusch, 2009). Cette hydrolyse mène au recrutement de la grosse sous-unité ribosomale et le détachement de facteurs eIF, dont eIF2 liée à la GDP (eIF2-GDP), permettant la formation du complexe ribosomal 80S (constitué des sous-unités 40S et 60S).

La traduction dépendante de la coiffe nécessite ainsi le facteur eIF2 dans sa forme liée à la GTP (eIF2-GTP). Suivant l'hydrolyse de la GTP et la libération d'eIF2-GDP, les stocks de eIF2-GTP doivent donc être reconstitués pour permettre le maintien de la traduction dépendante de la coiffe (Buffington et al., 2014; Jung et al., 2014). Ce processus est assuré par eIF2B, agissant comme facteur d'échange du nucléotide guanine nommé GEF (pour « *guanine exchange factor* ») pour eIF2. La phosphorylation de la sous-unité alpha d'eIF2 (eIF2 α) inhibe l'activité GEF d'eIF2B et réduit la traduction dépendante de la coiffe (Sonenberg et Hinnebusch, 2009). Inversement, une réduction de la phosphorylation d'eIF2 α (ou sa déphosphorylation) stimule l'activité GEF d'eIF2B et par conséquent la traduction générale. La phosphorylation d'eIF2 α est d'ailleurs réduite en réponse à une variété de stimuli induisant des changements durables de l'efficacité synaptique, tels que l'entraînement comportemental, une stimulation synaptique répétée, l'application de BDNF ou encore l'activation de la PKA (due à une l'augmentation de cAMP engendrée par l'activation pharmacologique de l'adénylate cyclase avec la forskoline) (Buffington et al., 2014).

La phosphorylation d'eIF2 α peut être opérée par plusieurs kinases, dont potentiellement trois dans les neurones (Buffington et al., 2014; Jung et al., 2014). La première, PKR, est activée par l'ARN double brin qui caractérise certaines infections virales. La deuxième, PERK (pour « *PKR-endoplasmic reticulum related kinase* »), est activée par les protéines du RE mal repliées ou anormalement agrégées, et GCN2 (pour « *general control nonderepressible-2* »), est activée entre autres par une carence en acides aminés (constituants des chaînes peptidiques). D'ailleurs, la phase tardive de la PLT et la formation de la mémoire à long terme sont facilitées dans les souris dépourvues (par ingénierie génétique) de GCN2 ou de PKR, dans lesquelles la phosphorylation d'eIF2 α est notamment réduite dans l'hippocampe (Buffington et al., 2014). Réciproquement, l'inhibition pharmacologique des phosphatases déphosphorylant eIF2 α (avec Sal003), ayant pour effet d'augmenter la proportion d'eIF2 α

phosphorylé, interfère avec la phase tardive de la PLT et la formation de mémoire à long terme.

Ainsi, les preuves convergent quant à l'effet répressif qu'exerce la phosphorylation d'eIF2 α sur la traduction dépendante de la coiffe dont l'apport est fortement prédominant pour la traduction générale, c'est-à-dire parmi l'ensemble des types de traduction, et important pour plusieurs formes de plasticité synaptique (Jung et al., 2014). Cependant, la traduction d'un petit sous-ensemble d'ARNm qui contiennent des cadres de lecture ouverte en amont, nommés uORF (pour « *upstream open reading frame* »), dans leur région 5'UTR est favorisée lorsque paradoxalement eIF2 α est phosphorylée et la traduction générale est atténuée (Sonenberg et Hinnebusch, 2009). Les ARNm de la β -sécrétase et d'ATF4 (pour « *activating transcription factor 4* »), initialement identifié comme étant CREB-2 (un facteur répressif bloquant la liaison de CREB-1), constituent des exemples d'ARNm avec uORF ayant des rôles importants dans l'homéostasie neuronale et la plasticité synaptique (Buffington et al., 2014; Jung et al., 2014).

1.3.2.2) La synthèse protéique localisée dans les dendrites

Le positionnement subcellulaire d'une protéine est déterminant quant à la nature de sa fonction (Hanus et Schuman, 2013; Rosenberg et al., 2014). Le déplacement d'ARNm spécifiques à l'intérieur d'une cellule, avant d'être traduits en réponse à des signaux localisés, apparait comme un mécanisme important de contrôle de la localisation des protéines, grandement conservé d'un point de vue évolutif et critique à la morphogenèse et à la plasticité neuronales (Alvarez-Castelao et Schuman, 2015; Cajigas et al., 2012; Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014; Kosik, 2016). La synthèse protéique localisée dans les dendrites a peu d'incidence quantitative sur le transcriptome (le profil global des transcrits ou ARNm) et le protéome (le profil global des protéines) du neurone pris dans son ensemble (Kosik, 2016; Rosenberg et al., 2014). Par contre, les mécanismes entraînant et régulant cette synthèse localisée aux ou près des sites postsynaptiques, confèrent une grande précision spatiale et

temporelle à la régulation post-transcriptionnelle de certains ARNm dans les dendrites et apparaissent essentiels aux processus cellulaires sous-jacents aux fonctions neuronales, en particulier pour l'expression de plusieurs formes de plasticité dans les circuits neuraux du cerveau (Alvarez-Castelao et Schuman, 2015; Cajigas et al., 2012; Hanus et Schuman, 2013; Jung et al., 2014; Kosik, 2016). De plus, la synthèse localisée de protéines n'apporte pas que de la précision et de la rapidité à la livraison de ces protéines, mais aussi une spécificité à l'état fonctionnel de la nouvelle protéine (Jung et al., 2014). Les protéines d'origine somatique, à la fois celles transitant par le système *trans*-Gogi et celles formant des cargaisons moléculaires transportées par des protéines motrices, subissent typiquement une succession de modifications post-traductionnelles avant d'atteindre leur destination finale (Rosenberg et al., 2014). Ainsi, dans les cas de protéines synaptiques, telles que la sous-unité GluA1 de récepteur AMPA, pouvant être à la fois synthétisées localement ou acheminées depuis le soma ou la zone proximale des dendrites (c'est-à-dire à la base des dendrites primaires), les interactions avec d'autres facteurs et les modifications post-traductionnelles distinguent les protéines d'origine somatique de celles nouvellement synthétisées sur place (Rosenberg et al., 2014).

Les observations dans les dendrites par le biais de la microscopie électronique de structures associées à la traduction d'ARNm en protéines furent parmi les premiers éléments de preuve suggérant une synthèse locale de certaines protéines (Kosik, 2016). Dès 1964, David Bodian rapporta la détection de prolongements de réticulum endoplasmique rugueux (RER) et d'agrégats de ribosomes à la base des terminaisons postsynaptiques de motoneurons dans la moelle épinière de singes macaques et de chimpanzés. De plus, la quantité de ribosomes et de RER semblait corrélée à la taille des protubérances postsynaptiques (assimilable à des épines dendritiques) à la base desquelles ils étaient situés (Bodian, 1965). Ces observations menèrent Bodian à proposer que les compartiments associés à ces protubérances requièrent plausiblement l'apport de matériel protéique qui dépendait en partie d'une synthèse locale.

Steward et Levy (1982) rapportèrent des observations faites dans l'hippocampe de rat, semblables à celles de Bodian dans la moelle épinière de primates presque deux décennies auparavant (Kosik, 2016). Ils démontrèrent qu'il y avait à la base des épines dendritiques des

neurones du gyrus dentelé une localisation préférentielle des polyribosomes, des structures semblables à des colliers de billes, correspondant à des ARNm messagers parcourus par une succession de ribosomes lors de la traduction (Steward et Levy, 1982). Par ailleurs, en étudiant le développement et la structure des dendrites dans des cultures de neurones hippocampiques dissociés, Bartlett et Banker constatèrent que les ribosomes se concentrent aussi aux points de ramification dendritique (Bartlett et Banker, 1984a; Bartlett et Banker, 1984b).

Plusieurs observations ont permis d'établir que l'activité synaptique entraîne la synthèse de protéines importantes dans les dendrites (Alvarez-Castelao et Schuman, 2015; Buxbaum, Haimovich, et al., 2015; Holt et Schuman, 2013; Kosik, 2016). Par exemple, l'application d'un agoniste des récepteurs de l'acétylcholine (le carbachol) de façon conjointe à une stimulation des collatérales de Schaffer activant les récepteurs NMDA de neurones pyramidaux du CA1 induit rapidement (après environ 20 min) une synthèse de protéines dans les dendrites de ces neurones (Feig et Lipton, 1993). De plus, le facteur neurotrophique *BDNF* induit la synthèse de plusieurs protéines dans les synaptoneurosome et les dendrites de neurones hippocampiques et corticaux, dont *Arc*, *CamKII α* , *Homer2* et *LIMK1* (Alvarez-Castelao et Schuman, 2015; Schratt, Nigh, Chen, Hu et Greenberg, 2004; Schratt et al., 2006; Yin, Edelman et Vanderklish, 2002). Par ailleurs, l'activation des récepteurs mGluR (du groupe 1) a été associée à la synthèse de la protéine PSD-95 dans les dendrites corticaux et hippocampiques (Muddashetty et al., 2011).

Par ailleurs, la conception ancienne de l'ARN comme simple intermédiaire inerte entre les gènes et les protéines a été invalidée par des vagues de découvertes à la fois de nouvelles classes d'ARN ne codant pas pour des protéines et de nouveaux mécanismes régulant l'expression génique, tels que la répression des ARNm messagers ciblés par certaines protéines reconnaissant spécifiquement certains motifs (Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014). De tels facteurs et mécanismes favorisent la diversification et la spécialisation des cellules, un phénomène dont les neurones peuvent être considérés un exemple extrême (Buxbaum, Yoon, Singer et Park, 2015; Kosik, 2016). De nombreuses nouvelles fonctions impliquant des ARN non codants ont été mises en lumière dans les années récentes, étendant le rôle connu de l'ARN à une multitude de processus cellulaires, incluant le transport et la

traduction locale d'ARNm induits par stimulation et sous-jacents aux réponses adaptatives des neurones durant la synaptogenèse et la plasticité synaptique (Buxbaum, Yoon, et al., 2015; Holt et Schuman, 2013).

1.3.2.2.1) La localisation et le transport d'ARN messagers dans les dendrites

La synthèse locale de certaines protéines dans une région cellulaire distante du noyau nécessite d'abord l'acheminement des ARNm codants pour ces protéines avant leur traduction (Buxbaum, Yoon, et al., 2015; Jung et al., 2014). Les cellules eucaryotes sont capables de localiser de façon spécifique des ARN à différentes régions ou différents compartiments cellulaires, formant ainsi des domaines fonctionnels distincts au sein de la cellule (Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014; Kosik, 2016). L'observation d'ARNm à l'intérieur des neurones par différents types de microscopie a permis de constater que les ARNm se concentrent particulièrement dans les domaines périphériques, près des structures spécialisées dans la communication synaptique et qui sont particulièrement dynamiques, comme les cônes de croissance des axones et les épines dendritiques (Donlin-Asp, Rossoll et Bassell, 2017; Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014; Kosik, 2016).

Suivant les observations de Steward et Levy (1982), des efforts importants furent consacrés par plusieurs équipes à vérifier si en effet des ARNm étaient transportés et traduits dans les dendrites. Il fut ainsi observé que de l'ARN nouvellement synthétisé dans le noyau, identifié et suivi par radiomarquage (par l'incorporation de ^3H -uridine), était transporté de façon active dans les dendrites de neurones hippocampiques en culture (Davis, Banker et Steward, 1987). À la même époque, un premier ARNm présent dans les dendrites fût identifié par hybridation *in situ* (dans le cortex cérébral en développement du rat) : l'ARNm codant pour la protéine *Microtubule-associated protein 2 (MAP2)*, une composante majeure du cytosquelette spécifique aux dendrites (Garner, Tucker et Matus, 1988). Dans le cadre de la même étude, l'ARNm de la tubuline, une protéine à la fois présente dans les dendrites et l'axone, fut détecté dans le corps cellulaire des neurones, mais non dans les dendrites. Par la suite, plusieurs autres ARNm furent observés dans les dendrites par hybridation *in situ*, tels ceux des protéines *Arc (activity regulated cytoskeleton associated protein)*, β -actine, *BDNF (brain-derived neurotrophic factor)*, *CamKIIa (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II)*, récepteur

tyrosine kinase B (TrkB), *Shank* (Bockers et al., 2004; Burgin et al., 1990; Holt et Schuman, 2013; Kosik, 2016; Mayford, Baranes, Podsypanina et Kandel, 1996; Tiruchinapalli et al., 2003; Tongiorgi et al., 2004; Tongiorgi, Righi et Cattaneo, 1997; Wallace, Lyford, Worley et Steward, 1998).

L'arrivée du séquençage profond de l'ARN par biopuces (« *microarray RNA deep sequencing* ») a permis une expansion très importante du transcriptome répertorié dans différents compartiments subcellulaires (Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014). Il apparaît ainsi aujourd'hui que des ensembles distincts d'ARNm sont ciblés à différents compartiments. Les ARNm dendritiques codent néanmoins pour des protéines appartenant à un large éventail de classes de molécules aux fonctions cellulaires diverses : cytosquelette, récepteurs/canaux, traduction, dégradation, métabolisme et d'autres (Alvarez-Castelao et Schuman, 2015; Donlin-Asp et al., 2017).

1.3.2.2.2) La traduction d'ARN messagers dans les dendrites

La traduction locale d'ARNm dendritiques n'est pas seulement une conséquence de la distribution de ces ARNm, mais une nécessité pour plusieurs fonctions physiologiques des neurones (Alvarez-Castelao et Schuman, 2015; Donlin-Asp et al., 2017; Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014; Kosik, 2016). Ainsi, la traduction des ARNm de *CamKIIa* et de *BDNF* (à 3'UTR longues) spécifiquement dans les dendrites apparaît comme importante pour la plasticité synaptique, entre autres le maintien de la PLT (An et al., 2008; Miller et al., 2002).

D'autre part, par le biais de différentes techniques expérimentales permettant l'isolation des compartiments synaptiques ou dendritiques, il a été possible de démontrer que ces compartiments sont aptes (pour une brève période) à supporter de façon indépendante la traduction des ARNm qui y sont présents sous forme de polyribosomes (Rao et Steward, 1991; Torre et Steward, 1992; Yin et al., 2002). En effet, les dendrites sont équipées des principales composantes de la machinerie traductionnelle, incluant les ribosomes, les ARNt, des facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction ainsi que des éléments nécessaires à la traduction d'ARNm à la membrane du réticulum endoplasmique (Tiedge et Brosius, 1996).

De plus, des études employant la photolyse de MNI-glutamate, une approche expérimentale

permettant la stimulation sélective de synapses individuelles, ont démontré que les épines dendritiques présentent une capacité potentielle à être régulées de façon indépendante par l'activité synaptique (Bosch et al., 2014; Matsuzaki et al., 2004; Meyer et al., 2014; Tanaka et al., 2008; Zito, Scheuss, Knott, Hill et Svoboda, 2009). Cependant, d'autres observations découlant du même type d'approche suggèrent que c'est l'intégration spatio-temporelle des signaux synaptiques au niveau des branches dendritiques qui régule la synthèse protéique nécessaire à la phase tardive de la PLT (Govindarajan, Israely, Huang et Tonegawa, 2011; Kosik, 2016).

1.3.2.2.3) Les mécanismes régulant la localisation et la traduction des ARNm dans les dendrites

La localisation et la traduction des ARNm sont régulées par l'interaction entre des signaux intracellulaires et extracellulaires nombreux et divers (Buxbaum, Haimovich, et al., 2015; Jung et al., 2014). Leur combinaison variable et dynamique entraîne une régulation d'une complexité et d'un raffinement qui semblent encore loin d'être cernés (Buxbaum, Yoon, et al., 2015; Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014; Kosik, 2016).

Par ailleurs, les dendrites de neurones chez les mammifères compteraient en général relativement peu de copies d'un ARNm donné en comparaison du nombre de synapses que ces dendrites comptent (Buxbaum, Wu et Singer, 2014; Kosik, 2016; Steward et al., 1996). Ainsi, les sites postsynaptiques stimulés n'auraient souvent pas à leur disposition l'ensemble du répertoire d'ARNm différents susceptibles de subir une traduction locale dépendante de l'activité synaptique et la probabilité de trouver un ARNm à un endroit donné lorsqu'un événement dépolarisant se produit dépendrait de l'abondance locale et immédiate et de la motilité de l'ARNm (Buxbaum, Haimovich, et al., 2015; Kosik, 2016).

Les granules d'ARN neuronales, aussi nommées ribonucléoprotéines (RNP) de transport, ne sont pas acheminées en un « aller simple » dans les dendrites vers une « destination » synaptique unique et fixe (Holt et Schuman, 2013; Kiebler et Bassell, 2006). Ces granules sont le plus souvent stationnaires et effectuent de façon entrecoupée des déplacements antérogrades

et rétrogrades relativement rapides dont la résultante est le plus souvent un transport antérograde relativement lent vers les régions plus distales des dendrites (Buxbaum, Haimovich, et al., 2015; Kosik, 2016). Ce transport stochastique peut éventuellement se transformer en mouvements oscillatoires dans une zone dendritique particulière ou se terminer par une immobilisation à proximité d'un site postsynaptique ou plus (Buxbaum, Yoon, et al., 2015; Jung et al., 2014; Kosik, 2016; Steward, Wallace, Lyford et Worley, 1998; Yoon et al., 2016).

Toutefois, il est important de noter que la catégorie des granules d'ARN neuronales inclue des granules de composition et de fonction variées (Erickson et Lykke-Andersen, 2011; Fritzsche et al., 2013; Hirokawa, 2006; Kanai, Dohmae et Hirokawa, 2004; Kiebler et Bassell, 2006; Kosik, 2016). D'ailleurs, certaines données issues d'études marquantes touchant la localisation et le transport d'ARN dans les dendrites ne sont pas nécessairement représentatives des comportements propres aux ARNm dendritiques puisqu'obtenues avec des approches ne marquant pas de façon spécifique l'ARN de type messenger (Buxbaum, Haimovich, et al., 2015; Kiebler et Bassell, 2006; Knowles et al., 1996).

Néanmoins, il est bien établi que la présence et le déplacement de plusieurs ARNm dans les dendrites sont accrus par différents types de stimulation reliée à l'activité synaptique (Alvarez-Castelao et Schuman, 2015). Tel est le cas entre autres pour l'ARNm d'*Arc* (« pour *activity regulated cytoskeleton associated protein* »), de *BDNF* (An et al., 2008; Steward et al., 1998; Tongiorgi et al., 2004; Tongiorgi et al., 1997; Wallace et al., 1998) et de la β -actine (Tiruchinapalli et al., 2003; Yoon et al., 2016).

1.3.2.2.3.1) La régulation en *cis* de la localisation et de la traduction des ARN messagers

Le destin de chaque ARNm est déterminé de façon importante par des informations inscrites dans sa séquence, parfois dans la région codante de l'ARNm, mais le plus souvent dans les régions non codantes avoisinantes : la 5'UTR (pour « 5' *untranslated region* ») et la 3'UTR (pour « 3' *untranslated region* ») (Achsel et Bagni, 2016; Buxbaum, Haimovich, et al., 2015; Darnell, 2013; Donlin-Asp et al., 2017; Fritzsche et al., 2013; Holt et Schuman, 2013; Kanai et al., 2004). En effet, la séquence et la structure particulières de chaque ARNm renferment

plusieurs portions ou éléments déterminant l'association de protéines RBP spécifiques dont la combinaison détermine la régulation intrinsèque de la stabilité, de la localisation et de la traduction de chaque ARNm (Achsel et Bagni, 2016; Fritzsche et al., 2013; Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014). Par exemple, la région non codante 3'UTR des ARNm d'*Arc*, de *BDNF* et de *CamKIIa* s'avère déterminante pour la localisation et la traduction de ces ARNm dans les dendrites (An et al., 2008; Blichenberg et al., 2001; Bockers et al., 2004; Buxbaum, Yoon, et al., 2015; Kobayashi, Yamamoto, Maruo et Murakami, 2005; Miller et al., 2002; Rook, Lu et Kosik, 2000).

Par ailleurs, la taille de la région 3'UTR peut varier entre isoformes d'un même transcrit suivant un épissage alternatif et une maturation différentielle. À titre d'exemple, il existe dans le SNC deux isoformes pour l'ARNm de *CamKIIa* et ainsi que pour celui de *BDNF* : un avec une région 3'UTR courte, l'autre avec une région 3'UTR longue (An et al., 2008; Blichenberg et al., 2001; Ghosh et al., 1994; Timmusk et al., 1993). La séquence nécessaire à l'assignation dendritique de l'ARNm de *CamKIIa* est seulement présente dans la 3'UTR de forme longue (Blichenberg et al., 2001). L'ARNm de *BDNF* à 3'UTR courte est restreint au soma alors que l'ARNm à 3'UTR longue se retrouve dans les dendrites des neurones hippocampiques (An et al., 2008). Ainsi, des différences dans les séquences non codantes d'un ARNm, codant par ailleurs pour la même protéine, peuvent engendrer des distributions subcellulaires distinctes (Buxbaum, Yoon, et al., 2015; Leal, Comprido et Duarte, 2014).

1.3.2.2.3.2) La régulation en *trans* de la localisation et de la traduction des ARN messagers

Bien que la synthèse protéique locale dans les dendrites implique la localisation d'ARNm dans les dendrites, cette dernière est soumise à des mécanismes de régulation en partie distincts de ceux contrôlant la traduction des ARNm en chaînes polypeptidiques (Achsel et Bagni, 2016; Buxbaum, Yoon, et al., 2015; Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014). Cette indépendance relative entre la localisation et la traduction d'ARNm a notamment été mise en évidence par le découplage expérimental de ces deux processus pour l'ARNm d'*Arc*, une protéine normalement synthétisée dans les dendrites en réponse à l'activité excitatrice, dans les neurones granulaires de l'hippocampe de rat (Wallace et al., 1998). En effet, Wallace et al. (1998) ont démontré que même lorsque la traduction est inhibée, le transport stimulé de

l'ARNm d'*Arc* dans les dendrites persiste.

Nous savons aujourd'hui que les ARNm localisés dans les dendrites se retrouvent à l'intérieur de complexes ribonucleoprotéiques messagers (RNPM) qui interagissent avec des protéines motrices participant au transport dépendant des microtubules et des microfilaments (Hirokawa, 2006; Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014; Kanai et al., 2004; Kosik, 2016; Leal et al., 2014). Ces complexes RNPM sont formés de combinaisons variables d'une panoplie de facteurs, dont de nombreux facteurs *trans* de régulation de l'ARNm (Erickson et Lykke-Andersen, 2011; Fritzsche et al., 2013; Kanai et al., 2004; Kiebler et Bassell, 2006). Les facteurs *trans* de régulation de l'ARNm sont des molécules, souvent des protéines RBP, liant les éléments *cis* de l'ARNm (Achsel et Bagni, 2016; Darnell, 2013; Donlin-Asp et al., 2017). La transduction des signaux extrinsèques tels que l'activité synaptique régule de façon importante les interactions entre les ARN, les facteurs *trans* de régulation et les protéines motrices et structurelles (Buxbaum, Yoon, et al., 2015; Hirokawa, 2006; Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014; Leal et al., 2014).

1.3.3.2.3) Les protéines liant l'ARN

Les protéines qui lient, transportent, déterminent la localisation ou régulent la traduction des ARNm constituent la famille des protéines liant l'ARN ou protéines *RBP* (pour « *RNA-binding protein* ») (Achsel et Bagni, 2016; Darnell, 2013; Donlin-Asp et al., 2017). Les protéines *RBP* reconnaissent et lient des séquences spécifiques de nucléotides, des motifs caractéristiques ou des structures secondaires particulières constituant des éléments en *cis* des ARNm, situés de façon prédominante dans les régions non codantes 3'*UTR* et 5'*UTR* des ARNm (Buxbaum, Yoon, et al., 2015; Holt et Schuman, 2013; Leal et al., 2014).

Les protéines *RBP* forment des complexes avec des ARNm, des ARN non codants (ARNnc) et des protéines accessoires (Achsel et Bagni, 2016; Darnell, 2013; Gerstberger, Hafner et Tuschl, 2014). Ces complexes, ou du moins une sous-population, sont assemblés dans le corps cellulaire et peuvent s'agréger pour former différents types de granules, dont les RNPM (Achsel et Bagni, 2016; Decker et Parker, 2012; Erickson et Lykke-Andersen, 2011; Hirokawa, 2006; Kiebler et Bassell, 2006). Ainsi une panoplie de protéines de type RBP

interagissent avec les ARNm et entre elles pour réguler le stockage dans des granules cytoplasmiques, le transport dans les dendrites et la traduction des ARNm en réponse aux différents signaux intra et extracellulaires (Achsel et Bagni, 2016; Buxbaum, Yoon, et al., 2015; Holt et Schuman, 2013; Jung et al., 2014).

1.3.3.3.2.3.1) CPEB

CPEB est probablement la mieux caractérisée des familles de protéines jouant un rôle important dans la régulation de la traduction (Darnell, 2013; Leal et al., 2014). Ces protéines contiennent deux domaines de liaison à l'ARN de type RRM. En liant des éléments définis de la région 3'UTR des ARNm ciblés, les protéines CPEB modulent la longueur de la queue polyadénine (poly(A)) des ARNm ciblés et, ce faisant, leur traduction (Achsel et Bagni, 2016). La protéine CPEB1 est présente dans le soma et les dendrites des neurones où elle contribue à induire la polyadénylation et la traduction de plusieurs transcrits (Darnell, 2013; Kiebler et Bassell, 2006). L'importance du rôle joué par CPEB1 dans la régulation traductionnelle dépendante de l'activité neuronale, nécessaire à la plasticité synaptique, a notamment été mise en évidence chez des souris déficientes en CPEB1, présentant des problèmes de mémoire et dont la potentialisation à long terme dans l'hippocampe était réduite (Richter, 2010).

1.3.3.3.2.3.2) ELAV(L)

Les protéines *ELAVL* (chez les mammifères) ont hérité leur nom de la protéine mise en cause dans le phénotype mutant chez la mouche drosophile *ELAV*, pour « *embryonic lethal abnormal visual* » (Homyk, Szidonya et Suzuki, 1980). Ces protéines sont des RBP comptant trois domaines de liaison à l'ARN de type RRM (Darnell, 2013). Chez les mammifères, on compte quatre membres dans la famille des protéines ELAVL, dont trois sont exprimés spécifiquement dans les neurones, Elavl2, Elavl3 et Elavl4 (aussi nommées, respectivement HuB, HuC et HuD; ou collectivement nELAVL, pour « neuronal ELAVL »). L'expression du paralogue Elavl1 (ou HuA/HuR) n'est pour sa part pas restreinte aux neurones. De plus, Elavl1 exerce un effet s'opposant à la répression exercée sur certains ARNm par des microARN (miARN), un type particulier de petits ARN non codants (ARNnc) (Gerstberger et al., 2014).

1.3.3.3.2.3.3) FMRP

La protéine FMRP (pour « *Fragile X mental retardation protein* ») tient son nom du fait que la perte de son expression est responsable de la maladie de l’X fragile, la deuxième plus fréquente cause de retard mental hérité et la plus fréquente cause monogénique connue d’autisme à ce jour (Donlin-Asp et al., 2017). FMRP est une protéine RBP contenant trois domaines pouvant lier l’ARN (deux domaines de type tandem KH et un de type RGG box) et agissant principalement comme répresseur de la traduction en bloquant la progression des ribosomes (« *ribosome stalling* ») sur l’ARNm ciblé, possiblement entre autres en interagissant directement avec le ribosome (Chen, Sharma, Shi, Agrawal et Joseph, 2014)

FMRP régule plusieurs ARNm codant pour des protéines ayant des rôles clés aux sites synaptiques, dont Arc, GluA1, PSD-95, Shank1, ainsi que son propre ARNm (Achsel et Bagni, 2016; Antar et al., 2004; Donlin-Asp et al., 2017). L’importance de la fonction de FMRP est bien sûr mise en évidence par les troubles cognitifs que sa perte entraîne chez les patients humains, mais aussi par les observations faites dans un cadre expérimental avec un modèle pathologique murin (« *Fmr1 knock-out* ») qui exhibe des déficits comportementaux majeurs (Darnell, 2013). Les neurones déficients en FMRP présentent une synthèse protéique excessive, mais dont la précision spatiale et la spécificité pour l’activité synaptique sont grandement réduites, engendrant des défauts dans la maturation des épines dendritiques (Muddashetty, Kelic, Gross, Xu et Bassell, 2007).

1.3.3.3.2.3.4) PABP

Une autre protéine favorisant la traduction des ARNm qu’elle lie est la protéine PABP (pour « *poly(A)-binding protein* ») (Buffington et al., 2014; Darnell, 2013; Kiebler et Bassell, 2006). La protéine PABP, comme son nom l’indique, est une RBP liant la queue poly(A) d’un ARNm (Getsberger et al., 2014). Lorsque PABP est fixée sur la queue poly(A), elle interagit avec le facteur d’initiation de la traduction eIF4G, à la coiffe 5’ de l’ARNm, ce qui engendre la circularisation (le repliement en une grande boucle) de l’ARNm et l’assemblage du complexe eIF4F (Jackson et al., 2010). Ces événements signalent à leur tour le recrutement du complexe 43S de préinitiation et favorisent ainsi l’initiation de la traduction (Buffington et al.,

2014; Jackson et al., 2010). Paradoxalement, la protéine PABP interagit aussi avec des facteurs impliqués dans la déstabilisation et la répression traductionnelle des ARNm exercée par les miARN (Iwakawa et Tomari, 2015; Jonas et Izaurralde, 2015; Wilczynska et Bushell, 2015).

1.3.3.3.2.3.5) NOVA

Les protéines NOVA sont des RBP ayant trois domaines de liaison à l'ARN, des domaines de type KH reconnaissant des regroupements nucléotidiques YCAY (les bases des nucléotides : C, cytosine; A, adénine; Y, une base pyrimidine) (Achsel et Bagni, 2016). L'expression de Nova1 et Nova2 est restreinte aux neurones post-mitotiques dans le SNC et Nova2 est prédominante dans le néocortex (Darnell, 2013). Les protéines NOVA dirigent l'épissage de certains exons dans plusieurs ARN pré-messager codant pour des protéines dendritiques, notamment des récepteurs de neurotransmetteurs et des canaux ioniques. Pour certains isoformes, cet épissage touche la région 3'UTR et constitue une première forme de régulation de la localisation d'ARNm par NOVA (Darnell, 2013). Cette situation constitue donc un exemple exceptionnel de facteurs *trans*, les protéines NOVA, déterminant des éléments de régulation en *cis*, la séquence de l'ARNm mature. Toutefois, NOVA peut aussi moduler la localisation (et vraisemblablement la traduction) d'un ARNm mature en demeurant lié à la région 3'UTR (Darnell, 2013). À titre d'exemple, NOVA régule l'ARN de la sous-unité alpha 2 du récepteur de la glycine (*GlyRa2*, pour « *glycine receptor subunit alpha 2* ») à la fois à l'étape de l'épissage et dans la localisation dendritique du transcrit mature (Darnell, 2013).

1.3.3.3.2.3.6) Stau

Les protéines Staufen (Stau) sont des protéines RBP jouant un rôle majeur dans la localisation d'un grand nombre d'ARNm, dans de nombreux processus développementaux et adaptatifs et chez une diversité d'organismes (Heraud-Farlow et Kiebler, 2014). Les protéines Stau ont la particularité d'avoir des domaines (quatre, chez les mammifères) liant l'ARN double brin, dits de type dsRBD (pour « double-stranded RNA-binding domain »), reconnaissant certaines structures secondaires formées par l'ARN selon plusieurs combinaisons possibles (Heraud-Farlow et Kiebler, 2014; Martin et Ephrussi, 2009). Premièrement, il peut s'agir de structures

intramoléculaires formées au sein d'un ARNm (en *cis*). Deuxièmement, il peut s'agir de structures intramoléculaires formées au sein d'un long ARNnc. Troisièmement, il peut s'agir d'un appariement intermoléculaire entre un long ARNnc et un ARNm. Finalement, il semble que dans certains cas particuliers, il peut s'agir d'un appariement intermoléculaire entre des portions des régions 3'UTR de deux ARNm.

Dans les neurones, les protéines Stau sont particulièrement importantes pour permettre d'assurer le ciblage et le transport d'ARNm, dont celui de CamKII α et de MAP1b, dans les dendrites (Heraud-Farlow et Kiebler, 2014). Il a aussi été rapporté que Stau1 modulerait l'expression de la PLT alors que Stau2 régulerait une forme particulière de DLT, dépendante des récepteurs mGluR, (Lebeau et al., 2008; Lebeau et al., 2011). De plus, Stau2 apparaît jouer un rôle important dans la morphogenèse des épines dendritiques (Vidigal et Ventura, 2015).

1.3.3.3.2.3.7) TDP-43

La protéine TDP-43 (pour « *TAR DNA-binding protein of 43 kDa* ») n'est pas strictement une protéine de type RBP à localisation cytoplasmique, tel que son nom laisse l'entendre, et est impliquée à plusieurs étapes dans la régulation de l'expression génique (Ratti et Buratti, 2016). TDP-43 peut ainsi lier l'ADN simple brin dans des régions promotrices pour moduler la transcription de certains gènes (Ederle et Dormann, 2017). Dans le noyau, TDP-43 intervient aussi dans l'épissage de plusieurs pré-ARNm en liant des introns particulièrement longs (Ratti et Buratti, 2016). Dans le cytoplasme, cette protéine lie entre autres la région 3'UTR et peut interagir avec plusieurs autres protéines RBP, dont FMRP et Staufen1, pour réguler la localisation, la stabilité ou la traduction de plusieurs ARNm, dont notamment celui de la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA (Ederle et Dormann, 2017).

1.3.3.3.2.3.8) ZBP

Les protéines ZBP forment une famille de RBP, à quatre motifs de type KH liant l'ARN, bien étudiées pour leur capacité à réguler la localisation d'ARNm dans les neurones (Darnell, 2013; Kiebler et Bassell, 2006). Ce rôle dans les dendrites fut d'abord mis en évidence pour ZBP1 dans la localisation et la traduction de l'ARNm de la β -actine dans les dendrites (Achsel et Bagni, 2016; Donlin-Asp et al., 2017). Le transport de l'ARNm de la β -actine impliquant

ZBP1 apparaît notamment être régulé par l'activité des récepteurs NMDA (Tiruchinapalli et al., 2003; Yoon et al., 2016).

1.3.3.3.2.4) Les ARN non codants

La découverte des ARN non codants a mis en lumière un énorme et insoupçonné potentiel de régulation touchant la stabilité et la traduction des ARNm (Holt et Schuman, 2013).

1.3.3.3.2.2.1) Les longs ARN non codants

Les assemblages avec les longs ARNnc présents dans le cytoplasme participent à la régulation post-transcriptionnelle en dirigeant l'assemblage de diverses machineries moléculaires sur des ARN messagers contenant des motifs de reconnaissance spécifiques pour moduler la stabilité et la traduction de ces ARN (Briggs, Wolvetang, Mattick, Rinn et Barry, 2015). Les longs ARNnc peuvent aussi influencer la régulation traductionnelle en agissant comme cibles compétitives détournant de leurs cibles « normales » certains petits ARNnc (dont traite la section 4).

1.3.3.3.2.2.2) Les petits ARN non codants

Les premiers petits ARNnc à être identifiés et décrits sont les petits ARN interférents (siARN ou « *siRNA* », pour « *small interfering RNA* »), les microARN (miARN) et les ARN interagissant avec Piwi (piARN ou « piRNA », pour « Piwi-interacting RNA ») (Aalto et Pasquinelli, 2012). Ces sous-types de petits ARNnc ont été classifiés en fonction de leurs voies de biogenèse et de leurs mécanismes régulateurs distincts. Toutefois, ils ont la caractéristique commune de présenter des séquences complémentaires à des séquences contenues par les acides nucléiques (ADN ou ARN) qu'ils ciblent et de réprimer l'expression des gènes codés par ces cibles (Aalto et Pasquinelli, 2012).

1.4) La voie des microARN

Les microARN (miARN) sont une classe de petits ARN non codants endogènes, qui déterminent le destin des ARN messagers (ARNm) en induisant en général la déstabilisation de ces derniers ou une répression de leur traduction (Iwakawa et Tomari, 2015; Jonas et Izaurralde, 2015; Vidigal et Ventura, 2015; Wilczynska et Bushell, 2015). Un grand nombre de sites de liaison de miARN sur les ARNm sont largement conservés à travers les espèces (Ebert et Sharp, 2012; Friedman, Farh, Burge et Bartel, 2009). Cette observation corrobore bien l'importance de la régulation exercée par les miARN sur un large éventail de processus physiologiques, incluant la prolifération et la différenciation cellulaires, la mise en place des programmes développementaux et des réponses adaptatives (Ebert et Sharp, 2012; Iwakawa et Tomari, 2015).

1.4.1) Les microARN

Les miARN sont des brins simples d'ARN pouvant varier entre 19 à 24 nucléotides de long, en moyenne 22, dont la séquence est partiellement complémentaire à des séquences se trouvant sur les ARN messagers (Ebert et Sharp, 2012; Fischer, 2015; Gurtan et Sharp, 2013; Jonas et Izaurralde, 2015; Leung, 2015). Par ailleurs, le répertoire de miARN s'accroît avec la taille du génome et la complexité des organismes d'une part, mais aussi d'autre part, durant le développement embryonnaire (Ebert et Sharp, 2012; Heimberg, Sempere, Moy, Donoghue et Peterson, 2008; Lee, Risom et Strauss, 2007). À ce jour, plus de 2000 miARN ont été identifiés dans le génome humain (Iwakawa et Tomari, 2015).

1.4.1.1) La biogenèse des microARN

Les séquences codant pour les miARN se retrouvent dans divers types d'unités fonctionnelles contenues dans l'ADN (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014; Yang et Lai, 2011).

De nombreux gènes produisant spécifiquement des miARN ont été découverts chez les organismes multicellulaires (Ebert et Sharp, 2012; Vidigal et Ventura, 2015). Beaucoup de miARN proviennent aussi d'introns de gènes codant pour des protéines (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014; Hansen et al., 2016; Westholm et Lai, 2011; Yang et Lai, 2011). D'autres miARN sont issus d'unités transcriptionnelles produisant aussi de longs ARNnc (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Rodriguez, Griffiths-Jones, Ashurst et Bradley, 2004; Rother et Meister, 2011). Les introns sont des segments qui sont systématiquement retirés des transcrits d'ARN par excision, alors que les exons sont des segments qui peuvent être retenus pour former les transcrits matures, durant le processus d'épissage de l'ARN (Westholm et Lai, 2011).

Les miARN, tels que les autres ARN fonctionnels, codants et non codants, sont générés à travers une succession d'étapes qui débute avec la transcription d'ADN en ARN et se poursuit avec des processus de maturation des transcrits (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014; Yang et Lai, 2011). L'expression d'une majorité des miARN découle initialement, tel que c'est le cas pour les ARNm codant pour des protéines, de la transcription de l'ADN en ARN par l'enzyme ARN polymérase II (Pol II) dans le noyau cellulaire (Ameres et Zamore, 2013; Lee et al., 2004). Il existe néanmoins quelques exceptions. De petits ARN assimilables à des miARN, tels que ceux dérivés d'ARN de transfert (ARNt) ou d'origine virale, sont transcrits par l'ARN polymérase III (Pol III) (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014; Yang et Lai, 2011). Tout comme les gènes codant pour des protéines, l'expression des miARN est modulée entre autres par plusieurs facteurs de transcription et des mécanismes de régulation épigénétique, tels que la méthylation de l'ADN et des modifications des histones (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014).

L'ARN simple brin renfermant la séquence du miARN, le miARN primaire (pri-miRNA), est beaucoup plus long que le futur miARN comme tel (Ameres et Zamore, 2013; Ha et Kim, 2014; Lee, Jeon, Lee, Kim et Kim, 2002; Lee et al., 2004). Par repliement du simple brin et appariement complémentaire (les bases des nucléotides) de certaines portions du brin, le pri-miARN forme des structures secondaires de type « tige-boucle » (« *stem-loop* ») (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014; Yang et Lai, 2011). Un pri-miARN typique

(monocistronique) comprend une tige (de 33 à 35 paires de bases de long), où se retrouve généralement la séquence du miARN (seule partie conservée dans la forme mature), une boucle au sommet de la tige et deux segments d'ARN non appariés à la base de la tige, correspondant aux deux extrémités (3' et 5') du transcrit (Ha et Kim, 2014). Toutefois, certains pri-miARN (polycistroniques) comprennent plusieurs structures « tiges-boucles » et renferment ainsi plusieurs séquences de miARN (Lee et al., 2002).

Suivant sa transcription, le pri-miARN subit plusieurs étapes de maturation (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014; Lee et al., 2002; Yang et Lai, 2011). Dans la voie canonique, la première étape est initiée dans le noyau cellulaire par la liaison de Drosha, une enzyme de type RNase III, c'est-à-dire une endonucléase ciblant spécifiquement de l'ARN double brin (Ameres et Zamore, 2013; Kim, Kim et Kim, 2016; Westholm et Lai, 2011). Avec DGCR8, son cofacteur essentiel, Drosha forme le complexe microprocesseur et clive la tige du pri-miARN, près de sa base (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014). En résulte le pré-miARN : une structure plus petite dans laquelle la boucle terminale et une portion de la tige double brin sont conservées et dont la forme est qualifiée d'« épingle à cheveux » (« *hairpin* ») (Ameres et Zamore, 2013; Yang et Lai, 2011). Par ailleurs, une panoplie de facteurs module l'activité du complexe microprocesseur, dont certaines autres protéines lient l'ARN (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014). Aussi, certains mécanismes alternatifs (non canoniques) de biogenèse de miARN contournent le complexe microprocesseur (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Yang et Lai, 2011). C'est notamment le cas des mirtrons, des pré-miARN directement issus de l'épissage et de la maturation de courts introns et non de pri-miARN (Ha et Kim, 2014; Westholm et Lai, 2011).

Alors qu'il est encore dans le noyau cellulaire, le pré-miARN est reconnu et lié par la protéine Exportine 5 (EXP5; du gène *XPO5*) associée à un cofacteur RAN-GTP, permettant le transport à travers un pore nucléaire et la libération du pré-miARN dans le cytoplasme (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Kim et al., 2016). Les pré-miARN cytoplasmiques sont reconnus par la protéine Dicer, une autre enzyme de type RNase III (Ha et Kim, 2014). Une fois chargé et stabilisé par Dicer, le pré-miARN est clivé de sorte que la boucle terminale est retirée. En résulte un duplex de miARN, en moyenne 22 nucléotides de long, qui demeure lié à *Dicer* (Ha

et Kim, 2014). *In vitro*, *Dicer* est suffisant seul, sans cofacteur ou partenaire, pour permettre le clivage du pré-miARN (Finnegan et Pasquinelli, 2013). Cependant, dans les cellules mammifères, l'efficacité de *Dicer* est accrue par son interaction avec deux autres protéines liant l'ARN double brin, la *TRBP* (pour « *TAR RNA-binding protein* ») et la *PACT* (pour « *protein activator of PKR* ») (Chendrimada et al., 2005; Gregory, Chendrimada, Cooch et Shiekhattar, 2005; Ha et Kim, 2014). La *TRBP* contribue aussi au transfert du duplex de miARN mature de *Dicer* à une protéine Argonaute (AGO) (Meister, 2013).

Une fois chargés sur une protéine AGO, les deux brins de miARN sont généralement déroulés et séparés (Meister, 2013). Un des brins, qualifié de miARN ou brin guide, est retenu par la protéine AGO, alors que l'autre brin, qualifié de miARN* ou brin passager est éjecté (Ameres et Zamore, 2013; Yang et Lai, 2011). Après avoir été éjectés, les miARN* sont le plus souvent rapidement dégradés par des nucléases cytoplasmiques, de sorte que leur abondance est marginale dans le bassin des miARN matures (Ha et Kim, 2014). Toutefois, il apparaît que la détermination entre le brin guide et le brin passager peut varier entre différents tissus, stades développementaux ou conditions cellulaires pour certains miARN en particulier (Finnegan et Pasquinelli, 2013).

1.4.1.2) La régulation post-transcriptionnelle par les microARN

Le miARN simple chargé sur la protéine AGO est alors apte à lier d'autres ARN par complémentarité (Meister, 2013). Cet appariement entre les nucléotides du miARN et un autre ARN est le plus souvent imparfait et implique de façon prépondérante la portion 5' du miARN couvrant les nucléotides 2-7 ou 2-8, qualifiée de région ou séquence « *seed* » (Ameres et Zamore, 2013; Bartel, 2009; Friedman et al., 2009; Iwakawa et Tomari, 2015). Chaque miARN peut ainsi cibler jusqu'à des centaines de transcrits différents (Friedman et al., 2009; Jonas et Izaurralde, 2015; Vidigal et Ventura, 2015). La très grande majorité des sites de liaisons des miARN sur les ARNm se retrouvent dans la région non traduite 3'UTR (Iwakawa et Tomari, 2015; Vidigal et Ventura, 2015).

La région 3'UTR d'un ARNm contient en général plusieurs sites de liaison de miARN (Ebert

et Sharp, 2012; Friedman et al., 2009; Vidigal et Ventura, 2015). Le plus souvent, ce sont des sites pour différents miARN, mais il y a aussi des cas où un même transcrite contient de multiples sites pour un même miARN (Mayr, Hemann et Bartel, 2007; Vidigal et Ventura, 2015; Wilczynska et Bushell, 2015). Par ailleurs, les transcrits codant pour des protéines spécifiquement exprimées dans certains tissus tendent à avoir une région 3'UTR plus longue et renfermant davantage de sites de liaison de miARN (Ebert et Sharp, 2012; Shenoy et Blelloch, 2014; Stark et al., 2005). L'effet d'un seul miARN sur le taux protéique d'une cible est modeste, ce taux étant réduit en moyenne par un facteur inférieur à deux (<50 %) (Baek et al., 2008; Ebert et Sharp, 2012). Cependant, l'effet répressif combiné de plusieurs miARN ciblant le même transcrite surpasse l'effet d'un seul miARN, un phénomène qualifié de coopérativité des miARN (Ebert et Sharp, 2012; Friedman et al., 2009; Shenoy et Blelloch, 2014; Wilczynska et Bushell, 2015).

Par ailleurs, il peut aussi y avoir compétitivité entre sites de liaison de miARN, lorsque ceux-ci se chevauchent ou sont seulement accessibles de façon mutuellement exclusive (Shenoy et Blelloch, 2014; Wilczynska et Bushell, 2015). Il existe aussi une compétitivité entre différents ARNm ayant des sites de liaison pour un même miARN (Ebert et Sharp, 2012; Shenoy et Blelloch, 2014; Wilczynska et Bushell, 2015). De plus, il existe une forme de réciprocité entre les miARN et leurs cibles. Plus certains miARN particuliers sont abondants, plus le nombre des transcrits qu'ils ciblent spécifiquement tend à être réduit par dégradation, alors que plus ces transcrits sont abondants, plus ils séquestreront les miARN qui les ciblent, réduisant leur disponibilité et leur probabilité de se lier à d'autres ARNm (Wilczynska et Bushell, 2015).

1.4.1.3) Le complexe de « mise sous silence » induit par les microARN

En ciblant un ARNm, le miARN et la protéine AGO forment le complexe de « mise sous silence » induit par les microARN ou *miRISC* (pour « *microRNA-induced silencing complex* ») (Meister, 2013). En s'associant à des cofacteurs, le *miRISC* réprime la traduction de l'ARNm ciblé, réduit la stabilité de ce dernier et peut entraîner sa dégradation (Fabian et Sonenberg, 2012; Finnegan et Pasquinelli, 2013; Iwakawa et Tomari, 2015; Jonas et Izaurralde, 2015;

Wilczynska et Bushell, 2015).

1.4.1.3.1) Les différents états/formes du complexe RISC

Le complexe *miRISC* est parfois aussi simplement appelé *RISC* (pour « *RNA-induced silencing complex* »), mais cette désignation englobe aussi sans distinction le complexe *siRISC* (pour « *small interfering RNA-induced complex* »), formé spécifiquement par la protéine Ago2 (chez les mammifères) avec un petit ARN interférent (siARN ou *siRNA*, pour « *small interfering RNA* ») (Meister, 2013). L'action des siARN et de la protéine Ago2 au sein des complexes *siRISC* est fonctionnellement distincte de celle des miARN et des protéines AGO (incluant Ago2) au sein des complexes *miRISC*, tel que cela sera plus amplement détaillé dans la section suivante (4.2) traitant des protéines AGO (Iwakawa et Tomari, 2015; Meister, 2013).

La formation du complexe *miRISC* est dans la très grande majorité des cas précédée par celle du complexe de chargement du *RISC*, parfois nommé RLC (pour « *RISC-loading complex* »), et dont l'acteur principal est Dicer (Ha et Kim, 2014; Meister, 2013). Dans sa forme minimale, le complexe de chargement du *RISC* est composé de la protéine *Dicer*, du duplex miARN/*miARN porté par *Dicer*, et d'une protéine AGO en contact avec *Dicer* (Meister, 2013). Toutefois, l'action des protéines TRBP et HSP90 (pour « *heat shock protein 90* ») est en général requise pour que Dicer procède à la maturation du duplex et pour que complexe de chargement du *RISC* puisse transférer le duplex à une protéine AGO de façon efficace (Chendrimada et al., 2005; Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014; Meister, 2013). Dans les cellules mammifères, HSP90 apparaît stabiliser les protéines AGO non chargées (un rôle joué par la HSC70, pour « *heat shock cognate* » chez la drosophile) et leur faire adopter une conformation ouverte permettant leur chargement avec le duplex d'ARN (Johnston, Geoffroy, Sobala, Hay et Hutvagner, 2010; Meister, 2013; Pare et al., 2009).

Une fois le brin passager éliminé, la protéine AGO chargée uniquement du miARN simple brin (brin guide) constitue le cœur du complexe *miRISC*, apte à cibler les ARNm contenant au moins un élément de reconnaissance ou site de liaison de pour ce miARN (Ha et Kim, 2014; Meister, 2013). Toutefois, suivant la liaison à sa cible, le complexe *miRISC* tend à recruter une protéine GW182 (pour « *glycine-tryptophan (GW) repeat containing protein of 182 kDa* »),

qui apparaît être en général nécessaire à l'action répressive des miARN (Iwakawa et Tomari, 2015; Jonas et Izaurralde, 2015). Pour cette raison, GW182 est souvent considéré comme une composante du *RISC* (Fabian et Sonenberg, 2012; Wilczynska et Bushell, 2015).

1.4.1.3.2) Les modes d'action du complexe miRISC

La liaison *miRISC* à GW182 entraîne la déadénylation de l'ARNm ciblé, c'est-à-dire le raccourcissement, de la queue poly(A) présente à l'extrémité 3' de l'ARNm (Iwakawa et Tomari, 2015; Jonas et Izaurralde, 2015). La queue poly(A) est une structure protégeant l'ARNm contre les nucléases cytoplasmiques et permettant la liaison de protéines PABP (Jackson et al., 2010; Jonas et Izaurralde, 2015). Lorsque le complexe *miRISC* et la protéine GW182 lient la région 3'UTR d'un ARNm, GW182 recrute le complexe CCR4-NOT (Iwakawa et Tomari, 2015; Wilczynska et Bushell, 2015).

Ces étapes initient les processus responsables de la répression exercée par le *miRISC* sur un ARNm ciblé, qui comprennent la répression de la traduction, la déadénylation, le retrait de la coiffe (« *decapping* ») et la dégradation 5'—à-3' de l'ARNm (Jonas et Izaurralde, 2015). Des travaux précoces dans le domaine des microARN suggéraient que ceux-ci affectaient principalement la traduction des ARNm ciblés et beaucoup de données sont venues démontrer l'importance de ce mode de répression (Fabian et Sonenberg, 2012; Olsen et Ambros, 1999; Wilczynska et Bushell, 2015). Toutefois, il a aussi été démontré que le complexe *miRISC* peut entraîner la déstabilisation et la dégradation d'ARNm ciblés (Iwakawa et Tomari, 2015; Jonas et Izaurralde, 2015).

1.4.1.3.2.1) La déstabilisation et la dégradation des ARNm ciblés par le miRISC

GW182 peut recruter, en plus du complexe CCR4-NOT, le complexe PAN2-PAN3 (Iwakawa et Tomari, 2015; Wilczynska et Bushell, 2015). Ces deux complexes catalysent la déadénylation des ARNm ciblés par *miRISC*. Selon un modèle proposé, les deux complexes agiraient de façon séquentielle : le complexe PAN2-PAN3 initierait la déadénylation et CCR4-NOT la poursuivrait (Jonas et Izaurralde, 2015). Suivant une déadénylation extensive, la coiffe 5' de l'ARNm est retirée par l'enzyme Dcp2 (pour « *decapping protein 2* »), dont l'activité est stimulée par Dcp1, apparentée à Dcp2 (Fabian et Sonenberg, 2012; Jonas et Izaurralde, 2015).

Une fois dépourvu de sa queue poly(A) et de sa coiffe, l'enzyme exoribonucléase 1 (XRN1), partant de l'extrémité 5' et progressant vers l'extrémité 3', dégrade de façon irréversible l'ARNm (Iwakawa et Tomari, 2015; Jonas et Izaurralde, 2015).

Aujourd'hui, les mécanismes sous-tendant la déstabilisation et la dégradation des ARNm ciblés par les miARN apparaissent mieux cernés que ceux impliqués dans la répression de la traduction (Iwakawa et Tomari, 2015; Jonas et Izaurralde, 2015). Cependant, la contribution relative de la dégradation des ARNm dans la régulation de leur expression par les miARN demeure incertaine et controversée (Wilczynska et Bushell, 2015). Certaines données supportent le rôle prédominant de la dégradation des ARNm ciblés parmi les effets des miARN (Eichhorn et al., 2014; Guo, Ingolia, Weissman et Bartel, 2010; Hendrickson et al., 2009; Jonas et Izaurralde, 2015). Toutefois, plusieurs preuves importantes indiquent que la répression de la traduction précède la dégradation des ARNm ciblés par les miARN et que la déadénylation de l'ARNm n'est pas nécessaire à la répression exercée par les miARN (Bazzini, Lee et Giraldez, 2012; Bethune, Artus-Revel et Filipowicz, 2012; Djuranovic, Nahvi et Green, 2012; Fabian et Sonenberg, 2012; Fukao et al., 2014; Meijer et al., 2013; Wilczynska et Bushell, 2015).

1.4.1.3.2.2) La répression de la traduction des ARNm ciblés par le miRISC

Plusieurs mécanismes affectant différentes étapes de la traduction des ARNm ont été proposés et pourraient coexister dans le cadre de la régulation exercée par les miARN (Iwakawa et Tomari, 2015; Wilczynska et Bushell, 2015). Toutefois, les preuves s'accumulent en faveur d'une action touchant principalement le processus d'initiation de la traduction dépendante de la coiffe. L'interaction du complexe miRISC et de la protéine GW182 n'induit pas seulement la déadénylation et la dégradation subséquente de l'ARNm ciblé, mais aussi la répression de sa traduction (Iwakawa et Tomari, 2015). GW182 interagit avec la protéine PABP liée à la queue poly(A) de l'ARNm ciblé et cette interaction pourrait perturber l'initiation de la traduction de plusieurs façons (Iwakawa et Tomari, 2015; Wilczynska et Bushell, 2015).

Lorsque liée à la queue poly(A) d'un ARNm, la protéine PABP favorise le recrutement du complexe eIF4F (en liant eIF4G) à la coiffe 5' et la circularisation de l'ARNm (Fabian et

Sonenberg, 2012; Jackson et al., 2010). Les protéines GW182 et eIF4G interagissent avec PABP de façon mutuellement exclusive (Wilczynska et Bushell, 2015). Ainsi, en interagissant avec PABP, GW182 inhibe l'interaction de PABP avec eIF4G et compromet l'initiation de la traduction (Fabian et Sonenberg, 2012; Iwakawa et Tomari, 2015; Wilczynska et Bushell, 2015). De plus, comme mentionné précédemment (sous-section 4.1.3.2.2), GW182 recrute le complexe CCR4-NOT et déclenche la déadénylation (possiblement à travers PAN2-PAN3) de l'ARNm ciblé par le *miRISC* (Jonas et Izaurralde, 2015). La déadénylation pourrait entre autres mener à la dissociation de PABP ou empêcher sa réassociation (Iwakawa et Tomari, 2015).

De plus, certaines études ont mis en évidence une interaction entre le *miRISC* et d'autres composantes du complexe eIF4F, les facteurs eIF4A ayant une activité enzymatique dépendante de l'ATP et agissant comme hélicase de l'ARN (de type DEAD-box) (Fukao, Aoyama et Fujiwara, 2015; Jackson et al., 2010; Meijer et al., 2013; Wilczynska et Bushell, 2015). Certains auteurs ont identifié le paralogue eIF4A2 comme le facteur clé relayant la régulation exercée par *miRISC* au complexe eIF4F et expliquent ce rôle par la forte corrélation observée entre la présence de sites de reconnaissance de miARN dans la région 3'UTR et la présence de structures secondaires dans la région 5'UTR (Meijer et al., 2013). En effet, l'activité hélicase des facteurs eIF4A contribue à défaire ces structures pour linéariser l'ARNm messenger, ce qui permet le recrutement ou la progression (« *scanning* ») du complexe de préinitiation 43S (Jackson et al., 2010; Wilczynska et Bushell, 2015). Dans une autre étude, il a été rapporté que le *miRISC* favorise la libération des facteurs eIF4A (1 et 2) précédant la dissociation des autres facteurs du complexe eIF4F, soit eIF4E et eIF4G, des ARNm ciblés (Fukao et al., 2014). Fukao et al. (2014) ont aussi démontré que les ARNm devenaient résistants à la répression exercée par les miARN lorsque les facteurs eIF4A interagissaient préférentiellement avec HuD/Elavl ou étaient contraints pharmacologiquement à demeurer liés à ces ARNm. De plus, les facteurs eIF4A sont délogés indépendamment de la déadénylation des ARNm (Fukao et al., 2014).

En dépit de la controverse touchant l'ordre dans lequel interviennent généralement la répression de la traduction et la dégradation des ARNm et la contribution relative de ces

modes de répression à la régulation post-transcriptionnelle globale, il est maintenant bien établi que certains ARNm ciblés par des miARN sont réprimés au niveau de la traduction sans être dégradés (Fabian et Sonenberg, 2012; Iwakawa et Tomari, 2015; Jonas et Izaurralde, 2015; Wilczynska et Bushell, 2015). En effet, plusieurs études ont rapporté des cas où la mise sous silence de certains ARNm ciblés par des miARN peut être renversée et la traduction de ces ARNm peut être initiée ou réactivée dans certaines conditions (Fabian et Sonenberg, 2012; Wilczynska et Bushell, 2015). Un tel phénomène serait d'ailleurs de première importance dans la localisation d'ARNm dans les dendrites et leur traduction en réponse à l'activité neuronale (Banerjee, Neveu et Kosik, 2009; Jung et al., 2014; Schratt et al., 2006; Smalheiser, 2014).

1.4.2) Les protéines Argonaute

Le gène et la protéine correspondante ont été décrits sous l'appellation Argonaute (AGO) pour la première fois dans le cadre d'une étude caractérisant les effets de la délétion d'un gène qui n'avait alors pas encore été caractérisé, *AGO1*, dans la plante *Arabidopsis thaliana* (Bohmert et al., 1998). En raison de la forme des feuilles recroquevillée de la plante mutante qui rappelait la forme des tentacules du mollusque céphalopode *Argonauta argo*, le nom d'Argonaute avait alors été choisi pour identifier ce gène et sa protéine.

Les protéines Argonaute sont grandement conservées à travers l'évolution et sont retrouvées dans tous les domaines de la vie (Swarts et al., 2014). Alors que les protéines Argonaute procaryotes (pAGO) prennent part à des mécanismes d'interférence de l'ADN, les protéines Argonaute eucaryotes, dirigent un large éventail de processus de régulation génique impliquant plusieurs classes de petits ARNnc (Meister, 2013; Swarts et al., 2014). Les protéines Argonaute sont présentes chez une majorité d'organismes eucaryotes, quoique l'estimation de la proportion varie au sein de la littérature (Meister, 2013; Swarts et al., 2014).

La classification des protéines Argonaute n'est pas consensuelle et varie en fonction des auteurs (Meister, 2013; Sasaki, Shiohama, Minoshima et Shimizu, 2003; Swarts et al., 2014).

Une classification proposée et acceptée par plusieurs auteurs stipule que chez les organismes eucaryotes la grande famille des Argonaute comprend la sous-famille ou le clade des protéines PIWI et la sous-famille ou le clade des protéines AGO ou eIF2C (pour « *eukaryotic initiation factor 2 C* ») (Meister, 2013; Sasaki et al., 2003). Le nématode *Caenorhabditis elegans* constitue à ce jour une exception avec un troisième clade identifié : les protéines WAGO (Meister, 2013). Une autre classification plus récente, qui tient compte des protéines AGO procaryotes (pAGO) et dont les auteurs soutiennent qu'elle s'appuie systématiquement sur des comparaisons des structures protéiques et des analyses phylogénétiques, décrit plutôt les protéines AGO comme appartenant à la superfamille des protéines PIWI, que ces auteurs définissent par la présence d'un domaine PIWI (Swarts et al., 2014).

En dépit de cette controverse, la terminologie AGO/eIF2C fait toujours référence aux protéines eucaryotes impliquées dans la voie des petits ARN interférents (siARN) ou des microARN (miARN) (Meister, 2013; Sasaki et al., 2003; Swarts et al., 2014). La structure des protéines AGO est caractérisée principalement par la présence de deux motifs ou domaines hautement spécialisés dans les interactions avec l'ARN : le domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), à proximité du milieu de la séquence peptidique, et le domaine PIWI (nommé d'après la protéine Piwi d'abord caractérisée chez *Drosophila melanogaster*), dans la région carboxy-terminale de la chaîne peptidique (Kuhn et Joshua-Tor, 2013; Meister, 2013; Sasaki et al., 2003; Song, Smith, Hannon et Joshua-Tor, 2004; Swarts et al., 2014).

1.4.2.1) Les différences fonctionnelles parmi les protéines Argonautes

Les mammifères possèdent quatre protéines différentes appartenant à la sous-famille AGO et impliquées dans la voie des miARN : Ago1, Ago2, Ago3 et Ago4 (Meister, 2013; Sasaki et al., 2003; Swarts et al., 2014). Cependant, seul Ago2 possède une activité endonucléase nommée *Slicer* (s'apparentant à une activité hélicase de type RNase H), déclenchée lors d'une complémentarité parfaite entre brins d'ARN et entraînant le clivage du brin opposé au brin guide (Iwakawa et Tomari, 2015; Meister, 2013). Ainsi, l'activité endonucléotique d'Ago2 clive le brin passager lorsqu'il y a appariement parfait au centre et sur la plus grande portion

du duplex de miARN ou sur toute la longueur du duplex, tel que dans le cas des siARN (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014; Meister, 2013).

Par ailleurs, lorsqu'Ago2 est chargé d'un siARN ou d'un miARN guide se liant avec une complémentarité parfaite à l'ARN ciblé, ce dernier est aussi clivé par *Slicer* (Iwakawa et Tomari, 2015; Meister, 2013). Les deux segments d'ARN ainsi produits ont chacun une extrémité non protégée qui se retrouve exposée aux nucléases cytoplasmiques et sont donc rapidement dégradés (Ameres et Zamore, 2013; Meister, 2013). En contraste, le même appariement entre petit ARNnc et ARN ciblé, lorsqu'opéré par une des trois autres protéines AGO, ne mène pas au clivage de ce dernier (Iwakawa et Tomari, 2015; Meister, 2013). Ainsi, dans le cas des siARN, le clivage opéré par Ago2 intervient à la fois lors de l'élimination du brin passager du duplex de siARN et lors de la dégradation de l'ARN ciblé (Ha et Kim, 2014; Meister, 2013). La dégradation rapide et irréversible d'ARNm déclenchée par *Slicer* apparaît toutefois ne contribuer que de façon marginale à la régulation de la traduction et de la stabilité des ARNm exercées par les protéines AGO dans les cellules mammifères (Fischer, 2015; Iwakawa et Tomari, 2015; Meister, 2013).

Néanmoins, l'activité catalytique d'Ago2 intervient dans plusieurs autres processus cellulaires impliquant l'ARN, dont notamment des mécanismes alternatifs de biogenèse des miARN (Ha et Kim, 2014; Meister, 2013; Yang et Lai, 2011). Ainsi, certains pré-miARN non typiques, présentant un appariement accru au milieu de la tige, peuvent être assujettis à un clivage par Ago2 (Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014). Dans ces cas, le brin 3' de la tige du pré-miARN peut être clivé pour produire une forme intermédiaire de pré-miARN (*ac-pre-miRNA* pour « *Ago2-cleaved precursor microRNA* ») avant la production du duplex par *Dicer* (Diederichs et Haber, 2007). Par contre, dans un cas (miR-451) unique à ce jour, Ago2 se substitue même à *Dicer* pour produire le duplex de miARN (Ha et Kim, 2014; Yang et Lai, 2011; Yang et al., 2010). De plus, l'association de certains miARN à Ago2 entraîne le rognage de leur extrémité 3' (« *miRNA trimming* ») d'un ou quelques nucléotide(s), engendrant ainsi des isoformes d'un même miARN (iso-miR) dont la spécificité diffère quelque peu (Ameres et Zamore, 2013; Juvvuna, Khandelia, Lee et Makeyev, 2012).

1.4.2.2) La régulation des protéines Argonaute

La voie des miARN est elle-même régulée à plusieurs niveaux (Ameres et Zamore, 2013; Finnegan et Pasquinelli, 2013; Ha et Kim, 2014; Meister, 2013; Wilczynska et Bushell, 2015; Jee et Lai, 2014; Leung, 2014). D'abord, le répertoire cellulaire des miARN, tout comme celui des ARNm, est soumis à un strict contrôle transcriptionnel tel qu'illustré par le fait que de nombreux miARN présentent des patrons d'expression spécifiques au type cellulaire, au stade développemental ou à certains signaux physiologiques (Ebert et Sharp, 2012; Shenoy et Blelloch, 2014) Jee et Lai, 2014). Les protéines effectrices directement impliquées dans la voie des miARN sont quant à elles exprimées dans tous les tissus chez les mammifères, quoique leur niveau d'expression soit aussi sujet à une régulation transcriptionnelle dépendante du type et des conditions cellulaires (Shenoy et Blelloch, 2014). Ces différences se répercutent sur l'activité globale de la voie des miARN dans les différents tissus et contextes physiologiques (Jee et Lai, 2014).

La régulation post-transcriptionnelle de la voie des miARN constitue une autre façon par laquelle sa fonction peut être modulée au sein de différents types de cellules et en fonction de différentes conditions (Shenoy et Blelloch, 2014). Cette régulation peut être subdivisée en trois types de processus (Jee et Lai, 2014). Premièrement : divers points de contrôle post-transcriptionnel mènent à des modifications de la séquence et de l'abondance (ou l'expression) intermédiaires dans la biogenèse (pri-miARN et pré-miARN) des miARN, des miARN matures ainsi que des ARNm codant pour les facteurs impliqués dans la voie des miARN (Kim, Heo et Kim, 2010). Deuxièmement, ces facteurs, incluant les protéines AGO, peuvent subir des modifications post-traductionnelles altérant leur conformation et déterminant leur fonction (Meister, 2013). Troisièmement, la disponibilité et l'activité de facteurs auxiliaires viennent moduler les effets exercés par le complexe *miRISC* (Jee et Lai, 2014).

1.4.2.2.1) Les modifications post-traductionnelles des protéines Argonaute

La nécessité absolue des protéines AGO dans la régulation exercée par les miARN et leur situation centrale dans le miRISC, les plaçant à l'interface des miARN et des ARNm cibles font que les processus contrôlant l'abondance et la fonction des protéines AGO ont une

incidence majeure dans la voie des miARN (Juvvuna et al., 2012; Leung, 2015). La régulation post-traductionnelle des protéines AGO en particulier permet une modulation localisée, rapide et flexible des effets exercés par les miARN sur leurs cibles (Meister, 2013).

1.4.2.2.1.1) La phosphorylation d'Ago2

Le type de modifications post-traductionnelles d'AGO le plus étudié est la phosphorylation et la première phosphorylation d'Ago2 rapportée fut celle à la sérine 387 (S387) (Meister, 2013; Zeng, Sankala, Zhang et Graves, 2008). Cette modification favorise la localisation d'Ago2 aux *P-bodies* (pour « *processing bodies* »), un type particulier de granules cytoplasmiques d'ARN (et de protéines) (Decker et Parker, 2012; Horman et al., 2013; Zeng et al., 2008). La phosphorylation de S387 a d'abord été décrite comme découlant de la voie de MAPK (pour « *mitogen-activated protein kinase* ») et pouvant être opérée *in vitro* par la protéine kinase MAPKAPK2 (pour « *MAP kinase activated protein kinase 2* ») (Zeng et al., 2008). Il a été ensuite rapporté que la phosphorylation de S387 augmentait l'affinité d'Ago2 pour GW182 et la répression de la traduction dans un modèle où Akt3 apparaissait toutefois comme la kinase responsable de cette phosphorylation (Horman et al., 2013). Par contre, une étude récente employant des cellules cancéreuses du colon, a de nouveau impliqué la voie de la MAPK dans la phosphorylation de S387 en trouvant qu'elle était dépendante des protéines kinase MEK1 et II (pour « *MAPK kinase* » I et II) et non d'Akt (McKenzie et al., 2016). De plus, McKenzie et al. (2016) proposent un modèle dans lequel cette phosphorylation supprimerait l'association d'Ago2 avec les endosomes multivésiculaires (EMV; ou *MVEs*, pour « *multivesicular endosome* »), ce qui aurait pour effet d'inhiber la sécrétion de miARN associés à Ago2 par des exosomes.

La phosphorylation d'Y393 a été découverte dans le cadre d'une étude qui visait à identifier des cibles de l'activité kinase du récepteur *EGFR* (pour « *epidermal growth factor receptor* »), stimulée en conditions d'hypoxie (Shen et al., 2013). Shen et al. (2013) ont observé que cette phosphorylation réduisait l'association d'Ago2 à *Dicer* et son cofacteur *TRBP* et la maturation de certains pré-miARN et ils ont donc proposé que l'état de phosphorylation, en régulant le recrutement d'Ago2 au complexe *Dicer-TRBP*, contrôle le chargement de petits duplex d'ARN sur Ago2. Par ailleurs, la protéine phosphatase PTPB1 a

été impliquée dans la déphosphorylation d'Y393 et une augmentation de la répression exercée par Ago2 (Yang et al., 2014). En somme, bien que Y393 soit à proximité de S387 dans Ago2, leurs phosphorylations respectives apparaissent avoir des effets antagonistes dans l'ensemble (Jee et Lai, 2014).

Par ailleurs, une analyse systématique a permis d'identifier plusieurs autres sites de phosphorylation d'Ago2, dont la tyrosine 529 (Y529) (Rudel et al., 2011). Lorsque non phosphorylé, Y529 stabilise l'extrémité 5' du miARN (ou siARN) porté par Ago2 (Jee et Lai, 2014). La phosphorylation de ce site renverse d'ailleurs la répression dépendante des miARN lors de l'activation des macrophages (Mazumder, Bose, Chakraborty, Chakrabarti et Bhattacharyya, 2013). En ce sens, la phosphorylation respective de Y393 et Y529 dans Ago2 semble avoir certaines conséquences semblables, soit une entrave à la liaison de miARN à Ago2 et une forme d'inhibition de la capacité répressive d'Ago2 (Jee et Lai, 2014).

1.4.2.2.1.2) L'ubiquitination et la dégradation des protéines AGO

La ligase d'ubiquitine TRIM71 (aussi connu comme étant Lin-41) a été identifiée comme une enzyme modifiant Ago2 dans des cellules souches embryonnaires (Chang et al., 2012; Loedige, Gaidatzis, Sack, Meister et Filipowicz, 2013; Rybak et al., 2009). Les études ayant mis en lumière cette interaction entre TRIM71 et Ago2 présentent toutefois des conclusions divergentes quant à ses conséquences fonctionnelles (Jee et Lai, 2014). Néanmoins, les résultats d'une ces études indiquent que l'ubiquitination d'Ago2 dans ce contexte peut entraîner sa dégradation, une observation supportée par le lien établi entre l'ubiquitination de protéines et leur dégradation par les protéasomes (Jee et Lai, 2014).

Par ailleurs, une étude touchant des mécanismes sous-jacents à la prolifération des cellules T, un type de cellules immunitaires, a permis de démontrer le lien entre l'ubiquitination d'Ago2 et sa dégradation dépendante des protéasomes (Bronevetsky et al., 2013). De plus, les auteurs ont constaté que l'ubiquitination et la dégradation d'Ago2, stimulées lors de l'activation des cellules T, s'effectuent en parallèle à une baisse généralisée des quantités de miARN menant à un remodelage du répertoire de miARN dans les cellules T activées (Bronevetsky et al., 2013). Cette observation est d'ailleurs supportée par les résultats d'une autre étude démontrant une

nette corrélation entre la présence (disponibilité) de miARN et la stabilité des protéines AGO (Smibert, Yang, Azzam, Liu et Lai, 2013). Smibert et al. (2013) ont observé que la stabilité d'Ago2 est grandement réduite dans des fibroblastes embryonnaires de souris n'exprimant pas la protéine *Dicer* (KO, pour « *knock-out* ») et donc dépourvues d'une très large majorité des miARN matures et fonctionnels (Ha et Kim, 2014). De plus, Ago2 apparaît être protégée de la dégradation dans les cellules *Dicer* KO par l'inhibition pharmacologique des protéasomes ou l'expression de pré-miR-451, un pré-miARN atypique dont la maturation est indépendante de *Dicer* (tel qu'expliqué à la sous-section 4.2.1) et requière plutôt l'activité endonucléotique d'Ago2 (Ha et Kim, 2014; Yang et al., 2010).

Une des premières modifications post-transcriptionnelles décrites pour les protéines AGO a été l'hydroxylation (Jee et Lai, 2014). Il a été démontré que la proline 700 (P700) dans la séquence peptidique d'Ago2 subissait une prolyl-4-hydroxylation opérée par l'enzyme C-P4H(I) (pour « *type I collagen proly 4-hydroxylase* ») (Qi et al., 2008). Une étude subséquente a permis de démontrer que cette modification stabilise Ago2 et par conséquent augmente la quantité et l'activité globale des miARN (Wu et al., 2011).

Par ailleurs, dans certaines conditions de stress cellulaire, les protéines AGO subiraient une poly-ADP-ribosylation (PARylation) qui contribuerait à inhiber leur action répressive (Leung, 2015). De plus, la PARylation des protéines AGO serait corrélée à leur localisation aux granules de stress, un type de granules cytoplasmiques d'ARN et de protéines (fonctionnellement distinctes des *P-bodies*), qui incluent d'ailleurs plusieurs enzymes PAR glycohydroxylases et PAR polymérase pouvant opérer la PARylation de protéines (Jee et Lai, 2014).

Finalement, les protéines peuvent subir l'ajout de molécules SUMO (pour « *small ubiquitin-like modifier* ») (Leung, 2015). La SUMOylation d'Ago2 à sa lysine 402 (K402) a d'abord été rapportée comme réduisant sa stabilité (Lipton et Sahin, 2014). En raison de sa proximité à ce site, Sahin et al. (2014) suggèrent d'ailleurs que la phosphorylation d'Y393 pourrait avoir une influence sur la SUMOylation de K402. Peu de temps après, les résultats obtenus par une autre équipe de recherche suggéraient que la SUMOylation d'Ago2 au même site était nécessaire pour l'activité *Slicer* d'Ago2 induite par les siARN (Josa-Prado, Henley et Wilkinson, 2015).

1.4.3) La voie des microARN dans le système nerveux

Le développement SNC nécessite l'intégration de plusieurs niveaux de régulation génique (tel qu'élaboré à la section 3) (Abernathy et Yoo, 2015; Davis, Haas et Pocock, 2015). Une multitude de preuves s'accumulent pour suggérer que les miARN sont des médiateurs clés des programmes géniques durant le développement neuronal et la plasticité synaptique (Abernathy et Yoo, 2015; Aksoy-Aksel, Zampa et Schratt, 2014). En effet, la flexibilité, la réversibilité potentielle et la relative rapidité que permet la régulation traductionnelle impliquant les miARN apportent une précision temporelle et spatiale déterminante dans la formation des réseaux neuronaux et pour les adaptations sous-tendant la plasticité synaptique (Smalheiser, 2014)

1.4.3.1) La fonction des microARN dans les neurones

Les études du profil d'expression des miARN, notamment celles plus récentes employant le séquençage profond (« *deep-sequencing* »), indiquent que des centaines de miARN sont exprimés dans le cerveau à tous les stades développementaux (Bicker, Lackinger, Weiss et Schratt, 2014; Smalheiser, 2014). Le rôle fondamental et critique joué par la voie des miARN dans les neurones a notamment été mis en évidence par plusieurs études s'attardant à observer les effets de l'ablation de *Dicer*, une manipulation ayant pour effet d'inhiber la maturation de la très grande majorité des miARN et d'annuler en grande partie l'activité du miRISC, dans le cerveau de différents modèles expérimentaux (Bicker et al., 2014).

Ainsi, l'importance fonctionnelle de la voie des miARN dans le développement neural a été mis en évidence pour une des premières fois par une étude décrivant les effets de la suppression de *Dicer* dans le développement du SNC du poisson zébré et rapportant de graves défauts de formation souvent létaux (Giraldez et al., 2005). Plusieurs études utilisant la souris

comme modèle ont ensuite démontré que l'ablation de *Dicer* dans diverses régions du cerveau interfère avec la survie des neurones et le développement neural (Davis et al., 2008; Huang, Liu, Huang, Zhao et Cheng, 2010). De façon surprenante, il a été rapporté que la suppression de *Dicer* dans le cerveau antérieur des souris juvéniles (âgées de huit à dix ans) mène à une amélioration de l'apprentissage et de la mémoire (Konopka et al., 2010). Paradoxalement, le même type de manipulation dans des souris adultes beaucoup plus âgées entraîne des signes de neurodégénérescence, tels qu'une perte neuronale dans l'hippocampe, un amincissement cortical et l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Hebert et al., 2010). Ces effets en apparence contradictoires pourraient être dus, outre la durée de l'ablation de *Dicer* et les possibles effets cumulatifs, au fait que des ensembles distincts de miARN sont exprimés au cours des différents stades développementaux, tel que décrit dans le tableau I.

Tableau I. Les miARN impliqués dans les différents stades développement et les processus neuronaux chez les mammifères.				
Processus	Prolifération des cellules souches et progéniteurs neuraux	Spécification/différenciation neuronale		Neuritogenèse (morphogenèse neuronale précoce)
miARN identifiés	let-7 miR-9 miR-25 miR-124 miR130b miR-132 miR-134 miR-135a2 miR-302-367	let-7 let-7a let-7b let-7d miR-9 miR-9* miR-124 miR130b miR-137 miR-200		miR-9 miR-22 miR-124 miR-125b miR-128 miR-132 miR-134 miR-228 miR-379-410
Références	(Davis et al., 2015; Yang et al., 2016)	(Davis et al., 2015; Yang et al., 2016)		(Davis et al., 2015)
Processus	Synaptogenèse	Plasticité synaptique et structurelle		
miARN identifiés	miR-132 miR-134 miR-138	miR-26a miR-29a/b miR-34c miR-92 miR-124 miR-125a/b miR-128b	miR-129 miR-132 miR-134 miR-135 miR-137 miR-138 miR-182	miR-188-5p miR-191 miR-195 miR-206 miR-223 miR-485 miR-501-3p
Références	(Davis et al., 2015)	(Aksoy-Aksel et al., 2014; Bicker et al., 2014; Hu et Li, 2017; Ye, Xu, Su et He, 2016)		

1.4.3.1.1) Le rôle des microARN dans le développement neuronal

Il apparaît maintenant manifestement que les miARN régulent à la fois des boucles de rétroaction positive et négative (« *feedback* » et « *feedforward* ») durant le développement neuronal, menant à des changements majeurs dans l'expression génique et constituant un mécanisme additionnel favorisant la complexification et la spécialisation des composantes (Abernathy et Yoo, 2015). En raffinant l'expression génique, les miARN contribuent à établir les transitions développementales et à déclencher des changements de destin cellulaire (Abernathy et Yoo, 2015; Ebert et Sharp, 2012).

L'activité des miARN est d'ailleurs étroitement coordonnée avec les réseaux transcriptionnels qui dirigent les programmes développementaux, la différenciation et la morphogenèse neuronale (Abernathy et Yoo, 2015; Bian, Xu et Sun, 2013). De nombreux miARN présentent une expression dépendante des stades du développement neuronal (van Spronsen et al., 2013; Wibbrand et al., 2012). Durant le développement précoce, les miARN apparaissent favoriser de façon prédominante la prolifération des précurseurs, puis la différenciation neuronale, alors qu'à des stades plus tardifs les miARN apparaissent servir souvent de freins moléculaires momentanés ou réversibles à la traduction des ARNm dendritiques durant la synaptogenèse et la plasticité synaptique (Bicker et al., 2014).

1.4.3.1.2) Le rôle des microARN dans la plasticité synaptique et structurale

Des rôles importants pour un grand nombre de miARN ont été mis en cause dans différents aspects de la plasticité neuronale (tableau 1; (Bicker et al., 2014). En effet, une panoplie de miARN ont été mis en cause dans la traduction de plusieurs protéines jouant un rôle de premier plan dans la transmission synaptique et la plasticité des épines dendritiques, dont APT1, Arc, CamKIIa, GluA1, GluA2, GluN2A, GluN2B, Homer, Kv1.1, Limk1, Lypla1, Map1b, p250GAP, PSD-95, Shank (Aksoy-Aksel et al., 2014; Bicker et al., 2014; Smalheiser, 2014). Plusieurs miARN ont aussi été identifiés comme ciblant les ARNm de facteurs de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle impliquée dans la plasticité synaptique et structurale : CPEB, CREB, FMRP, MeCP2, MEF2, PTBP2, Pumilio (Bicker et al., 2014). De nombreux miARN présentent une expression dépendante de l'activité neuronale (Bicker et

al., 2014; Pichardo-Casas et al., 2012; van Spronsen et al., 2013; Wibrand et al., 2012). De plus, l'activité synaptique et neuronale contrôle la régulation exercée par des miARN sur plusieurs de leurs cibles (Aksoy-Aksel et al., 2014; Smalheiser, 2014).

1.4.3.1.2.1) La régulation de l'expression des microARN par l'activité neuronale

Il est maintenant bien établi que la transcription de différents gènes de miARN qui sont enrichis de façon spécifique dans le cerveau est régulée par l'activité neuronale (Aksoy-Aksel et al., 2014). Ces mécanismes ont d'abord été mis en lumière dans des études s'attardant au gène de miR-132, dont l'expression est induite dans les neurones en culture par divers stimuli reliés à l'activité (Aksoy-Aksel et al., 2014; Wayman et al., 2008). Les voies de signalisation opérant la transduction de ces stimuli affectent l'activation du facteur de transcription CREB (voir sous-section 3.1), liant deux sites CRE (pour « *cAMP-responsive element* ») dans la région du promoteur du gène de miR-132 (Aksoy-Aksel et al., 2014; Klein et al., 2007; Vo et al., 2005).

L'expression du pri-miR132 est modulée de façon particulièrement importante par les paradigmes de stimulation associés à la PLT ou l'activation des récepteurs NMDA (Aksoy-Aksel et al., 2014; Wibrand et al., 2012). Parmi les voies de transduction de ce type d'activité synaptique et neuronale, celles impliquant les protéines kinase de type CamK (pour « *calcium/calmodulin-dependen kinase* ») et MAPK/ERK semblent avoir une influence particulièrement importante pour la transcription de pri-miR-132 (Klein et al., 2007; Vo et al., 2005; Wayman et al., 2008). De plus, de façon semblable à la transcription des gènes à réponse immédiate ou *IEG* codant pour des ARNm tels que celui d'*Arc* (pour « *activity-regulated cytoskeleton protein* »), la transcription de pri-miR-132 induite par *CREB* atteint son maximum relativement rapidement, soit à l'intérieur de deux heures, suivi d'une augmentation plus modeste, mais persistante du taux de miR-132 dans sa forme mature, en parallèle de la traduction des ARNm d'*IEG* (Aksoy-Aksel et al., 2014; Vo et al., 2005; Wibrand et al., 2012).

1.4.3.1.2.2) La régulation de l'activité des microARN par l'activité neuronale

La régulation de la synthèse protéique locale dans les dendrites par l'activité synaptique et neuronale implique une répression réversible de certains ARNm dirigée par les miARN et

exercée par le miRISC (Aksoy-Aksel et al., 2014). Une des premières preuves en faveur de l'existence d'un tel mécanisme a été l'observation de la modulation par le facteur neurotrophique *BDNF* de la répression exercée par miR-134 dans des neurones hippocampiques en culture (Schratt et al., 2006). Schratt et al. (2006) ont démontré que l'effet répressif de miR134 sur la traduction locale était renversé par l'activation de la voie de mTOR (pour « mammalian/mechanistic target of rapamycin ») déclenchée par le *BDNF* (Schratt et al., 2006). De façon intéressante, l'activité de la voie mTOR a aussi été impliquée dans la régulation de la répression exercée par miR-129, mais cette fois de façon positive en favorisant la mise sous silence de l'ARNm de Kv1.1 (une sous-unité de canal potassique voltage-dépendant) (Sosanya et al., 2013). C'est la dissociation de la protéine HuD (ou Elav14) d'une séquence (riche en AU) dans la région 3'UTR de l'ARNm de Kv1.1 qui permettrait la liaison du complexe *miRISC* dans la même région de cet ARNm et entrainerait la répression de sa traduction (Aksoy-Aksel et al., 2014).

Dans une autre étude, il a été démontré que la protéine MOV10, une enzyme hélicase d'ARN et importante partenaire du *miRISC*, est ubiquitinée et dégradée lors d'une dépolarisation membranaire importante ou de l'activation des récepteurs NMDA (Banerjee et al., 2009). Banerjee et al. (2009) ont pu observer une dérégulation de l'ARNm de *Limk1*, ciblé par miR-134, de l'ARNm d'*APT1*, ciblé par miR-138, et d'une sonde munie de la région 3'UTR de l'ARNm de *CamKII α* . Par ailleurs, dans une étude s'attardant à la modulation du miRISC par la protéine FMRP, il a été établi que la phosphorylation de FMRP (à sa sérine 499) favorisait son association à Ago2 chargé de miR-125a et le ciblage de l'ARNm de PSD-95 par ce complexe (Muddashetty et al., 2011). Muddashetty et al. (2011) ont de plus observé que l'activation des récepteurs mGluR (du groupe I) entraînait la déphosphorylation de FMRP favorisant sa dissociation du miRISC et la traduction de PSD-95.

Les résultats de plusieurs autres études (dont les observations n'ont cependant pas toutes été obtenues avec des neurones ou tissus cérébraux) peuvent être d'ailleurs reliés à ceux de Muddashetty et al. (2011) et collectivement contribuent à mettre en lumière le rôle important de FMRP dans la modulation du miRISC (Aksoy-Aksel et al., 2014; Smalheiser, 2014).

En plus d'interagir avec des protéines AGO, FMRP interagit aussi avec *Dicer* dans les

dendrites des neurones épineux dans l'hippocampe et le néocortex de rat (Lugli, Larson, Martone, Jones et Smalheiser, 2005; Smalheiser, 2014). Deuxièmement, la phosphorylation de FMRP favorise sa dissociation de Dicer (Cheever et Ceman, 2009a). Cette influence inverse de la phosphorylation de FMRP sur son interaction avec Dicer *versus* Ago2, suggère que cette modification post-traductionnelle pourrait constituer, ou du moins être impliquée dans, un mécanisme coordonnant FMRP avec les étapes finales de la biogenèse des miARN matures (Aksoy-Aksel et al., 2014; Cheever et Ceman, 2009a, 2009b; Muddashetty et al., 2011; Smalheiser, 2014). Troisièmement, l'activation des mGluR favoriserait l'ubiquitination et la dégradation par les protéasomes de FMRP (Nalavadi, Muddashetty, Gross et Bassell, 2012). La déphosphorylation de FMRP serait d'ailleurs une étape déterminante dans ce processus, en plus de favoriser la dissociation de FMRP du miRISC et la traduction des ARNm ciblés dans les dendrites (Ceman et al., 2003; Muddashetty et al., 2011; Nalavadi et al., 2012). Quatrièmement, FMRP participe au recrutement de MOV10 sur certains ARNm et ensemble FMRP et MOV10 modulent l'association d'Ago2 dans la région 3'UTR de ces ARNm en fonction de la configuration des sites de liaisons ou des éléments de reconnaissance des miARN (Kenny et al., 2014). Ainsi, la régulation activité-dépendante de la répression de certains ARNm par le miRISC s'effectuerait entre autres à travers le contrôle de son interaction avec d'autres protéines RBP, telles que FMRP et MOV10, impliquées dans la régulation de la synthèse protéique locale dans les dendrites (Aksoy-Aksel et al., 2014; Smalheiser, 2014).

1.4.3.2) La fonction des protéines Argonaute dans les neurones

Dans le système nerveux central des mammifères, Ago1 et Ago2 sont les deux formes prédominantes de protéines AGO, ainsi que celles dont les ARNm sont les plus abondants (Juvvuna et al., 2012; Sasaki et al., 2003). Aussi, Ago1 et 2 sont détectés dans le compartiment somatodendritique des neurones excitateurs et de certains interneurons et où ils sont notamment associés à la densité postsynaptique dans l'hippocampe et le néocortex de souris (Lugli et al., 2005; Smalheiser, 2014). De plus, *Dicer*, certains miARN matures et leurs précurseurs (pré-miARN) y sont aussi retrouvés, supportant un engagement fonctionnel des

protéines AGO dans les dendrites et aux synapses (Lugli et al., 2005; Smalheiser, 2014).

1.4.3.2.1) La régulation des protéines Argonaute durant le développement

Durant le développement embryonnaire de la souris, Ago2 est exprimé (en ARNm) de façon très répandue parmi les différents organes et régions de l'embryon, mais est particulièrement enrichi dans le cerveau antérieur de l'embryon de 9,5 jours (E9.5) (Liu et al., 2004).

L'importance de l'expression d'Ago2 pour le développement en général a été mise en évidence de façon dramatique lors de l'observation du développement embryonnaire d'un modèle murin ayant subi une mutation délétère du gène d'Ago2 : à E10.5, les embryons mutants homozygotes (Ago2 — / —) présentaient un développement très retardé avec de nombreuses malformations, dont typiquement un défaut de fermeture du tube neural, aux conséquences létales avant la fin de la gestation (Liu et al., 2004).

Par ailleurs, certaines observations suggèrent qu'au cours du développement, l'expression des deux principales formes d'AGO est régulée de façon différentielle dans le SNC (Juvvuna et al., 2012). Juvvuna et al. (2012) ont aussi constaté que le taux de la protéine Ago2 demeure relativement élevé dans le cerveau entre les phases embryonnaire (E12.5) et adulte (au jour postnatal 60), alors que celui d'Ago1 diminue fortement entre E12.5 et P60. Par ailleurs, la différenciation de neurones sympathiques, lorsque provoquée en culture, a été associée à une augmentation du taux protéique d'Ago2 (Patranabis et Bhattacharyya, 2016). Patranabis et Bhattacharyya (2016) ont de plus rapporté que la phosphorylation d'Ago2 sur une ou plusieurs tyrosines(s) (car détectée de façon non spécifique) était associée au relâchement de la répression exercée par let-7 lors de la différenciation des neurones sympathiques. Finalement, il a été proposé que l'activité du facteur de transcription Ncoa3, principalement en assurant l'expression d'Ago2, favoriserait le développement dendritique, tel qu'observé dans des neurones corticaux primaires en culture (Storchel et al., 2015).

1.4.3.2.2) La régulation des protéines Argonaute par l'activité neuronale

Une étude employant la vidéomicroscopie (« *live imaging* ») de neurones hippocampiques ou hypothalamiques en culture, transfectés pour exprimer la protéine recombinante GFP-Ago2 ou GFP-Dcp1a, a permis l'observation des déplacements de petites granules formées par ces

protéines dans les dendrites (Cougot et al., 2008). Cougot et al. (2008) ont constaté qu'en condition basale environ un tiers des granules formées par GFP-Ago2 et environ un quart de celles formées de GFP-Dcp1, que les auteurs qualifient de *dIP-bodies* pour « *dendritic P-body-like structures* », étaient mobiles et exhibaient des trajectoires rectilinéaires et des vitesses constantes, indiquant un mouvement motorisé. L'activation des récepteurs NMDA (30 μ M pour 15 minutes) induisait une redistribution distale des granules de GFP-Ago2 ou GFP-Dcp1a (sans toutefois de différence détectable après seulement 5 min de stimulation) (Cougot et al., 2008).

De façon intéressante, les granules cytoplasmiques contenant Ago2 et les P-bodies contenant Dcp1 (pour employer la terminologie des auteurs) exhibaient aussi des comportements semblables en réponse à un autre type de stimulation associée à la plasticité synaptique (Zeitelhofer, Karra, et al., 2008). En effet, tel que décrit par Zeitelhofer et al. (2008), l'application de BDNF réduit de façon importante les granules cytoplasmiques contenant Ago2 ainsi que les P-bodies contenant Dcp1, marqués par immunofluorescence, dans les dendrites de neurones hippocampiques en culture. Bien que les déplacements et les changements de distribution observés pour GFP-Ago2 ou GFP-Dcp1, dans des conditions équivalentes, mais de façon séparée (c'est-à-dire dans des préparations distinctes), présentent de grandes similitudes, le double marquage par immunofluorescence des protéines endogènes Ago2 et Dcp1 a révélé que l'activation des récepteurs NMDA menait à une réduction de leur colocalisation, interprétée comme une dissociation de ces deux protéines (Cougot et al., 2008).

Par ailleurs, il a aussi été rapporté que l'activation des récepteurs NMDA affecte l'interaction entre Ago2 et PICK1 (pour « *protein interacting with C kinase 1* »), une protéine contenant entre autres un domaine PDZ (aussi présent dans la protéine PSD-95, voir sous-section 1.3.4.2.1) et associée aux endosomes de recyclage (Antoniou, Baptista, Carney et Hanley, 2014). Ces endosomes et PICK1 sont par ailleurs impliqués dans le trafic des récepteurs AMPA à la membrane (Anggono et Huganir, 2012). Antoniou et al. (2014) ont observé une corrélation inverse entre l'association d'Ago2 avec PICK1 et les endosomes de recyclage et la répression exercée par miR-134. L'activation des récepteurs NMDA dans des

conditions d'activité neuronale réduite, les auteurs ont observé une diminution de l'association entre Ago2 et PICK1. Les auteurs avancent de plus que leur paradigme pour induire une DLT dépendante des récepteurs NMDA favoriserait une augmentation de la répression exercée par les miARN, du moins par miR-134, en entraînant la dissociation d'Ago2 et PICK1 (Antoniou et al., 2014). Cette conclusion contraste toutefois avec la dérégulation associée à l'activation des récepteurs NMDA dans d'autres études (Banerjee et al., 2009; Krol, Busskamp, et al., 2010).

Une étude antérieure avait apporté certains indices quant à un mécanisme potentiel reliant l'activité synaptique aux changements de localisation ou d'interaction des protéines AGO dans les dendrites et leurs épines (Lugli et al., 2005). Les auteurs de cette étude avaient trouvé que l'activité de la calpaïne, une enzyme de type protéase Ca^{2+} -dépendante stimulée dans les dendrites par l'activité des récepteurs NMDA, entraîne une dissociation d'Ago1/2 et de *Dicer* de la PSD (Bingol et Sheng, 2011; Lugli et al., 2005).

CHAPITRE 2 : SUJET ET BUTS DE LA THÈSE

2.1) La problématique sous-jacente

L'homéostasie et la plasticité neuronales requièrent une régulation serrée, mais flexible du métabolisme des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire et les adaptations structurelles (Alvarez-Castelao et Schuman, 2015; Hanus et Schuman, 2013; Rosenberg et al., 2014). La synthèse locale de protéines dans les dendrites joue un rôle critique dans la morphogenèse dendritique et dans plusieurs formes de plasticité synaptique (Ho, Lee et Martin, 2011; Mayford et al., 2012). Cette synthèse requiert le transport d'ARN messagers (ARNm) et la régulation de leur traduction en protéines dans les dendrites (Holt et Schuman, 2013; Kosik, 2016; Swanger et Bassell, 2011; Weiss, Antoniou et Schrott, 2015).

La voie des microARN (miARN) joue un rôle de premier plan dans la régulation de la traduction d'ARN messagers (ARNm) dans le cytoplasme des cellules (Ebert et Sharp, 2012; Leung, 2015). La voie des miARN est elle-même régulée par une machinerie moléculaire au centre de laquelle se retrouvent les protéines Argonaute (Jonas et Izaurralde, 2015; Meister, 2013). Un nombre rapidement croissant d'études mettent en évidence les rôles d'un large éventail de miARN dans la morphogenèse des dendrites et de leurs épines, dans la plasticité synaptique et structurale ou encore dans certaines pathologies neuronales (Aksoy-Aksel et al., 2014; Davis et al., 2015; Hu et Li, 2017; Ryan, Joilin et Williams, 2015; Yang et al., 2016; Ye et al., 2016). Cependant, la régulation et la fonction exactes des protéines AGO demeurent très peu connues dans les neurones (Fu, Shah et Baraban, 2016).

2.2) Le sujet de la thèse

Afin de contribuer à une meilleure connaissance des mécanismes impliquant le complexe miRISC dans le développement et la plasticité des neurones du cerveau, nous avons voulu caractériser **la régulation et la fonction des protéines Argonaute dans les dendrites des neurones hippocampiques.**

2.3) Les buts du projet de doctorat

2.3.1) Les justifications et les objectifs spécifiques de la première étude

Plusieurs études ont démontré que l'activation de divers récepteurs impliqués dans la transmission excitatrice et la plasticité synaptique induit des changements de la localisation d'Ago2 et régule l'activité du miRISC dans les neurones de l'hippocampe (Antoniou et al., 2014; Banerjee et al., 2009; Cougot et al., 2008; Lugli et al., 2005; Lugli, Torvik, Larson et Smalheiser, 2008; Muddashetty et al., 2011; Pai et al., 2014; Wibrand et al., 2010; Zeitelhofer, Karra, et al., 2008). Il apparaît entre autres que l'activation des récepteurs NMDA est de façon générale accompagnée d'une dissociation entre Ago2 et certaines protéines et d'une redistribution d'Ago2 dans les dendrites (Antoniou et al., 2014; Cougot et al., 2008; Lugli et al., 2005). Toutefois, les conséquences fonctionnelles des stimulations impliquant les récepteurs NMDA sur la régulation traductionnelle exercée par le complexe miRISC sont sujettes à des observations et des interprétations divergentes, voire des fois contradictoires (Antoniou et al., 2014; Banerjee et al., 2009; Fu et al., 2016; Joilin et al., 2014; Krol, Busskamp, et al., 2010; Lugli et al., 2008; Pai et al., 2014; Wibrand et al., 2010). De plus, les façons par lesquelles la signalisation découlant des récepteurs NMDA détermine la localisation et la fonction des protéines AGO demeurent inconnues. Nous avons donc entrepris de mettre en lumière **des mécanismes par lesquels l'activité des récepteurs NMDA régule la protéine Ago2 dans les dendrites de neurones de l'hippocampe.**

La stabilité d'Ago2 apparaît comme un aspect majeur régulant sa fonction dans les cellules en général (Bronevetsky et al., 2013; Jee et Lai, 2014; Lipton et Sahin, 2014; Rybak et al., 2009; Smibert et al., 2013; Wu et al., 2011). Par ailleurs, il est bien établi que l'activité synaptique, en particulier l'activité des récepteurs NMDA, entraîne la dégradation de nombreuses protéines dans les dendrites et leurs épines (Bingol et Sheng, 2011; Ehlers, 2003; Hanus et Schuman, 2013). De plus, l'activité des protéasomes et la dégradation de certaines protéines, qui apparaissent être coordonnées avec la synthèse d'autres protéines, sont aussi nécessaires à la plasticité des épines dendritiques de même qu'à l'expression de plusieurs formes de

plasticité synaptique à long terme et à la consolidation de la mémoire (Alvarez-Castelao et Schuman, 2015; Dong, Bach, Haynes et Hegde, 2014; Hamilton et al., 2012; Jarome et Helmstetter, 2013; Rosenberg et al., 2014). Toutefois, la stabilité des protéines AGO n'a pas encore été caractérisée dans les neurones. Afin d'éclaircir la relation entre la signalisation découlant des récepteurs NMDA et la fonction d'Ago2, nous avons entrepris de vérifier si l'activation de ces récepteurs, en plus d'influencer la localisation d'Ago2, modulait sa stabilité.

Par ailleurs, les exemples de régulation d'Ago2 affectant sa localisation, sa stabilité et son interaction avec l'ARN par des modifications post-traductionnelles s'accumulent (Horman et al., 2013; McKenzie et al., 2016; Muller, Schafer, Luhmann et White, 2015; Patranabis et Bhattacharyya, 2016; Rudel et al., 2011; Shen et al., 2013; Yang et al., 2014; Zeng et al., 2008). Toutefois, l'implication de telles modifications sur Ago2 n'a, à notre connaissance, jamais été étudiée dans des neurones centraux, tels que les neurones hippocampiques, ni dans le cadre de la transduction de récepteurs impliqués dans la transmission et la plasticité synaptiques (Aksoy-Aksel et al., 2014). Nous avons jugé qu'il était plausible que les changements de localisation et de stabilité d'Ago2 induits par l'activité des récepteurs NMDA pourraient être engendrés par l'entremise du contrôle de l'état de phosphorylation d'Ago2. Nous avons décidé de concentrer notre attention sur le site de phosphorylation d'Ago2 correspondant à la sérine 387 (S387), qui est une des modifications post-traductionnelles d'Ago2 les mieux caractérisées dans les modèles cellulaires non neuronaux (Horman et al., 2013; McKenzie et al., 2016; Zeng et al., 2008). Nous avons donc voulu vérifier si l'activation des récepteurs NMDA modifiait l'état de phosphorylation de S387 dans Ago2 et si cette modification avait une incidence sur la stabilité d'Ago2.

Par ailleurs, la plasticité structurelle des épines dendritiques est fortement dépendante d'une régulation de la traduction des ARNm par des miARN dans les dendrites (Aksoy-Aksel et al., 2014; Jung et al., 2014; Smalheiser, 2014). De plus, la régulation des modifications post-traductionnelles et de la stabilité de plusieurs protéines RBP sous-tend plusieurs des adaptations prenant part à la plasticité synaptique et homéostatique (Achsel et Bagni, 2016; Aksoy-Aksel et al., 2014; Darnell, 2013; Donlin-Asp et al., 2017). Ainsi, après avoir mis en lumière les liens

entre l'activité des récepteurs NMDA, l'état de phosphorylation et la stabilité d'Ago2, et en tenant compte des impacts connus ou proposés de ces dernières sur la traduction d'ARNm (dans les cellules non neuronales), il nous est apparu probable que l'état de phosphorylation ou la stabilité d'Ago2 aient une incidence sur la plasticité structurale des dendrites (Horman et al., 2013; Jee et Lai, 2014; Meister, 2013; Rybak et al., 2009). Nous avons donc manipulé artificiellement l'état de phosphorylation d'Ago2 pour en observer l'impact sur la morphologie et la maturation des épines dendritiques.

2.3.2) Les justifications et les objectifs spécifiques de la deuxième étude

Dans le système nerveux central des mammifères, Ago1 et Ago2 sont les deux formes prédominantes d'AGO. Cependant, leurs différences fonctionnelles dans ces neurones demeurent inexplorées. Les résultats de plusieurs études convergent pour démontrer que l'expression d'Ago2 est régulée et a un rôle clé dans le développement neural et neuronal (Juvvuna et al., 2012; Liu et al., 2004; Patranabis et Bhattacharyya, 2016; Storchel et al., 2015). Le rôle d'Ago1 pourrait être davantage limité aux phases précoces de ces processus développementaux (Juvvuna et al., 2012). Toutefois, la façon dont les taux d'expression d'Ago1 et Ago2 évoluent et leur influence respective sur la morphogenèse au cours du développement de neurones centraux différenciés n'ont jamais été caractérisées et comparées. Dans la deuxième étude, nous avons donc entrepris de caractériser **l'expression des protéines Ago1 et Ago2** et de vérifier si elles ont **des rôles distincts au cours du développement de neurones** centraux primaires tels que les neurones hippocampiques.

Certaines observations suggèrent qu'une expression soutenue de la protéine Ago2 est nécessaire à la croissance et à la morphogenèse des dendrites des neurones corticaux en culture, une population présentant une similitude importante à celle constituée par les neurones hippocampiques en culture (Storchel et al., 2015). Ayant constaté une évolution différentielle de l'expression des protéines Ago1 et Ago2 durant la croissance et la maturation des neurones hippocampiques en culture concordante avec celle observée par d'autres auteurs pour le cerveau dans son ensemble, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'expression

d'Ago1 et d'Ago2 pourrait avoir des influences opposées lors de morphogenèse dendritique.

Dans le cadre de notre première étude, nous avons démontré que l'état de phosphorylation d'Ago2, régulé par l'activité des récepteurs NMDA, modulait la plasticité des épines dendritiques. Ayant observé qu'une élévation, induite expérimentalement, du taux la protéine Ago1 ou de la protéine Ago2 avait des effets différents sur le développement des dendrites dans le cadre de la deuxième étude, nous avons aussi voulu vérifier si Ago1 et Ago2 avaient des rôles différents lors de la maturation des épines dendritiques.

CHAPITRE 3 : PREMIÈRE SECTION DES RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

3.1) Informations générales sur la première étude

3.1.1) Sujet de la première étude

Les mécanismes par lesquels l'activité des récepteurs NMDA régule la protéine Ago2 dans les dendrites de neurones de l'hippocampe.

3.1.2) Contenu du chapitre

La première section de résultats expérimentaux est constituée :

- i) d'un article (en anglais; section 3.2) voué à la publication; et
- ii) de données supplémentaires (en anglais; section 3.3 : « *Supplementary data* »), présentant des expériences préliminaires ou complémentaires dans le cadre de la première étude.

3.1.3) Contributions des auteurs

3.1.3.1) Rôles pour l'article (section 3.2)

J'ai conçu les expériences en collaboration avec mon directeur de recherche. Les plasmides d'ADNc pCI-tdTomato et pEGFP-Ago2WT ont été fournis par mon directeur de recherche et j'ai généré les construits pEGFP-Ago2S387A et pEGFP-Ago2S387D. J'ai réalisé toutes les expériences et les analyses des résultats. Mon directeur de recherche et moi avons rédigé le manuscrit pour l'article ensemble.

3.1.3.2) Rôles pour le matériel supplémentaire (section 3.3)

J'ai conçu les expériences en collaboration avec mon directeur de recherche. Les plasmides d'ADNc pCI-tdTomato et pEGFP-Ago2WT ont été fournis par mon directeur de recherche et j'ai généré les construits pEGFP-Ago2S387A, pEGFP-Ago2S387D et pCI-mEos2-Ago2. J'ai réalisé toutes les expériences et les analyses des résultats. J'ai rédigé le texte et mon directeur de recherche l'a révisé.

3.2) Article

3.2.1) General information

3.2.1.1) Title

NMDA-receptor dependent dephosphorylation of Ago2 serine 387 increases Ago2 degradation and affects dendritic spine density and maturation.

3.2.1.2) Authors

Nicolas Paradis-Isler; Jannic Boehm.

3.2.1.3) Keywords

Ago2; argonaute (AGO) proteins; degradation; dendrite; dephosphorylation; microRNA (miRNA); neuron; NMDA receptor; proteasome; spine.

3.2.2) Abstract

Argonaute (AGO) proteins are essential components of the microRNA (miRNA) pathway. AGO proteins are loaded with miRNAs to target mRNAs and regulate their stability and translation into proteins. As such, AGO proteins are important actors in controlling local protein synthesis at dendritic spines and synapses. Although the regulation of dendritic mRNAs by miRNAs has become a focus of interest over the past years, the mechanisms regulating neuronal AGO proteins remain largely unknown. Here we report that dendritic Ago2 is downregulated by the proteasome upon NMDA-receptor activation. We find that serine 387 (S387) in Ago2 is dephosphorylated upon NMDA treatment and that this dephosphorylation precedes Ago2 degradation. Expressing S387 phosphorylation deficient or mimetic Ago2 in neurons, we observe that this phosphorylation site is involved in modulating dendritic spine morphology and PSD-95 expression in spines. Collectively, our results point towards a signaling pathway linking NMDA-receptor dependent Ago2 dephosphorylation and turnover to postsynaptic structural changes

3.2.3) Significance statement

Argonaute proteins are the core components of the miRNA-induced silencing complex (RISC). In neurons, RISC has been found in dendrites near synapses, suggesting that synaptic activity could regulate local protein translation through the unsilencing of certain mRNAs. Here we show that Ago2, a member of the argonaute family that is highly expressed in neurons, is dephosphorylated and degraded upon NMDA-R activation. The NMDA-R dependent dephosphorylation of Ago2 induces increased spine density and spine maturation. Our results therefore suggest a novel signaling pathway linking NMDA-receptor dependent Ago2 dephosphorylation and turnover to postsynaptic structural changes.

3.2.4) Introduction

Neuronal homeostasis requires a tight regulation of turnover for proteins involved in cellular signaling and structural adaptation (Hanus & Schuman, 2013). More particularly, activity-dependent local protein synthesis has been shown to be necessary for several forms of synaptic plasticity (Alvarez-Castelao & Schuman, 2015; Ho, Lee, & Martin, 2011; Rosenberg et al., 2014). Consequently, many messenger RNAs (mRNAs) are transported to dendrites and then locally translated into proteins (Darnell, 2013; Holt & Schuman, 2013; Jung, Gkogkas, Sonenberg, & Holt, 2014; Weiss, Antoniou, & Schrott, 2015).

In recent years, microRNAs (miRNAs) have emerged as key factors in post-transcriptional regulation for a majority of messenger RNAs (mRNAs) (Ebert & Sharp, 2012; Pasquinelli, 2015). miRNAs are short non-coding RNAs (~20-24 nucleotides) that target their complementary sequences in specific mRNAs, thereby causing the inhibition of translation and/or a decrease in mRNA stability (Filipowicz & Sonenberg, 2015; Iwakawa & Tomari, 2015; Jonas & Izaurralde, 2015; Pasquinelli, 2012). The prominent role of miRNAs in neurons has been underlined by the discovery that miRNAs are significantly involved in regulating neuronal morphology and function (Olde Loohuis et al., 2012; Qureshi & Mehler, 2012; Siegel, Saba, & Schrott, 2011; Weiss et al., 2015; Ye, Xu, Su, & He, 2016).

The regulation of mRNA translation by miRNAs occurs in the miRNA-induced silencing complex (miRISC), which enables miRNAs to target their mRNAs (Iwakawa & Tomari, 2015; Jonas & Izaurralde, 2015; Krol, Loedige, & Filipowicz, 2010; Meister, 2013). Several studies have shown that the association of miRISC with different scaffold or RNA binding proteins underlies the translational regulation associated with synaptogenesis and synaptic plasticity (Antoniou, Baptista, Carney, & Hanley, 2014; Banerjee, Neveu, & Kosik, 2009; Edbauer et al., 2010; Lugli, Larson, Martone, Jones, & Smalheiser, 2005; Muddashetty et al., 2011; Pai et al., 2014).

At the core of miRISCs are Argonaute (AGO) proteins, which are loaded with miRNAs and enable miRNAs to bind their target mRNAs and induce subsequent translational repression (Iwakawa & Tomari, 2015; Jonas & Izaurralde, 2015; Krol et al., 2010; Meister, 2013). Mammals express four to five different AGO proteins: Ago1-4 and, in mouse, Ago5 (Carmell,

Xuan, Zhang, & Hannon, 2002; Sasaki, Shiohama, Minoshima, & Shimizu, 2003). Ago 1 and 2 are the predominant forms of AGO proteins in the brain (Valdmanis et al., 2012). Ago2 is the only mammalian AGO protein to possess endonuclease activity, which is induced by short interfering RNAs and catalyzes cleavage and rapid degradation of targeted mRNAs (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004). Several different post-translational modifications of Ago2, like phosphorylation or ubiquitination, have been shown to alter Ago2 subcellular localization, protein stability and its interaction with RNAs (Jee & Lai, 2014; Meister, 2013). Despite the importance of Ago2 as a core component in miRNA-mediated control of dendritic mRNA translation, the regulation of Ago2 in response to neuronal activity remains largely unknown.

Here we report that Ago2 is downregulated in a proteasome dependent manner upon NMDA-receptor (NMDA-R) activation in cultured hippocampal neurons. We find that prior to Ago2 degradation, NMDA treatment causes dephosphorylation of Ago2 at serine 387 (S387). Finally, we demonstrate that expression of S387 phosphorylation deficient Ago2 increases dendritic spine density and promotes features associated with spine maturation.

3.2.5) Materials and Methods

3.2.5.1) cDNA Constructs

pCI-tdTomato was described in (Kopec, Li, Wei, Boehm, & Malinow, 2006). pEGFP-Ago2WT was cloned by inserting human Ago2 cDNA from pcDNA3-myc-Ago2 (Liu et al., 2004) into the pEGFP-C2 vector (Clontech). pEGFP-Ago2S387A and pEGFP-Ago2S387D were generated by PCR site-directed mutagenesis of pEGFP-Ago2WT.

S387A mutagenic primers:

5'— *GCAAATTGATGCGAAGTGCAGCTTTCAACACAGATCCATCCATACGTCCG*-3';
5'-*CGGACGTATGGATGGATCTGTGTTGAAAGCTGCACTTCGCATCAATTTGC*-

3. S387D mutagenic primers :

5'— *GCAAATTGATGCGAAGTGCAGATTTCAACACAGATCCATACGTCCG*-3';
5'-*CGGACGTATGGATCTGTGTTGAAATCTGCACTTCGCATCAATTTGC*-3

3.2.5.2) Primary neuronal cultures

Hippocampi from E18-19 Sprague-Dawley rats were digested in trypsin (0.25%) and mechanically dissociated. Cells were plated onto poly-D-lysine (PDL) coated 6-well (35 mm) dishes at high density ($2-3 \times 10^5$ cells/ml) for western blot experiments and onto PDL/laminin coated glass coverslips (12 mm round Corning BioCoat Cellware) in 24-well plates at low density ($7-8 \times 10^4$ cells/ml) for imaging experiments. Cultures were maintained in Neurobasal medium with 2% B27 supplement and 0.5 mM GlutaMAX supplement (Gibco), with initially 2% FBS (HyClone), at 37°C and 5% CO₂. At 3 days *in vitro* (DIV3), for high-density cultures, and DIV4, for low-density cultures, half of the media was replaced with media without FBS and with cytosine-β-D-arabino-furanoside (Ara-C, 2.5 μM) to inhibit glial proliferation. Subsequently, a third to half of the media was replaced without FBS every four to seven days, depending on culture density and experimental time points.

3.2.5.3) Drugs and treatments

For all treatments, neurons were incubated at 37°C, 5% CO₂ in conditioned media with all drugs and other substances added with fresh maintenance media. *N*-Methyl-D-aspartate (NMDA, Sigma) was applied at either 20 μM for 5 min (Figures 1A and B), or 40 μM for 15 min for a stronger stimulation (all other experiments) to the cell culture medium. In most cases, neurons were fixed or lysed immediately following stimulation. However, for some experiments (Figures 2A, 3 and 6A), neurons were washed with media and incubated for an additional 15 min to increase time dependent effects of NMDA treatment. To inhibit proteasomal degradation, lactacystin (5 μM; Cayman Chemicals and AdipoGen) was applied an hour prior to NMDA-R stimulation. For experiments in Figure 3 we added the protein synthesis inhibitor cycloheximide (25 ug/ml, Acros Organics) to neuronal cultures to prevent the theoretical possibility that newly synthesized Ago2 could affect total Ago2 levels.

3.2.5.4) Fixation and Immunocytochemistry/Immunofluorescence

After treatment, neurons were immediately fixed with cold 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS with 5 mM MgCl₂ for 10 min and additionally in 2% PFA PBS for 10 min at room temperature (RT). For immunofluorescence labeling, cells were permeabilized and blocked in 0.2% Triton X-100 and 3% goat serum or 5% BSA in TBS for 20 min at RT. Neurons were then incubated with primary antibodies at 1:200 to 1:400 concentrations in TBS with 0.2% Tween-20 and 1.5% goat serum or 2.5% BSA for 1 to 2 hrs at RT or overnight at 4°C. Secondary antibodies were applied at 1:100 to 1:300 dilution in TBS 0.2% Tween.

Indirect immunofluorescent labelling was performed with the following primary antibodies: for (total) Ago2, mouse monoclonal Wako Cat# 014-22023 (RRID: AB_1106837; Figure 1A and B and 2B) or mouse monoclonal Abcam Cat# ab57113 (RRID: AB_2230916; Figure 1C); for Ago2 pS387, rabbit polyclonal EMC Biosciences Cat# AP5291 (RRID: AB_2571732); for PSD-95, mouse monoclonal ThermoFischer Cat# MA1-046 (RRID: AB_2092361). Secondary antibodies were conjugated with AlexaFluor 488, 546, 594 or 633 (ThermoFisher). Filamentous actin (F-actin) was stained with Phalloidin conjugated to fluorescein isothiocyanate (Phalloidin-FITC; Sigma-Aldrich).

3.2.5.5) Transfections

Hippocampal neuronal cultures grown on coverslips (DIV12-15) were transfected with pCI-ttdTomato and pEGFP-Ago2 constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and then transferred to conditioned media without Lipofectamine for two to three days (DIV15-19) before treatment and fixation.

3.2.5.6) Image acquisition and analysis

Image acquisition was performed with an Olympus Fluoview-1000 argon and diode laser scanning confocal microscope equipped with a Plan-Apo 60X oil objective (numerical aperture: 1.42). Confocal aperture and z-step size were adjusted automatically through the confocal microscopy platform Olympus Fluoviewer for optimal quantitative imaging of the

fluorophores employed in each experiment. For experiments employing the same combination of fluorophores, confocal aperture and z-step size were the same. For each experimental set, acquisition settings (laser intensity and scan speed) and detector settings (HV, digital gain and offset) were tested to optimize the quantitative aspect of the signal (at the single z-slice level), to avoid signal saturation or non-detection, oversampling or undersampling and excessive background and noise. Importantly, all settings, manually or automatically adjusted, were kept constant within an experimental set.

Quantitative analysis of endogenous Ago2 immunolabeling was performed on averaged z-stacks without any image manipulation or enhancement. Quantification of eGFP-Ago2 constructs was performed on summed z-stacks to which background subtraction (automatic, rolling ball, Image J) was applied. For quantification of PSD-95 (Figure 6B), thresholding prior to image quantification was used to select double positive pixels tdTomato and PSD-95 to account for labeling of transfected neurons only.

For quantification of Ago2 in dendrites with immunofluorescence labeling or eGFP fusion constructs, the dendrite appearing to be the most prominent was identified and a segmented line (ie continuous with bifurcation points) was drawn manually (ImageJ) for each neuron. To ensure unbiased analysis, the segmented line (for the lineplot) was drawn with images only displaying the channel corresponding to the dendritic marker employed (phalloidin for immunolabeled neurons; tdTomato for transfected neurons), with the experimenter being blinded to a) the channel corresponding to labeled or tagged Ago2; and b) to the experimental condition (e.g. control vs. NMDA treatment).

The line plot started at the base of the dendrite (border to the soma) and followed closely the center of the dendrite. Once the line was drawn in the channel corresponding to the dendritic marker, the experimenter added the channel corresponding to labeled or tagged Ago2 to the image to measure fluorescence intensity values in each channel using a line plot function (in Olympus Fluoviewer or ImageJ softwares). All lineplots were cut off at a uniform length (300 or 400 pixels, depending on experiments) and the fluorescence intensity was averaged for retained segments. For quantification of eGFP-Ago2 levels, mean eGFP fluorescence intensity was standardized by the corresponding mean tdTomato fluorescence intensity. The obtained

values were then compiled and subjected to statistical analysis (followed by the experimenter being unblinded to the experimental condition of the different groups).

For quantification of eGFP-Ago2 in dendritic spines (Figure 5), images of secondary and tertiary dendrites were acquired. The eGFP/tdTomato ratio of mean fluorescence intensities was measured for each spine individually and matched to an equivalent region of interest (same shape and size) at the base of the spine, in the dendrite.

For dendritic spine density and morphology analysis (Fig 6), images of tertiary dendrites were acquired. Spines were counted in regions of constant length (19.2 μm) along the dendrite. Spines were categorized in three groups: stubby, thin or mushroom.

3.2.5.7) Western Blot

Immediately prior to lysis, cultures were washed once with ice cold PBS with 5 mM MgCl_2 and 50 μM APV and then with ice cold plain PBS. Whole cell extracts were obtained by scraping cells in denaturing lysis buffer (1% SDS TBS; 200 μl per 35 mm well) and boiling samples at 95 $^\circ\text{C}$ for 10 min. Lysates were centrifuged in a tabletop centrifuge for 15 min and the supernatant collected. For loading sample preparation, lysates were diluted with an equal volume of 2x Laemmli buffer (10% β -Mercaptoethanol) and boiled at 100 $^\circ\text{C}$ for 5 min. Samples were loaded onto 10% SDS-PAGE for electrophoresis and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked in 5% BSA in TBS 0.2% Tween (1hr, RT). To analyze Ago2 S387 phosphorylation (Figures 2A and 3), membranes were first incubated with Ago2 pS387 rabbit polyclonal antibody (EMC Biosciences Cat# AP5291, RRID: AB_2571732), diluted 1:1000 in blocking buffer, at 4 $^\circ\text{C}$ overnight, followed by incubation with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Rockland Cat# 18-8816-33, RRID: AB_469529) and ECL (GE). Afterwards, membranes were stripped and probed for total Ago2. For total Ago2 quantification, membranes were incubated with Ago2 mouse monoclonal antibody (Abcam Cat# ab57113, RRID: AB_2230916), diluted 1:1000 in blocking buffer, at 4 $^\circ\text{C}$ o/n, followed by incubation with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (ThermoFisher Scientific Cat# 31430, RRID: AB_228307) and ECL. β -actin mouse monoclonal antibody conjugated with

peroxidase (Sigma-Aldrich Cat# A2228, RRID: AB_476697) was used as loading control.

3.2.5.8) Data representation and statistics

Data sets for quantitative fluorescence analysis did not exhibit normal distribution. Therefore, to determine whether differences between datasets were statistically significant, the following nonparametric tests were employed: Mann-Whitney U test, for experiments with two experimental conditions, and Kruskal-Wallis test (nonparametric ANOVA) with Dunn's multiple comparisons posttest, for experiments with more than two experimental conditions. The results for quantitative fluorescence analysis are represented nonparametrically with whisker and box plots (Figure 1, 2B, 4; 5 and 6B). The rectangular box represents the range between the 1st quartile and the 3rd quartile. The median is represented as a horizontal line within the box. The whiskers represent the minimum and the maximum and should not be confused with standard error of the mean or standard deviation. For visual simplicity and comparison purposes, all values for different treatments within an experiment were standardized to the median value of their respective control group.

For analysis of spine density (Figure 6), the datasets exhibited normal distribution, allowing the use of standard one-way and two-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test. For western blot analysis, experiments were executed in a paired or matched design (i.e. independent sets of experiments with each set having its corresponding untreated control) and the obtained densitometric values of each sample were normalized by their respective control. Hence, the following non-parametric tests were used: a one-tailed sign test for paired samples subjected to two experimental conditions (Figure 2A), and a Friedman test with Dunn's multiple comparisons post-test for matched samples with four conditions (Figure 3).

3.2.6) Results

3.2.6.1) NMDA-R activity regulates proteasomal degradation of dendritic Ago2.

To analyze the effect of synaptic activity on Ago2 protein localization and turnover in dendrites, we briefly incubated mature dissociated hippocampal neuronal cultures with NMDA. Immunocytochemistry analysis revealed a significantly lower amount of dendritic Ago2 in neurons treated with NMDA in comparison to untreated neurons (Figure 1A). Having observed that NMDA-R stimulation leads to a downregulation of dendritic Ago2, we turned our attention towards the underlying mechanism. It has been shown in several non-neuronal cell types, that Ago2 protein levels are regulated by proteasomal degradation (Adams, Claffey, & White, 2009; Bronevetsky et al., 2013; Johnston, Geoffroy, Sobala, Hay, & Hutvagner, 2010). In addition, synaptic activity and NMDA-R activation in particular are known to upregulate the proteasomal pathway in dendrites and spines (Bingol & Schuman, 2006; Bingol & Sheng, 2011; Bingol et al., 2010; Ehlers, 2003; Hamilton et al., 2012). We therefore hypothesized, that NMDA-R activation could trigger proteasomal degradation of Ago2 in neuronal dendrites. To test this hypothesis, we added the proteasome inhibitor lactacystin one hour prior to NMDA application to neuronal cultures. As shown in figure 1B, treatment of neuronal cultures with lactacystin prevented NMDA-R dependent Ago2 decrease in dendrites, indicating that Ago2 downregulation involves the proteasomal pathway. We next repeated this experiment with an alternative monoclonal antibody against Ago2 to validate our results. With this alternative antibody we obtained the identical result, i.e. a significant decrease of Ago2 upon NMDA-R stimulation, which is prevented by pretreatment of neuronal cultures with the proteasome inhibitor lactacystin (Figure 1C)

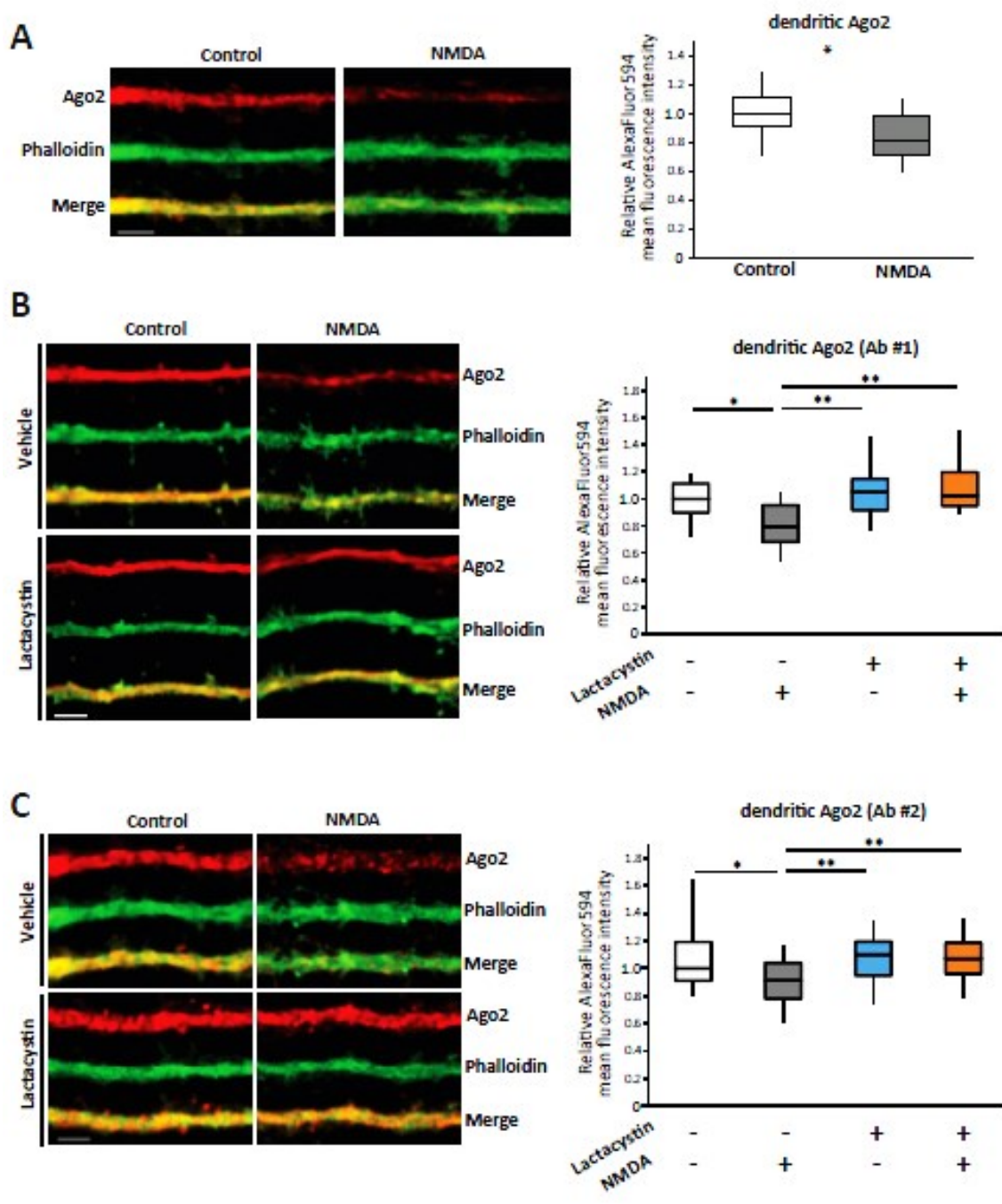


Figure 1. NMDA receptor activation leads to a rapid, proteasome dependent decrease of Ago2 levels in hippocampal neurons.

A, Immunocytochemistry analysis of Ago2 protein (red) in dendrites of cultured hippocampal neurons (DIV 19) counterstained with Phalloidin-FITC (green) and treated with or without NMDA prior to fixation. Left: representative images of primary dendrite segments. Right: whisker and box plot of Ago2 (AlexaFluor594) mean fluorescence intensity of 62.1 μm segments of proximal dendrites in different neurons (results normalized to control condition median; “Control”, n = 16; “NMDA”, n = 19; two-tailed Mann–Whitney U test, * p < 0.05). **B**, Immunocytochemistry analysis of Ago2 protein (red) with Wako clone 4D2 monoclonal antibody (Ab#1), in dendrites of cultured hippocampal neurons (DIV 19) counterstained with Phalloidin-FITC (green), with or without lactacystin pretreatment and with or without NMDA treatment immediately prior to fixation. Whisker and box plot of Ago2 (AlexaFluor594) fluorescence intensity in dendrites (results normalized to control condition median; “Vehicle”, n = 24; “Vehicle + NMDA”, n = 19; “Lactacystin”, n = 22; “Lactacystin + NMDA”, n = 18; Kruskal-Wallis test p = 0.0002; Dunn’s multiple comparisons post test, * p < 0.05, ** p < 0.01). **C**, Immunocytochemistry analysis of Ago2 protein (red) with a different antibody than in A, Abcam ab57113 monoclonal antibody (Ab#2) in dendrites of cultured hippocampal neurons (DIV 19) counterstained with Phalloidin-FITC (green), with or without lactacystin pretreatment and with or without NMDA treatment immediately prior to fixation. Whisker and box plot of Ago2 (AlexaFluor594) mean fluorescence intensity in dendrites (results normalized to control condition median; “Vehicle”, n = 27; “Vehicle + NMDA”, n = 27; “Lactacystin”, n = 27; “Lactacystin + NMDA”, n = 27; Kruskal-Wallis test p = 0.0018; Dunn’s multiple comparisons post test, * p < 0.05, ** p < 0.01).

3.2.6.2) NMDA-R activation triggers dephosphorylation of Ago2 at S387.

Having found that activation of NMDA-Rs promotes proteasome-dependent downregulation of Ago2 in dendrites, we wanted to shed light onto the underlying signaling pathway. It has been shown that Ago2 protein turnover is influenced by its localization to processing bodies (P-bodies) (Jee & Lai, 2014; Johnston et al., 2010; Smibert, Yang, Azzam, Liu, & Lai, 2013), which are involved in translational repression and RNA decay (Decker & Parker, 2012; Leung, 2015). Phosphorylation of Ago2 at S387 causes Ago2 to localize towards P-bodies and has been shown to increase translational repression by Ago2 (Horman et al., 2013; Zeng, Sankala, Zhang, & Graves, 2008). We therefore analyzed whether NMDA-R signaling affects the phosphorylation of Ago2 at S387. Neuronal cultures were treated with NMDA and relative levels of S387 phosphorylated Ago2 (Ago2 pS387) and of total Ago2 in whole cell lysates were determined by western blot. We observed two bands with the antibody directed against total Ago2, with only the upper band being recognized by the phosphospecific antibody against Ago2 pS387 (Figure 2A). Importantly, NMDA-R activation leads to a specific decrease of S387 phosphorylated Ago2 when compared to total Ago2 (combined intensity of upper and lower band). As shown previously by other research groups, Ago2 undergoes multiple posttranslational modifications such as sumoylation that lead to an increase in molecular weight (Sahin, Lapaquette, Andrieux, Faure, & Dejean, 2014) and, in conjunction with S387 phosphorylation, are most likely responsible for the occurrence of the larger shift for the upper band in the total Ago2 western blot.

Next, we wanted to corroborate our Western blot results and verify with immunofluorescent labeling that the reduction in Ago2 pS387 upon NMDA stimulation occurs in dendrites. We observed in NMDA treated neurons a decrease in dendritic Ago2 pS387 in parallel to a decrease in dendritic total Ago2 (Figure 2B). However, the decrease in Ago2 pS387 was greater in proportion than the decrease in total Ago2, as indicated by the lower ratio of Ago2 pS387 to total Ago2 in dendrites stimulated with NMDA. This result corroborates our initial Western blot results from figure 2A.

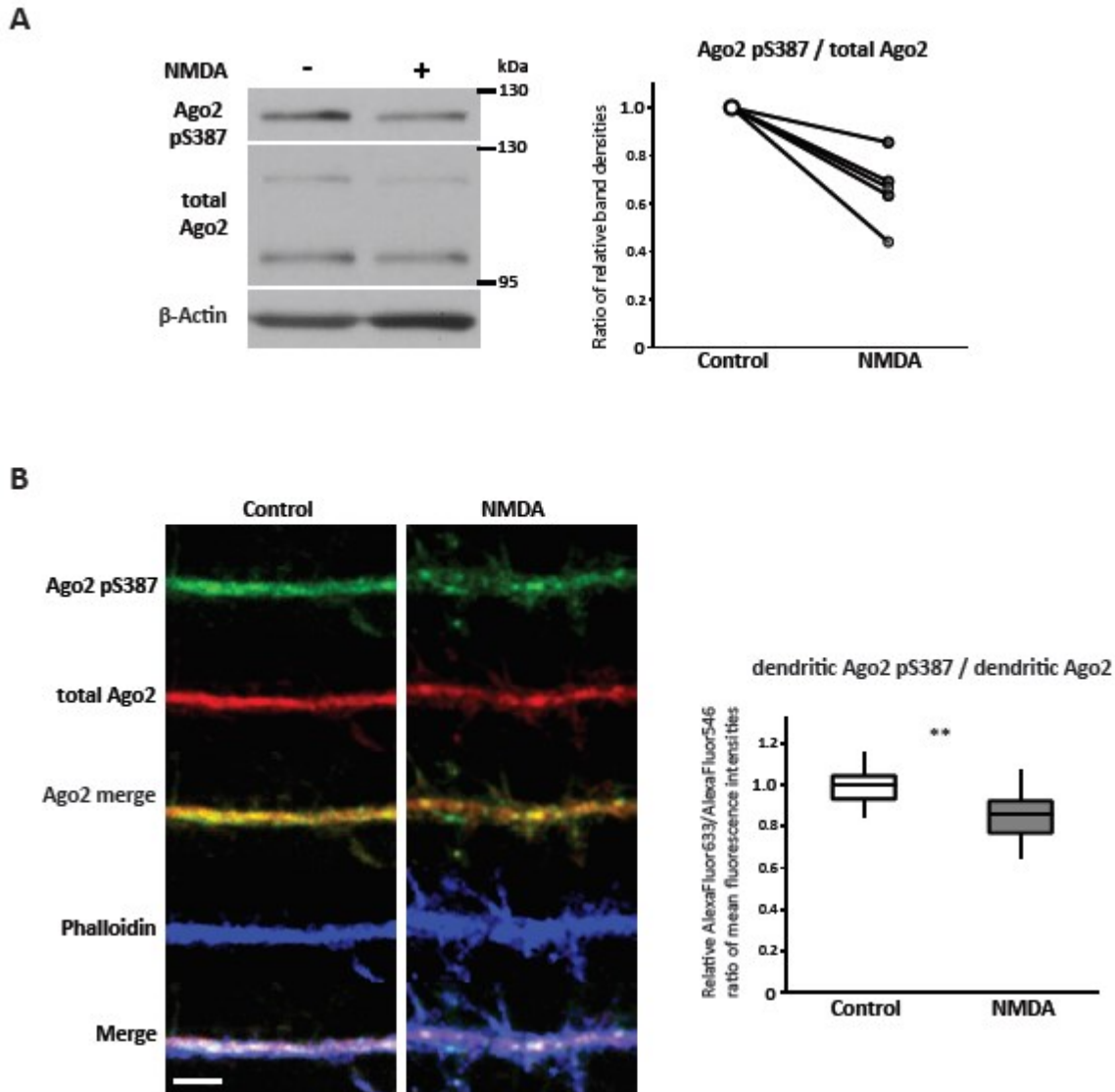


Figure 2. NMDA receptor activation leads to a rapid decrease of S387 phosphorylation in Ago2.

A, Western blot of hippocampal neurons (DIV 23) treated with or without NMDA. Left: representative images of Ago2 pS387 vs. total Ago2 western blots (with corresponding β -actin loading control). Right: change in Ago2 pS387/total Ago2 ratio of paired samples for five (5) independent experiments (each “NMDA” sample normalized to paired “Control”; one-tailed sign test $p < 0.05$). **B**, Immunocytochemistry analysis of Ago2 pS387 protein (red) vs. total Ago2 (green) in dendrites of cultured hippocampal neurons (DIV 19) counterstained with

Phalloidin-FITC (green), with or without NMDA treatment immediately prior to fixation. Whisker and box plot for Ago2 pS387/total Ago2 relative ratio of mean fluorescence intensities in dendrites (results normalized to respective control condition median; “Control”, n = 24, “NMDA” n = 19; two-tailed Mann-Whitney U test, ** p < 0.01).

Our observation that NMDA-R activation leads to a specific reduction of S387 phosphorylated Ago2 could be explained by two different scenarios: a) either NMDA-R activation triggers the degradation of S387 phosphorylated Ago2; or b) NMDA-R activation leads to Ago2 S387 dephosphorylation and it is the dephosphorylated Ago2 that is preferentially subjected to degradation. To test these two mutually exclusive hypotheses, we incubated neuronal cultures with the proteasome inhibitor lactacystin and analyzed whether we would still observe NMDA-dependent dephosphorylation of Ago2 pS387 in the absence of proteasomal degradation. To prevent a potential change in rate of Ago2 synthesis during treatment affecting unphosphorylated Ago2 levels and skewing the ratio of Ago2 pS387 to total Ago2, we added the protein synthesis inhibitor cycloheximide to all neuronal cultures at the same time as the proteasome inhibitor (or vehicle). Western blot analysis revealed that neurons treated with lactacystin still showed a significant reduction in Ago2 S387 phosphorylation with NMDA-R activation, which was comparable to the reduction seen in neurons not incubated with lactacystin (Figure 3A, B and C). However, lactacystin did prevent decrease of total Ago2 protein amount upon NMDA-R activation (Figure 3D), similarly to what we previously observed in dendrites by immunocytochemistry (Figure 2B and C). These results indicate that NMDA-R activation induces the dephosphorylation of Ago2 at S387, which occurs independently from Ago2 degradation by the proteasome, suggesting that this dephosphorylation precedes NMDA-R dependent Ago2 degradation by the proteasome.

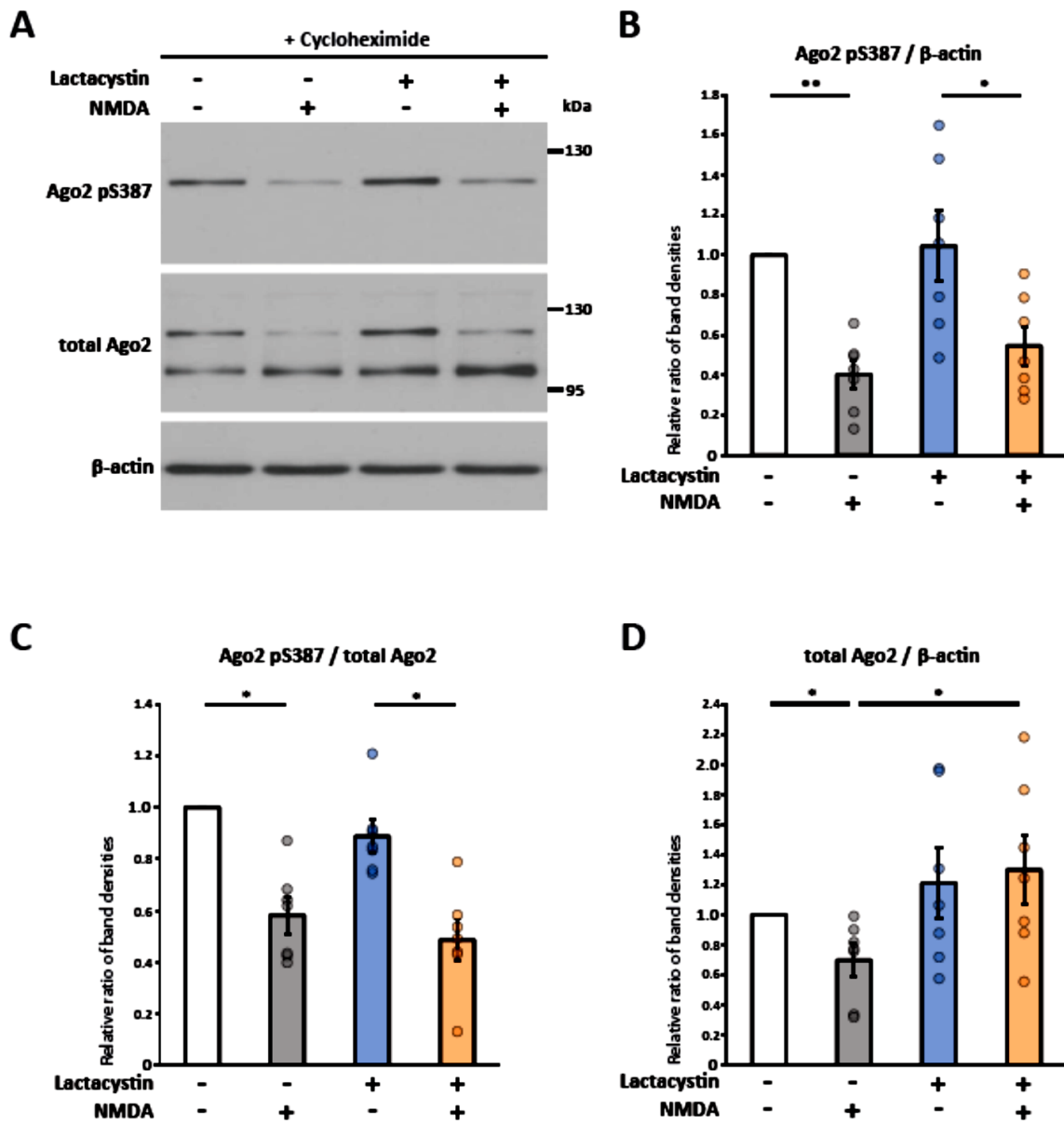


Figure 3. NMDA receptor activation leads to both dephosphorylation of Ago2 S387 and Ago2 degradation.

A, Matched hippocampal neuronal cultures (DIV 23) treated with protein synthesis inhibitor cycloheximide and lactacystin or vehicle (DMSO) and stimulated with or without NMDA. Representative images of western blot for Ago2 pS387, total Ago2 and β -actin from the same western blot membrane (total Ago2 probed after stripping) for series of matched samples. *B*,

Histogram (mean \pm SEM) of relative Ago2 pS387 band density standardized to relative β -actin band density; Friedman test overall p-value: 0.0017. **C**, Histogram (mean \pm SEM) of relative Ago2 pS387 band density standardized to total relative Ago2 band density; Friedman test overall p-value: 0.0003. **D**, Histogram (mean \pm SEM) of total Ago2 standardized to β -actin, as revealed by ratio of relative band densities; Friedman test overall p-value 0.0145. For **B**, **C** and **D**: values for series of matched samples normalized to respective control (“vehicle” only) sample, n=7; Dunn’s multiple comparisons post test, * p < 0.05, ** p < 0.01).

3.2.6.3) S387 phosphorylation deficient Ago2 is readily degraded upon NMDA-R activation.

While our results so far point towards a link between Ago2 dephosphorylation at S387 and Ago2 degradation upon NMDA-R stimulation, they do not provide direct evidence that the dephosphorylation of Ago2 is a necessary event for the targeted degradation of Ago2. To further elucidate the role of Ago2 S387 phosphorylation in regulating Ago2 turnover, we cloned an eGFP-tagged Ago2 wild-type construct (Ago2WT) as well as an eGFP-tagged phosphoblock mutant of Ago2 with serine 387 substituted by alanine (Ago2S387A) and an eGFP-tagged phosphomimetic mutant of Ago2 with serine 387 substituted by aspartic acid (Ago2S387D). First, we transfected neurons with Ago2WT and tdTomato (a red fluorescent protein to visualize the complete neuronal structure and for standardization of eGFP-Ago2 fluorescence intensity) and tested whether ectopically expressed Ago2WT is regulated in a similar fashion like endogenous Ago2, i.e. it is degraded upon NMDA-R activation in a proteasome dependent manner. As previously for endogenous Ago2, we observed that eGFP-Ago2-WT is decreased in dendrites by NMDA-R stimulation and that this downregulation is prevented by proteasome inhibition (Figure 4A).

To verify that S387 dephosphorylation is an obligatory step for the proteasome dependent downregulation of Ago2 upon NMDA-R activation, we tested whether Ago2 with a phosphomimetic mutation at S387 (Ago2S387D) is protected from NMDA-R dependent degradation. Hippocampal neurons were transfected with expression vectors for either eGFP-Ago2S387A or eGFP-Ago2S387D and tdTomato. While the phosphoblock form of Ago2 was downregulated in dendrites, we observed that the phosphomimetic form was upregulated upon NMDA treatment (Figure 4B). Although this last result might suggest that the S387D mutant undergoes increased recruitment into stimulated dendrites, it more importantly shows that Ago2 S387 dephosphorylation is a prerequisite for Ago2 proteasomal degradation.

Our results in figure 3 and 4B suggest that NMDA-R activation induces a two-step process: first, NMDA-R activation causes Ago2 dephosphorylation at S387 and second, NMDA-R activation causes subsequent Ago2 degradation by increasing proteasomal activity. To validate this two-step process, we tested whether Ago2 with a phosphoblock mutation at S387 (S387A) is still subjected to increased proteasomal degradation after NMDA-R activation. eGFP-Ago2S387A and tdTomato were expressed together in hippocampal neurons and treated with NMDA with or without prior incubation with lactacystin. Again, we observed a reduction of Ago2S387A in dendrites upon NMDA-R activation, which is absent in lactacystin treated neurons (Figure 4C). Taken together, these findings validate that dephosphorylation at Ago2 S387A after NMDA-R activation is priming Ago2 for its subsequent proteasome dependent degradation.

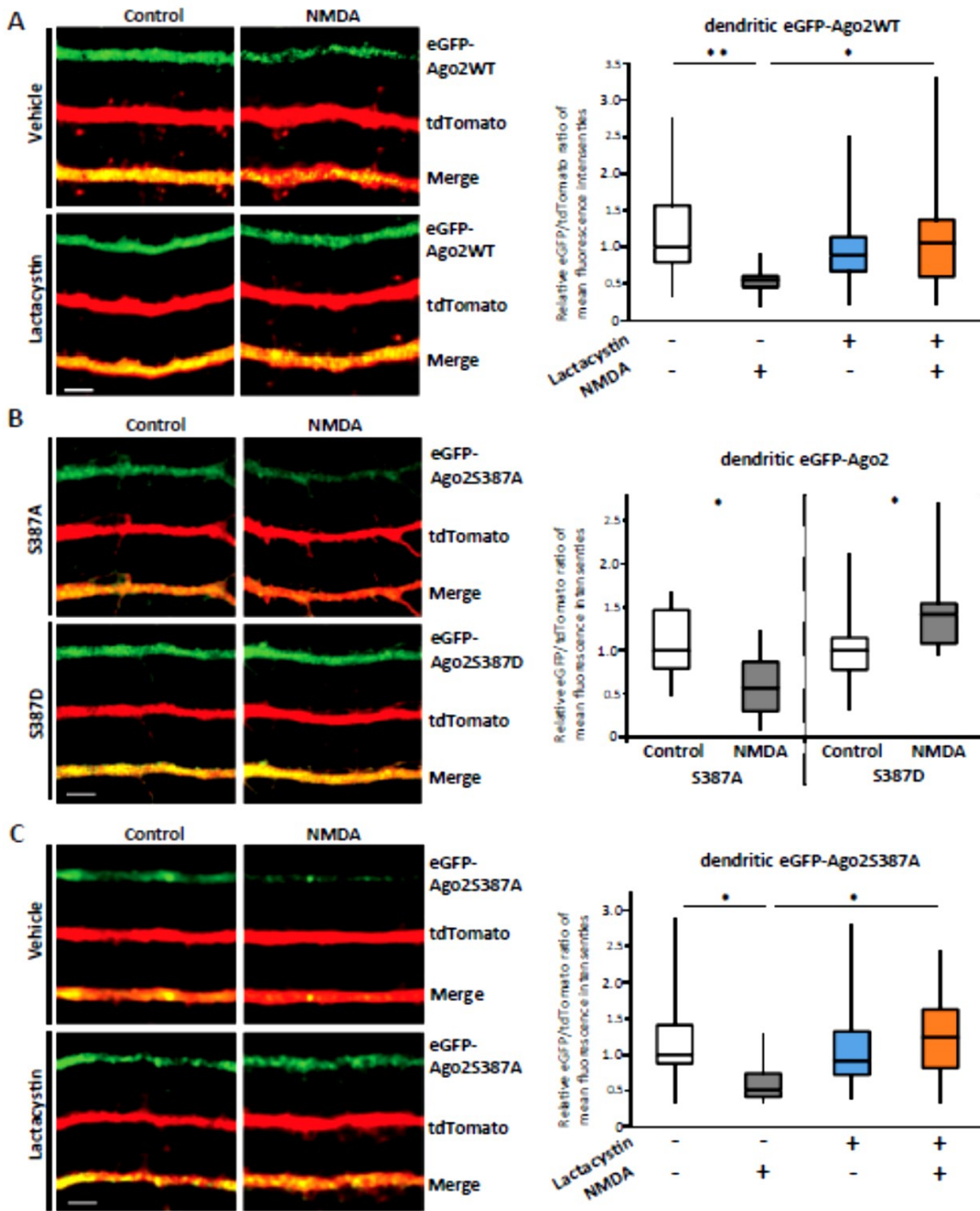


Figure 4. The Ago2-S387D phosphomimetic mutant blocks NMDA induced Ago2 degradation.

A, Analysis of eGFP-Ago2WT in primary dendrites of DIV 17 cultured hippocampal neurons, transfected with pEGFP-Ago2WT and pCI-tdTomato, treated with lactacystin or vehicle (DMSO) and with or without NMDA treatment prior to fixation. Whisker and box plot of relative eGFP-Ago2/tdTomato ratio of mean fluorescence intensities in dendrites (results normalized to control condition median; “Vehicle”, n = 14; “Vehicle +NMDA”, n = 11; “Lactacystin”, n = 14; “Lactacystin +NMDA”, n = 15; Kruskal-Wallis test, $p = 0.0278$; Dunn’s multiple comparisons post test, * $p < 0.05$). B, Analysis of eGFP-Ago2S387A and eGFP-Ago2S387D in dendrites of DIV 15 cultured hippocampal neurons, transfected with pEGFP-Ago2S387A or pEGFP-Ago2S387D and pCI-tdTomato, with or without NMDA treatment prior to fixation. Whisker and box plot of relative eGFP-Ago2/tdTomato ratio of mean fluorescence intensities in dendrites (results normalized to respective control condition median; “S387A Control”, n = 17; “S387A NMDA”, n = 15; two tailed Mann–Whitney U test, * $p < 0.05$; “S387D Control”, n = 19; “S387D NMDA”, n = 11; two tailed Mann–Whitney U test, * $p < 0.05$). C, Analysis of eGFP-Ago2S387A in dendrites of DIV 17 cultured hippocampal neurons, transfected with pEGFP-Ago2S387A and pCI-tdTomato, treated with lactacystin or vehicle (DMSO) and with or without NMDA treatment prior to fixation. Whisker and box plot of relative eGFP-Ago2/tdTomato ratio of mean fluorescence intensities in dendrites (results normalized to control condition median; “Vehicle”, n = 17; “Vehicle + NMDA”, n = 13; “Lactacystin”, n = 11; “Lactacystin + NMDA”, n = 11; Kruskal-Wallis test, $p = 0.0110$; Dunn’s multiple comparisons post test, * $p < 0.05$).

So far, we found that NMDA-R activation leads to the dephosphorylation and degradation of Ago2 in dendrites. However, in hippocampal neurons, NMDA-Rs are enriched at synapses on dendritic spines (Rao & Craig, 1997; Takumi, Ramirez-Leon, Laake, Rinvik, & Ottersen, 1999). We therefore analyzed eGFP-Ago2 turnover in tertiary dendrites where spines are more abundant than in the so far analyzed primary dendrites. The ectopic expression of eGFP-Ago2^{WT} together with tdTomato allowed us to compare the effects of NMDA application on Ago2 levels in spines vs. dendrites. Similarly to what was observed in dendrites (Figure 4A), we found that eGFP-Ago2 levels are also decreased in spines upon NMDA-R activation (Figures 5A and B). Interestingly, when comparing the turnover of eGFP-Ago2 in spines vs. dendrites, we observed a greater decrease of Ago2 in spines compared to dendrites after NMDA-R stimulation (Figures 5C and D).

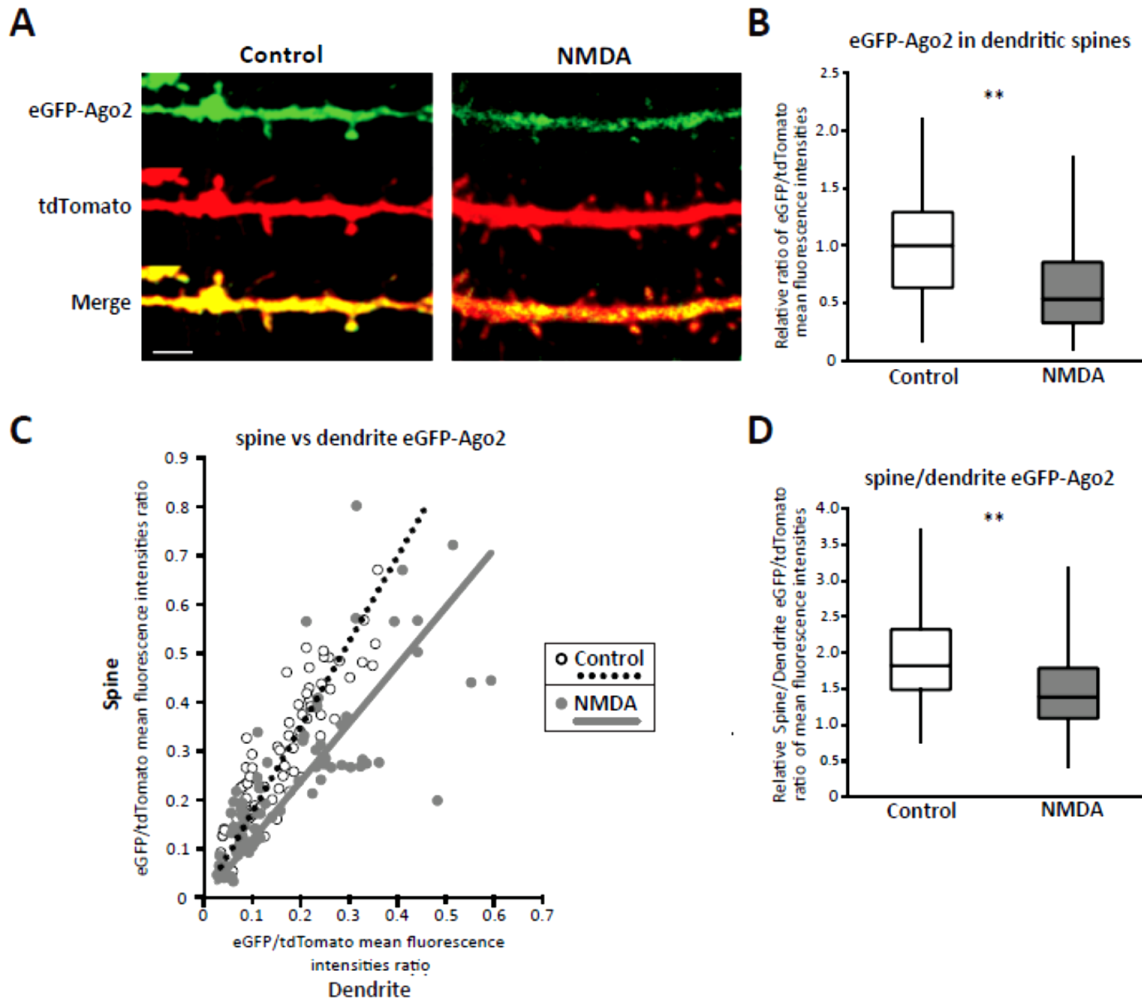


Figure 5. NMDA induced Ago2 decrease occurs to a greater extent in dendritic spines than in dendrites.

A, Secondary dendrites of DIV 18 cultured hippocampal neurons, transfected with pEGFP-Ago2WT and pCI-tdTomato, treated with or without NMDA prior to fixation. *B*, Analysis of eGFP-Ago2 in dendritic spines of secondary and tertiary dendrites. Whisker and box plot of relative eGFP-Ago2/tdTomato ratio of mean fluorescence intensities in spines (results normalized to control condition median; “Control”, n=89 spines from 10 neurons; “NMDA”, n=75 spines from 10 neurons; two-tailed Mann–Whitney test, ** p < 0.01). *C*, Scatter plot of eGFP-Ago2/tdTomato ratio in spines (vertical axis) vs. eGFP-Ago2/tdTomato ratio in

corresponding regions of interest (same size and shape) in secondary and tertiary dendrites. Dashed line: “Control” linear trend; grey full line: “NMDA” linear trend. **D**, Whisker and box plot of spine/dendrite eGFP-Ago2/tdTomato ratio (results normalized to control condition median; “Control”, n = 89 spines from 10 neurons; “NMDA”, n = 75 spines from 10 neurons; two-tailed Mann–Whitney test, ** p < 0.01).

3.2.6.4) Blocked Ago2 S387 phosphorylation leads to increased spine density and PSD-95 enrichment.

Finally, we turned our attention to the physiological consequences of Ago2 S387 phosphorylation in dendrites. Reducing Ago2 phosphorylation at S387 has been shown to decrease miRNA-induced repression of mRNAs (Horman et al., 2013). Furthermore, several research groups reported that miRNA dependent translational regulation of local protein expression is associated with synaptogenesis and synaptic plasticity (Antoniou et al., 2014; Banerjee et al., 2009; Edbauer et al., 2010; Lugli et al., 2005; Muddashetty et al., 2011; Pai et al., 2014). Hence, we hypothesized that the NMDA-R dependent dephosphorylation of Ago2 S387 could be involved in regulating the release of mRNA repression and thereby allowing the local translation of mRNAs in dendrites and spines.

To test whether Ago2 S387 phosphorylation affects spine growth and shape, we expressed Ago2WT, Ago2S387A or Ago2S387D in cultured hippocampal neurons and quantified dendritic spines on tertiary dendrites. In Ago2WT expressing neurons, NMDA-R activation was associated with an increase in spine density (Figure 6A). Interestingly, expression of Ago2S387A by itself increased spine density in untreated transfected neurons and NMDA treatment did not further increase spine density for Ago2S387A expressing neurons, indicating that blocking Ago2 S387 phosphorylation occludes the effects of NMDA-R stimulation on spine density. In untreated Ago2S387D expressing neurons, spine density was similar to that of untreated Ago2WT expressing neurons. However, in contrast to Ago2WT expressing neurons, NMDA-R activation was not associated with an increase in spine density in neurons expressing Ago2S387D. These results indicate that mimicking S387 phosphorylation of Ago2 blocks the effects of NMDA-R stimulation on spine density. Overall, our results that phosphodeficient Ago2 mimics NMDA-R dependent spine increase and that phosphomimetic Ago2 blocks NMDA-R dependent spine increase, support the involvement of S387 phosphorylation of Ago2 in modulating NMDA-R dependent spine growth.

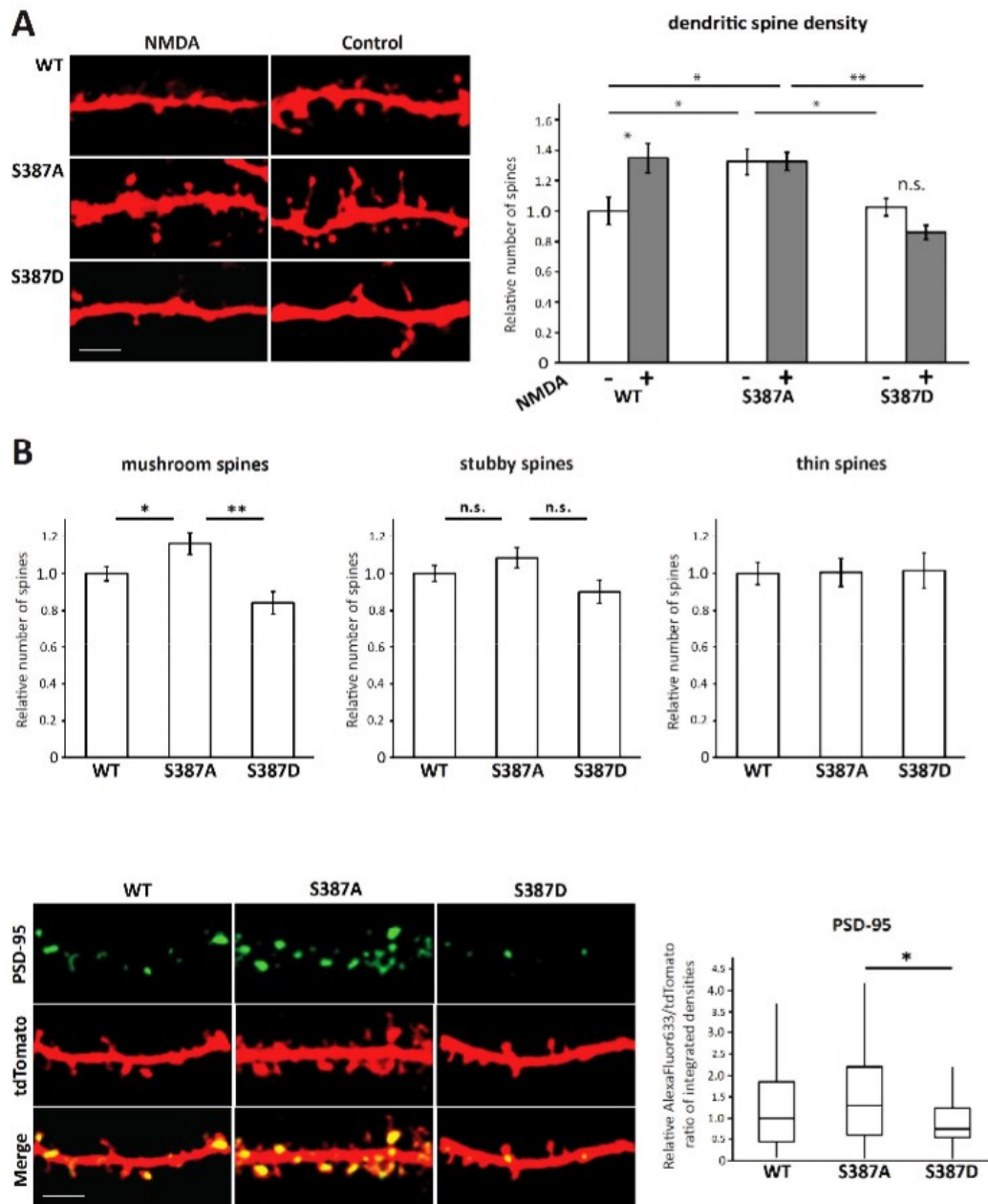


Figure 6. Ago2 S387 phosphorylation affects dendritic spine density and morphology.

A, Dendritic spine density after NMDA treatment of DIV 19 cultured hippocampal neurons transfected with pCI-tdTomato and either pEGFP-Ago2WT, pEGFP-Ago2S387A or pEGFP-Ago2S387D. Left: representative images of tertiary dendrites of transfected neurons (tdTomato, red). Right: analysis of relative spine density for tertiary dendrites (means +/-SEM, results normalized to “Ago2WT Control” condition mean; “Ago2WT Control”, n = 20 dendrites from 10 neurons; “Ago2WT NMDA” n = 20 dendrites from 11 neurons; “Ago2S387A Control”, n = 20 dendrites from 11 neurons; “Ago2S387A NMDA”, n = 23 dendrites from 11 neurons; “Ago2S387D Control”, n = 25 dendrites from 12 neurons; “Ago2S387A NMDA”, n = 20 dendrites from 12 neurons; two way ANOVA overall p value 0.0041; post-hoc Tukey test * p < 0.05, ** p < 0.01). **B**, DIV 18 cultured hippocampal neurons, transfected with pCI-tdTomato (red) and either pEGFP-Ago2WT, pEGFP-Ago2S387A or pEGFP-Ago2S387D were subjected to spine analysis and immunocytochemistry analysis for PSD-95. Top : Analysis of spine density for each spine type: mushroom, stubby and thin spines (means +/-SEM, results normalized to “Ago2WT” mean; “Ago2WT” n = 78 dendrites from 29 neurons; “Ago2S387A” n = 53 dendrites from 20 neurons; “Ago2S387D” n = 36 dendrites from 13 neurons). Mushroom spines (left panel), one way ANOVA p = 0.0005; Stubby spines (center panel), one way ANOVA p = 0.09; Thin spines (right panel), one way ANOVA p = 0.99; post-hoc Tukey tests * p < 0.05, ** p < 0.01, “n.s.” not significant). Bottom left: representative images of tertiary dendrites of transfected neurons (tdTomato, red) labelled for PSD-95 (green). Bottom right: analysis of differences in PSD-95 expression, using PSD-95 (AlexaFluor633) fluorescent density standardized to tdTomato fluorescent density in the same region of interest (results are normalized to Ago2WT median; “Ago2WT” n = 78 dendrites from 29 neurons; “Ago2S387A” n = 53 dendrites from 20 neurons; “Ago2S387D” n = 36 dendrites from 13 neurons; Kruskal-Wallis test p = 0.0416; Dunn’s multiple comparisons post test * p < 0.05).

The finding that the expression of Ago2S387A in itself is associated with an increase in total spine density (Figure 6A), prompted us to further analyze whether Ago2S387 phosphorylation affects spine maturation. Spines are classified based on their shape as mushroom like, stubby or thin spines; with mushroom like spines being the most mature form (Nimchinsky, Sabatini, & Svoboda, 2002). To verify if Ago2 S387 phosphorylation has an impact on the occurrence of the different spine types, i.e. mushroom, stubby and thin spines, hippocampal neurons were transfected with either Ago2WT, Ago2S387A or Ago2S387D (+ tdTomato). We found that mushroom spines are more numerous in neurons expressing Ago2S387A compared to Ago2WT or Ago2S387D, while no significant differences in thin and stubby spines could be observed (Figure 6B). Given that mushroom spines are considered the most mature form of spines (Nimchinsky et al., 2002), our results suggest that Ago2 S387 dephosphorylation contributes to spine maturation.

An important factor in dendritic spine maturation and excitatory synapse formation is the enrichment of PSD-95 in spines (Huganir & Nicoll, 2013; Sala & Segal, 2014). Importantly, Ago2 has been reported to be directly involved in the regulation of PSD-95 mRNA in the dendrites of hippocampal neurons (Muddashetty et al., 2011). To analyze the possible role of Ago2 S387 phosphorylation in regulating PSD-95 enrichment in spines, hippocampal neurons were transfected with either Ago2WT, Ago2S387A or Ago2S387D (+ tdTomato) and PSD-95 expression was analyzed by immunocytochemistry. Although the increase in PSD-95 in neurons expressing Ago2S387A compared to AgoWT was not statistically significant, we observed a significant increase in PSD-95 in neurons expressing Ago2S387A compared to neurons expressing phosphomimetic Ago2S387D (Figure 6B, bottom).

Taken together, the effects of the phosphoblock mutation of Ago2S387A vs. phosphomimetic Ago2S387D on dendritic spine density and morphology as well as on PSD95 enrichment in spines, support the involvement of Ago2 S387 dephosphorylation in spine growth and maturation.

3.2.7) Discussion

Mature miRNAs associate with AGO proteins to exert their regulatory effects on mRNA translation (Jonas & Izaurralde, 2015; Krol et al., 2010; Leung, 2015; Meister, 2013). Several studies have shown that dendritic localization and interaction of Ago2 with components of the miRNA pathway is modulated by neuronal maturation and neuronal activity (Antoniou et al., 2014; Cougot et al., 2008; Juvvuna, Khandelia, Lee, & Makeyev, 2012; Lugli et al., 2005; Muddashetty et al., 2011; Pai et al., 2014; Patranabis & Bhattacharyya, 2016; Zeitelhofer, Karra, et al., 2008).

Here we show that neuronal activity in form of NMDA-receptor activation leads to Ago2 dephosphorylation at S387 and proteasome-dependent degradation of Ago2 in dendrites of hippocampal neurons. Our results further demonstrate that blocking phosphorylation of S387 in Ago2 leads to an increase in spine density and PSD95 enrichment in spines. Overall, our observations support a model (Figure 7) where NMDA-receptor activation through the regulation of Ago2 turnover contributes to the derepression of mRNAs involved in spine growth and maturation.

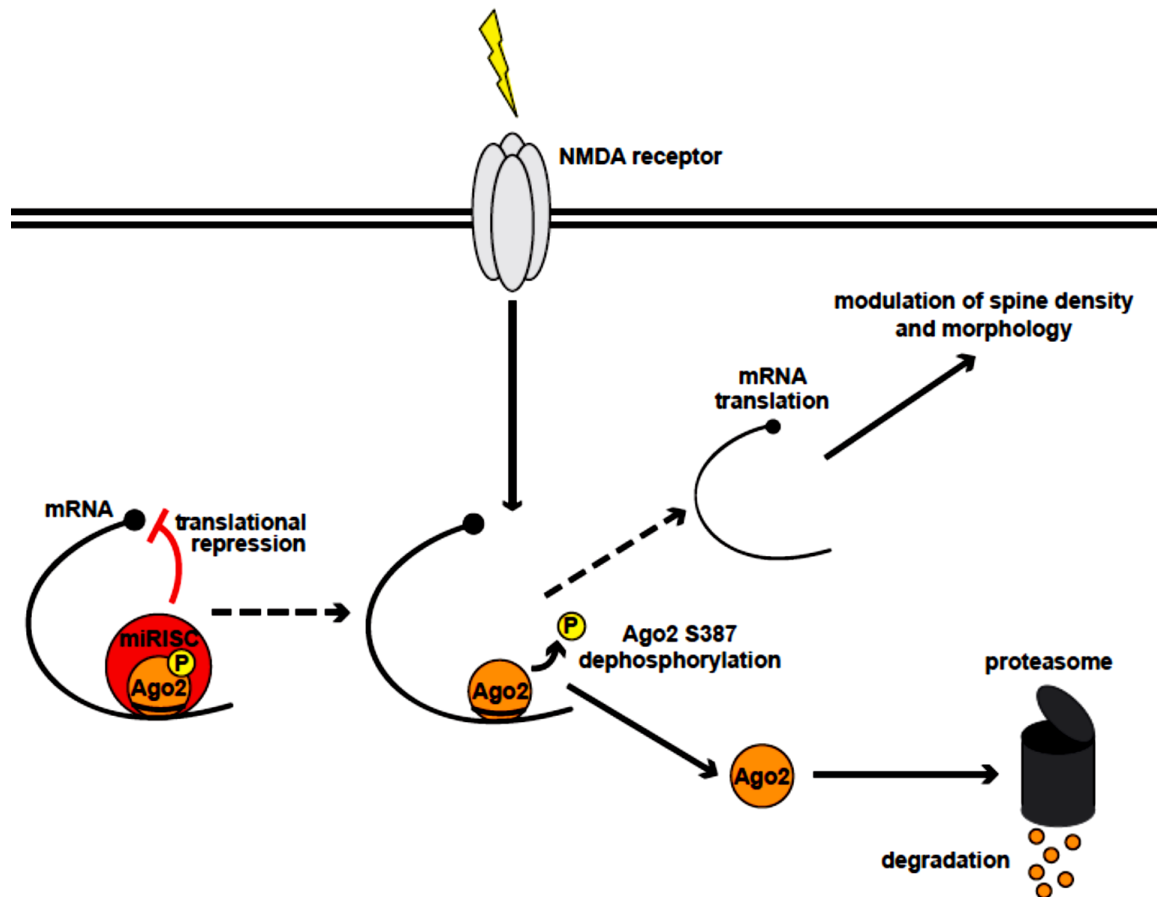


Figure 7. Proposed model for the role of NMDA-R dependent Ago2 S387 dephosphorylation and Ago2 degradation in modulating dendritic spine density and morphology.

Ago2 as part of the microRNA-induced silencing complex (miRISC) represses the translation of certain mRNAs. Acute NMDA-R activation induces dephosphorylation of Ago2 at S387 and degradation of Ago2 via the proteasome, allowing the translation of mRNAs involved in the formation of new dendritic spines and the maturation or stabilization of existing spines.

3.2.7.1) NMDA receptor-dependent degradation of Ago2

Neuronal activity, especially NMDA-R activation, is known to upregulate proteasomal activity and turnover of a variety of proteins in dendrites and spines (Alvarez-Castelao & Schuman, 2015; Bingol & Sheng, 2011; Hanus & Schuman, 2013; Jarome & Helmstetter, 2013; Rosenberg et al., 2014). A widely accepted view, supported by several lines of evidence, proposes that synaptic activity leads in general to an acute increase in turnover of several mature miRNAs and derepression of their mRNA targets (Eacker, Dawson, & Dawson, 2013; Im & Kenny, 2012; Krol et al., 2010; Siegel et al., 2011; Zeitelhofer, Macchi, & Dahm, 2008). Our result that NMDA-R activation causes proteasome dependent Ago2 degradation therefore provides a mechanistic frame for the local synaptic derepression of miRNA-targeted transcripts as well as miRNA turnover in neurons. In addition, the here described activity and proteasome dependent turnover of Ago2 is similar to the previously reported degradation of MOV10 (an Ago2 interacting protein that is degraded after NMDA-R activation) and FMRP (a RNA-binding protein that also interacts with Ago and is degraded after mGluR activation) in cortical and hippocampal neurons (Banerjee et al., 2009; Nalavadi, Muddashetty, Gross, & Bassell, 2012). Importantly, MOV10 and FMRP have both been found to regulate Ago2 association to mRNAs (Kenny et al., 2014; Nalavadi et al., 2012). Taken together, these findings and our results suggest a common scheme where neuronal activity regulates the dendritic miRNA-pathway through proteasomal degradation of its key effector proteins.

3.2.7.2) NMDA-receptor dependent dephosphorylation of Ago2

Ago2 S387 phosphorylation favors Ago2 localization to processing bodies (P-bodies), i.e. to cytoplasmic granules where miRNA-targeted mRNAs are stored or degraded (Horman et al., 2013; Zeng et al., 2008). Therefore, our observation that Ago2 S387 is dephosphorylated upon NMDA receptor activation (Figure 3) is in line with findings that neuronal activity, NMDA-receptor activation in particular, leads to acute disassembly of dendritic P-bodies and release of Ago2 (Cougot et al., 2008; Zeitelhofer, Karra, et al., 2008). Dephosphorylation of Ago2 S387 has also been shown to reduce miRNA-induced repression of mRNAs (Horman et al., 2013). Derepression of miRNA-targeted mRNAs involves in general the dissociation of Ago2 from

these mRNAs and may lead to the unloading of Ago2 from its miRNAs (Krol et al., 2010; Meister, 2013). The pool of Ago2 that is unloaded of its mRNA and/or miRNA is then preferentially targeted for degradation (Hauptmann & Meister, 2013; Jee & Lai, 2014). In accordance with these results, we find that dephosphorylation of Ago2 at S387 after NMDA-receptor activation is associated with increased Ago2 degradation. Two possible mechanisms could account for this effect: either the dephosphorylation of S387 is by itself is sufficient to target Ago2 for degradation or the dissociation of Ago2 from RNA in consequence to S387 dephosphorylation renders Ago2 vulnerable to degradation.

Finally, our findings add Ago2 S387 phosphorylation in neurons to a growing number of post-translational modifications of Ago2 that regulate its turnover in non-neuronal cells (Jee & Lai, 2014; Meister, 2013), like the phosphorylation of tyrosine 393 (Y393) and the sumoylation of lysine 402 (K402) that have been shown to also regulate miRNA loading and stability of Ago2 (Sahin et al., 2014; Shen et al., 2013; Yang et al., 2014).

3.2.7.3) Modulation of dendritic spines by Ago2 dephosphorylation

Dendritic spines constitute postsynaptic compartments that are composed of an intricate network of scaffolding proteins. During development and synaptic plasticity, changes in spine number and shape are highly dependent on local dendritic protein translation (Ho et al., 2011; Swanger & Bassell, 2011). The importance of the miRNA pathway in regulating local mRNA translation in dendrites is well established (Holt & Schuman, 2013; Jung et al., 2014; Krol et al., 2010; Weiss et al., 2015) and many miRNAs have been found to impact dendritic morphology (Eacker et al., 2013; Im & Kenny, 2012; Impey et al., 2010; Schratt et al., 2006; Siegel et al., 2009; Wayman et al., 2008; Ye et al., 2016). In accordance with the important role of the miRNA pathway in synaptic maturation and plasticity, we find that the Ago2 phosphorylation state at S387 impacts dendritic spine density (Figure 6A).

Apart from dendritic spine morphology, we find that Ago2 phosphorylation affects PSD95 enrichment. PSD-95 is a marker for synaptic maturation (Cane, Maco, Knott, & Holtmaat, 2014; Ehrlich, Klein, Rumpel, & Malinow, 2007; Taft & Turrigiano, 2014), playing an important role in concentrating glutamate receptors at synapses (Huganir & Nicoll, 2013). The PSD-95 mRNA undergoes localized translation in dendrites (Swanger & Bassell, 2011) and was shown to be

regulated by Ago2/miRNA-125a in conjunction with FMRP in dendrites (Muddashetty et al., 2011).

Taken together, our results link NMDA induced Ago2 S387 dephosphorylation to increased spine density and maturation. Given that proteasomal degradation of MOV10 (an Ago2 interaction partner) is, like Ago2, regulated through NMDA-R activity (Banerjee et al., 2009), it appears that NMDA-R dependent proteasomal degradation of components of the miRNA pathway constitutes an important element for derepression of dendritic mRNAs and local protein synthesis triggered by synaptic activity. Our findings therefore contribute to an emerging picture where activity-dependent turnover of translational regulators is intimately linked to activity-dependent mRNA translation (Banerjee et al., 2009; Dong, Bach, Haynes, & Hegde, 2014; Dong, Vashisht, & Hegde, 2014; Hou et al., 2006; Khoutorsky et al., 2013). Ultimately, this relationship may offer an explanation to how proteasome activation is linked to protein synthesis in the context of changes in structural plasticity (Hamilton et al., 2012) as well as in long-term memory formation (Jarome & Helmstetter, 2013, 2014).

3.2.8) References

- Adams, B. D., Claffey, K. P., & White, B. A. (2009). Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells. *Endocrinology*, *150*(1), 14-23.
- Alvarez-Castelao, B., & Schuman, E. M. (2015). The Regulation of Synaptic Protein Turnover. *J Biol Chem*, *290*(48), 28623-28630.

- Antoniou, A., Baptista, M., Carney, N., & Hanley, J. G. (2014). PICK1 links Argonaute 2 to endosomes in neuronal dendrites and regulates miRNA activity. *EMBO Rep*, *15*(5), 548-556.
- Banerjee, S., Neveu, P., & Kosik, K. S. (2009). A coordinated local translational control point at the synapse involving relief from silencing and MOV10 degradation. *Neuron*, *64*(6), 871-884.
- Bingol, B., & Schuman, E. M. (2006). Activity-dependent dynamics and sequestration of proteasomes in dendritic spines. *Nature*, *441*(7097), 1144-1148.
- Bingol, B., & Sheng, M. (2011). Deconstruction for reconstruction: the role of proteolysis in neural plasticity and disease. *Neuron*, *69*(1), 22-32.
- Bingol, B., Wang, C. F., Arnott, D., Cheng, D., Peng, J., & Sheng, M. (2010). Autophosphorylated CaMKIIalpha acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines. *Cell*, *140*(4), 567-578.
- Bronevetsky, Y., Villarino, A. V., Eisley, C. J., Barbeau, R., Barczak, A. J., Heinz, G. A., Kremmer, E., Heissmeyer, V., McManus, M. T., Erle, D. J., Rao, A., & Ansel, K. M. (2013). T cell activation induces proteasomal degradation of Argonaute and rapid remodeling of the microRNA repertoire. *J Exp Med*, *210*(2), 417-432.
- Cane, M., Maco, B., Knott, G., & Holtmaat, A. (2014). The relationship between PSD-95 clustering and spine stability in vivo. *J Neurosci*, *34*(6), 2075-2086.
- Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., & Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, *16*(21), 2733-2742.
- Cougot, N., Bhattacharyya, S. N., Tapia-Arancibia, L., Bordonne, R., Filipowicz, W., Bertrand, E., & Rage, F. (2008). Dendrites of mammalian neurons contain specialized P-body-like structures that respond to neuronal activation. *J Neurosci*, *28*(51), 13793-13804.

- Darnell, R. B. (2013). RNA protein interaction in neurons. *Annu Rev Neurosci*, 36, 243-270.
- Decker, C. J., & Parker, R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9), a012286.
- Dong, C., Bach, S. V., Haynes, K. A., & Hegde, A. N. (2014). Proteasome modulates positive and negative translational regulators in long-term synaptic plasticity. *J Neurosci*, 34(9), 3171-3182.
- Dong, C., Vashisht, A., & Hegde, A. N. (2014). Proteasome regulates the mediators of cytoplasmic polyadenylation signaling during late-phase long-term potentiation. *Neurosci Lett*, 583, 199-204.
- Eacker, S. M., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2013). The interplay of microRNA and neuronal activity in health and disease. *Front Cell Neurosci*, 7, 136.
- Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149(3), 515-524.
- Edbauer, D., Neilson, J. R., Foster, K. A., Wang, C. F., Seeburg, D. P., Batterton, M. N., Tada, T., Dolan, B. M., Sharp, P. A., & Sheng, M. (2010). Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, 65(3), 373-384.
- Ehlers, M. D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci*, 6(3), 231-242.
- Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S., & Malinow, R. (2007). PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10), 4176-4181.
- Filipowicz, W., & Sonenberg, N. (2015). The long unfinished march towards understanding microRNA-mediated repression. *RNA*, 21(4), 519-524.

- Hamilton, A. M., Oh, W. C., Vega-Ramirez, H., Stein, I. S., Hell, J. W., Patrick, G. N., & Zito, K. (2012). Activity-dependent growth of new dendritic spines is regulated by the proteasome. *Neuron*, *74*(6), 1023-1030.
- Hanus, C., & Schuman, E. M. (2013). Proteostasis in complex dendrites. *Nat Rev Neurosci*, *14*(9), 638-648.
- Hauptmann, J., & Meister, G. (2013). Argonaute regulation : two roads to the same destination. *Dev Cell*, *25*(6), 553-554.
- Ho, V. M., Lee, J. A., & Martin, K. C. (2011). The cell biology of synaptic plasticity. *Science*, *334*(6056), 623-628.
- Holt, C. E., & Schuman, E. M. (2013). The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons. *Neuron*, *80*(3), 648-657.
- Horman, S. R., Janas, M. M., Litterst, C., Wang, B., MacRae, I. J., Sever, M. J., Morrissey, D. V., Graves, P., Luo, B., Umesalma, S., Qi, H. H., Miraglia, L. J., Novina, C. D., & Orth, A. P. (2013). Akt-mediated phosphorylation of argonaute 2 downregulates cleavage and upregulates translational repression of MicroRNA targets. *Mol Cell*, *50*(3), 356-367.
- Hou, L., Antion, M. D., Hu, D., Spencer, C. M., Paylor, R., & Klann, E. (2006). Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron*, *51*(4), 441-454.
- Huganir, R. L., & Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*, *80*(3), 704-717.
- Im, H. I., & Kenny, P. J. (2012). MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends Neurosci*, *35*(5), 325-334.
- Impey, S., Davare, M., Lesiak, A., Fortin, D., Ando, H., Varlamova, O., Obrietan, K., Soderling, T. R., Goodman, R. H., & Wayman, G. A. (2010). An activity-induced microRNA

- controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Mol Cell Neurosci*, 43(1), 146-156.
- Iwakawa, H. O., & Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol*, 25(11), 651-665.
- Jarome, T. J., & Helmstetter, F. J. (2013). The ubiquitin-proteasome system as a critical regulator of synaptic plasticity and long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem*, 105, 107-116.
- Jarome, T. J., & Helmstetter, F. J. (2014). Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Front Mol Neurosci*, 7, 61.
- Jee, D., & Lai, E. C. (2014). Alteration of miRNA activity via context-specific modifications of Argonaute proteins. *Trends Cell Biol*, 24(9), 546-553.
- Johnston, M., Geoffroy, M. C., Sobala, A., Hay, R., & Hutvagner, G. (2010). HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol Biol Cell*, 21(9), 1462-1469.
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*, 16(7), 421-433.
- Jung, H., Gkogkas, C. G., Sonenberg, N., & Holt, C. E. (2014). Remote control of gene function by local translation. *Cell*, 157(1), 26-40.
- Juvvuna, P. K., Khandelia, P., Lee, L. M., & Makeyev, E. V. (2012). Argonaute identity defines the length of mature mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 40(14), 6808-6820.
- Kenny, P. J., Zhou, H., Kim, M., Skariah, G., Khetani, R. S., Drnevich, J., Arcila, M. L., Kosik, K. S., & Ceman, S. (2014). MOV10 and FMRP regulate AGO2 association with microRNA recognition elements. *Cell Rep*, 9(5), 1729-1741.
- Khoutorsky, A., Yanagiya, A., Gkogkas, C. G., Fabian, M. R., Prager-Khoutorsky, M., Cao, R., Gamache, K., Bouthiette, F., Parsyan, A., Sorge, R. E., Mogil, J. S., Nader, K., Lacaille,

- J. C., & Sonenberg, N. (2013). Control of synaptic plasticity and memory via suppression of poly(A)-binding protein. *Neuron*, 78(2), 298-311.
- Kopec, C. D., Li, B., Wei, W., Boehm, J., & Malinow, R. (2006). Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci*, 26(7), 2000-2009.
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11(9), 597-610.
- Leung, A. K. (2015). The Whereabouts of microRNA Actions: Cytoplasm and Beyond. *Trends Cell Biol*, 25(10), 601-610.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., & Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305(5689), 1437-1441.
- Lugli, G., Larson, J., Martone, M. E., Jones, Y., & Smalheiser, N. R. (2005). Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J Neurochem*, 94(4), 896-905.
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet*, 14(7), 447-459.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15(2), 185-197.
- Muddashetty, R. S., Nalavadi, V. C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, S. T., & Bassell, G. J. (2011). Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Mol Cell*, 42(5), 673-688.

- Nalavadi, V. C., Muddashetty, R. S., Gross, C., & Bassell, G. J. (2012). Dephosphorylation-induced ubiquitination and degradation of FMRP in dendrites: a role in immediate early mGluR-stimulated translation. *J Neurosci*, *32*(8), 2582-2587.
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol*, *64*, 313-353.
- Olde Loohuis, N. F., Kos, A., Martens, G. J., Van Bokhoven, H., Nadif Kasri, N., & Aschrafi, A. (2012). MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell Mol Life Sci*, *69*(1), 89-102.
- Pai, B., Siripornmongcolchai, T., Berentsen, B., Pakzad, A., Vieuille, C., Pallesen, S., Pajak, M., Simpson, T. I., Armstrong, J. D., Wibrand, K., & Bramham, C. R. (2014). NMDA receptor-dependent regulation of miRNA expression and association with Argonaute during LTP in vivo. *Front Cell Neurosci*, *7*, 285.
- Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*, *13*(4), 271-282.
- Pasquinelli, A. E. (2015). MicroRNAs: heralds of the noncoding RNA revolution. *RNA*, *21*(4), 709-710.
- Patranabis, S., & Bhattacharyya, S. N. (2016). Phosphorylation of Ago2 and Subsequent Inactivation of let-7a RNP-Specific MicroRNAs Control Differentiation of Mammalian Sympathetic Neurons. *Mol Cell Biol*, *36*(8), 1260-1271.
- Qureshi, I. A., & Mehler, M. F. (2012). Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, *13*(8), 528-541.
- Rao, A., & Craig, A. M. (1997). Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron*, *19*(4), 801-812.

- Rosenberg, T., Gal-Ben-Ari, S., Dieterich, D. C., Kreutz, M. R., Ziv, N. E., Gundelfinger, E. D., & Rosenblum, K. (2014). The roles of protein expression in synaptic plasticity and memory consolidation. *Front Mol Neurosci*, 7, 86.
- Sahin, U., Lapaquette, P., Andrieux, A., Faure, G., & Dejean, A. (2014). Sumoylation of human argonaute 2 at lysine-402 regulates its stability. *PLoS One*, 9(7), e102957.
- Sala, C., & Segal, M. (2014). Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev*, 94(1), 141-188.
- Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., & Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics*, 82(3), 323-330.
- Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M., & Greenberg, M. E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*, 439(7074), 283-289.
- Shen, J., Xia, W., Khotskaya, Y. B., Huo, L., Nakanishi, K., Lim, S. O., Du, Y., Wang, Y., Chang, W. C., Chen, C. H., Hsu, J. L., Wu, Y., Lam, Y. C., James, B. P., Liu, X., Liu, C. G., Patel, D. J., & Hung, M. C. (2013). EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature*, 497(7449), 383-387.
- Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P. F., Busch, C. J., Kane, C., Hubel, K., Dekker, F., Hedberg, C., Rengarajan, B., Drepper, C., Waldmann, H., Kauppinen, S., Greenberg, M. E., Draguhn, A., Rehmsmeier, M., Martinez, J., & Schratt, G. M. (2009). A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat Cell Biol*, 11(6), 705-716.
- Siegel, G., Saba, R., & Schratt, G. (2011). microRNAs in neurons: manifold regulatory roles at the synapse. *Curr Opin Genet Dev*, 21(4), 491-497.
- Smibert, P., Yang, J. S., Azzam, G., Liu, J. L., & Lai, E. C. (2013). Homeostatic control of Argonaute stability by microRNA availability. *Nat Struct Mol Biol*, 20(7), 789-795.

- Swanger, S. A., & Bassell, G. J. (2011). Making and breaking synapses through local mRNA regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 21(4), 414-421.
- Taft, C. E., & Turrigiano, G. G. (2014). PSD-95 promotes the stabilization of young synaptic contacts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1633), 20130134.
- Takumi, Y., Ramirez-Leon, V., Laake, P., Rinvik, E., & Ottersen, O. P. (1999). Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci*, 2(7), 618-624.
- Valdmanis, P. N., Gu, S., Schuermann, N., Sethupathy, P., Grimm, D., & Kay, M. A. (2012). Expression determinants of mammalian argonaute proteins in mediating gene silencing. *Nucleic Acids Res*, 40(8), 3704-3713.
- Wayman, G. A., Davare, M., Ando, H., Fortin, D., Varlamova, O., Cheng, H. Y., Marks, D., Obrietan, K., Soderling, T. R., Goodman, R. H., & Impey, S. (2008). An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(26), 9093-9098.
- Weiss, K., Antoniou, A., & Schratt, G. (2015). Non-coding mechanisms of local mRNA translation in neuronal dendrites. *Eur J Cell Biol*, 94(7-9), 363-367.
- Yang, M., Haase, A. D., Huang, F. K., Coulis, G., Rivera, K. D., Dickinson, B. C., Chang, C. J., Pappin, D. J., Neubert, T. A., Hannon, G. J., Boivin, B., & Tonks, N. K. (2014). Dephosphorylation of tyrosine 393 in argonaute 2 by protein tyrosine phosphatase 1B regulates gene silencing in oncogenic RAS-induced senescence. *Mol Cell*, 55(5), 782-790.
- Ye, Y., Xu, H., Su, X., & He, X. (2016). Role of MicroRNA in Governing Synaptic Plasticity. *Neural Plast*, 2016, 4959523.
- Zeitelhofer, M., Karra, D., Macchi, P., Tolino, M., Thomas, S., Schwarz, M., Kiebler, M., & Dahm, R. (2008). Dynamic interaction between P-bodies and transport

ribonucleoprotein particles in dendrites of mature hippocampal neurons. *J Neurosci*, 28(30), 7555-7562.

Zeitelhofer, M., Macchi, P., & Dahm, R. (2008). Perplexing bodies: The putative roles of P-bodies in neurons. *RNA Biol*, 5(4), 244-248.

Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X., & Graves, P. R. (2008). Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem J*, 413(3), 429-436.

3.2.9) Additional information

Abbreviations: miRNAs: microRNAs; mRNAs: messenger RNAs; siRNAs: short interfering RNAs; AGO proteins: Argonaute proteins; miRISC: miRNA-induced silencing complex; P-bodies : processing bodies; PTX: picrotoxin; CHX: cycloheximide; eGFP: enhanced green fluorescent protein; tdTomato: tandem-dimer Tomato fluorescent protein; NMDA: N-methyl-D-aspartate; AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; GluA1: ionotropic glutamate receptor subunit 1; PSD-95 : postsynaptic density protein 95 (kD)

Acknowledgements: We thank Drs. Araya, Desgroseillers and Di Cristo for critical comments and Ms. Catherine Bourgeois for technical expertise.

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

Funding sources: This work was supported by an operating grant from the “Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada” (NSERC, discovery grant # 371858). JB is supported by a salary award from the “Fonds de recherche santé Québec” (FRQS). NPI was supported by a NSERC “Alexander Graham Bell” master student stipend and a PhD stipend from the Quebec “Fonds de recherche nature et technologies” (FQRNT).

3.3) Supplementary data

3.3.1) Supplementary materials and methods

3.3.1.1) Cell cultures and transfections

HEK293 cells were passaged a day prior to transfection to obtain ~70% confluency on day of transfection. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in serum-free media for 6 hours, which was afterwards replaced with serum-containing culture media. Cells were then maintained in culture for ~36 hours to allow expression of cDNA prior to fixation. Neurons were transfected as described in section 3.2.5.5.

3.3.1.2) cDNA constructs

pRSETA-mEos2 was obtained from Addgene. mEos2 was PCR amplified with custom designed DNA primer synthesized by Invitrogen, adding a EcoRI restriction site and a Kozak sequence at the 5' end of mEos2 cDNA and mutating the stop codon into tryptophan codon and adding a BamHI site at the 5' end of mEos2 cDNA. mEos2 (PCR product) was inserted into pcDNA3-myc-Ago2 (Liu et al., 2004) between myc and human Ago2 cDNAs and in frame with Ago2, using EcoRI and BamHI restriction enzymes. mEos2-Ago2 (with the Kozak sequence) was cut out of pcDNA3-myc-mEos2-Ago2 and inserted into pCI (Clontech), using EcoRI and XbaI restriction sites. pCI-tdTomato, pEGFP-Ago2WT, pEGFP-Ago2S387A and pEGFP-Ago2S387D were described in section 3.2.5.1.

3.3.1.3) Drugs and treatments

To selectively activate *N*-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, NMDA (20 μ M, 5 min) and (Tocris Bioscience) was used. In one instance, cycloheximide (CHX; 25 μ M) was added an hour before stimulation to inhibit protein synthesis. To illicit synaptic activity, picrotoxin (PTX; 2 μ M) and glycine (200 μ M) were applied (5 min). To inhibit proteasomal degradation, MG132 (InVivoGen) was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and applied an hour prior to stimulation.

3.3.1.4) Fixation and Immunofluorescence/Immunocytochemistry

HEK293 cells were rinsed in PBS and then fixed with 2% PFA PBS for 10 min at room temperature (RT). Upon removal of culture media, neurons were immediately fixed with cold 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS with 5 mM MgCl₂ for 10 min and additionally in 2% PFA PBS for 10 min at room temperature (RT). For immunofluorescence analysis, cells were permeabilized and blocked in 0.2% Triton X-100 and 3% goat serum or 5% BSA in TBS for 20 min at RT. Neurons were then incubated with primary antibodies at 1:200 to 1:400 concentrations in TBS with 0.2% Tween-20 and 1.5% goat serum or 2.5% BSA for 1 to 2 hr(s) at RT. Secondary antibodies were applied at 1:100 to 1:300 dilution in TBS 0.2% Tween. To probe total surface GluA1, neurons were not permeabilized and were incubated with the primary and secondary antibodies in PBS without surfactant. Filamentous actin (F-actin) was stained with Phalloidin conjugated to fluorescein isothiocyanate (Phalloidin-FITC; Sigma-Aldrich). Filamentous actin (F-actin) was labelled with Phalloidin conjugated to fluorescein isothiocyanate (Phalloidin-FITC; Sigma-Aldrich). Ago2 rabbit polyclonal antibody was obtained from Millipore (Cat# 07-590; RRID: AB_390151). Ago2 mouse monoclonal antibodies were from Wako Chemicals (clone 2D4; Cat# 014-22023; RRID: AB_1106837) and Abcam (Cat# ab57113; RRID: AB_2230916). CamKII α mouse monoclonal (clone 6G6, Cat# 05-532; RRID: AB_309787), MAP2 chicken polyclonal (Cat# AB5543; RRID: AB_571049) and GluA1 N-terminus mouse monoclonal (clone RH95, Cat# MAB2263; RRID: AB_1977459) were purchased from Millipore. Secondary antibodies were labeled with DyLight405 (Jackson), AlexaFluor488, AlexaFluor546, AlexaFluor594 or AlexaFluor633 (ThermoFisher).

3.3.1.5) Image acquisition and analysis

Image acquisition and analysis were performed as described in section 3.2.5.6.

3.3.1.6) Western Blot

Procedure for Western Blot analysis was performed as described in section 3.2.5.7.

3.3.1.7) Data representation and statistics

Data representation and statistics followed the principles laid out in section 3.2.5.8.

3.3.2) Supplementary results

3.3.2.1) Activity-dependent localization of Ago2 in dendrites

3.3.2.1.1) NMDA receptor-dependent redistribution of Ago2 in dendrites

We have observed and other groups have reported that, under certain conditions, Ago2, both the endogenous form labelled by indirect immunofluorescence (I-IF), as shown in figure 8 (supplementary results), and the ectopically expressed GFP-tagged protein, forms granules in the soma and dendrites of hippocampal neurons (Antoniou, Baptista, Carney, & Hanley, 2014; Cougot et al., 2008; Zeitelhofer, Karra, et al., 2008). A study employing video microscopy reported that a third of the small granules formed by GFP-Ago2 in dendrites were motile in basal condition (Cougot et al., 2008). The same authors found that NMDA application was also associated with a more distal localization of GFP-Ago2 granules in fixed neurons. While we have observed that following NMDA treatment (with a brief delay), endogenous Ago2 was more distinctively distributed into granules (figure 8, supplemental material), others have reported a reduction in colocalization of endogenous Ago2 with Decapping protein 1 (Dcp1), a protein involved mRNA destabilization and a characteristic component of Processing bodies (P-bodies) (Cougot et al., 2008).

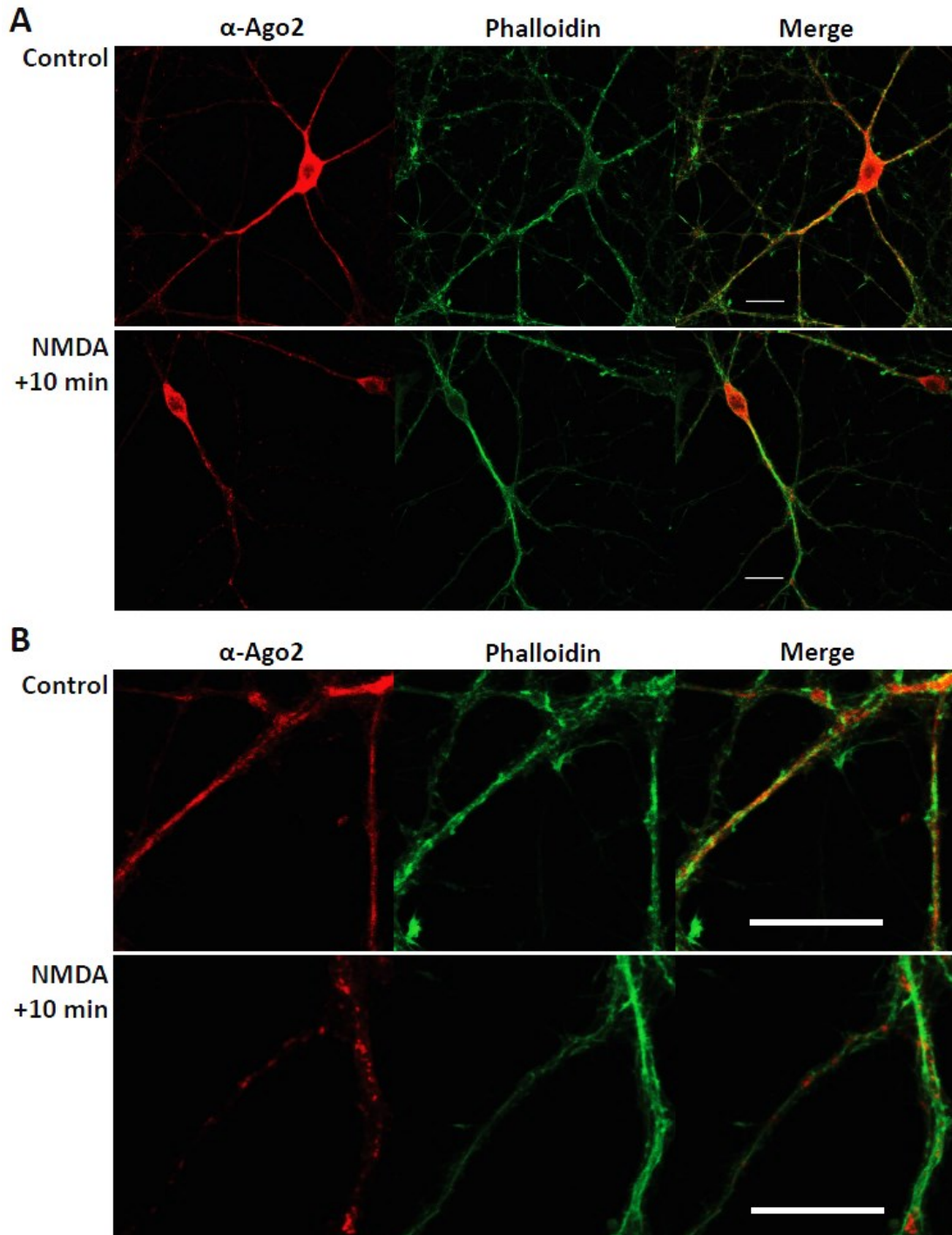


Figure 8. NMDA treatment is associated changes Ago2 distribution in dendrites of hippocampal neurons.

Figure 8 : Immunocytochemical detection of Ago2 protein (red) in dendrites of cultured hippocampal neurons (DIV 19) counterstained with Phalloidin-FITC (green), treated with or without NMDA (20 μ m, 5 min) followed by recovery (10 min) prior to fixation. Bottom: close-up images of secondary dendrites. Scale bar: 20 μ m.

P-bodies are a subtype of cytoplasmic granules enriched with RNA decay factors and to which AGO proteins, miRNAs and targeted mRNAs can be recruited (Decker & Parker, 2012; Jonas & Izaurralde, 2015; Leung, 2015; Liu, Valencia-Sanchez, Hannon, & Parker, 2005). Although P-bodies are characterized as sites of RNA decay that include miRNA-targeted mRNAs, accumulating evidence indicates that miRNA-dependent translation repression can occur outside P-bodies and may precede recruitment of targeted mRNAs to P-bodies (Decker & Parker, 2012; Eulalio, Huntzinger, & Izaurralde, 2008; Leung, 2015). On the other hand, P-bodies have also been proposed to contain miRNA-targeted mRNAs that could be exchanged with other cytoplasmic granules, such as stress granules, or be released, derepressed and translated in certain conditions (Bhattacharyya, Habermacher, Martine, Closs, & Filipowicz, 2006; Decker & Parker, 2012; Leung, 2015; Leung, Calabrese, & Sharp, 2006). Moreover, although P-bodies are enriched with Ago2, most of cytoplasmic Ago2 is thought to reside outside P-bodies (Leung, 2015; Leung et al., 2006). The characterization and the function of P-bodies remain controversial, especially in neurons and their dendrites (Decker & Parker, 2012; Kosik, 2016; Zeitelhofer, Macchi, & Dahm, 2008).

3.3.2.1.2) NMDA receptor dependent remodeling of Ago2 granules

Stimulated transport of Ago2-containing granules or activity-dependent redistribution of Ago2 in dendrites observed by time-lapse or live imaging has not been reported to our knowledge. Therefore, it is not clear whether activity-dependent changes in Ago2 distribution result from active transport, remodeling of granules or protein turnover. For this reason, we generated a probe (construct) that can be transfected in cells to monitor localization of Ago2 by time-lapse. By cloning, we fused cDNA for the human form of Ago2 with cDNA for mEos2, a green fluorescent protein engineered to be photoconverted (ie converted photostimulation) into red fluorescent protein. The advantage of using mEos2-Ago2 for time-lapse imaging is the possibility to distinctively label “red” by photo conversion a spatial fraction of Ago2 that is otherwise labeled “green”, and therefore to follow displacement, redistribution or turnover of the “red” portion of Ago2 in comparison to the “green” pool of Ago2.

In preliminary experiments, as exemplified in figure 9 (supplementary results), NMDA application appeared to lead to a reduction in size of mEos2-Ago2 aggregates and “dissolution” of the smallest granules in dendrites. Photoconverted (red) mEos2-Ago2

exhibited a similar behaviour to native (green) mEos2-Ago2 and aggregates of both seemed to shrink upon NMDA-R activation without re-coalescing or relocalizing to other parts of the dendrites or the soma. These preliminary observations, although missing a proper control and sufficient replication to be rigorously and conclusively interpreted, nevertheless suggested to us that NMDA-R signaling regulates Ago2 in part by affecting its turnover.

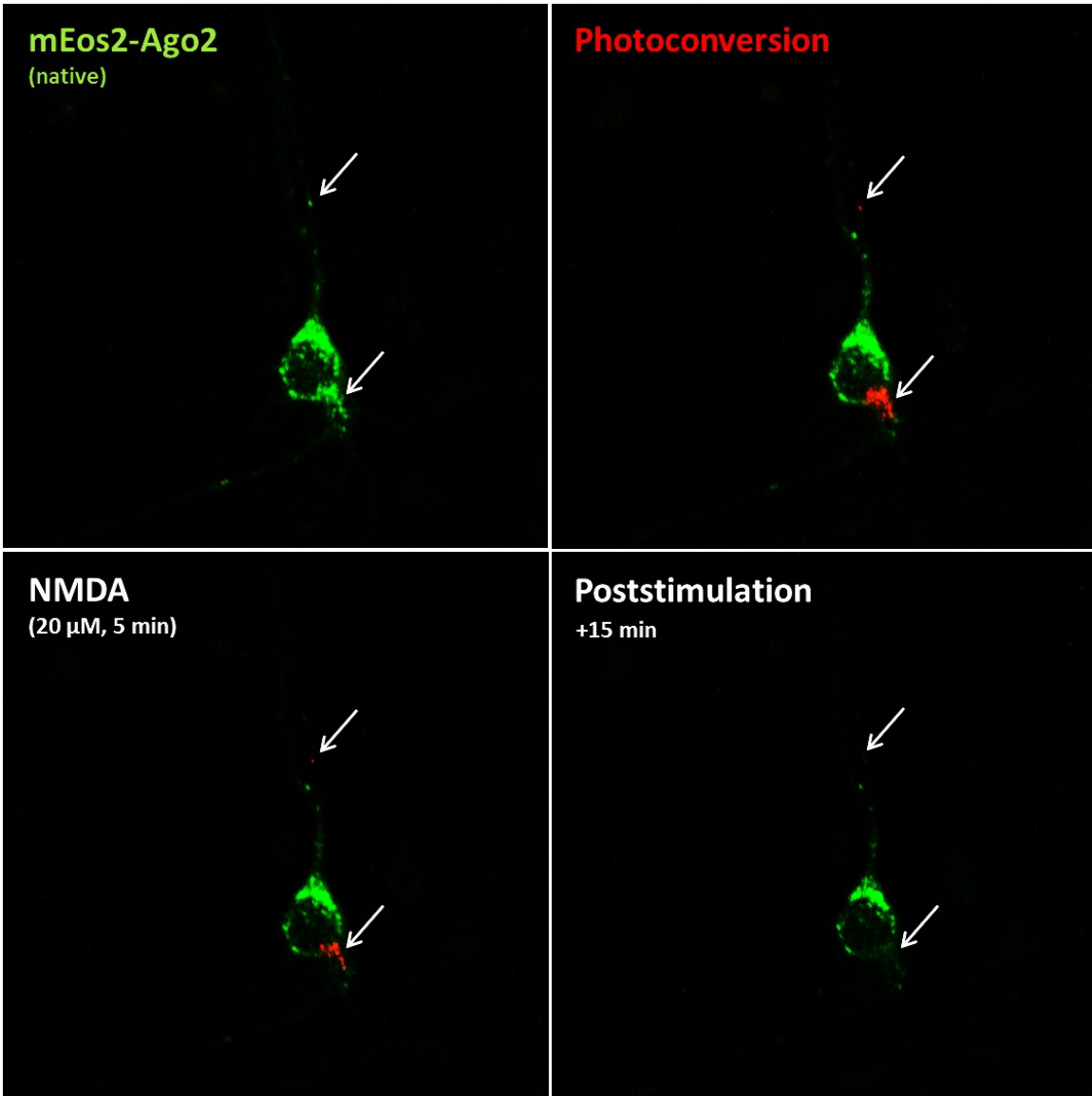


Figure 9. NMDA application leads to apparent disassembly of aggregated mEos2-Ago2.

Cultured hippocampal neuron transfected at DIV11 with pCI-mEos2-Ago2 and observed at DIV12 by time-lapse imaging with a confocal microscope. White arrows indicate two areas on separate dendrites subjected to photoconversion: a large portion of aggregated mEos2-Ago2 at the edge of the soma and the base of a primary dendrite and a relatively small granule in a secondary dendrite branching out of different primary dendrite, on the opposite side of the soma.

Top left panel, basal condition prior to photoconversion. ***Top right panel***, following photoconversion (by 405 nm stimulation) of mEos2, from green to red, and immediately prior to NMDA incubation. ***Bottom left panel***, immediately following NMDA application (20 μ m, 5 min). ***Bottom right panel***, 15 min after NMDA incubation.

3.3.2.2) NMDA receptor-dependent downregulation of Ago2 in dendrites

3.3.2.2.1) The immediate effect of NMDA receptor activation on endogenous Ago2

Exposing dissociated hippocampal neurons to NMDA without a recovery period lead to an immediate and significant decrease of endogenous Ago2 labeled by IF (with a polyclonal antibody) and measured in dendrites (Figure 10, supplementary results). This result supported our interpretation of the observations made by the time-lapse imaging with mEos2-Ago2 (Figure 9, supplementary results). To validate that NMDA-R activation upregulates turnover of Ago2 in hippocampal neurons, we again used cultured neurons and analyzed Ago2 concentration in total cell lysates by Western blot. To exclude the effect of a potential NMDA-R-dependent downregulation of Ago2 protein synthesis in the soma, neurons (control and stimulated) in this experiment were pretreated with cycloheximide, an inhibitor of peptidic chain elongation during translation (Rosenberg et al., 2014). We observed a subtle but significant reduction of Ago2 at the whole cell level after treatment with NMDA, confirming the occurrence of NMDA-R dependent turnover of Ago2, as presented in figure 11 (supplementary results).

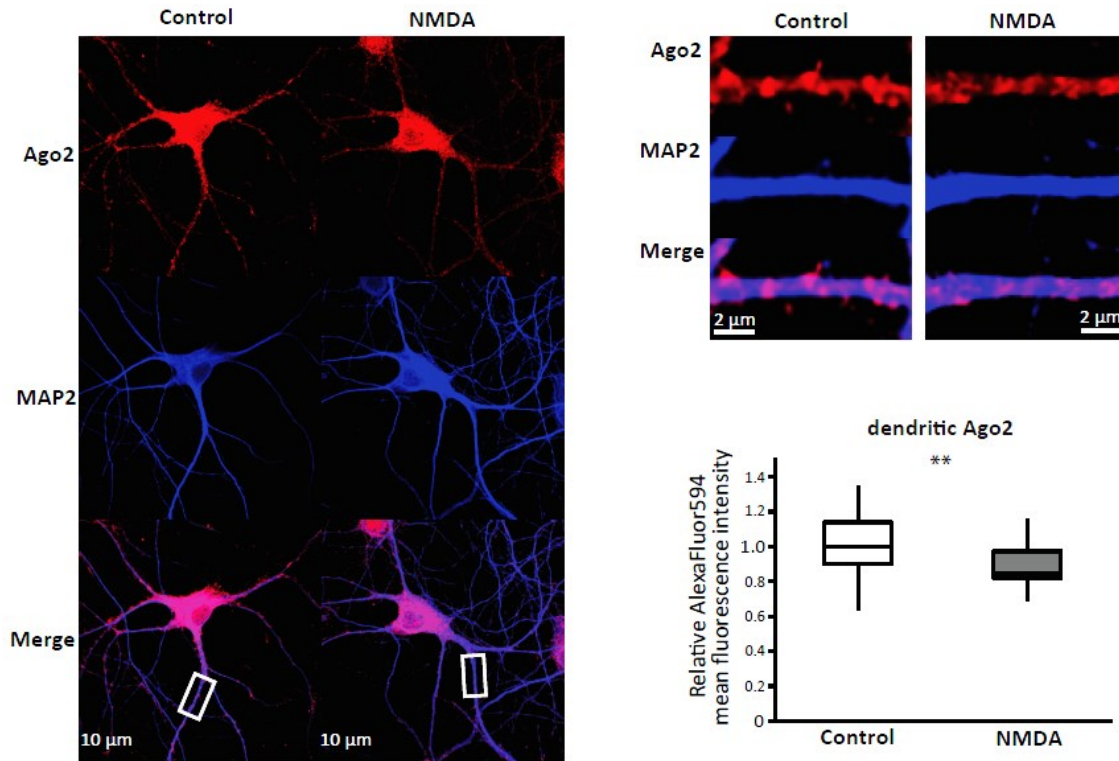


Figure 10. NMDA receptor activation leads an immediate decrease of endogenous Ago2 levels in hippocampal neurons dendrites.

Immunocytochemistry analysis of Ago2 protein (red) in dendrites of DIV15 hippocampal neurons labelled for MAP2 (blue), treated with NMDA (20 μ m, 5 min) immediately prior to fixation. and subjected to indirect immunofluorescence of Ago2 (red) and MAP2 (blue). Whisker and box plot of mean Ago2 (AlexaFluor594) of mean Ago2 (AlexaFluor594) fluorescence intensity in 62.1 μ m segment of proximal dendrite (normalized to control condition median; “Control”, n = 46; “Low NMDA”, n = 34; two tailed Mann–Whitney U test, * p < 0.01).

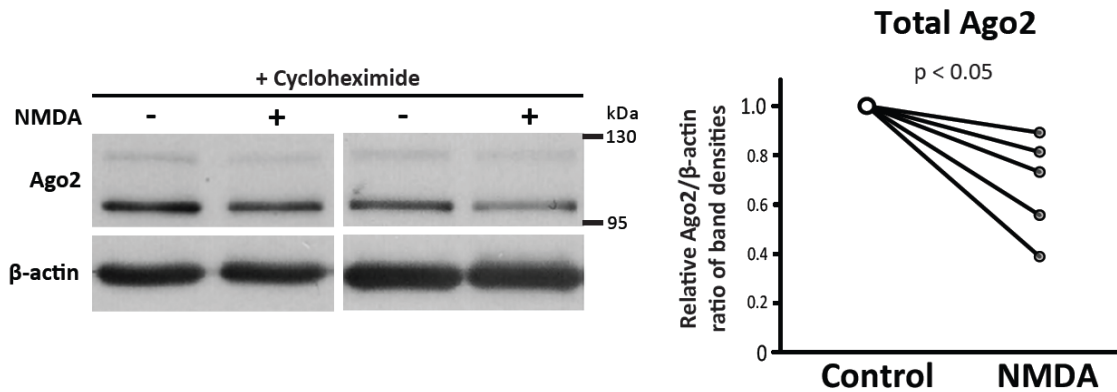


Figure 11. NMDA receptor activation upregulates turnover of Ago2 protein in hippocampal neurons

Matched hippocampal neuronal cultures (DIV 23) treated with protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) and with or without NMDA (20 μ M, 5 min) immediately prior to cell lysis. Left, Representative images of two western blots for total Ago2 and β -actin for paired samples. Right, Graphical representation of relative Ago2 band density standardized to relative β -actin band density for treated samples normalized to the corresponding paired control sample value (series of paired samples n = 5; one-tailed sign test p < 0.05).

However, since a significant amount of NMDA receptors (NMDA-Rs) on dendrites of hippocampal neurons are situated in extrasynaptic regions, treatment of cultured hippocampal neurons with NMDA indiscriminately activates synaptic and extrasynaptic NMDA-Rs (Ivanov et al., 2006; Rusakov & Kullmann, 1998). Therefore, we wanted to verify if activation of NMDA-Rs by glutamatergic synaptic transmission was sufficient to trigger a decrease of Ago2 levels in dendrites. To elicit such stimulation, we submitted “markedly” mature (DIV 28) dissociated hippocampal neuronal cultures to a brief (5 min) incubation of the GABA_A receptor channel blocker picrotoxin (PTX, 200 μ M) in conjunction with glycine (200 μ M). The brief disinhibition of cultured hippocampal neuron provoked by loss of GABA_A signaling (by receptor blockade or antagonism) leads to spontaneous bursting activity in neurons, which, along with the presence of glycine, ensures that the NMDA-Rs (as well as the other glutamate receptors) that are activated are predominantly synaptic (Ivanov et al., 2006; Lu et al., 2001; Molnar, 2011). Analysis of Ago2 ICC labeling (performed with the polyclonal Ab) revealed a significantly lower amount of dendritic Ago2 in treated neurons in comparison to untreated neurons, as shown in figure 12 (supplementary results), indicating that NMDA-R signaling triggered by synaptic glutamatergic transmission was sufficient to significantly downregulate Ago2 in dendrites.

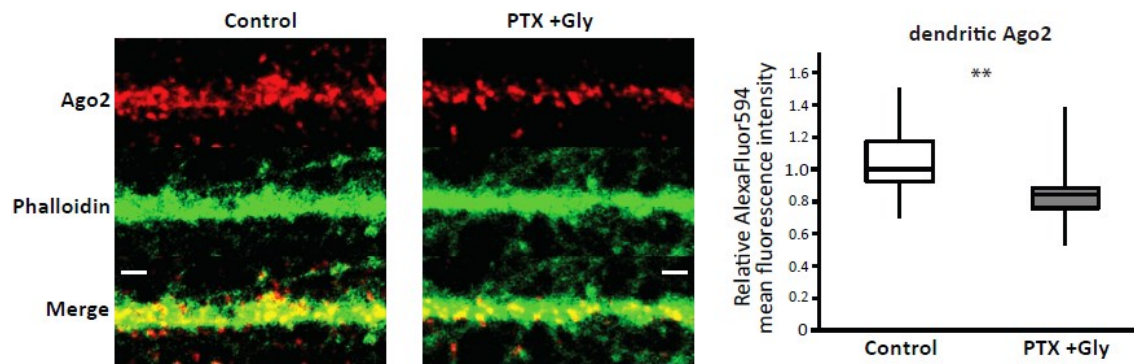


Figure 12. Synaptic NMDA receptor activation leads to downregulation of Ago2 in dendrites.

Immunocytochemistry analysis of Ago2 protein (red) in dendrites of DIV28 cultured hippocampal neurons counterstained with Phalloidin-FITC (green), with or without picrotoxin (PTX, 200 μ M) and glycine (Gly, 200 μ M, 5 min) prior to fixation (white scale bar = 2 μ m). Whisker and box plot of mean Ago2 (AlexaFluor594) fluorescence intensity in dendrite (normalized to control condition median; “Control”, n = 39; “PTX + Gly”, n = 27; two tailed Mann–Whitney U test, * p < 0.01).

3.3.2.2.2) MG132 prevents NMDA receptor downregulation of Ago2 in dendrites

In this first study, we hypothesized and validated that NMDA-R activation induces a proteasome-dependent downregulation of Ago2 in neuronal dendrites. To test this hypothesis we compared the effects of NMDA treatment on Ago2 degradation, with or without proteasome inhibition. We therefore pretreated (1 hr.) neuron cultures with either MG132 or the vehicle solvent (DMSO) alone, prior to and during the stimulation. We then fixed the neurons and labelled Ago2 as well as CamKII α , a protein specifically expressed in excitatory neurons (Coultrap & Bayer, 2012; Sik, Hajos, Gulacsi, Mody, & Freund, 1998), As shown in figure 13 (supplementary results), treatment with MG132 prevents NMDA-R dependent Ago2 downregulation in dendrites of CamKII α -positive neurons.

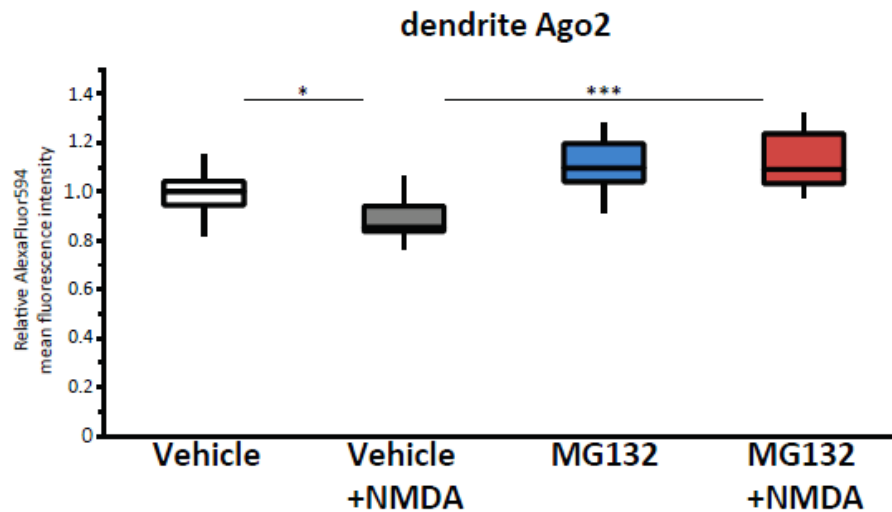
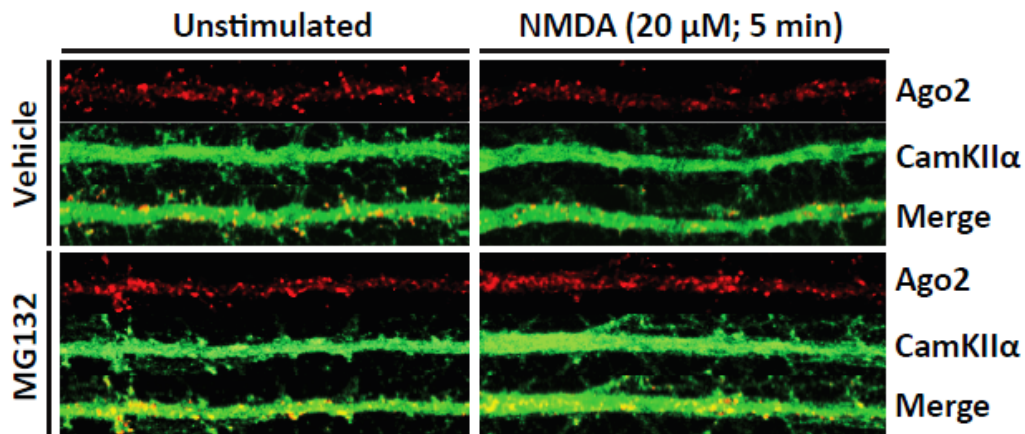


Figure 13. NMDA induced downregulation of Ago2 in dendrites of cultured hippocampal is prevented by treatment with MG132

Immunocytochemistry analysis of Ago2 protein (red) in dendrites of CamKII α (green) labelled DIV15 cultured hippocampal neurons, pre-treated (1hr) with MG132 and stimulated or not with NMDA (20 μ M, 5 min) immediately prior to fixation. Boxplot of quartiles (normalized to control condition median) of mean Ago2 (AlexaFluor594) fluorescence intensity in 62.1 μ m segment of proximal dendrite (Kruskal-Wallis with Dunn post test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

MG132 is widely used for proteasome inhibition in research and has been used in studies implicating proteasomal degradation in the regulation of Ago2 turnover in non-neuronal cells (Bronevetsky et al., 2013; Goldberg, 2012; Rosenberg et al., 2014; Rybak et al., 2009; Smibert, Yang, Azzam, Liu, & Lai, 2013). However, MG132 also inhibits several other proteases heavily involved in regulating protein turnover in dendrites: calpain, which, similarly to the proteasomes, is regulated by Ca^{2+} and stimulated by NMDA-R activation, gamma-secretase and certain caspases (Bingol & Sheng, 2011; Craiu et al., 1997; De Strooper et al., 1999; Hanus & Schuman, 2013; Lugli, Larson, Martone, Jones, & Smalheiser, 2005; Rosenberg et al., 2014; Siman, Noszek, & Kegerise, 1989; Tawa, Odessey, & Goldberg, 1997). Importantly, NMDA-R-triggered calpain activity has been involved in regulating Ago1 and 2 (eIF2c) association to the postsynaptic density through binding to Dicer (Lugli et al., 2005). Furthermore, MG132 inhibitory effect on the proteasome is reversible and MG132 is less soluble and permeant to the cellular membrane than other proteasome inhibitors such as lactacystin (Craiu et al., 1997; Goldberg, 2012; Rosenberg et al., 2014). In contrast to MG132, lactacystin also binds specifically and inactivates irreversibly the 20S proteasomal subunit (Craiu et al., 1997; Rosenberg et al., 2014). For all these reasons, we wanted to further validate our interpretation that the proteasome was implicated in NMDA-R-dependent Ago2 downregulation by employing lactacystin instead of MG132 in subsequent experiments (article; figures 1-B and C, 3 and 4). The results presented in figures 1-B and C (article) corroborated the results obtained with MG132 in CamKII α -positive neurons (figure 13, supplementary results).

3.3.2.2.3) Validity of results obtained from Ago2 labeling with the polyclonal antibody

After having performed several experiments where Ago2 was labeled by immunocytochemistry/immunofluorescence (ICC/IF) with a rabbit polyclonal antibody (Ab) (Millipore Cat# 07-590; RRID: AB_390151), we were compelled to corroborate the results by employing Ago2 monoclonal antibodies validated for ICC/IF. The results obtained with two monoclonal antibodies presented in figure 1 (article) confirmed our preliminary findings with labeling performed with the polyclonal Ab (article; figures 1A-B : Wako clone 2D4, Cat# 014-22023; RRID: AB_1106837; figure 1C : Abcam Cat# ab57113; RRID: AB_2230916). These antibodies (Clone 2D4 and ab57113) have been previously validated for immunocytochemistry (ICC) by the commercial producers (Wako and Abcam) and were used for immunofluorescent labelling

in several peer-reviewed articles (Antoniou et al., 2014; Collino et al., 2010; Didiot, Subramanian, Flatter, Mandel, & Moine, 2009; Ferreira et al., 2014).

Nevertheless, to assess directly the specificity of labelling with the polyclonal Ago2 Ab, we performed a control experiment where Ago2 was co-labeled by both the polyclonal AB and a monoclonal AB, ab57113, validated for quantitative I-IF/ICC. Ferreira et al. (2014), used ab57113 to quantify cytoplasmic Ago2 by I-IF and validated the specificity of the labelling by small interfering RNA (siRNA) knockdown of Ago2. Given that the rabbit polyclonal AB (Millipore 07-590) was raised against residues 7-48 of Ago2 (N-terminal region) while the mouse monoclonal Ab (Abcam ab57113), was raised against residues 483-859 of Ago2, their binding is not competitive. Hence, both ABs can be used in the same preparation and changes in their associated fluorescence signals (from the respective conjugated secondary antibodies) should parallel one and other if both Abs are specific for Ago2. As shown in figure 14-A (supplementary results), both antibodies show similar signal distribution in dendritic line plots, a first indication of the specificity of the polyclonal AB. Furthermore, we tested the effect of ectopic Ago2 overexpression (figure 14-B, supplementary results). We observe a similar increase in signal intensity with Ago2 labelling with both the polyclonal and the monoclonal ab57113 antibodies in neurons expressing eGFP-Ago2 in comparison control neurons expressing unfused GFP.

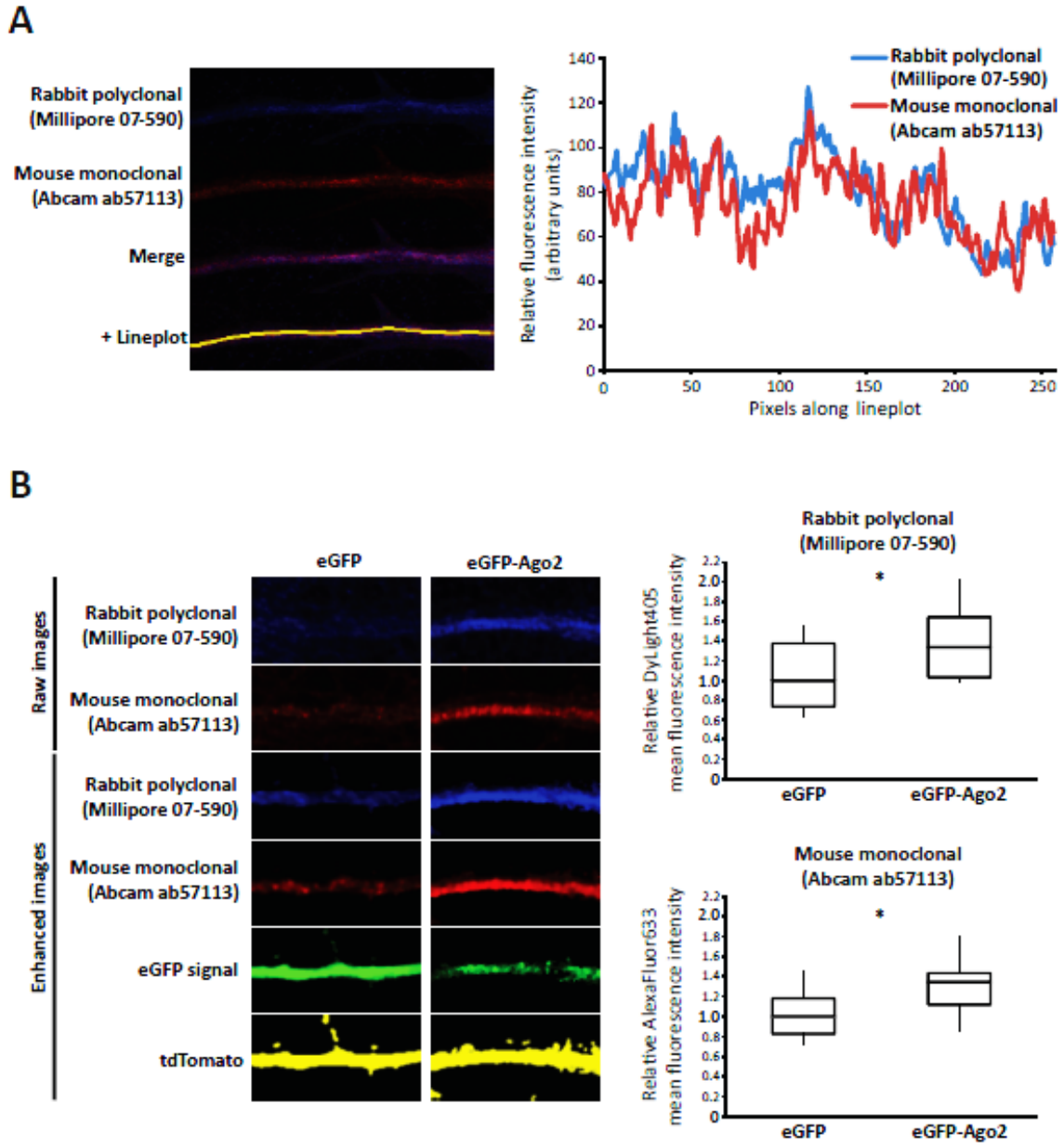


Figure 14. Validation of rabbit polyclonal anti-Ago2 antibody.

A, Left, example of double immunofluorescent labelling of dendritic Ago2 (in an untransfected DIV 19 cultured hippocampal neuron) with rabbit polyclonal anti-Ago2 (Millipore 07-590), coupled to donkey anti-rabbit DyLight405 (blue), and mouse monoclonal (Abcam ab57113), coupled to goat anti-mouse AlexaFluor633 (red). Right, pixel by pixel graphical representation

of fluorescent intensities along the dendritic line plot (represented by the yellow line in the bottom picture of the left panel) showing similar values of relative fluorescent intensities. **B**, Cultured hippocampal neurons DIV 19 transfected with tdTomato (yellow) and either eGFP alone or eGFP-Ago2WT (green), fixed and subjected to double immunocytochemistry labelling with rabbit polyclonal anti-Ago2 (blue) and mouse monoclonal anti-Ago2 (red). Boxplots of relative mean fluorescent intensity in dendrites (along 82.8 μm lineplots) associated with each Ago2 antibodies from the same neurons expressing either unfused eGFP (n = 11) or eGFP-Ago2WT (n = 16).

3.3.2.3) Ago2 function is regulated in part by its serine387 phosphorylation.

3.3.2.3.1) Validation of the phosphomimetic effect of the S387D mutation of Ago2

To investigate the role of Ago2 serine 387 (S387) phosphorylation in NMDA receptor-dependent regulation of Ago2, we generated by PCR site-directed mutagenesis of Ago2, mutant forms that either prevented or permanently mimicked phosphorylation at S387. In the phosphoblock (or phosphonull) Ago2 mutant, serine 387 is replaced by alanine (S387A), an amino acid that cannot be phosphorylated, while in the phosphomimetic mutant, serine 387 is replaced by aspartate (S387D), a residue harboring a negative charge on its side chain that can mimic certain of the physico-chemical properties of an added phosphate group.

However, depending on the chemical and structural characteristics of proteins, a mutation intended to be phosphomimetic can, in some instances, act as phosphoblock (since the substituted aspartate or glutamate cannot be phosphorylated and since the side chain negative charge might not always replicate the effects of a given phosphorylation on the structure and function of the modified protein). Ago2 S387 phosphorylation is known to favor Ago2 localization to processing bodies (P-bodies), i.e. to cytoplasmic granules where miRNA-targeted mRNAs are stored or degraded (Horman et al., 2013; Zeng, Sankala, Zhang, & Graves, 2008). Therefore, we first validated the phosphomimetic effect of the S387D substitution by analysis of P-body-like granules in HEK293 cells, presented in figure 15 (supplementary results). As expected, we saw an increase in P-body-like structures with Ago2S387D and a decrease with Ago2S387A compared to Ago2WT, confirming its phosphomimetic effect. This validation reinforces our interpretation of results presented in figure 4-B (article) as indicating that S387 dephosphorylation is necessary for, or at least precedes, Ago2 NMDA-R-dependent degradation.

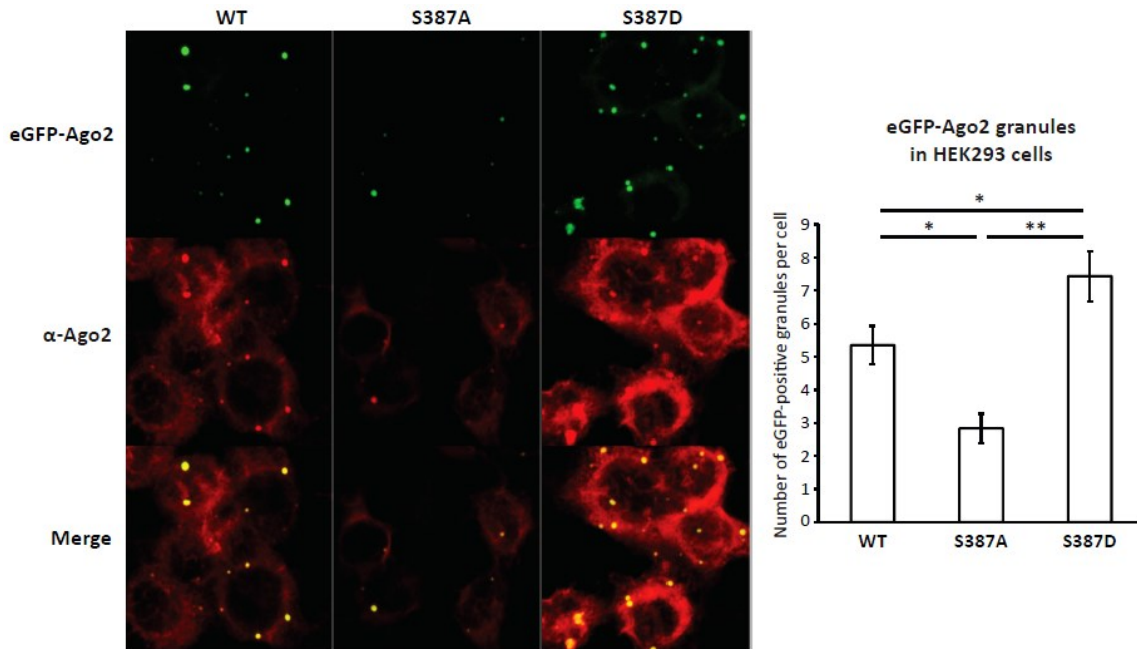


Figure 15. Increased localization of Ago2S387D to P-body like structures validates the phosphomimetic effect of the S387D mutation.

Analysis of eGFP-Ago2 containing P-body-like granules in HEK293 cells transfected with either pEGFP-Ago2WT, pEGFP-Ago2S387A or pEGFP-Ago2S387D (green), fixed and immunolabeled for total Ago2 (red; endogenous + recombinant Ago2). Right, histogram (mean \pm SEM) of the number of eGFP-Ago2 granules per cell (“WT”, $n = 17$, “S387A”, $n = 12$, “S387D”, $n = 16$; one way ANOVA $p < 0.0001$; Tukey multiple comparisons post-hoc test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.3.2.3.2) Ago2 phosphorylation at S387 increases surface expression of GluR1 and increases spine density.

Given our finding that Ago2 was dephosphorylated in response to NMDA-R activation and given the established implication of S387 phosphorylation in the translational repression exerted by Ago2 (Horman et al., 2013), we thought that the regulation of Ago2 S387 phosphorylation was likely to modulate postsynaptic plasticity. Spine maturation in hippocampal neurons is often accompanied by an increase in surface expression of AMPA sensitive glutamate receptors (AMPA-Rs) (Ho, Lee, & Martin, 2011; Zito, Scheuss, Knott, Hill, & Svoboda, 2009). Among the different AMPA-R subunits (GluA1 to GluA4), the surface delivery of GluA1 containing AMPA-Rs has been described to be associated with changes in spine morphology and maturation (Henley & Wilkinson, 2016; Kopec, Li, Wei, Boehm, & Malinow, 2006). To test whether Ago2 dephosphorylation at S387 promotes GluA1 surface expression, we expressed either Ago2WT or Ago2S387A in neurons and compared the amount of surface GluA1 by immunocytochemistry. As shown in figure 16 (supplementary results), we observed an increase in GluA1 surface expression in neurons transfected with Ago2S387A. This observation further supports our interpretation of results presented in figure 7 (article) that Ago2S387A promotes spine maturation.

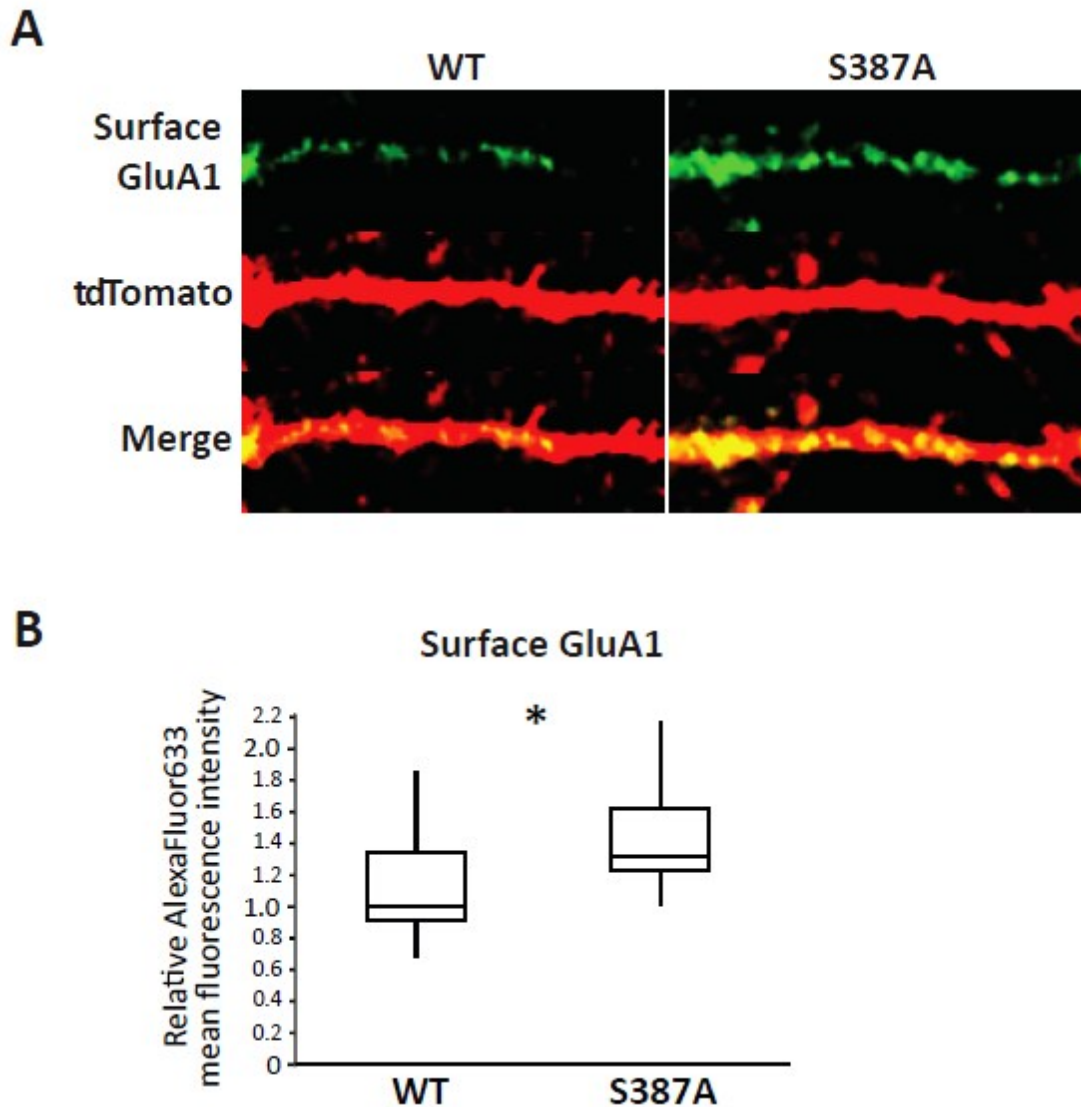


Figure 16. Ago2 S387 phosphorylation modulates GluA1 expression

A, Immunocytochemistry analysis of surface GluA1 (shown in green) of DIV 17 cultured hippocampal neurons, transfected with tdTomato (red) and either Ago2WT or Ago2S387A. **B**, Whisker and box plot of GluA1 (AlexaFluor633) mean fluorescence intensity (normalized to Ago2WT median; “Ago2WT”, n = 12; “Ago2S387A”, n = 16; two tailed Mann-Whitney U test, * p < 0.05).

3.3.3) Supplementary references

- Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., & Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, *125*(6), 1111-1124.
- Collino, F., Deregibus, M. C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., Tetta, C., & Camussi, G. (2010). Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One*, *5*(7), e11803.
- Coultrap, S. J., & Bayer, K. U. (2012). CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci*, *35*(10), 607-618.
- Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C. F., Fenteany, G., Goldberg, A. L., & Rock, K. L. (1997). Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem*, *272*(20), 13437-13445.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A., & Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, *398*(6727), 518-522.
- Didiot, M. C., Subramanian, M., Flatter, E., Mandel, J. L., & Moine, H. (2009). Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly. *Mol Biol Cell*, *20*(1), 428-437.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2008). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol*, *15*(4), 346-353.

- Ferreira, R., Santos, T., Amar, A., Gong, A., Chen, T. C., Tahara, S. M., Giannotta, S. L., & Hofman, F. M. (2014). Argonaute-2 promotes miR-18a entry in human brain endothelial cells. *J Am Heart Assoc*, 3(3), e000968.
- Goldberg, A. L. (2012). Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *J Cell Biol*, 199(4), 583-588.
- Henley, J. M., & Wilkinson, K. A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 17(6), 337-350.
- Ivanov, A., Pellegrino, C., Rama, S., Dumalska, I., Salyha, Y., Ben-Ari, Y., & Medina, I. (2006). Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol*, 572(Pt 3), 789-798.
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*, 16(7), 421-433.
- Kosik, K. S. (2016). Life at Low Copy Number: How Dendrites Manage with So Few mRNAs. *Neuron*, 92(6), 1168-1180.
- Leung, A. K. (2015). The Whereabouts of microRNA Actions: Cytoplasm and Beyond. *Trends Cell Biol*, 25(10), 601-610.
- Leung, A. K., Calabrese, J. M., & Sharp, P. A. (2006). Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(48), 18125-18130.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., & Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7(7), 719-723.
- Lu, W., Man, H., Ju, W., Trimble, W. S., MacDonald, J. F., & Wang, Y. T. (2001). Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 29(1), 243-254.

- Molnar, E. (2011). Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin Cell Dev Biol*, 22(5), 506-513.
- Rusakov, D. A., & Kullmann, D. M. (1998). Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J Neurosci*, 18(9), 3158-3170.
- Rybak, A., Fuchs, H., Hadian, K., Smirnova, L., Wulczyn, E. A., Michel, G., Nitsch, R., Krappmann, D., & Wulczyn, F. G. (2009). The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat Cell Biol*, 11(12), 1411-1420.
- Sik, A., Hajos, N., Gulacsi, A., Mody, I., & Freund, T. F. (1998). The absence of a major Ca²⁺ signaling pathway in GABAergic neurons of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3245-3250.
- Siman, R., Noszek, J. C., & Kegerise, C. (1989). Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J Neurosci*, 9(5), 1579-1590.
- Tawa, N. E., Jr., Odessey, R., & Goldberg, A. L. (1997). Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest*, 100(1), 197-203.
- Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T., & Svoboda, K. (2009). Rapid functional maturation of nascent dendritic spines. *Neuron*, 61(2), 247-258.

CHAPITRE 4 : DEUXIÈME SECTION DES RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

4.1) Informations générales sur la deuxième étude

4.1.1) Sujet de la deuxième étude

L'expression et le rôle des protéines Ago1 et Ago2 au cours du développement des neurones hippocampiques.

4.1.2) Contenu du chapitre

La deuxième section de résultats expérimentaux est constituée d'un article (en anglais; section 4.2) pour publication éventuelle.

4.1.3) Contributions des auteurs

J'ai conçu les expériences en collaboration avec mon directeur de recherche. Les plasmides d'ADNc pCI-tdTomato, pEGFP-Ago1, pEGFP-Ago2WT et pEGFP-Ago2PAZ10 ont été fournis par mon directeur de recherche et j'ai généré le construit pEGFP-Ago2S387A. J'ai réalisé toutes les expériences et les analyses des résultats. J'ai rédigé le manuscrit et mon directeur de recherche l'a révisé.

4.2) Article

4.2.1) General information

4.2.1.1) Title

Diverging roles for Ago1 and Ago2 proteins in dendrite morphogenesis

4.2.1.2) Authors

Nicolas Paradis-Isler; Jannic Boehm.

4.2.1.3) Keywords

Ago1, Ago2, Argonaute (AGO) proteins, dendrite, development, hippocampal neuron, maturation, morphogenesis, spine.

4.2.2) Abstract

MicroRNAs are involved in post-transcriptional regulation of gene expression and have been found to be important for neuronal development. Argonaute (AGO) proteins are the core effectors of the microRNA pathway. However, AGO proteins influence on neuronal maturation and dendrite morphogenesis remains poorly defined. Here, we report that Ago1 protein expression decreases during maturation of cultured hippocampal neurons, while Ago2 expression is sustained. By transfecting neurons to overexpress Ago1, we show that higher Ago1 levels are associated with decreased dendrite complexity in immature neurons and decreased dendritic spine density in mature neurons. Conversely, we show that neurons overexpressing Ago2 exhibit increased dendrite complexity and spine maturation. These results suggest that both the drop in Ago1 levels and the more sustained expression of Ago2 promote dendrite development during hippocampal neuron maturation. Furthermore, Ago2 serine 387 (S387) phosphorylation has previously been shown to be important for microRNA-dependent post-transcriptional regulation. We find that expression of a S387 deficient form of Ago2 (S387A) in neurons is associated with reduced dendrite complexity in comparison to wild type Ago2, supporting the importance of S387 phosphorylation for the regulation of Ago2 function in dendrite development. Overall, our data support divergent roles for Ago1 and Ago2 in dendrite morphogenesis.

4.2.3) Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding ribonucleic acids (RNAs), typically 19 to 24 nucleotides in length, present in all animals, as well as in plants and some viruses. They are predominantly involved in the post-transcriptional regulation of gene expression (Iwakawa & Tomari, 2015; Leung, 2015; Meister, 2013). miRNAs regulate both messenger RNA (mRNA) stability and translation into proteins through binding to partially complementary sites, most often situated in the 3' untranslated region (3'UTR), downstream from the protein coding region of mRNAs (Iwakawa & Tomari, 2015; Jonas & Izaurralde, 2015; Wilczynska &

Bushell, 2015). Each mRNA coding for a protein isoform has a specific miRNA signature with a unique combination of binding sites for different miRNAs. However, miRNAs cannot bind mRNAs autonomously, this type of interaction is mediated by Argonaute (AGO) proteins (Jonas & Izaurralde, 2015; Meister, 2013).

Mammals express four different AGO proteins: Ago1, Ago2, Ago3 and Ago4 (Meister, 2013; Sasaki, Shiohama, Minoshima, & Shimizu, 2003). In the brain, as in most organs, Ago1 and Ago2 are the two predominant forms (Juvvuna, Khandelia, Lee, & Makeyev, 2012; Valdmanis et al., 2012). Ago2 is the only mammalian AGO protein to possess Slicer cleaving activity, which is induced by short interfering RNAs (siRNAs) and catalyzes target cleavage leading to rapid degradation of mRNAs (Meister, 2013). Ago2 slicer endonuclease activity has also been found to be involved in several other endogenous processes like microRNA maturation and trimming as well as in mRNA splicing (Diederichs & Haber, 2007; Finnegan & Pasquinelli, 2013; Ha & Kim, 2014; Juvvuna et al., 2012; Meister, 2013; Yang & Lai, 2011; Yang et al., 2010). However, differences between Ago1 and Ago2 regulation and function remain largely unexplored in neurons.

In the present study, we find that Ago1 and Ago2 protein levels are differentially regulated during development of cultured hippocampal neurons. We find that Ago1 and Ago2 exert opposing influences on dendritic morphogenesis and maturation at different developmental stages. We also show that the effects on dendrite morphology associated with changes in Ago2 expression depend, to a great extent, on the possibility for Ago2 to be regulated by phosphorylation at its serine 387 (S387), a modification that we have previously shown to be implicated in spine morphogenesis (section 3.2). Together our results underline the importance of precise regulation of Ago1 and Ago2 expression and their different roles during dendritic development and maturation and point toward post translational regulation of Ago2 shaping the dendritic tree.

4.2.4) Materials and methods

4.2.4.1) DNA Constructs

pCI-tdTomato is described by Kopec *et al.* (2007). pEGFP-Ago1, pEGFP-Ago2WT and pEGFP-Ago2PAZ10 were cloned by cutting out human Ago1, Ago2WT and Ago2PAZ10 cDNAs out of pcDNA3-myc-Ago1, pcDNA3-myc-Ago2 and pcDNA3-myc-Ago2PAZ10 plasmids respectively (Liu *et al.*, 2004; Liu, Rivas, *et al.*, 2005; Liu, Valencia-Sanchez, Hannon, & Parker, 2005) and insertion into the pEGFP-C2 vector (Clontech). pEGFP-Ago2S387A was generated by PCR site-directed mutagenesis of pEGFP-Ago2WT. S387A mutagenic primers: 5'-GCAAATTGATGCGAAGTGCAGCTTTCAACACAGATCCATCCATACGTCCG-3'; 5'-CGGACGTATGGATGGATCTGTGTTGAAAGCTGCACTTCGCATCAATTTGC-3'.

4.2.4.2) Fixation and Immunofluorescence/Immunocytochemistry

Neurons were immediately with cold 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS with 5 mM MgCl₂ for 10 min and additionally in 2% PFA PBS for 10 min at room temperature (RT). For immunofluorescence analysis, cells were permeabilized and blocked in 0.2% Triton X-100 and 5% BSA in TBS for 20 min at RT. Neurons were then incubated with mouse monoclonal antibody against PSD-95 (ThermoFischer, Cat# MA1-046; RRID: AB_2092361), 1:400 (in 0.2% Tween TBS) overnight at 4 °C. Goat anti-mouse AlexaFluor633 (ThermoFisher) was used as secondary antibody, 1:200 (in 0.2% Tween TBS) for 2 hrs at room temperature. Coverslips were mounted with Prolong Diamond Antifade reagent (ThermoFisher).

4.2.4.3) Image acquisition and analysis

Imaging was performed with an Olympus Fluoview-1000 argon and diode laser scanning confocal microscope. For each experimental set, Aperture and Z-stack step were adjusted automatically through the Fluoviewer 4.1 software by selection of fluorophores and laser power and digital gain were adjusted for sufficient sensitivity without signal saturation and pixel correspondence was adjusted for quantitative acquisition. Image analysis was performed with Fluoviewer 4.2 and ImageJ softwares on summed or averaged Z-stack without enhancement.

4.2.4.4) Primary neuronal cultures and transfections

Hippocampi from E18-19 Sprague-Dawley rats were digested in trypsin (0.25%) and mechanically dissociated. Cells were plated onto poly-D-lysine (PDL) coated 6-well (35 mm) dishes at $2-3 \times 10^5$ cells/ml (for western blot experiments) and onto PDL/laminin coated glass coverslips (12 mm round Corning BioCoat Cellware) in 24-well plates at $7-8 \times 10^4$ cells/ml (for imaging experiments).

Cultures were maintained in Neurobasal medium with 2% B27 supplement and 0.5 mM GlutaMAX supplement (Gibco), with initially 2% FBS (HyClone), at 37°C and 5% CO₂. At 3 days *in vitro* (DIV 3), half of the media was replaced with media without FBS and with cytosine-β-D-arabinofuranoside (Ara-C, 2.5 μM) to inhibit glial proliferation. Subsequently, a third to half of the media was replaced without FBS every three to five days, depending on culture density and experimental time points.

Hippocampal neuronal cultures grown on coverslips were transfected with pCI-tdTomato and pEGFP-Ago2 constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) and then transferred to conditioned media without Lipofectamine for one to four days before fixation.

4.2.4.5) Western Blot

Immediately prior to lysis, cultures were washed once with ice cold PBS with 5 mM MgCl₂ and then with ice cold plain PBS. Whole cell extracts were obtained by scraping cells in denaturing lysis buffer (TBS 1% SDS; 200 μl per 35 mm well) and boiling samples at 95 °C for 10 min. Lysates were centrifuged in a tabletop centrifuge for 15 min and the supernatant collected. Lysates were cleared by centrifugation for 15 min at 17 kG (RT). Sample protein concentration was determined using a BCA protein assay kit (Thermo Scientific) and appropriate volumes of TBS 1% SDS were added to equalize protein concentration across samples. For loading sample preparation, lysates were diluted with an equal volume of 2x Laemmli buffer (10% β-Mercaptoethanol) and boiled at 100 °C for 5 min. Samples were loaded onto 10% SDS-PAGE for electrophoresis and transferred to PVDF membranes.

Membranes were blocked in 5% BSA in TBS 0.2% Tween (1hr, RT). Membranes were first probed with Ago1 rabbit polyclonal antibody (Millipore, Cat# 07-599; RRID: AB_310742), diluted 1:500 in blocking buffer, overnight at 4°C, followed by incubation with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Rockland Cat# 18-8816-33; RRID: AB_469529) and ECL (GE). Afterwards, membranes were stripped and probed with Ago2 mouse monoclonal antibody (Abcam, Cat# ab57113; RRID: AB_2230916), diluted 1:1000 in blocking buffer, overnight at 4°C, followed by incubation with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (ThermoFisher Scientific Cat# 31430, RRID: AB_228307) and ECL. β -actin mouse monoclonal antibody conjugated with peroxidase (Sigma-Aldrich Cat# A2228, RRID: AB_476697) was used as loading control.

4.2.4.6) Data representation and statistics

Graphical representation of Ago2/Ago1 ratio (figure 17-B) show mean values, with error bars representing standard error of the mean (SEM), for Ago2 band density standardized to Ago1 band density (y axis), in function of hippocampal neurons cultures age in days *in vitro* (DIV; x axis), with values for all timepoints normalized to the mean value for DIV4. Graphical representations of Sholl linear analysis (figures 18-B, 19-B, 21-B and 22-B) show mean values, with error bars representing SEM, for the number of dendritic intersections (y axis) in function of the radius (x axis). All other results were subjected to Kruskal-Wallis test (nonparametric ANOVA) with Dunn's multiple comparisons post hoc test, for null hypothesis testing, and were represented nonparametrically with whisker and box plots. The bottom whisker represents the spread of values belonging to the first quartile, the lower extremity corresponding to the minimum value of the sample. The lower box and the upper boxes represent the second and third quartile respectively, the middle line corresponding the median value of the sample. The top whisker represents the spread of values belonging to the fourth quartile of the sample, the upper extremity corresponding to the maximum value of the sample.

4.2.5) Results

4.2.5.1) Differential regulation of Ago1 and Ago2 protein levels during neuronal development

To evaluate how Ago1 and Ago2 protein levels evolve during neuronal development, three sets of cultured hippocampal neurons were prepared on separate occasions from embryonic day 18 or 19 (E18-19) rat brains. On the third day *in vitro* (DIV), cultures were treated with cytosine- β -D-arabino-furanoside (Ara-C, 2.5 μ M) to inhibit cell division to limit progenitor cell and glial proliferation and thus obtain cultures highly enriched in neurons closely synchronized in their development. Neuron cultures were then harvested at DIV 4, 7, 10, 13, 16, 20 and 24, and processed to obtain whole cell lysates and evaluate protein content by Western blot (WB) (figure 17). We found that while Ago2 protein remains relatively stable, Ago1 protein decreases throughout most of monitored time points during development of cultures (figure 17-A).

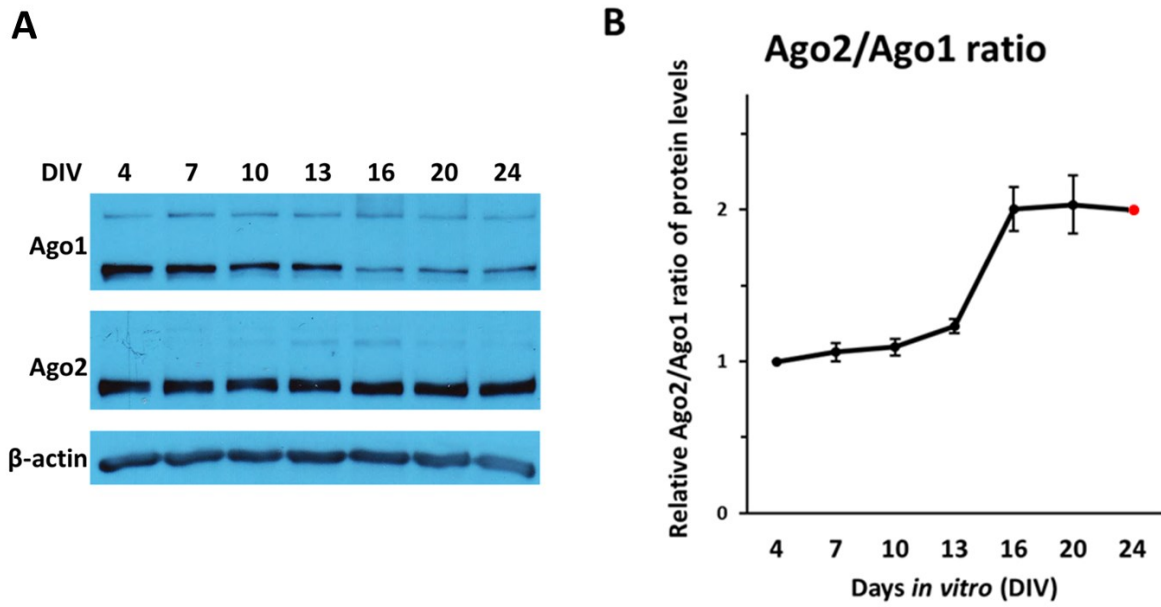


Figure 17. Ago1 and Ago2 protein levels are differentially regulated during the development of cultured hippocampal neurons

A, Western blot of Ago1 and Ago2 for matched hippocampal cultures harvested at different ages between DIV 4 and 24. *B*, Change in Ago2 abundance relative to Ago1: Ago2/Ago1 ratio, normalized to DIV 4 value (mean \pm SEM, $n = 3$ for all timepoints excepted DIV 24, $n = 2$).

4.2.5.2) Influence of Ago1 and Ago2 expression on dendrite morphogenesis in immature neurons

Regulation of Ago2 expression by the transcription factor Ncoa3 has been implicated in cultured cortical neurons dendrite morphogenesis (Storchel et al., 2015). However, it remains unclear whether changes in Ago2 levels alone can regulate dendrite development. It has been proposed that the distinctive temporal patterns for Ago1 and Ago2 expression during brain development contribute to fine tuning of the miRNA repertoire (Juvvuna et al., 2012). The differential regulation of Ago1 and Ago2 protein levels that we observed during hippocampal neuron development is therefore likely to have important implications for post-transcriptional regulation during neuronal morphogenesis.

We hypothesized that changes in Ago1 and Ago2 protein levels could impact dendritic growth and maturation differently, perhaps with opposing influences. Ago1 might exert an influence that favors morphological features associated with early neuronal development, or that restrains neuronal maturation. On the other hand, sustained expression of Ago2 might promote dendrite growth and maturation. To test whether preventing decline in Ago1 protein levels would perturb or slow dendrite development and, inversely, whether increasing Ago2 protein levels would promote it, we opted to induce overexpression of either Ago1 or Ago2 in immature neurons, for which dendrite growth and elaboration is very dynamic (Kaech & Banker, 2006).

We transfected DIV 3 neurons to express tdTomato, a red fluorescent protein, alongside either human Ago1 or Ago2, each tagged with enhanced green fluorescent protein (eGFP). We compared these Ago1 or Ago2 overexpressing neurons to control neurons, transfected to express tdTomato and unfused eGFP (without ectopic Ago1 and Ago2). The cultures were fixed at DIV 6 to observe neuronal morphology of transfected neurons by confocal microscopy. To quantify the effects of Ago1 and Ago2 overexpressing on dendrite development, we performed Sholl (linear) analysis which provides information on the number of dendritic branches as a function of distance from the soma (corresponding to the radius) using a “series of circles with increasing radii centred in its perikaryon” or soma (Milosevic & Ristanovic, 2007; Sholl, 1953).

To analyze dendrite morphology in more details, we derived from Sholl linear analysis two measures indicative of dendritic elaboration: maximal branching and the branching index. Maximal branching is a value that represents for each neuron the maximum number of intersections at any of the circles set for Sholl analysis or, in other words, the highest count of intersections at any of the given radiuses (Ferreira et al., 2014). The branching index of each neuron corresponds to the ratio formed by its maximal branching divided by the number of its primary dendrites, therefore provides an estimate of the degree of ramification within each dendritic tree (Ferreira et al., 2014; Schoenen, 1982).

In these immature neurons, Ago1 overexpression, in comparison to the control condition, is associated with reduced dendrite growth (figure 18-A) and dendritic complexity, predominantly in the area proximal to the soma (figure 18-B). Ago2 overexpression, on the other hand, appears to increase dendritic branching in comparison to both Ago1 overexpression and control condition (figures 18-A and B). When looking at maximal branching (figure 18-C), Ago1 overexpression is associated with maximal branching values significantly inferior to both control (eGFP) and Ago2 overexpression conditions. However, when comparing branching indexes (figure 18-D), the only significant trend is the higher branching index values associated with Ago2 overexpression in comparison to Ago1 overexpressing neurons. Collectively, the results presented in figure 18 reveal opposite influences on dendrite branching for Ago1 and Ago2 and indicate that upregulating Ago1 expression restricts dendrite development in immature neurons.

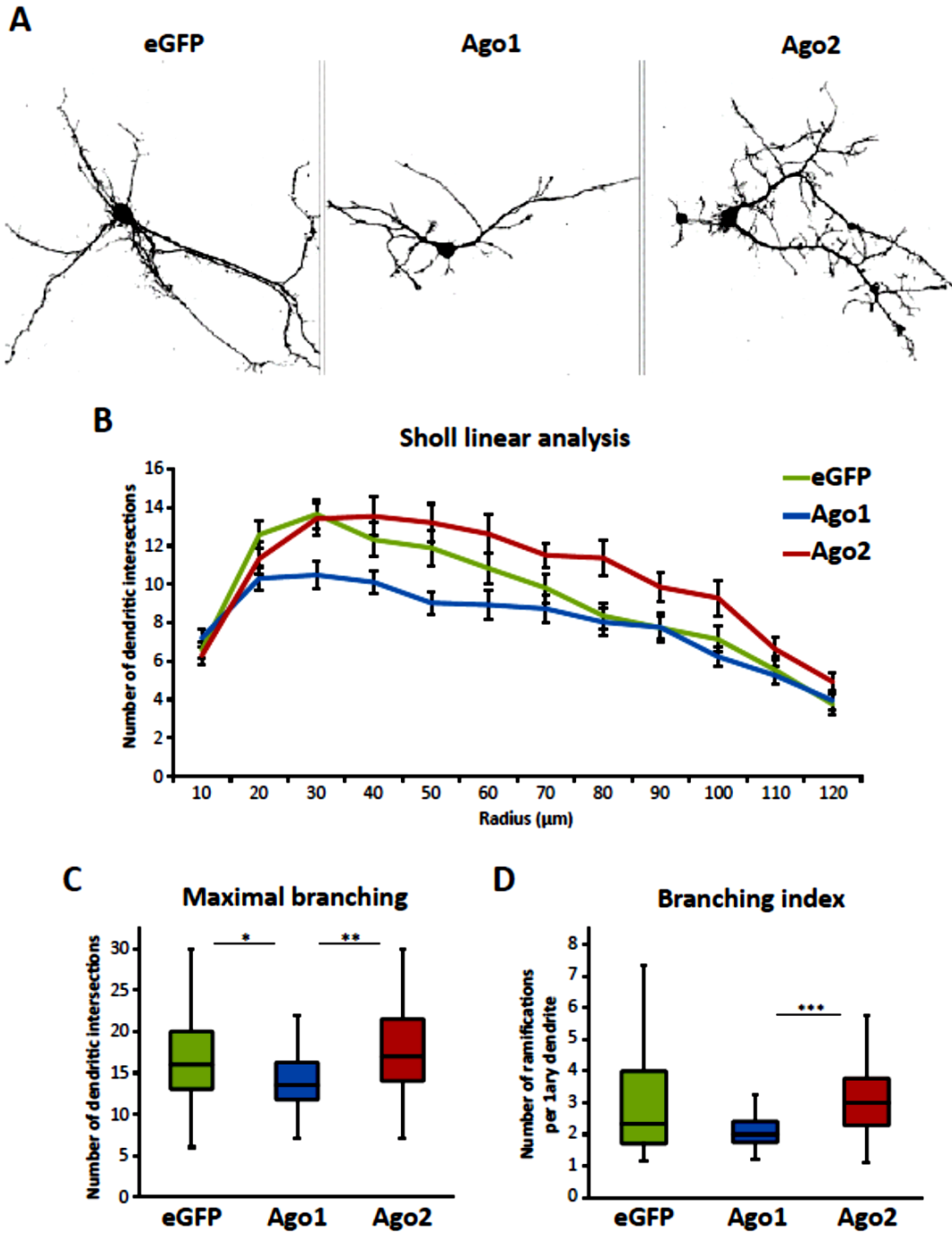


Figure 18. Influence of Ago1 and Ago2 expression in immature neurons on dendrite morphology

Figure 18 : *A*, Representative images (threshold/bin) of fixed DIV 6 cultured hippocampal neurons transfected at DIV 3 with tdTomato and either unfused eGFP, eGFP-Ago1 or eGFP-Ago2. *B*, Graphical representation of linear Sholl analysis: average number of intersections(\pm SEM) between dendritic segments and circle of corresponding radius. *C*, Whisker and box plot of maximal branching corresponding to the maximal number of intersections at any given radius (Kruskal-Wallis test, overall p value : 0.0048; Dunn's post test). *D*, Whisker and box plot of the ramification index corresponding to the ratio between the maximal number of intersections and the number of primary dendrites (Kruskal-Wallis test, overall p value : 0.0005; Dunn's post test). For *B-D*, "eGFP" n = 45, "Ago1" n = 40, "Ago2" n = 39; for C and D, Kruskal-Wallis test (non-parametric ANOVA) followed by Dunn's multiple comparisons test * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

4.2.5.3) Influence of Ago1 and Ago2 expression on dendrite morphogenesis in mature neurons

To observe the effects of upregulating either Ago1 or Ago2 levels on dendrite morphology of mature neurons, in which the dendritic tree is more stable, we transfected DIV 14 neurons, as we had previously done with DIV 3-6 neurons (figure 19), with a combination of tdTomato and either eGFP, eGFP-Ago1 or eGFP-Ago2, and fixed the cultures at DIV 18 to observe dendritic morphology (Kaech & Banker, 2006).

Most neurons transfected to express Ago1 do not exhibit distinctive features compared to control neurons (figure 19-A). Ago2 overexpressing neurons however appear in general to have a more elaborate dendritic tree than control neurons or those ectopically expressing Ago1. Sholl linear analysis confirms that in mature neurons Ago2 overexpression is associated with increased dendritic complexity (figure 19-B), while ectopic expression of Ago1 does not alter the Sholl distribution in any major way, in contrast to what we found for immature neurons (figure 18-B). Analysis of maximal branching yielded significantly greater values in Ago2 overexpressing neurons than in both control neurons and those transfected to express Ago1 (figure 19-C). When comparing the branching indexes (figure 19-D), values for Ago2 overexpressing neurons are significantly greater than values for Ago1 overexpressing neurons. The findings presented in figure 19 converge to show that increased Ago2 expression promotes dendritic complexity in mature neurons, similarly to the effects observed in immature neurons (figure 19).

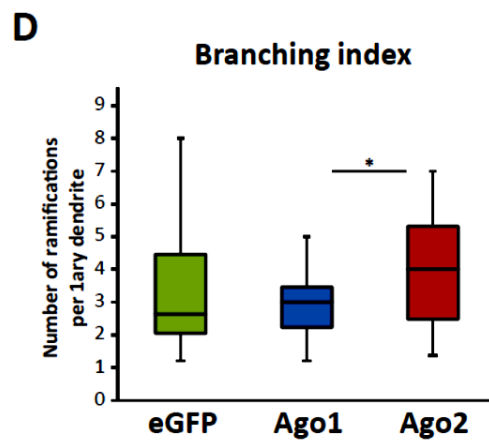
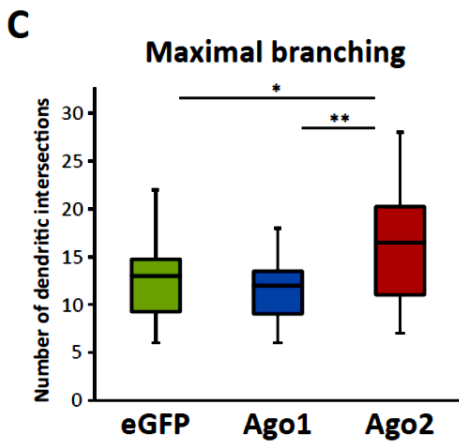
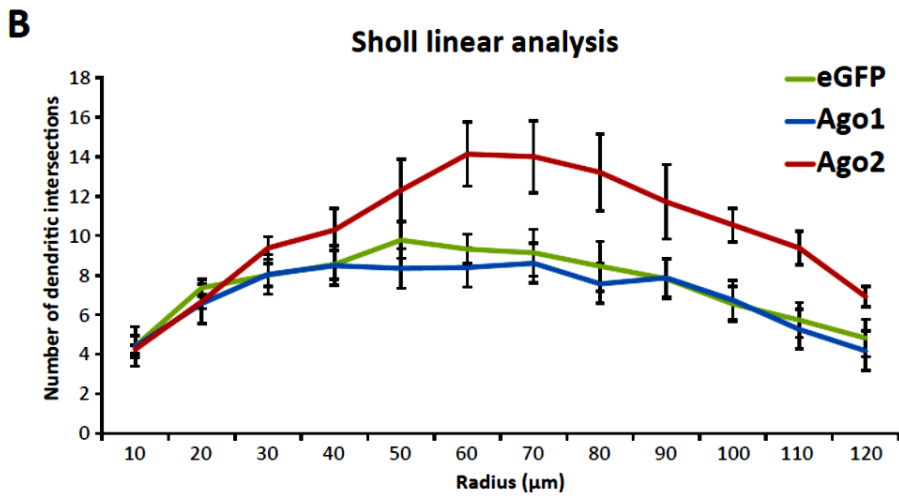
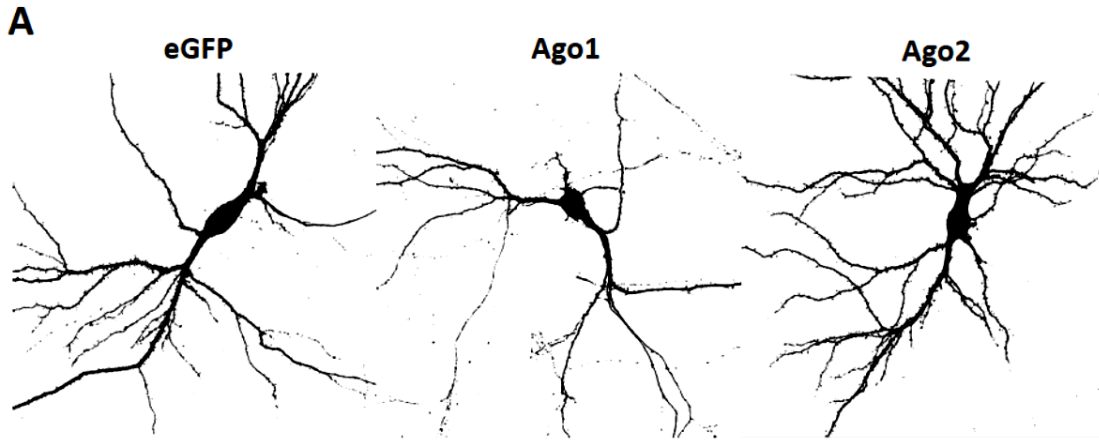


Figure 19. Influence of Ago1 and Ago2 expression in mature neurons on dendrite morphology

Figure 19 : *A*, Representative images (thresholded/bin) of fixed DIV 18 cultured hippocampal neurons transfected at DIV 14 with tdTomato and either unfused eGFP, eGFP-Ago1 or eGFP-Ago2. *B*, Graphical representation of Sholl linear analysis: average number of intersections(\pm SEM) between dendritic segments and circle of corresponding radius. *C*, Whisker and box plot of maximal branching corresponding to the maximal number of intersections at any given radius (Kruskal-Wallis test, overall p value : 0.0032; Dunn's post test). *D*, Whisker and box plot of the branching index corresponding to the ratio between the maximal number of intersections and the number of primary dendrites (Kruskal-Wallis test, overall p value : 0.0426; Dunn's post test). For *B-D*, "eGFP" n=22, "Ago1" n=23, "Ago2" n=24; For C and D, Kruskal-Wallis test (non-parametric ANOVA) followed by Dunn's multiple comparisons test * p < 0.05, ** p < 0.01.

4.2.5.4) Influence of Ago1 and Ago2 expression on dendritic spine maturation

We previously found evidence that post-translational regulation of Ago2 is implicated in structural plasticity of dendritic spines (section 3.2). Given that, in the first part of the present study, we found Ago1 protein expression to negatively regulate dendritic elaboration in immature neurons and Ago2 protein expression to positively regulate dendritic elaboration in mature neurons (figures 18 and 19), we speculated that Ago1 and Ago2 protein expression might also influence spine density and morphology in other ways. We hypothesized that Ago1 might have a repressive influence and/or Ago2 might have a permissive influence on spine formation and/or maturation. To observe the effects of upregulating Ago1 or Ago2 expression on dendritic spine density and maturation, we again used neurons transfected with a combination of tdTomato and either eGFP, eGFP-Ago1 or eGFP-Ago2 at DIV 14, then fixed at DIV 18 and labelled them with PSD-95 (PSD-95 fluorescence integrated density standardized to tdTomato fluorescence integrated density), a marker of spine stabilization and maturation (Bosch et al., 2014; Henley & Wilkinson, 2016; Meyer et al., 2014; Sala & Segal, 2014; Yoshii & Constantine-Paton, 2010).

We analyzed segments of tertiary dendrites of transfected neurons (figure 20-A). We found that Ago2 overexpressing neurons tended to exhibit significantly greater PSD-95 expression than neurons transfected to express eGFP or Ago1 (figure 20-B), suggesting that increased Ago2 levels promote spine maturation. When analyzing total spine density (for segments analyzed), ectopic expression of Ago1 was associated with lower values (figure 20-C), suggesting that higher Ago1 levels might inhibit spine formation or stabilization. To further characterize the effects of upregulating either Ago1 or Ago2 expression on spine morphology, we categorized spines according to three types: stubby, mushroom and thin (Takeuchi et al., 2014). Ectopic Ago1 expression was associated with reduced numbers of stubby spines compared to control neurons (figure 20-D), which appeared to be predominantly responsible for the reduced total spine density observed (figure 20-C). Neurons transfected to express Ago2 tended to have significantly more thin spines and mushroom spines (figures 20-E and F) compared to neurons transfected to express. Overall, the data presented in figure 20, points toward Ago1 expression having a repressive influence on spine formation and Ago2 expression having a permissive influence on spine growth and maturation.

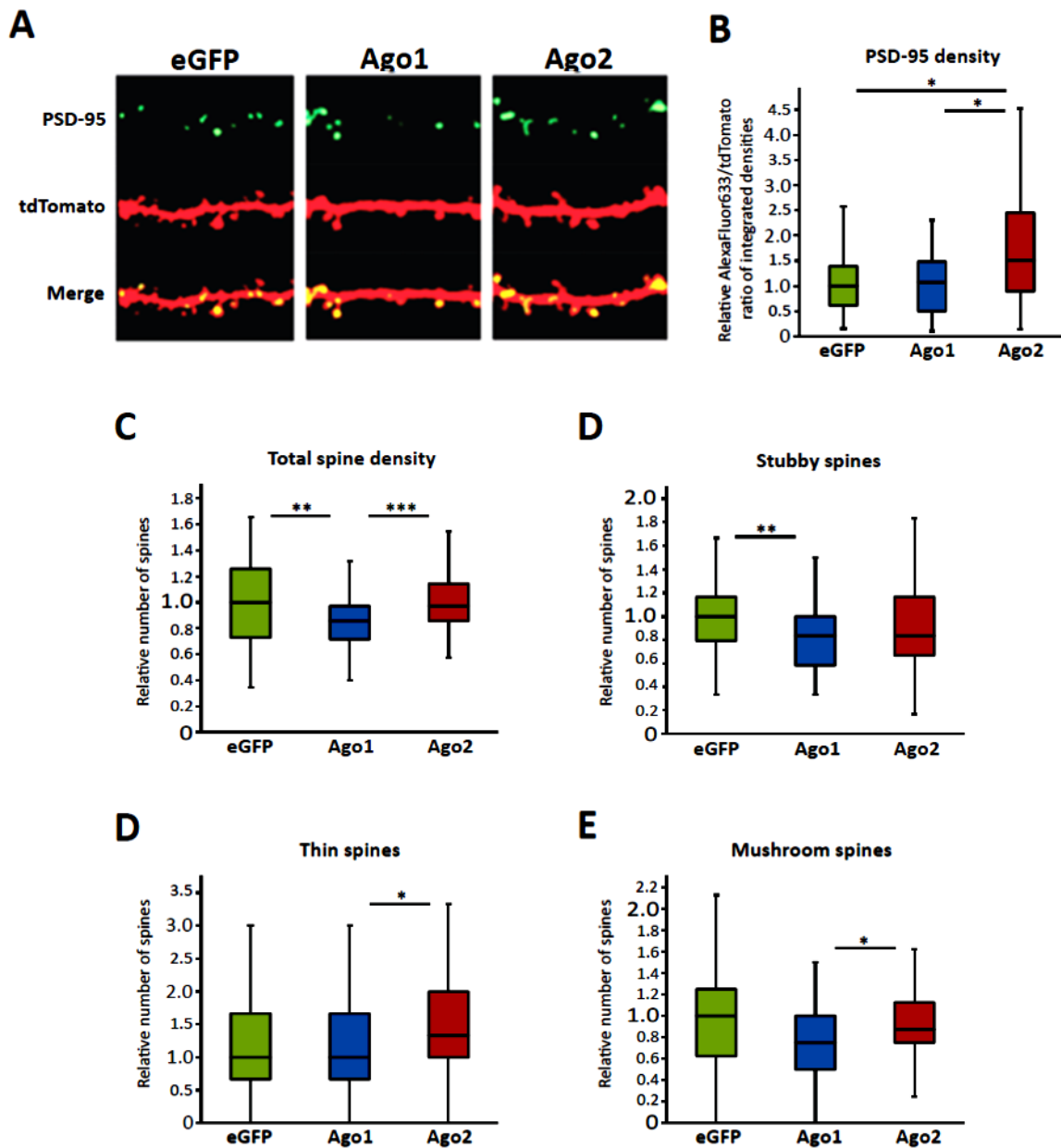


Figure 20. Influence of Ago1 and Ago2 expression on dendritic spine density and morphology

A, Representative images of tertiary dendrites of DIV 18 cultured hippocampal neurons fixed and labelled by immunocytochemistry for PSD-95 (shown in green), after being transfected at DIV 14 with tdTomato (shown in red) and either unfused eGFP, eGFP-Ago1 or eGFP-Ago2

(not shown). **B**, Whisker and box plot of relative PSD-95 expression on tertiary dendrites (corresponding to integrated density standardized to tdTomato integrated density; Kruskal-Wallis test, overall $p = 0.0069$; Dunn's post test). **C**, Whisker and box plot of relative total spine density of tertiary dendrites (Kruskal-Wallis test, overall p value < 0.0001 ; Dunn's post test). **D**, Whisker and box plot of relative stubby spine density of tertiary dendrites (Kruskal-Wallis test, overall p value : 0.0080 ; Dunn's post test). **E**, Whisker and box plot of relative mushroom spine density of tertiary dendrites (Kruskal-Wallis test, overall $p = 0.0327$; Dunn's post test). **F**, Whisker and box plot of relative mushroom spine density of tertiary dendrites (Kruskal-Wallis test, overall p value : 0.0389 ; Dunn's post test). For **B**, "eGFP" $n=54$, "Ago1" $n=57$, "Ago2" $n=79$. For **C-F**, "eGFP" $n=64$, "Ago1" $n=67$, "Ago2" $n=93$. For **B-F**, Kruskal-Wallis test (non-parametric ANOVA) followed by Dunn's multiple comparisons test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.2.5.5) Influence of Ago2 phosphorylation on dendrite morphogenesis in mature neurons

In a previous study, we found that NMDA receptor activation leads to dephosphorylation of Ago2 serine 387 (S387) (section 3.2). We also observed that inducing expression of a form of Ago2 in which S387 phosphorylation is blocked by a mutation of serine to alanine (S387A) increases dendritic spine density and maturation in neurons in comparison to the wild type form (WT). Given the established importance of NMDA receptor signaling in dendrite development and neuronal maturation (Tolias et al., 2005; Valnegri, Puram, & Bonni, 2015) and our findings in the present study indicating that Ago2 expression is positively correlated to dendritic development and maturation (figures 19 and 20), we thought that regulation of Ago2 S387 phosphorylation might also modulate dendrite elaboration. To determine whether Ago2 S387 phosphorylation regulates dendritic growth or branching, we transfected DIV 14 neurons with a combination of tdTomato and either eGFP, eGFP-Ago2WT or eGFP-Ago2S387A, and fixed the cultures at DIV 18 to observe dendritic morphology.

Given its positive effect on dendritic spine density and maturation (section 3.2), we surmised that expression of Ago2 S387A would promote dendritic elaboration even more than Ago2 (WT) overexpression. In conformity to what was observed in figure 19, Ago2 (WT) transfected mature neurons tended to exhibit a more complex dendritic arborescence than eGFP transfected neurons (figures 21-A and B). To our surprise however, neurons expressing Ago2 S387A appeared in general to have less ramified dendrites than neurons expressing Ago2WT (figures 21-A) and exhibited population-wise a pattern of dendritic elaboration similar to control (eGFP) neurons, as revealed by Sholl linear analysis (figure 21-B). Maximal branching analysis (figure 21-C) and calculation of the branching index (figure 21-D) further confirmed that Ago2 S387A transfected neurons exhibited reduced dendritic complexity in comparison to Ago2 WT transfected.

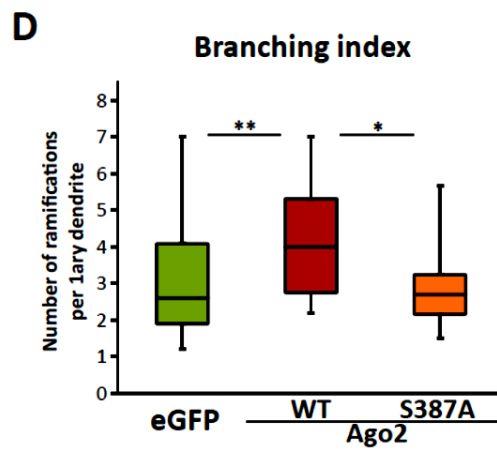
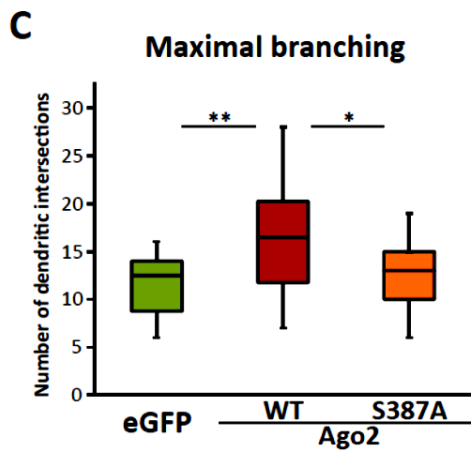
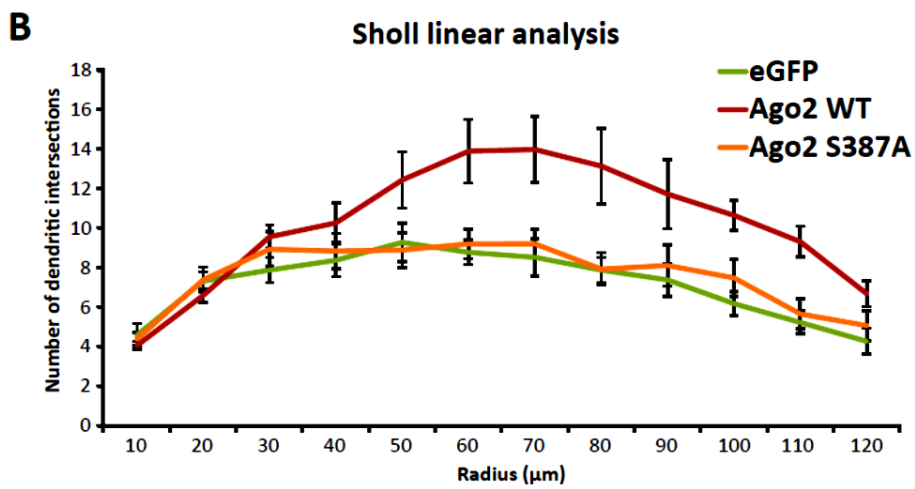
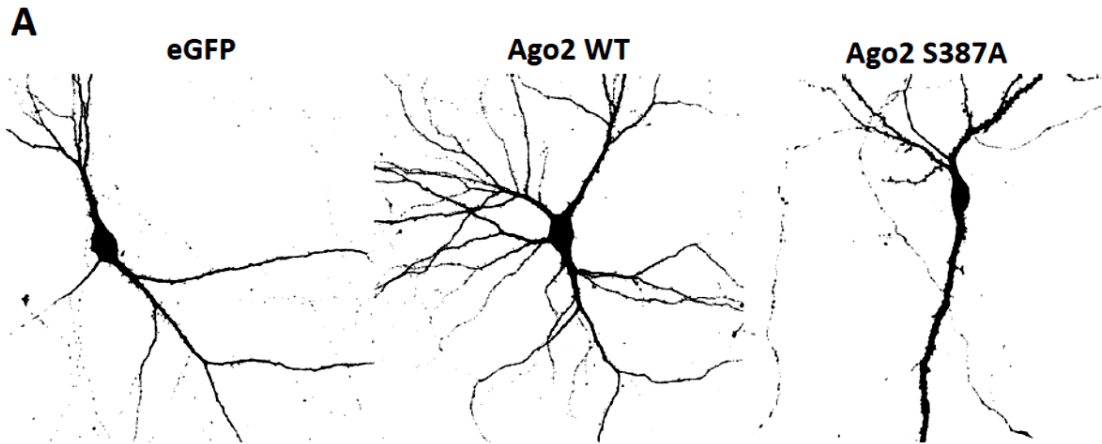


Figure 21. Impact of blocked Ago2 S387 phosphorylation on dendrite morphology

Figure 21 : *A*, Representative images (thresholded/bined) of fixed DIV 18 cultured hippocampal neurons transfected at DIV 14 with tdTomato and either unfused eGFP, eGFP-Ago2WT or eGFP-Ago2S387A. *B*, Graphical representation of Sholl linear analysis: average number of intersections(+/- SEM) between dendritic segments and circle of corresponding radius. *C*, Whisker and box plot of maximal branching corresponding to the maximal number of intersections at any given radius (Kruskal-Wallis test, overall p value : 0.0030; Dunn's post test). *D*, Whisker and box plot of the ramification index corresponding to the ratio between the maximal number of intersections and the number of primary dendrites (Kruskal-Wallis test, overall p value : 0.0101; Dunn's post test). For ***B-D***, "eGFP" n = 20, "Ago2 WT" n = 24, "Ago2 S387A" n = 22; For *C* and *D*, Kruskal-Wallis test (non-parametric ANOVA) followed by Dunn's multiple comparisons test * p < 0.05, ** p < 0.01.

We were puzzled by these results. We wondered whether the effects of Ago2 overexpression might be mitigated by increased turnover of Ago2 S387A, suggested by our previous findings (section 3.2), rather than by reduced miRNA-dependent regulation associated with Ago2 S387A (Horman et al., 2013; Jee & Lai, 2014; Meister, 2013). To limit the potential impact of Ago2 S387A decreased stability, we opted to observe the effects on morphology after a much shorter period of expression. Furthermore, to evaluate if differences between the effects associated with Ago2 WT and Ago2 S387A expression are attributable to reduced RNA binding ability of Ago2 S387A, we chose to also compare the impact of the expression of a miRNA-binding deficient Ago2 mutant form, Ago2 PAZ10, already used in several studies (Johnston, Geoffroy, Sobala, Hay, & Hutvagner, 2010; Liu, Rivas, et al., 2005; Liu, Valencia-Sanchez, et al., 2005; Vasudevan & Steitz, 2007). Therefore, we transfected DIV 14 neurons with a combination of tdTomato and either eGFP-Ago2WT, eGFP-Ago2S387A or eGFP-Ago2PAZ10, and fixed the cultures at DIV 15 to observe dendritic morphology.

Strikingly, even after less than 24 hours, neurons transfected to express Ago2 S387A or Ago2 PAZ10 exhibited dramatically reduced dendritic elaboration in comparison to Ago2 WT (figures 22-A and B). Maximal branching analysis (figure 22-C) further confirmed that both Ago2 S387A and Ago2 PAZ10 transfected neurons exhibited reduced dendritic complexity in comparison to Ago2 WT transfected neurons. The branching index tended to be lower for both Ago2 S387A and Ago2 PAZ10 transfected neurons than for Ago2 WT transfected neurons. With this short expression period (<24 h) however, the difference was statistically significant only for Ago2 PAZ10 (figure 22-D). Taken together, results presented in figures 21 and 22 suggest that the mutations perturbing Ago2's interaction with RNA abolish the effects of Ago2 overexpression on dendritic elaboration (seen in Ago2 WT neurons). Furthermore, these data support a role for regulation of dendrite morphogenesis by Ago2 phosphorylation, possibly through NMDA receptor signaling.

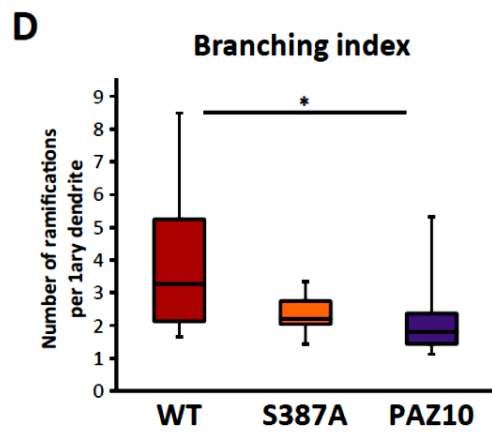
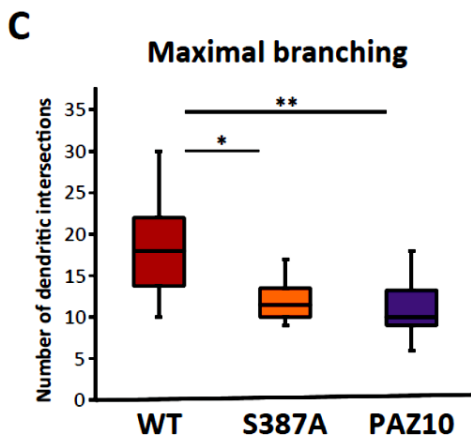
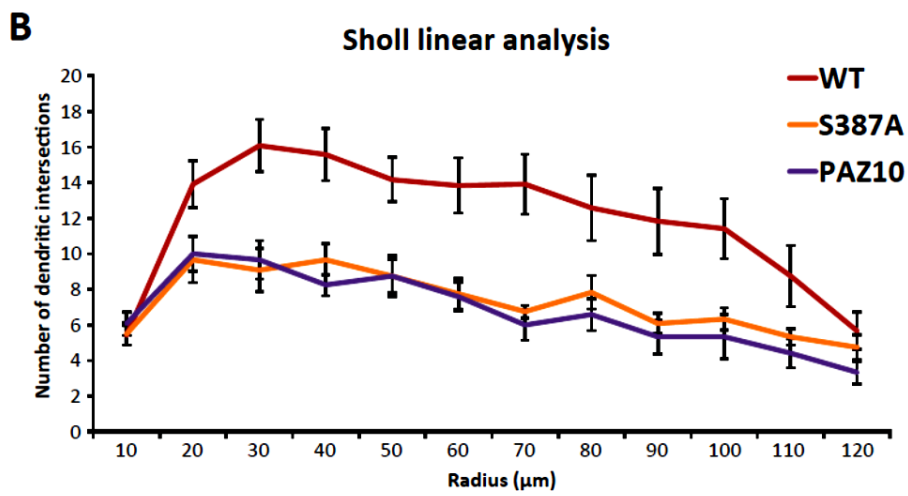
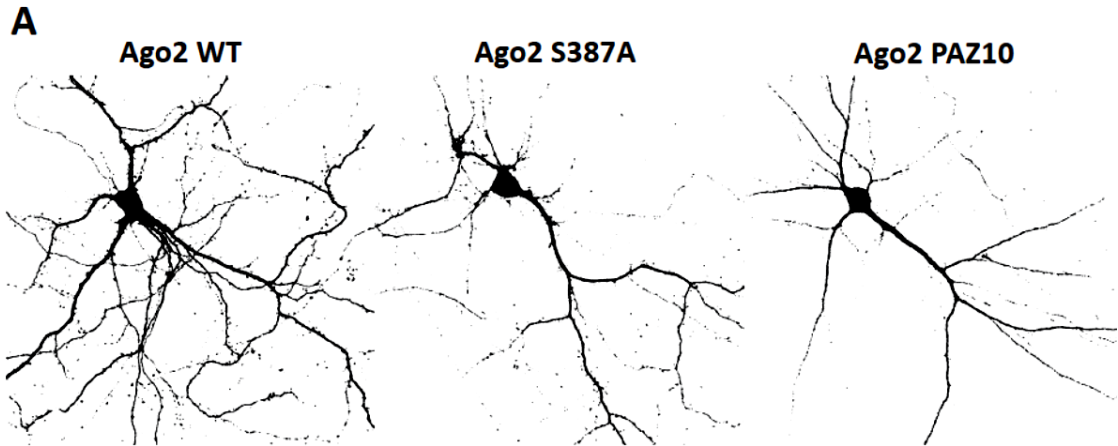


Figure 22. Impact of diminished Ago2 miRNA-binding on dendrite morphology

Figure 22 : *A*, Representative images (thresholded/bined) of fixed DIV 15 cultured hippocampal neurons transfected at DIV 14 with tdTomato and either eGFP-Ago2WT, eGFP-Ago2S387A or eGFP-Ago2PAZ10. *B*, Graphical representation of Sholl linear analysis: average number of intersections(+/- SEM) between dendritic segments and circle of corresponding radius. *C*, Whisker and box plot of maximal branching corresponding to the maximal number of intersections at any given radius (Kruskal-Wallis test, overall p value : 0.0024; Dunn's post test). *D*, Whisker and box plot of the ramification index corresponding to the ratio between the maximal number of intersections and the number of primary dendrites (Kruskal-Wallis test, overall p value : 0.0138; Dunn's post test). For ***B-D***, "WT" n = 12, "S387A" n = 12, "PAZ10" n = 12; For ***C*** and ***D***, Kruskal-Wallis test (non-parametric ANOVA) followed by Dunn's multiple comparisons test * p < 0.05, ** p < 0.01.

4.2.6) Discussion

4.2.6.1) The role of Ago1 versus Ago2 in dendrite morphogenesis

In the present study, we found that Ago1 levels decrease during development of cultured rat hippocampal neurons, while Ago2 levels were relatively stable (DIV 4 to DIV 24, figure 17-A). We observed that transfecting immature neurons (DIV3) to express Ago1 (up to DIV 6) had a restrictive effect on dendrite development (figure 18). On the other hand, neurons overexpressing Ago2 during a period associated with synaptic maturation (DIV 14-18) exhibited increased dendrite complexity (figure 19). Analyzing the influence of Ago1 and Ago2 expression on dendritic spine morphology in mature neurons, we found that Ago2 overexpression was associated with higher PSD-95 expression and number of mushroom spines in comparison to ectopic expression of Ago1 (figures 20-A, B and E). The later condition was also had associated to reduced total spine density and number of stubby spines in comparison to control neurons (figures 20-A, C and D). We also showed that blocking Ago2 phosphorylation at S387, implicated in modulation of miRNA-dependent translational repression (Horman et al., 2013), abolished the positive effects of Ago2 overexpression on dendritic complexity (figures 19 and 20).

The divergent temporal modulation of Ago1 and Ago2 protein levels, resulting in an upregulation of the Ago2/Ago1 ratio, during neuronal development that we have observed (figure 17) parallels the increase in the fractional abundance of Ago2 between mouse embryo (E12.5) and adult (P60) brain reported by Juvvuna et al. (2012). Although our previous finding that a fraction of dendritic Ago2 is rapidly degraded upon NMDA receptor activation (section 3.2) might seem to be conflicting with our results in the current study, these two phenomena are compatible. Indeed, elevated Ago2 levels allow the impact of activity-induced turnover of Ago2 to be restricted in space and time, with limited incidence on the total pool of Ago2 in the neuron. In this context, acute downregulation of Ago2 could affect only a limited set of dendritic mRNAs.

Importantly, we showed in the current study that upregulating Ago1 expression, and thus decreasing the fractional abundance of Ago2, in neurons early on (DIV 3 to 6), at an age where they typically exhibit a very rapid and dynamic development of the dendrites (Kaech &

Banker, 2006), appears to delay dendrite morphogenesis (figure 18). Inversely, Ago2 overexpression in neurons, which amplifies the developmental increase in Ago2 fractional abundance, appears to stimulate dendrite branching (figures 18 and 19), even at a stage when normally the number of dendrites has peaked for cultured hippocampal neurons (Kaech & Banker, 2006; Wu, Fujishima, & Kengaku, 2015). These last findings support the notion proposed by others that sustained Ago2 expression during neuronal development is important for dendrite morphogenesis (Storchel et al., 2015). Overall, our results concerning the respective influence of Ago1 and Ago2 expression on dendrite development reveal opposing roles for Ago1 and Ago2 in dendrite morphogenesis and point towards different periods for which their expression levels most critically impact this process.

Our results relating to the modulation of dendritic spine morphology by Ago1 and Ago2 levels also point towards them having diverging influences on postsynaptic maturation (figure 20). We find that expression of ectopic Ago1 reduces dendritic spine density, which is normally greatly increased during dendritic maturation (Kaech & Banker, 2006; Lohmann & Kessels, 2014; Sala & Segal, 2014). Ago2 overexpression on the other hand is associated with higher expression of PSD-95 in spines, which is associated to increased spine volume, maturation and stabilization (Bailey, Kandel, & Harris, 2015; Bosch et al., 2014; El-Husseini, Schnell, Chetkovich, Nicoll, & Brecht, 2000; Henley & Wilkinson, 2016; Meyer et al., 2014; Sala & Segal, 2014; Takeuchi et al., 2014; Yoshii & Constantine-Paton, 2010).

Furthermore, in comparison to control neurons, those transfected to express Ago1 have reduced numbers of stubby spines, the smallest spines that most often correspond to nascent spines (Bailey et al., 2015; Engert & Bonhoeffer, 1999). Also, neurons transfected to express Ago2 exhibit more thin and mushroom spines in comparison to those transfected to express Ago1. Thin spines or dendritic filopodia are often very motile and especially sensitive to ambient activity (Sala & Segal, 2014). Mushroom spines are characteristically more mature, correlated to higher PSD-95 expression and increased AMPA receptors at the postsynaptic surface (Bailey et al., 2015; Matsuzaki et al., 2001; Sala & Segal, 2014; Takeuchi et al., 2014). Overall, these findings point toward Ago1 having a repressive influence on spine formation, while Ago2 has a permissive influence on spine growth and maturation. Furthermore, these

results bring further support the importance of increased Ago2 fractional abundance in neuronal development (Juvvuna et al., 2012).

It has been proposed that the distinctive temporal patterns for Ago1 and Ago2 expression during brain development regulate the generation of variants of the same miRNA that differ in length, most often by only one nucleotide, referred to as iso-miRs (Juvvuna et al., 2012). Iso-miRs have slightly different affinities for the same targets (Ameres & Zamore, 2013) One of the processes that may account for iso-miRs is the shortening of some miRNAs loaded onto AGO proteins by nucleotide excision at the 3' tail, miRNA trimming (Bartel, 2009; Fernandez-Valverde, Taft, & Mattick, 2010). Higher “Ago2 fractional abundance”, which is assumed to increase the likelihood of miRNAs being loaded onto Ago2 rather than Ago1, was found to be associated to an upregulation of miRNA trimming also observed during mouse brain development (Juvvuna et al., 2012). Therefore, increased miRNA trimming, which modifies the targeting specificity of miRNAs, might be one of the underlying mechanisms for the diverging effects of ectopic Ago1 and Ago2 expression on dendrite and spine morphogenesis we have observed.

Nevertheless, other functional differences between Ago1 and Ago2 might contribute to their diverging influence on dendrite development and maturation. It has been reported that miRNAs are indistinctively loaded onto the various AGO proteins in mammalian cells (Burroughs et al., 2011; Dueck, Ziegler, Eichner, Berezikov, & Meister, 2012; Wang et al., 2012). However, recent evidence points toward Ago1 and Ago2 associating with different miRNAs to form functionally distinct miRISCs that can both target the same mRNA (Ghosh & Adhya, 2016). Ghosh et al. (2016) reported that Ago1 associates to miR-1 to downregulate cyclin D1 (Cnd1) mRNA levels while Ago2 associates to let-7 primarily to repress Cnd1 translation in rat myoblasts entering G1 phase. Furthermore, the authors also found that miRNA-targeted Cnd1 mRNA formed two subpopulations: one targeted by both Ago1 and Ago2, the other targeted by Ago2 alone. It is thus tempting to speculate that in neurons, Ago1 and Ago2 might also associate preferentially with certain miRNAs forming functionally distinct miRISCs and that in immature neurons some transcripts might generally be targeted by both Ago1 and Ago2, while the same transcripts might be more susceptible to be targeted

by Ago2 only in mature neurons.

Ago1 and Ago2 might also impact mRNA localization and translation in ways that are mostly independent of sequence specificity, i.e. not directly dependent of the specific miRNAs loaded or mRNAs targeted. Given that preferential interaction of several RNA-binding proteins (RBPs) with either Ago1 or Ago2 has been reported, Ago1 and Ago2 might also impact differently the fate of mRNAs by recruiting different sets of RBPs (Hock et al., 2007). Furthermore, Ago2 association to miRISC partner proteins such as Dcp1, FMRP and MOV10 that have important implications for regulation of dendritic mRNAs has been reported, but have remained largely unexplored for Ago1 (Aksoy-Aksel, Zampa, & Schratt, 2014; Cougot et al., 2008; Kenny et al., 2014; Muddashetty et al., 2011).

4.2.6.2) A potential role for post-translational regulation of Ago2 in dendritic maturation

Another important aspect that can potentially underlie some of the functional divergence between Ago1 and Ago2 might be differences in the way these two proteins are regulated by post-translational modifications (Jee & Lai, 2014; Meister, 2013). Ago2 serine387 (S387) phosphorylation has been previously implicated by others in Ago2 localization, association to GW182 and to miRNA-dependent repression (Horman et al., 2013; McKenzie et al., 2016; Zeng, Sankala, Zhang, & Graves, 2008) and we have previously found this modification of Ago2 to be regulated by NMDA receptor activity and to modulate dendritic spine structural plasticity (section 3.2). In the present study, we therefore also sought to verify if S387 phosphorylation regulated Ago2 function in dendrite morphogenesis.

The results obtained with the Ago2 S387A mutant were unexpected and lead us to a more complex interpretation. We found in a previous study (section 3.2) that the expression of Ago2 S387A favors increased dendritic spine density, numbers of mushroom spines and PSD-95 expression, all features associated with neuronal maturation (Kaech & Banker, 2006; Lohmann & Kessels, 2014). Therefore, we expected Ago2 S387A expression to promote dendrite development, at least as much as overexpression of Ago2 (WT) if not more. To our surprise, we found that Ago2 S387A was associated with greatly reduced dendritic complexity

in comparison with the WT to an extent where it appeared to reverse the effects of Ago2 overexpression and decrease dendritic complexity to the same level as that seen with control neurons (figure 21). At first, we had difficulty reconciling these observations with the role we found for Ago2 dephosphorylation in our previous study (section 3.2). One potential phenomena we thought could explain the results obtained in figure 21, was the decreased stability we have found to be associated with Ago2 S387A. In our view, it seemed likely that during the relatively long period of expression (DIV 14-18), an important proportion of Ago2 S387A could be degraded and thus prevent sufficient Ago2 accumulation necessary to alter dendrite morphogenesis,

However, we found that even with a much shorter period of expression (DIV 14-15) Ago2 S387A led to a decrease in dendrite complexity in comparison to Ago2 WT (figure 22). Also, Ago2 PAZ10, a form with multiple mutations within its PAZ domain and reported to be deficient in miRNA-binding (Liu, Valencia-Sanchez, et al., 2005), appeared to exert a similar effect on dendrite morphogenesis. Even within this narrowed timeframe, it cannot be excluded that Ago2 S387A reduced stability might substantially increase its turnover. Also, it is plausible that Ago2 PAZ10, staying in principle devoid of miRNA, has its stability reduced and its turnover increased accordingly to a proposed model in which unloaded AGO proteins are prone to degradation (Jee & Lai, 2014).

Nevertheless, our findings could also be explained by the role of neuronal activity in dendrite pruning (Valnegri et al., 2015). Calcium transients generated through voltage-gated calcium channels (VGCCs) have been shown to promote dendrite pruning (Kanamori et al., 2013).

NMDA receptor activity can also trigger calcium influx, directly through the pore formed by this receptor, and indirectly by leading to activation of VGCCs (Kostandy, 2012).

Furthermore, calcium entry via NMDA receptors and VGCCs stimulates several of the same protein kinases and phosphatases (Woolfrey & Dell'Acqua, 2015). Therefore, it is plausible that activity-induced dephosphorylation of Ago2 at S387 could contribute to the translational regulation necessary for dendrite pruning at a certain developmental stage. Also, given that we have found in our previous study that expression of Ago2 S387A promotes PSD-95 expression in comparison to Ago2 WT, it is important to note that PSD-95 expression has been reported

to slow dendritic growth (Charych et al., 2006). The perspective brought by these aspects of dendrite development suggest that expression of Ago2 S387A could amplify some of the processes governed normally by synaptic activity and dendritic depolarization that limit dendrite elaboration or trigger elimination of non stabilized branches at the stage of synaptic maturation (Valnegri et al., 2015).

4.2.7) References

- Aksoy-Aksel, A., Zampa, F., & Schratt, G. (2014). MicroRNAs and synaptic plasticity--a mutual relationship. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1652).
- Ameres, S. L., & Zamore, P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(8), 475-488.
- Bailey, C. H., Kandel, E. R., & Harris, K. M. (2015). Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(7), a021758.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233.
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, 82(2), 444-459.
- Burroughs, A. M., Ando, Y., de Hoon, M. J., Tomaru, Y., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., & Daub, C. O. (2011). Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biol*, 8(1), 158-177.

- Charych, E. I., Akum, B. F., Goldberg, J. S., Jornsten, R. J., Rongo, C., Zheng, J. Q., & Firestein, B. L. (2006). Activity-independent regulation of dendrite patterning by postsynaptic density protein PSD-95. *J Neurosci*, *26*(40), 10164-10176.
- Cougot, N., Bhattacharyya, S. N., Tapia-Arancibia, L., Bordonne, R., Filipowicz, W., Bertrand, E., & Rage, F. (2008). Dendrites of mammalian neurons contain specialized P-body-like structures that respond to neuronal activation. *J Neurosci*, *28*(51), 13793-13804.
- Diederichs, S., & Haber, D. A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, *131*(6), 1097-1108.
- Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E., & Meister, G. (2012). microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res*, *40*(19), 9850-9862.
- El-Husseini, A. E., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A., & Brecht, D. S. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, *290*(5495), 1364-1368.
- Engert, F., & Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, *399*(6731), 66-70.
- Fernandez-Valverde, S. L., Taft, R. J., & Mattick, J. S. (2010). Dynamic isomiR regulation in *Drosophila* development. *RNA*, *16*(10), 1881-1888.
- Ferreira, T. A., Blackman, A. V., Oyrer, J., Jayabal, S., Chung, A. J., Watt, A. J., Sjöström, P. J., & van Meyel, D. J. (2014). Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Methods*, *11*(10), 982-984.
- Finnegan, E. F., & Pasquinelli, A. E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *48*(1), 51-68.
- Ghosh, U., & Adhya, S. (2016). Non-equivalent Roles of AGO1 and AGO2 in mRNA Turnover and Translation of Cyclin D1 mRNA. *J Biol Chem*, *291*(13), 7119-7127.
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*(8), 509-524.

- Henley, J. M., & Wilkinson, K. A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, *17*(6), 337-350.
- Hock, J., Weinmann, L., Ender, C., Rudel, S., Kremmer, E., Raabe, M., Urlaub, H., & Meister, G. (2007). Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep*, *8*(11), 1052-1060.
- Horman, S. R., Janas, M. M., Litterst, C., Wang, B., MacRae, I. J., Sever, M. J., Morrissey, D. V., Graves, P., Luo, B., Umesalma, S., Qi, H. H., Miraglia, L. J., Novina, C. D., & Orth, A. P. (2013). Akt-mediated phosphorylation of argonaute 2 downregulates cleavage and upregulates translational repression of MicroRNA targets. *Mol Cell*, *50*(3), 356-367.
- Iwakawa, H. O., & Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol*, *25*(11), 651-665.
- Jee, D., & Lai, E. C. (2014). Alteration of miRNA activity via context-specific modifications of Argonaute proteins. *Trends Cell Biol*, *24*(9), 546-553.
- Johnston, M., Geoffroy, M. C., Sobala, A., Hay, R., & Hutvagner, G. (2010). HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol Biol Cell*, *21*(9), 1462-1469.
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*, *16*(7), 421-433.
- Juvvuna, P. K., Khandelia, P., Lee, L. M., & Makeyev, E. V. (2012). Argonaute identity defines the length of mature mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res*, *40*(14), 6808-6820.
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*, *1*(5), 2406-2415.
- Kanamori, T., Kanai, M. I., Dairyo, Y., Yasunaga, K., Morikawa, R. K., & Emoto, K. (2013). Compartmentalized calcium transients trigger dendrite pruning in Drosophila sensory neurons. *Science*, *340*(6139), 1475-1478.

- Kenny, P. J., Zhou, H., Kim, M., Skariah, G., Khetani, R. S., Drnevich, J., Arcila, M. L., Kosik, K. S., & Ceman, S. (2014). MOV10 and FMRP regulate AGO2 association with microRNA recognition elements. *Cell Rep*, 9(5), 1729-1741.
- Kostandy, B. B. (2012). The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci*, 33(2), 223-237.
- Leung, A. K. (2015). The Whereabouts of microRNA Actions: Cytoplasm and Beyond. *Trends Cell Biol*, 25(10), 601-610.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., & Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305(5689), 1437-1441.
- Liu, J., Rivas, F. V., Wohlschlegel, J., Yates, J. R., 3rd, Parker, R., & Hannon, G. J. (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*, 7(12), 1261-1266.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., & Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7(7), 719-723.
- Lohmann, C., & Kessels, H. W. (2014). The developmental stages of synaptic plasticity. *J Physiol*, 592(1), 13-31.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*, 4(11), 1086-1092.
- McKenzie, A. J., Hoshino, D., Hong, N. H., Cha, D. J., Franklin, J. L., Coffey, R. J., Patton, J. G., & Weaver, A. M. (2016). KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Reports*, 15(5), 978-987.
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins : functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet*, 14(7), 447-459.

- Meyer, D., Bonhoeffer, T., & Scheuss, V. (2014). Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron*, 82(2), 430-443.
- Milosevic, N. T., & Ristanovic, D. (2007). The Sholl analysis of neuronal cell images: semi-log or log-log method? *J Theor Biol*, 245(1), 130-140.
- Muddashetty, R. S., Nalavadi, V. C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, S. T., & Bassell, G. J. (2011). Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Mol Cell*, 42(5), 673-688.
- Sala, C., & Segal, M. (2014). Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev*, 94(1), 141-188.
- Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., & Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics*, 82(3), 323-330.
- Schoenen, J. (1982). Dendritic organization of the human spinal cord: the motoneurons. *J Comp Neurol*, 211(3), 226-247.
- Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 87(4), 387-406.
- Storchel, P. H., Thummler, J., Siegel, G., Aksoy-Aksel, A., Zampa, F., Sumer, S., & Schrott, G. (2015). A large-scale functional screen identifies Noval1 and Ncoa3 as regulators of neuronal miRNA function. *EMBO J*, 34(17), 2237-2254.
- Takeuchi, T., Duzkiewicz, A. J., & Morris, R. G. (2014). The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1633), 20130288.
- Tolias, K. F., Bikoff, J. B., Burette, A., Paradis, S., Harrar, D., Tavazoie, S., Weinberg, R. J., & Greenberg, M. E. (2005). The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron*, 45(4), 525-538.

- Valdmanis, P. N., Gu, S., Schuermann, N., Sethupathy, P., Grimm, D., & Kay, M. A. (2012). Expression determinants of mammalian argonaute proteins in mediating gene silencing. *Nucleic Acids Res*, *40*(8), 3704-3713.
- Valnegri, P., Puram, S. V., & Bonni, A. (2015). Regulation of dendrite morphogenesis by extrinsic cues. *Trends Neurosci*, *38*(7), 439-447.
- Vasudevan, S., & Steitz, J. A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, *128*(6), 1105-1118.
- Wang, D., Zhang, Z., O'Loughlin, E., Lee, T., Houel, S., O'Carroll, D., Tarakhovskiy, A., Ahn, N. G., & Yi, R. (2012). Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development. *Genes Dev*, *26*(7), 693-704.
- Wilczynska, A., & Bushell, M. (2015). The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ*, *22*(1), 22-33.
- Woolfrey, K. M., & Dell'Acqua, M. L. (2015). Coordination of Protein Phosphorylation and Dephosphorylation in Synaptic Plasticity. *J Biol Chem*, *290*(48), 28604-28612.
- Wu, Y. K., Fujishima, K., & Kengaku, M. (2015). Differentiation of apical and basal dendrites in pyramidal cells and granule cells in dissociated hippocampal cultures. *PLoS One*, *10*(2), e0118482.
- Yang, J. S., & Lai, E. C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell*, *43*(6), 892-903.
- Yang, J. S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R., Papapetrou, E. P., Sadelain, M., O'Carroll, D., & Lai, E. C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(34), 15163-15168.
- Yoshii, A., & Constantine-Paton, M. (2010). Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*, *70*(5), 304-322.

Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X., & Graves, P. R. (2008). Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem J*, 413(3), 429-436.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

5.1) Discussion autour de la première étude

Plusieurs études par des équipes de recherche indépendantes ont mis en cause l'activité des récepteurs NMDA dans la régulation des interactions et de la localisation d'Ago2 (Aksoy-Aksel et al., 2014; Antoniou et al., 2014; Cougot et al., 2008; Lugli et al., 2005; Meister, 2013; Pai et al., 2014; Smalheiser, 2014; Zeitelhofer, Karra, et al., 2008). Toutefois, les façons par lesquelles la transduction des signaux découlant des récepteurs NMDA régulent directement la fonction d'Ago2 sont demeurées jusqu'à présent pratiquement inconnues. Dans la première étude, nous avons donc cherché à détailler les effets aigus de l'activation des récepteurs NMDA sur la fonction d'Ago2 et à cerner certains des mécanismes responsables de ces effets dans les neurones hippocampiques.

5.1.1) Rappel des principaux objectifs, résultats et conclusions de la première étude

Nous avons trouvé que l'activation des récepteurs NMDA était associée à une dégradation de la protéine Ago2, dépendante des protéasomes, dans les neurones hippocampiques et leurs dendrites (figures 1, 3-D, 4-A et 5). Puisque la phosphorylation d'Ago2 sur sa sérine387 (S387) a été mise en cause dans la localisation d'Ago2 et la régulation traductionnelle dépendante des miARN, nous avons voulu vérifier si cette modification post-traductionnelle était régulée par la signalisation découlant des récepteurs NMDA (Horman et al., 2013; Jee et Lai, 2014; Leung, 2015; Meister, 2013; Zeng et al., 2008). Nous avons constaté que le taux de phosphorylation d'Ago2 S387 était régulé à la baisse de façon aiguë suivant l'activation des récepteurs NMDA (figure 3) et nous avons vérifié aussi que cette baisse résultait d'une déphosphorylation apparaissant précéder et favoriser la dégradation de la protéine Ago2 dans ces conditions (figures 3 et 4). Nos observations suggèrent que la déphosphorylation d'Ago2 en S387 est nécessaire à la formation de nouvelles épines dendritiques suivant une forte activation des récepteurs NMDA et indiquent aussi que cette déphosphorylation pourrait favoriser à plus long terme la maturation des épines dendritiques (figure 6).

5.1.2) Les résultats de la première étude et les données de la littérature

5.1.2.1) L'expression et le turnover de la protéine Ago2 dans les neurones

5.1.2.1.1) L'expression de la protéine Ago2 en fonction de l'activité des récepteurs NMDA

À notre connaissance, une seule autre étude a rapporté une analyse du taux protéique d'Ago2 dans des neurones suivant une stimulation de l'activité des récepteurs NMDA (Pai et al., 2014). Cette étude, décrivant les effets d'une induction de PLT dans l'hippocampe de rat *in vivo*, n'a toutefois rapporté aucun changement significatif de l'expression d'Ago2 (Pai et al., 2014). Il est important de souligner ici que plusieurs facteurs peuvent expliquer la divergence entre les observations de Pai et al. (2014) et les nôtres.

Bien que le type de protocole d'induction de PLT dans l'hippocampe *in vivo* par stimulation téτανique, c'est-à-dire à haute fréquence (« *HFS* »), du gyrus dentelé employé par Pai et al. (2014) peut entraîner une activation de récepteurs NMDA aux différentes synapses du circuit trisynaptique, ce paradigme de stimulation active davantage les canaux calciques voltage-dépendants (de type L) que les récepteurs NMDA et induit une PLT qui est principalement exprimée de façon présynaptique aux synapses formées par les fibres moussues sur les neurones pyramidaux du CA3 (Bliss et al., 2014; Citri et Malenka, 2008; Malenka et Bear, 2004). De plus, les autres types de récepteurs du glutamate sont susceptibles d'être aussi activés de façon importante dans ces conditions (Citri et Malenka, 2008; Malenka et Bear, 2004). Ainsi, la combinaison de ces facteurs indique que les types de signalisation et de plasticité associés à la stimulation téτανique du gyrus dentelé divergent de ceux déclenchés par le traitement de neurones hippocampiques avec du NMDA, assurant une activation prédominante de récepteurs NMDA et l'induction d'adaptations postsynaptiques telles que nous l'avons observé ou d'autres auteurs l'ont rapporté (Beattie et al., 2000).

D'autre part, Pai et al. (2014) ont réalisé leurs observations au plus tôt 30 minutes après leur protocole de stimulation, alors que nous avons évalué les quantités d'Ago2 le plus souvent immédiatement après l'activation des récepteurs NMDA ou sinon, au plus tard 15 minutes après la stimulation. De plus, Pai et al. (2014) ont mesuré ce taux dans des homogénats d'hippocampe

entier, et non seulement de la région stimulée, incluant une proportion importante d'astrocytes, d'oligodendrocytes et de microglies susceptibles de masquer des changements spécifiques aux neurones stimulés. En contraste, nous avons fait nos observations à partir de cultures contenant presque exclusivement des neurones hippocampiques (Bartlett et Banker, 1984b; Kaech et Banker, 2006). Finalement, il mérite d'être mentionné que bien que les auteurs aient pu démontrer, en la bloquant (avec de l'AP5), que l'activité des récepteurs NMDA est impliquée dans les changements de l'association d'Ago2 avec certains miARN induits par la stimulation tétanique, leur analyse du taux protéique d'Ago2 (Pai et al., 2014).

5.1.2.1.2) Le rôle des protéasomes dans le turnover d'Ago2 dans les neurones

Dans le cadre de la première étude, nous avons trouvé que l'activation des récepteurs NMDA était associée à une réduction des niveaux de la protéine Ago2 dans les dendrites et que cette réduction découlait d'une dégradation dépendante de l'activité des protéasomes. Plusieurs études convergent pour démontrer qu'Ago2 peut être dégradée par les protéasomes (Bronevetsky et Ansel, 2013; Johnston et al., 2010; Rybak et al., 2009; Smibert et al., 2013). Toutefois, nos observations ne nous permettent pas d'exclure la possibilité que la stabilité d'Ago2 soit régulée de façon indirecte par les protéasomes.

5.1.2.1.2.1) Le lien potentiel entre la stabilité d'Ago2 et la dégradation

Le rôle potentiel d'autres protéines régulées par les protéasomes pourrait être associé à deux scénarios différents. Soit les protéasomes réguleraient la stabilité d'Ago2 en étant responsables de la dégradation de partenaires d'interaction stabilisant Ago2 sans toutefois opérer la protéolyse de cette dernière, qui serait alors assurée par une autre voie protéolytique (Jee et Lai, 2014; Martinez et Gregory, 2013). Soit les protéasomes réguleraient la stabilité d'Ago2 à la fois en dégradant certains de ses partenaires d'interaction et Ago2 comme tel.

La stabilité d'Ago2 pourrait être modulée entre autres par son interaction avec d'autres protéines RBP régulées par les protéasomes (Aksoy-Aksel et al., 2014). La protéine hélicase MOV10 est une candidate potentielle pour une telle régulation par association puisqu'il a été démontré que MOV10 interagit avec le miRISC/Ago2 pour en réguler la liaison à ses cibles et qu'elle est dégradée par la voie ubiquitine-protéasome (UPS, pour « *ubiquitin-proteasome system* ») en

réponse à l'activation des récepteurs NMDA (Aksoy-Aksel et al., 2014; Banerjee et al., 2009; Kenny et al., 2014).

Un autre exemple de protéine RBP dont le turnover est régulé par le système UPS dans les neurones et dont l'association à Ago2 pourrait moduler la stabilité de cette dernière est la protéine FMRP (Aksoy-Aksel et al., 2014; Kenny et al., 2014; Nalavadi et al., 2012). En effet, il a été démontré que FMRP était dégradé par cette voie en réponse à l'activation des récepteurs mGluR du groupe I (mGluR1/5) (Hou et al., 2006; Muddashetty et al., 2011). Ce type de stimulus induit aussi la déphosphorylation de FMRP à sa sérine 499. D'une part, ce changement d'état de FMRP est associé à une dérégulation traductionnelle des ARN messagers que cette RBP cible (Ceman et al., 2003; Nalavadi et al., 2012). D'autre part, cette déphosphorylation favorise la dissociation d'Ago2 de FMRP et d'un ARNm ciblé, tel celui de PSD-95, ainsi que la dégradation de FMRP lors de l'activation des récepteurs mGluR1/5 (Nalavadi et al., 2012).

5.1.2.1.2.2) L'ubiquitination d'Ago2

Puisque les protéines dégradées par les protéasomes sont en général préalablement modifiées par l'ajout d'une chaîne (ou plus) de polyubiquitine, il serait pertinent éventuellement de vérifier si et comment l'ubiquitination d'Ago2 est affectée par l'activité des récepteurs NMDA (Bingol et Sheng, 2011; Goldberg, 2012; Hegde, 2017). D'ailleurs, il a été rapporté que dans des cellules souches embryonnaires, Ago2 est polyubiquitinée par la ligase TRIM71 (aussi identifiée comme Lin-41) et est dégradée par les protéasomes (Rybak et al., 2009). La polyubiquitination et la dégradation protéasomale d'Ago2 ont aussi été observées dans les cellules T activées (Bronevetsky et Ansel, 2013). Si lors de l'inhibition des protéasomes, l'activation de ces récepteurs est associée à une augmentation significative de la polyubiquitination d'Ago2, alors il serait confirmé que la dégradation d'Ago2 est opérée directement par le système ubiquitine-protéasome (UPS). L'analyse de l'ubiquitination d'Ago2 en réponse à l'activation des récepteurs NMDA pourrait donc permettre de déterminer si Ago2 est bel et bien adressé au système UPS (Hegde, 2017).

De plus, vu que les résultats que nous avons obtenus suggèrent fortement que la déphosphorylation d'Ago2 en S387 est un prérequis à la dégradation d'Ago2 reliée à l'activité

des récepteurs NMDA et vu qu'il est établi que l'ubiquitination d'une protéine est souvent reliée à son état de phosphorylation, il serait aussi important d'établir si l'ubiquitination d'Ago2 est influencée par son état de phosphorylation en S387 (Bingol et Sheng, 2011; Hegde, 2017). Pour ce faire, l'ubiquitination des formes phosphonulle S387A et phosphomimétique S387D (ou S387E) devrait être analysée. Une polyubiquitination accrue d'Ago2 S387A en comparaison des formes WT et phosphomimétique apporterait un élément de preuve additionnelle que la déphosphorylation d'Ago2 est nécessaire à, ou du moins favorise, l'adressage d'Ago2 aux protéasomes.

Néanmoins, il est concevable qu'Ago2 puisse être ubiquitinée à un degré limité de façon préalable à, ou indépendante de, la déphosphorylation d'Ago2 déclenchée par l'activation des récepteurs NMDA. Il est envisageable par exemple que la combinaison d'une monoubiquitination et de la déphosphorylation d'Ago2 puisse mener à une polyubiquitination additionnelle adressant Ago2 alors aux protéasomes (Hegde, 2017). Une protéine Ago2 individuelle pourrait hypothétiquement être recyclée plusieurs fois pour cibler successivement différents ARN messagers, et avoir une chaîne de polyubiquitine allongée de façon graduelle à chaque cycle jusqu'à l'atteinte d'une taille critique, constituant un signal de dégradation (Jee et Lai, 2014).

5.1.2.2) La régulation de la phosphorylation d'Ago2 S387 par l'activité des récepteurs NMDA

5.1.2.2.1) Les protéines phosphatases susceptibles de déphosphoryler Ago2 S387 en réponse à l'activation des récepteurs NMDA

L'activité des récepteurs NMDA et l'entrée de calcium dans le compartiment somatodendritique peuvent à la fois stimuler à la fois des protéines phosphatases et des protéines kinase (Citri et Malenka, 2008; Lee, 2006; Lohmann et Kessels, 2014; Luscher et Malenka, 2012; Malenka et Bear, 2004; Sala et Segal, 2014; Winder et Sweatt, 2001; Woolfrey et Dell'Acqua, 2015). L'implication des protéines phosphatase de sérine/thréonine, principalement les protéines phosphatases 1 (PP1), 2A (PP2A) et 2B (PP2B), est typiquement associée à l'induction de la

DLT et PP1, en particulier, est considérée agir comme un frein sur les processus d'expression de la PLT (Baumgartel et Mansuy, 2012; Blitzler et al., 1998; Citri et Malenka, 2008; Genoux et al., 2002; Lee, 2006; Luscher et Malenka, 2012; Mulkey, Endo, Shenolikar et Malenka, 1994; Mulkey, Herron et Malenka, 1993; Soderling et Derkach, 2000; Winder et Sweatt, 2001; Woolfrey et Dell'Acqua, 2015). Toutefois, PP2B, une phosphatase calcium/calmoduline-dépendante aussi connue sous le nom de calcineurine, est aussi activée par les influx calciques à haute fréquence associés à une induction de PLT (Li et al., 2012; Winder et Sweatt, 2001). Dans de telles conditions, la calcineurine connaît un pic d'activation très rapide et bref et la PP1 présente un patron d'activation fluctuant de façon semblable à celui de CamKII (Li et al., 2012).

Dans la première étude, nous nous sommes concentrés sur la régulation aiguë de la protéine Ago2 en réponse à l'activation des récepteurs NMDA. Dans ce contexte, nous avons observé que la protéine Ago2 était rapidement déphosphorylée en S387. Des efforts futurs devraient donc être consacrés à déterminer la ou les phosphatases de type sérine/thréonine responsables de cette déphosphorylation déclenchée par l'activation des récepteurs NMDA. Ainsi, la calcineurine et la PP1 nous apparaissent de bonnes candidates à tester.

5.1.2.2.2) Les protéines kinase susceptibles de phosphoryler Ago2 S387 dans les neurones

Nous pensons qu'il est probable que la réduction rapide du taux de phosphorylation d'Ago2 S387 en réponse à l'activation des récepteurs NMDA soit transitoire et soit compensée, voire renversée, par la suite. Cette augmentation plus tardive du taux de phosphorylation d'Ago2 S387, après la déphosphorylation précoce, suivant l'activation des récepteurs NMDA, pourrait s'effectuer de plusieurs façons : par transport ou redistribution dans les dendrites d'Ago2 phosphorylée sur S387 (Ago2 pS387) en provenance du soma, par recrutement d'Ago2 pS387 aux épines dendritiques ou par phosphorylation d'Ago2 S387, subséquente à la déphosphorylation rapide et transitoire.

Il a été rapporté que des voies de signalisation associées à la protéine kinase MAPK, soit celle de p38/MAPK et celle de MEK-ERK, étaient en cause dans la phosphorylation d'Ago2 S387 dans des modèles non neuronaux (McKenzie et al., 2016; Zeng et al., 2008). Dans les neurones, ces voies prennent part à la transduction des récepteurs NMDA et ont un rôle important dans la

plasticité synaptique (Citri et Malenka, 2008; English et Sweatt, 1997; Lee, 2006; Malenka et Bear, 2004; McKenzie et al., 2016; Thomas et Huganir, 2004; Zeng et al., 2008). De plus, la signalisation découlant de MAPK s'avère importante pour la régulation traductionnelle dépendante de l'activité neuronale (Malenka et Bear, 2004; Thomas et Huganir, 2004). Pour ces raisons, il serait pertinent d'évaluer l'implication de p38/MAPK et MEK-ERK dans la phosphorylation d'Ago2 S387 dans les neurones hippocampiques.

Une autre voie constitue une candidate probable régulant cette phosphorylation dans les neurones hippocampiques. Ainsi, Akt-3 (PKB γ) a été identifiée comme une protéine kinase phosphorylant Ago2 S387 dans des cellules HeLa (Horman et al., 2013). Dans les neurones, la voie PI3K-Akt-mTOR est d'ailleurs régulée entre autres par l'activité des récepteurs NMDA et TrkB (Bockaert et Marin, 2015; Gong, Park, Abbassi et Tang, 2006; Leal et al., 2014; Lipton et Sahin, 2014).

5.1.2.3) Les conséquences fonctionnelles de la régulation de la phosphorylation d'Ago2 S387 par l'activité des récepteurs NMDA

5.1.2.3.1) La régulation traductionnelle par Ago2 et les miARN

Dans la première étude, nos observations indiquent qu'Ago2 est déphosphorylée en S387 en réponse à l'activation des récepteurs NMDA et suggèrent que cette déphosphorylation est importante pour la formation de nouvelles épines dendritiques et qu'elle favorise leur maturation. Par ailleurs, les résultats rapportés et les interprétations avancées par d'autres auteurs supportent l'existence d'effets répressifs de la phosphorylation d'Ago2 S387A sur la traduction, du moins dans des modèles non neuronaux (Bockaert et Marin, 2015; Horman et al., 2013; Jee et Lai, 2014; Zeng et al., 2008). En combinant ces données et les nôtres, nous avons donc proposé un modèle où l'activation des récepteurs NMDA, en entraînant la déphosphorylation d'Ago2 S387, contribue à une dérégulation traductionnelle de certains ARNm (figure 7). Ce modèle est d'ailleurs compatible avec le renversement de la répression dépendante de miARN en réponse à l'activation des récepteurs NMDA observé dans d'autres études (Banerjee et al., 2009; Krol, Busskamp, et al., 2010).

Cependant, nos observations et conclusions, comme celles de Banerjee et al. (2009) et de Krol et al. (2010) contrastent avec les conséquences de la régulation d'Ago2 par l'activité des récepteurs NMDA décrites par Antoniou et al. (2014) et Rajgor et al. (2017), soit une augmentation de la répression traductionnelle. Il nous apparaît probable que cette contradiction apparente soit attribuable, du moins en partie, aux conditions différentes dans lesquelles les récepteurs NMDA sont activés. D'une part, Antoniou et al. (2014) et Rajgor et al. (2017) utilisent une stimulation brève (3 minutes) dans un média minimal et non conditionné (HBSS) avec une concentration relativement faible de glycine (20 μ M). De plus, Antoniou et al. (2014) ont effectué cette stimulation en présence d'une inhibition des potentiels d'action par de la tétrodotoxine (TTX). Antoniou et al. (2014) et Rajgor et al. (2017) qualifient leurs traitements de paradigmes de dépression à long terme chimique (« *cLTD* »), une suggestion plausible en regard des effets rapportés par d'autres auteurs pour de brèves applications de NMDA (Beattie et al., 2000; Lee, Kameyama, Huganir et Bear, 1998).

Pour les expériences que nous avons réalisées dans le cadre de la première étude, nous avons employé des périodes d'incubation plus longues (5 ou 15 min) qu'Antoniou et al. (2014) et Rajgor et al. (2017). Aussi en contraste avec ces auteurs, les traitements de nos cultures de neurones étaient réalisés avec du média de culture conditionné (à l'exception des expériences présentées aux figures 9 et 12), donc en présence de facteurs trophiques ayant une influence importante sur l'homéostasie neuronale et la plasticité synaptique (Kaech et Banker, 2006). Il est aussi pertinent de noter que le média de culture neuronale employé contient aussi une importante concentration de glycine (400 μ M) (Brewer, Torricelli, Evege et Price, 1993). Par ailleurs, l'augmentation du nombre d'épines dendritiques associé au traitement de NMDA employé (40 μ M pour 15 min, suivi de 15 min post stimulation; figure 6-A, Ago2 WT) suggère que « notre » paradigme de stimulation pourrait s'apparenter à une forme de potentialisation (Sala et Segal, 2014).

Par ailleurs, une autre étude récente rapporte une augmentation de la répression dépendante de miARN induite par l'activité neuronale (Sambandan et al., 2017). En effet, les résultats rapportés par Sambandan et al. (2017), obtenus notamment avec une sonde flanquée de la région 3'UTR de CamKII α et ciblée par le miARN miR-181a, convergent avec les résultats rapportés

par Antoniou et al. (2014) et Rajgor et al. (2017), obtenus avec des sondes flanquées de la région 3'UTR de LimK1 ou d'APT1 et ciblées respectivement par miR-134 et miR-138. Il est important de noter ici que le paradigme de stimulation employé par Sambandan et al. (2017), de façon semblable à celui utilisé par Antoniou et al. (2014) et Rajgor et al. (2017) présentent aussi des caractéristiques suggérant l'induction d'une forme de dépression synaptique. D'une part, Sambandan et al. (2017) ont recours à un paradigme de stimulation par photolyse (« *uncaging* ») de MNI-glutamate à basse fréquence, un paradigme que d'autres ont auparavant démontré comme induisant un affaiblissement synaptique et une réduction de la taille des épines dendritiques stimulées (Oh et al., 2013; Stein et al., 2015). D'autre part, Sambandan et al. (2017) ont observé une répression de l'ARNm de CamKII α , dont la localisation et la traduction dans les dendrites sont typiquement accrues par les paradigmes induisant une PLT (Khoutorsky et al., 2013; Miller et al., 2002).

Par ailleurs, il a été démontré dans des neurones hippocampiques en culture qu'un même traitement activant les récepteurs NMDA pouvait être associé à des changements de signe opposé de l'abondance de différents miARN (van Spronsen et al., 2013). De plus, van Spronsen et al. (2013) ont démontré que des paradigmes de stimulation chimique activant les récepteurs NMDA et associés soit à une potentialisation synaptique, soit à une dépression synaptique pouvaient avoir des effets divergents, parfois opposés, sur l'abondance d'un même miARN (Bicker et al., 2014; Molnar, 2011). Il est donc possible que l'activation des récepteurs NMDA dans différents contextes puisse avoir des conséquences divergentes quant à la régulation d'Ago2. Ainsi, il nous semble plausible que des paradigmes associés à une DLT et ceux associés à une PLT puissent avoir des effets distincts, voire opposés, sur la traduction d'ARNm ciblés par Ago2 et certains miARN. De plus, ces effets pourraient évoluer entre une phase précoce et une phase plus tardive suivant l'activation des récepteurs NMDA, tels qu'observés pour certains miARN (van Spronsen et al., 2013). Il nous apparait donc important dans le futur que des efforts soient consacrés à distinguer les conséquences sur l'activité d'Ago2 et des miARN d'une activation des récepteurs NMDA dans le cadre d'une induction de DLT versus celle d'une PLT et d'en départager les effets immédiats et les effets décalés.

5.1.2.3.2) La régulation de l'activité endonucléotique d'Ago2

Plusieurs données supportent l'existence de mécanismes assurant les étapes finales de maturation de certains miARN ou autres ARNnc dans les dendrites en réponse à l'activité neuronale (Bicker et al., 2014; Hu et Li, 2017; Lugli et al., 2005; Lugli et al., 2008; Sambandan et al., 2017; Smalheiser, 2014; Smalheiser, Lugli, Thimmapuram, Cook et Larson, 2011; Weiss et al., 2015; Wibrand et al., 2010); Bicker et al., 2013). Il n'est pas possible en définitive d'établir un lien direct entre nos observations dans le cadre de la première étude et un mécanisme de maturation de miARN conventionnel opéré par Dicer et localisé dans les dendrites.

Toutefois, l'activité endonucléotique d'Ago2 peut être recrutée par des mécanismes non canoniques de maturation des siARN et des miARN (Ha et Kim, 2014; Juvvuna et al., 2012; Meister, 2013; Yang et Lai, 2011; Yang et al., 2010). De façon un peu surprenante, tout en étant associée à une augmentation de la répression traductionnelle dépendante des miARN, la phosphorylation d'Ago2 en S387 est aussi associée à une inhibition de son activité endonucléotique d'Ago2 (Horman et al., 2013). Il apparaît donc que l'activation des récepteurs NMDA est susceptible de favoriser de façon aiguë certains processus faisant intervenir l'activité endonucléotique d'Ago2. Ainsi, la régulation d'Ago2 par l'activité des récepteurs NMDA pourrait moduler la maturation localisée dans les dendrites de miARN atypiques, partageant les caractéristiques de pré-miR-451, ou de petits ARN interférents endogènes (endo-siARN) pouvant être opérée par Ago2 (Cheloufi, Dos Santos, Chong et Hannon, 2010; Ha et Kim, 2014; Smalheiser, 2014; Smalheiser et al., 2011; Weiss et al., 2015). Il serait donc pertinent dans le futur d'explorer l'implication potentielle de l'activité endonucléotique d'Ago2 dans la régulation traductionnelle dans les dendrites.

5.2) Discussion touchant la deuxième étude

La voie des miARN est une composante majeure de la régulation traductionnelle au cours du développement neuronal et un nombre important et grandissant de miARN sont identifiés comme une expression hétérochronique et ayant des rôles développementaux dans le système nerveux central (Davis et al., 2015; Yang et al., 2016). Cependant, la façon dont les protéines AGO sont régulées au cours du développement neuronal et leurs spécificités fonctionnelles respectives dans le cadre de ce processus sont demeurées jusqu'à présent pratiquement inconnues. Dans la deuxième étude faisant partie du projet de recherche, nous avons donc cherché à caractériser le profil d'expression des protéines Ago1 et Ago2 durant le développement neuronal et à distinguer l'influence respective d'Ago1 et d'Ago2 sur la morphogenèse dendritique.

5.2.1) Rappel des principaux objectifs, résultats et conclusions de la deuxième étude

En ayant recours à des cultures de neurones de l'hippocampe provenant de rat embryonnaire (E 18-19), nous avons pu analyser l'expression de la protéine Ago1 et celle de la protéine Ago2, spécifiquement dans des neurones primaires et avec un suivi temporel échelonné (à différents âges des cultures) au cours de leur développement. Nous avons constaté une expression décroissante pour la protéine Ago1 et une expression plus soutenue pour la protéine Ago2 durant la croissance et la maturation des neurones (figure 17-A).

En induisant la surexpression d'Ago1 ou d'Ago2 afin d'en observer les effets sur la morphogenèse des dendrites, nous avons constaté que dans les neurones immatures, la surexpression d'Ago1 est associée à la formation d'un arbre dendritique moins développé (figure 18), alors que dans les neurones matures la surexpression d'Ago2 est associée à une complexité accrue de l'arbre dendritique (figure 19). Nous avons aussi pu observer que dans les neurones matures (figure 20), l'expression d'une forme ectopique d'Ago1 a un effet négatif sur

la densité des épines dendritiques, alors que la surexpression d'Ago2 apparaît favoriser l'expression de PSD-95 et le développement des épines en forme de champignons (« *mushroom* ») en comparaison d'Ago1.

Pour vérifier si la phosphorylation d'Ago2 à sa sérine387 (S387) était nécessaire à la fonction d'Ago2 dans la régulation traductionnelle façonnant la morphologie dendritique, nous avons comparé les effets de l'expression de la forme phosphonulle (S387A) et de la forme sauvage (WT) d'Ago2. Les neurones exprimant Ago2 S387A avaient généralement un arbre dendritique moins ramifié ou complexe que ceux exprimant Ago2 WT, même avec une courte période d'expression (figures 20 et 21).

5.2.2) Les résultats de la deuxième étude comparés aux données de littérature et les questions à approfondir

5.2.2.1) L'expression d'Ago1 et d'Ago2 dans les neurones

5.2.2.1.1) Les changements dans l'expression d'Ago1 et d'Ago2 durant le développement neuronal

Nos observations concordent avec la description de l'évolution de l'expression d'Ago1 et Ago2 dans le cerveau, pris dans son ensemble, durant le développement et impliquent aussi que le ratio entre le taux protéique d'Ago2 et le taux protéique d'Ago1 (ratio Ago2/Ago1), ou l'abondance relative (« *fractional abundance* ») de la protéine Ago2 par rapport à l'ensemble des protéines AGO, augmente au cours du développement des neurones hippocampiques (Juvvuna et al., 2012). De plus, nous avons constaté que l'augmentation la plus importante dans le ratio Ago2/Ago1 a lieu entre 13 et 16 jours en culture (DIV, pour « *days in vitro* ») pour atteindre un plateau après 16 DIV (figure 1-B). Cet intervalle coïncide avec le début d'une période caractérisée par une formation accrue d'épines dendritiques et la maturation synaptique pour les neurones hippocampiques en culture (Kaeck et Banker, 2006; Liao, Zhang, O'Brien, Ehlers et Huganir, 1999; Papa, Bundman, Greenberger et Segal, 1995).

5.2.2.1.2) L'influence respective des protéines Ago1 et Ago2 sur le développement neuronal

Partant de l'hypothèse selon laquelle les patrons d'expression distincts pour Ago1 et Ago2 pouvaient être impliqués dans une modulation développementale de la régulation exercée par les miARN et être importants pour la morphogenèse dendritique, nous avons voulu mettre en lumière leurs influences respectives dans la morphogenèse dendritique. En induisant l'expression d'une forme exogène d'Ago1 ou Ago2, en plus de l'expression endogène de ces deux protéines, dans les neurones de l'hippocampe en culture, nous avons observé des influences importantes et opposées d'Ago1 et Ago2 sur le développement des dendrites.

Nos observations quant à l'influence positive du taux d'expression d'Ago2 sur l'élaboration et la maturation dendritiques sont supportées par certaines données provenant d'une autre équipe de recherche qui tend à montrer l'importance d'une expression soutenue d'Ago2 durant le développement neural pour une croissance normale des dendrites (Storchel et al., 2015). En contraste, la surexpression d'Ago1 dans les neurones hippocampiques en culture apparaît répéter certains des effets de la délétion de Dicer sur la morphogenèse dendritique des neurones dans l'hippocampe, soit une complexité dendritique et une densité d'épines réduites (Davis et al., 2008; Fineberg, Kosik et Davidson, 2009).

De façon surprenante, Juvvuna et al. (2012) ont toutefois rapporté des observations qui suggèrent qu'Ago1 plutôt qu'Ago2 serait requis pour l'induction de la différenciation neuronale des cellules de neuroblastome Neuro2A (N2a) par miR-124, un miARN exprimé de façon prépondérante dans le SNC et les neurones (Makeyev, Zhang, Carrasco et Maniatis, 2007; Mishima, Mizuguchi, Kawahigashi, Takizawa et Takizawa, 2007). Il est intéressant de souligner ici que la différenciation neuronale de cellules de neuroblastome SK-N-BE(2)—C induite par le traitement *in vitro* à l'acide rétinoïque est associée à des changements de l'expression respective des ARNm d'Ago1 et d'Ago2 qui apparaissent très différents, voire opposés, aux différences d'expression des ARNm d'Ago1 et d'Ago2 dans des lysats de cerveau de souris embryonnaire (E12.5) et adulte (P60) (Juvvuna et al., 2012; Potenza, Papa et Russo, 2009). Ainsi, les observations faites avec des lignées de cellules neurales n'apparaissent pas refléter la régulation d'Ago1 et Ago2 dans le cerveau ou des neurones primaires.

Toutefois, la différenciation de neurones sympathiques *in vitro*, aussi induite avec de l'acide rétinoïque, a été associée à une augmentation de l'expression de la protéine Ago2 (Patranabis et Bhattacharyya, 2016). De prime abord, les conclusions de Juvvuna et al. (2012) et de Patranabis et Bhattacharyya (2016) quant aux rôles d'Ago1 et Ago2 dans la différenciation neuronale peuvent sembler contradictoires. Cependant, ces divergences pourraient être dues aux différentes approches et conditions expérimentales utilisées dans les deux études. Les résultats rapportés par ces auteurs pourraient d'ailleurs être conciliés par le fait que l'implication d'Ago1 dans l'induction de la différenciation neuronale a été observée par Juvvuna et al. (2012) lors de la surexpression d'Ago1 dans des cellules N2a initialement non différenciées, alors que l'augmentation endogène d'Ago2 dans des neurones sympathiques a été constatée par Patranabis et Bhattacharyya (2016) après leur différenciation.

L'interprétation par Juvvuna et al. (2012) découlant de leur comparaison de l'effet respectif d'Ago1 ou Ago2 combinés à miR-124 dans les cellules N2a doit aussi être relativisée du fait que leurs observations ont été réalisées alors que l'expression endogène d'Ago2 était réprimée par « *knock-down* » (Ago2 KD) avec ARN de type « épingle à cheveux » (*shRNA*, pour « *short hairpin RNA* »). Ainsi, ces auteurs ont comparé : i) une condition combinant la surexpression d'Ago1 (par une expression ectopique s'ajoutant à l'expression endogène d'Ago1) à une répression d'Ago2 par *shRNA*; à ii) une condition combinant l'expression d'Ago2 ectopique (forme résistante au *shRNA*) compensant la perte de la forme endogène réprimée par *shRNA*. Un aspect tout aussi problématique, sinon plus, dans l'interprétation des résultats de cette expérience est la répression d'Ago2 par une approche requérant l'activité endonucléotique spécifique à la protéine Ago2 (Meister, 2013). De plus, il apparaît que l'utilisation de *shRNA* (ou de *siARN*) peut saturer la protéine Ago2 d'ARN interférent entrant en compétition avec des miARN endogènes pouvant normalement être chargés sur Ago2 et de mener à une réduction de l'expression et de l'activité de ces miARN, tel que cela a été notamment démontré pour miR-124 (Grimm et al., 2006; van Gestel et al., 2014; Yoon et al., 2016). En somme, le recours à un « *knock down* » d'Ago2 avec une approche exploitant la voie de l'interférence par ARN rend les observations potentiellement attribuables à une altération de la fonction d'Ago2 et non nécessairement à la perte d'expression d'Ago2.

Néanmoins, les changements dans l'abondance relative d'Ago2 et d'Ago1 que nous avons observés durant la maturation des neurones hippocampiques de rat en culture concordent avec les observations faites lors du développement du cerveau murin pris dans son ensemble (Juvvuna et al., 2012). De plus, le rôle positif d'Ago2 dans le développement des dendrites est supporté par des données provenant d'une autre équipe de recherche (Storchel et al., 2015). Nous avons ainsi déterminé que l'interprétation la plus parcimonieuse était que la régulation découlant d'Ago2 permet ou tend à stimuler le développement et maturation des dendrites, alors que celle découlant d'Ago1 tend à réprimer ou retarder le développement et la maturation des dendrites. Ce faisant, nos observations et nos conclusions viennent appuyer l'hypothèse d'abord articulée par Juvvuna et al. (2012) selon laquelle l'abondance relative d'Ago2 par rapport à Ago1 (« *Ago2 fractional abundance* » ou « ratio Ago2/Ago1 ») agirait comme un gradient développemental régulant certains aspects de la maturation et de la morphogenèse neuronale.

Toutefois, nous ne pouvons être certains que les effets que nous avons observés sont proportionnels à, et découlent exclusivement de, l'accroissement quantitatif des taux protéiques d'Ago1 ou Ago2. La surexpression de certaines protéines induite par transfection pourrait engendrer des conséquences fonctionnelles qualitativement distinctes des phénomènes naturels (Decker et Parker, 2012; Kaech et Banker, 2006). Il serait donc nécessaire pour valider avec plus de certitude les rôles d'Ago1 et d'Ago2 dans la morphogenèse des dendrites et de leurs épines, de valider les effets d'une diminution ou d'une abolition de l'expression de l'une et l'autre de ces protéines.

Cependant, le choix d'une approche appropriée et optimale est critique pour permettre des observations physiologiquement pertinentes et interprétables. Tel que discuté précédemment (section 4.2.6), dans le cadre d'une étude touchant les protéines AGO ou la voie des miARN, il est préférable d'éviter les approches exploitant la voie de l'interférence par l'ARN (« *RNAi* »), c'est-à-dire employant des petits ARN interférents (« *siRNA* ») ou des ARN en « épingle à cheveux » (« *shRNA* »). Une approche régulant spécifiquement l'expression d'Ago1 ou Ago2 au niveau génétique ou transcriptionnel serait donc préférable.

Toutefois, là encore, d'importantes contraintes fonctionnelles et méthodologiques s'appliquent. Ainsi, la délétion complète de l'expression d'Ago2 entraîne généralement un défaut de

fermeture du tube neural et est létale pour l'embryon (Liu et al., 2004). Pour pouvoir comparer les effets de la délétion des gènes d'Ago1 et Ago2, il faudrait pouvoir induire cette délétion une fois les neurones prélevés et en culture. De plus, il serait pertinent d'observer ces effets dans des conditions plus physiologiques, soit en induisant la délétion dans des tranches d'hippocampe ou de cortex, ou même *in vivo*. Toutefois, dans ces cas, il serait préférable que cette manipulation soit effectuée de façon clairsemée entre les cellules pour éviter des effets cellulaires « populationnels ».

5.2.2.2) Les différences fonctionnelles entre Ago1 et Ago2 dans les neurones

5.2.2.2.1) Le rôle de la phosphorylation d'Ago2 S387 dans la morphogenèse dendritique

Dans la deuxième étude, nous avons aussi réalisé des observations qui supportent un rôle pour la phosphorylation d'Ago2 S387 dans la morphogenèse dendritique. En effet, la complexité réduite de l'arbre dendritique des neurones exprimant la forme phosphonulle Ago2 S387A en comparaison des neurones transfectés pour exprimer Ago2 WT indique que la régulation post-traductionnelle d'Ago2 en S387 est importante pour le rôle d'Ago2 dans le développement et la maturation des dendrites. Plusieurs modèles de mécanisme sont compatibles avec nos observations.

Nos résultats pourraient être expliqués par le rôle de l'activité neuronale et des signaux calciques dans l'élagage (« *pruning* ») des dendrites, un processus important pour la consolidation des réseaux neuraux et coïncidant avec le début d'une période de maturation synaptique (Kanamori et al., 2013; Valnegri et al., 2015). Ainsi, les effets sur la morphologie dendritique obtenus avec l'expression de la forme mutante S387A d'Ago2, pourraient refléter de façon exacerbée la possibilité pour Ago2 S387 d'être déphosphorylée par une phosphatase, telle que PP1 ou la calcineurine, activée par l'entrée de calcium à travers les récepteurs NMDA ou les canaux calciques voltage-dépendants (Li et al., 2012; Winder et Sweatt, 2001; Woolfrey et Dell'Acqua, 2015).

Autrement, il est possible que la phosphorylation d'Ago2 S387 soit nécessaire à la régulation de localisation ou de la traduction dans les dendrites de certains ARNm, préalablement à la dérégulation de ces derniers, entre autres par la déphosphorylation de S387. Selon ce scénario, la surexpression d'Ago2 (WT) augmente l'acheminement dans les dendrites d'ARNm ciblés par certains miARN associés à Ago2, mais cet effet stimulateur serait inhibé lorsqu'Ago2 perd sa capacité d'être phosphorylée en S387 (Ago2 S387A) ou sa capacité à lier les miARN (Ago2 PAZ10).

5.2.2.2.2) L'association préférentielle d'Ago1 ou d'Ago2 avec certains miARN et ARNm

L'expression d'un nombre important de miARN tend à augmenter durant le développement des neurones hippocampiques (van Spronsen et al., 2013; Wibrand et al., 2012). Il est intéressant de noter entre autres que l'expression de plusieurs miARN ciblant l'ARNm d'*Arc*, un gène de type *IEG* (pour « *immediate-early gene* ») important pour la plasticité synaptique, évolue de façon semblable au ratio Ago2/Ago1 durant le développement des neurones hippocampiques en culture (Wibrand et al., 2012). Il serait pertinent dans le futur de vérifier si les miARN dont l'expression est accrue au cours du développement neuronal, en particulier ceux dont les patrons temporels sont hautement corrélés à l'évolution du ratio Ago2/Ago1, sont préférentiellement associés à Ago2. À l'inverse, il serait aussi informatif d'établir si les miARN dont l'expression décroît au cours du développement sont préférentiellement portés par Ago1.

Par ailleurs, il a été rapporté qu'Ago1 et Ago2 peuvent cibler le même transcrite en s'associant à des miARN différents et exercer des effets régulateurs distincts (déstabilisation du transcrite versus répression traductionnelle) dans des myoblastes (Ghosh et al., 2015). Il serait donc important de déterminer si des actions combinées, mais distinctes d'Ago1 et d'Ago2 sur des cibles communes sont possibles dans les neurones. En contrepartie, il serait tout aussi pertinent de vérifier si Ago1 et Ago2 régulent des ensembles différents de transcrits. Par exemple, Ago1 et Ago2 pourraient chacune cibler de façon préférentielle différents isoformes de transcrits codant pour la même protéine, particulièrement ceux qui diffèrent dans la région 3'UTR et ceux dont les patrons d'expression divergent au cours du développement (Wilczynska et Bushell, 2015).

5.3) Liens entre les résultats de la première et de la deuxième étude

5.3.1) La régulation des protéines AGO dans les neurones

5.3.1.1) L'expression des protéines AGO dans les neurones

L'activité et l'efficacité synaptiques sont augmentées au cours de la maturation neuronale (Lohmann et Kessels, 2014). Ce fait suggère que le rôle des récepteurs NMDA devrait gagner en importance dans la régulation d'Ago2 et la dégradation de cette dernière devrait être croissante au cours du développement. À première vue, il peut sembler y avoir une certaine contradiction entre l'observation que l'expression d'Ago2 demeurerait relativement stable au cours du développement neuronal (deuxième étude) et la conclusion que l'activation des récepteurs NMDA est associée à une réduction des niveaux de la protéine Ago2 dans les dendrites. Toutefois, plusieurs éléments nous permettent d'avancer que l'expression soutenue de la protéine Ago2 durant le développement neuronal et la régulation à la baisse de cette dernière suivant l'activation des récepteurs NMDA sont compatibles.

D'une part, l'expression d'Ago2 durant la maturation neuronale découle, du moins en partie, d'une activation transcriptionnelle par le facteur Nco3 (Storchel et al., 2015). Par ailleurs, la réduction des taux protéiques d'Ago2 que nous avons observée dans les dendrites se produit très rapidement en réponse à l'activité des récepteurs NMDA. Or, dans un contexte physiologique où les récepteurs NMDA ne seraient stimulés qu'à certains sites synaptiques actifs, il semble probable que la dégradation d'Ago2 soit plus sélective et restreinte aux épines dendritiques ou à leurs zones périphériques. Dans un tel scénario, une réduction localisée des quantités de protéines d'Ago2 pourrait avoir relativement peu d'incidence sur le taux cellulaire de la protéine d'Ago2. De plus, cette réduction localisée pourrait plausiblement être compensée par l'arrivée d'Ago2 en provenance d'autres régions des dendrites ou du soma, ou même possiblement par une synthèse *de novo* d'Ago2 stimulée par l'activité neuronale.

D'autre part, nous avons aussi constaté dans le cadre de la deuxième étude que l'expression de la protéine Ago1 décroît de façon importante au cours du développement des neurones

hippocampiques de rat. De façon semblable, il a été rapporté que l'expression du transcrit et celle de la protéine d'Ago1 étaient toutes deux grandement réduites au cours du développement cérébral murin (Juvvuna et al., 2012). Il nous apparaît donc plausible que l'expression d'Ago1 soit en grande partie régulée au niveau transcriptionnel durant le développement neuronal. Cette hypothèse demeure à valider et, à notre connaissance, aucun facteur de transcription n'a encore été mis en cause dans une régulation directe de l'expression d'Ago1. Cette question mérite à notre avis une attention particulière dans le futur en raison notamment des implications potentielles pour les mécanismes dirigeant la différenciation et la maturation neuronales.

De plus, la façon dont la stabilité et la durée de vie de la protéine Ago1 sont régulées demeure une question ouverte, même dans les modèles neuronaux. Certains résultats indiquent que l'expression de la protéine Ago1 peut aussi être régulée à la baisse, de façon semblable à Ago2, dans certaines conditions associées à la dégradation protéasomale d'Ago2 (Bronevetsky et al., 2013). Toutefois, à notre connaissance, l'ubiquitination et le turnover d'Ago1 n'ont pas été caractérisés dans des cellules de mammifères.

5.3.1.2) Régulation post-traductionnelle et turnover des protéines AGO dans les neurones

Il est possible que d'autres modifications post-traductionnelles connues comme régulant la stabilité d'Ago2, puissent se combiner à la phosphorylation ou l'ubiquitination d'Ago2, pour en déterminer le sort (Jee et Lai, 2014; Leung, 2015; Martin, Wilkinson, Nishimune et Henley, 2007; Meister, 2013; Sahin et al., 2014). Il est notamment établi qu'Ago2 peut être SUMOylé à sa lysine402 (K402) (Josa-Prado et al., 2015; Sahin et al., 2014). D'ailleurs, certains des résultats obtenus par Sahin et al. (2014) les poussent à proposer que la phosphorylation d'Ago2 à sa tyrosine393 (Y393) à proximité influence la SUMOylation d'Ago2 et donc sa stabilité. Ce modèle apparaît plausible, car la SUMOylation de plusieurs protéines est déterminée par leur état de phosphorylation et régule leur ubiquitination et leur dégradation (Martin et al., 2007).

Il est aussi intéressant de souligner que des preuves récentes indiquent que la SUMOylation est, aux côtés de la phosphorylation et de l'ubiquitination, un autre type de modification post-traductionnelle qui régule la fonction, la localisation et la stabilité d'un très grand nombre de

protéines et en réponse à l'activité neuronale et qui serait impliquée de façon importante dans des mécanismes liés à la plasticité synaptique (Craig et Henley, 2012; Martin et al., 2007).

Par ailleurs, la dégradation de certaines protéines ubiquitinées peut aussi être opérée par autophagie ou par translocation dans les lysosomes (Hegde, 2017). C'est d'ailleurs en partie ce qui explique que l'autophagie peut être stimulée par l'accumulation de protéines polyubiquitinées et prendre partiellement le relais lors d'une application prolongée de certains inhibiteurs des protéasomes (Goldberg, 2012; Hegde, 2017). Il a d'ailleurs été rapporté que dans certaines conditions, la dégradation d'Ago2 était dépendante des lysosomes et non des protéasomes (Jee et Lai, 2014; Martinez et Gregory, 2013).

En outre, la possibilité que des protéines AGO subissent une forme ou une autre d'autophagie est supportée par le fait qu'une proportion importante des protéines AGO est associée au système vésiculaire, incluant le réticulum endoplasmique, le Golgi, les endosomes multivésiculaires ou de recyclage (Antoniou et al., 2014; Leung, 2015; Makarova et al., 2016; Martinez et Gregory, 2013; McKenzie et al., 2016; Meister, 2013; Shankar et al., 2016). D'ailleurs, les protéines AGO ont déjà été identifiées collectivement comme étant la protéine GERp95 (pour « Golgi ER protein 95 kDa ») et le premier anticorps ayant permis leur marquage par immunocytochimie dans des cellules de mammifères a été généré en utilisant une fraction purifiée de membranes intracellulaires comme antigène (Cikaluk et al., 1999; Leung, 2015).

La régulation traductionnelle par les protéines AGO et le turnover de ces dernières pourraient donc impliquer des voies différentes selon les ARNm ciblés, c'est-à-dire dépendant si ces ARNm codent pour des protéines cytosoliques ou membranaires (contenant un SNP), et selon les conditions cellulaires, découlant notamment des programmes développementaux et de l'activité neuronale. En fonction de certaines spécificités fonctionnelles distinguant les différentes protéines AGO et de leur association à différents facteurs ou de leurs modifications post-traductionnelles, les protéines AGO pourraient par exemple être adressées à l'interface du système vésiculaire/endosomal, à certains types de granules cytoplasmiques (*P-bodies*, granules de stress, RNPm, etc.), aux protéasomes ou aux lysosomes (Hock et al., 2007; Jee et Lai, 2014; Leung, 2015; Leung et al., 2006; McKenzie et al., 2016).

De plus, l'invagination des membranes endosomales lors de la microautophagie (autophagie sélective) de certaines protéines cytoplasmiques associées à ces membranes donne lieu à la formation de vésicules luminales caractérisant les EMV (Braccioli, van Velthoven et Heijnen, 2013; Sahu et al., 2011). Les protéines contenues dans ces vésicules peuvent être dégradées, par hydrolyse dans les lysosomes après la fusion des EMV à ces derniers, ou éjectées dans des exosomes, lors de la fusion des EMV avec la membrane cellulaire (Jiang, Dupont, Castillo et Deretic, 2013; Makarova et al., 2016; Simons et Raposo, 2009). Les exosomes pouvant être transférés entre cellules contiennent d'ailleurs des miARN qui peuvent être associés à Ago2 (Leung, 2015; Makarova et al., 2016; Morel et al., 2013; Xin et al., 2013).

D'ailleurs, il a récemment été rapporté que la phosphorylation d'Ago2 en S387 découlant de la voie MEK-ERK (stimulée par KRAS) inhibe son association aux EMV et l'incorporation dans les exosomes de miARN associés à Ago2, pour une lignée de cellules cancéreuses du colon en culture (McKenzie et al., 2016). De façon intéressante, il a aussi été rapporté que l'activité des récepteurs NMDA régule l'association d'Ago2 aux endosomes de recyclage dans les neurones corticaux (Antoniou et al., 2014). De plus, Antoniou et al. (2014) ont trouvé que l'association d'Ago2 aux endosomes par l'entremise de la protéine PICK1 était corrélée à une inhibition de la répression miARN-dépendante opérée par Ago2. Il est pertinent de noter qu'un phénomène semblable a été décrit dans une étude employant des fibroblastes : l'interaction à la membrane du RE d'Ago2 avec la petite molécule Ras (la forme oncogène KRAS), régulant la voie de signalisation MEK-ERK, inhibe l'activité répressive d'Ago2 (Shankar et al., 2016).

Cependant, il nous est difficile de concilier toutes ces observations et leurs interprétations avec la déphosphorylation d'Ago2 S387 que nous avons observée en réponse à l'activation des récepteurs NMDA. En effet, si la phosphorylation de S387 inhibe l'association d'Ago2 aux membranes du système vésiculaire dans les neurones de façon semblable à ce que McKenzie et al. (2016) ont observé, nous nous attendrions à ce que l'activation des récepteurs NMDA soit associée à une augmentation de l'association d'Ago2 aux endosomes. Inversement, si l'activation des récepteurs NMDA est bel et bien associée à une diminution de l'association d'Ago2 aux endosomes dans les dendrites, tel que le soutiennent Antoniou et al. (2014), nous considérons que la phosphorylation de S387 devrait alors favoriser l'association d'Ago2 aux

membranes endosomales dans les neurones, ce qui contrasterait avec le modèle décrit par McKenzie et al. (2016) pour des cellules cancéreuses du colon. Cependant, il est possible que l'incohérence découle de différences reliées aux différents types de cellules utilisés.

5.3.2) La fonction des protéines AGO dans les neurones

Il a été démontré que l'abondance de différents miARN est modifiée de façon distincte par des traitements affectant l'activité synaptique des neurones hippocampiques en culture (van Spronsen et al., 2013). Plusieurs études supportent l'hypothèse selon laquelle la majorité des miARN sont généralement chargés de façon indiscriminée sur l'une ou l'autre des protéines AGO (Burroughs et al., 2011; Dueck et al., 2012; Wang et al., 2012). Cependant, des données démontrent aussi que certains miARN seraient associés de façon préférentielle à l'une ou l'autre des protéines AGO (Burroughs et al., 2011; Diederichs et Haber, 2007; Ghosh et Adhya, 2016; Juvvuna et al., 2012; Winter et Diederichs, 2011; Yang et al., 2010). Il nous apparaît donc plausible que l'expression de certains miARN et ARNm soit régulée différemment par les signaux dans les dendrites selon que ces ARN sont associés à Ago1 ou à Ago2.

De plus, plusieurs des isoformes de transcrits d'un même gène qui se distinguent l'un de l'autre par leur région 3'UTR sont soumis à une distribution cellulaire différentielle : certains sont transportés dans les dendrites, d'autres sont confinés au soma et d'autres ne semblent pas être soumis à une régulation spatiale (localisation) particulière (Buxbaum, Haimovich, et al., 2015). Des différences dans la séquence et la taille de la 3'UTR peuvent impliquer des différences dans les sites de liaison de miARN présents sur certains ARNm (Wilczynska et Bushell, 2015). Par ailleurs, des sites de liaison de différents miARN présents sur un même ARNm peuvent être ciblés de façon préférentielle par Ago1 ou Ago2 (Ghosh et Adhya, 2016). Il nous apparaît donc possible que la régulation de certains isoformes d'ARNm puisse dépendre différemment d'Ago1 et d'Ago2 et que cette divergence ait un impact sur la localisation de ces transcrits dans les neurones.

Conclusion

Les microARN (miARN) sont des acteurs importants dans la régulation de l'expression des gènes dans le cerveau (Aksoy-Aksel et al., 2014; Davis et al., 2015; Fiorenza et Barco, 2016; Motti, Bixby et Lemmon, 2012; Petri, Malmevik, Fasching, Akerblom et Jakobsson, 2014). La voie des miARN joue notamment un rôle critique dans la régulation traductionnelle dans le cadre des processus de plasticité neuronale tels que la morphogenèse dendritique et la plasticité synaptique (Bicker et al., 2014; Fu et al., 2016; Gardiner, Twiss et Perrone-Bizzozero, 2015; Hu et Li, 2017; McNeill et Van Vactor, 2012; Ryan et al., 2015). Les protéines Argonaute (AGO) sont les principaux effecteurs de la régulation des ARN messagers (ARNm) dépendante des miARN (Fabian et Sonenberg, 2012; Iwakawa et Tomari, 2015; Jonas et Izaurralde, 2015; Meister, 2013). Les protéines AGO constituent elles-mêmes un point de contrôle majeur sur lequel convergent de nombreuses voies de signalisation pour ajuster la disponibilité des ARNm et coordonner leur traduction (Jee et Lai, 2014; Leung, 2015; Meister, 2013; Wilczynska et Bushell, 2015).

Le projet de recherche présenté dans cette thèse visait à caractériser la régulation et la fonction des protéines Argonaute dans les neurones hippocampiques durant le développement et la maturation de leurs dendrites. Dans la première étude du projet, nous avons trouvé que l'activation des récepteurs NMDA induit rapidement la déphosphorylation d'Ago2 et sa dégradation et que cette régulation favorise la formation et la maturation des épines dendritiques. Dans la deuxième étude, nous avons constaté que l'expression de la protéine Ago1 est réduite de façon importante en comparaison de la protéine Ago2 durant le développement des neurones et nos observations supportent l'existence d'un rôle important pour cette régulation différentielle dans la morphogenèse dendritique. En décrivant le fonctionnement d'Ago1 et Ago2 dans les neurones hippocampiques, ce projet de recherche a contribué à mettre en lumière certains mécanismes de régulation post-transcriptionnelle importants pour le contrôle de la synthèse protéique dans les dendrites. Cette régulation, modulée par l'activité neuronale, est cruciale pour l'homéostasie, le développement et la plasticité des neurones. Le rôle majeur des protéines AGO et des miARN dans la

neurophysiologie cellulaire implique que nos observations entourant la régulation de leur fonction durant le développement neuronal et en réponse à des signaux associés à l'activité synaptique ont des conséquences importantes pour la compréhension des processus moléculaires qui sous-tendent l'intégration nerveuse et, ultimement, la mémoire et les fonctions cognitives (Bian et al., 2013; Fu et al., 2016; Gardiner et al., 2015; Hu et Li, 2017; Liu et al., 2004; McNeill et Van Vactor, 2012; Ryan et al., 2015; Ye et al., 2016).

Par ailleurs, en raison des voies de signalisation cellulaires et des partenaires d'interaction potentiellement influencés ou pouvant être modulés par la voie des miARN, nous pensons que nos observations pourraient fournir des indices quant aux processus impliqués dans certaines formes de dérégulation traductionnelle associées à des pathologies neurodéveloppementales ou neurodégénératives (Garza-Manero, Pichardo-Casas, Arias, Vaca et Zepeda, 2014; Hebert et al., 2010; Hollins et Cairns, 2016; Im et Kenny, 2012; Pichardo-Casas et al., 2012; Pogue, Hill et Lukiw, 2014). D'ailleurs, un grand intérêt est porté au potentiel thérapeutique que présentent certaines approches exploitant les voies des miARN et des siARN (Braccioli et al., 2013; Leuschner et al., 2011; Xin et al., 2013; Yang et al., 2016; Zhang et al., 2016). Une connaissance accrue des mécanismes régulant et impliquant les protéines AGO est importante afin d'optimiser la spécificité et l'efficacité de ce type d'interventions et de limiter leurs effets non désirables (Grimm et al., 2006; van Gestel et al., 2014).

Bibliographie

- Aalto, A. P. et Pasquinelli, A. E. (2012). Small non-coding RNAs mount a silent revolution in gene expression. *Curr Opin Cell Biol*, 24(3), 333-340.
- Abernathy, D. G. et Yoo, A. S. (2015). MicroRNA-dependent genetic networks during neural development. *Cell Tissue Res*, 359(1), 179-185.
- Achsel, T. et Bagni, C. (2016). Cooperativity in RNA-protein interactions: the complex is more than the sum of its partners. *Curr Opin Neurobiol*, 39, 146-151.
- Adams, B. D., Claffey, K. P. et White, B. A. (2009). Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells. *Endocrinology*, 150(1), 14-23.
- Aimone, J. B., Li, Y., Lee, S. W., Clemenson, G. D., Deng, W. et Gage, F. H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev*, 94(4), 991-1026.
- Aksoy-Aksel, A., Zampa, F. et Schrott, G. (2014). MicroRNAs and synaptic plasticity--a mutual relationship. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1652).
- Alberini, C. M. et Kandel, E. R. (2014). The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(1), a021741.
- Alvarez-Castelao, B. et Schuman, E. M. (2015). The regulation of synaptic protein turnover. *J Biol Chem*, 290(48), 28623-28630.
- Alves-Sampaio, A., Troca-Marin, J. A. et Montesinos, M. L. (2010). NMDA-mediated regulation of DSCAM dendritic local translation is lost in a mouse model of Down's syndrome. *J Neurosci*, 30(40), 13537-13548.

- Amaral, D. G. et Strick, P. L. (2012). The Organization of the Central Nervous System. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & M. T. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 337-355): McGraw-Hill Professional.
- Ameres, S. L. et Zamore, P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(8), 475-488.
- An, J. J., Gharami, K., Liao, G. Y., Woo, N. H., Lau, A. G., Vanevski, F., Torre, E. R., Jones, K. R., Feng, Y., Lu, B. et Xu, B. (2008). Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell*, 134(1), 175-187.
- Angevine, J. B., Jr. (1965). Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol Suppl*, Suppl 2:1-70.
- Anggono, V. et Huganir, R. L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 22(3), 461-469.
- Antar, L. N., Afroz, R., Dichtenberg, J. B., Carroll, R. C. et Bassell, G. J. (2004). Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci*, 24(11), 2648-2655.
- Antoniou, A., Baptista, M., Carney, N. et Hanley, J. G. (2014). PICK1 links Argonaute 2 to endosomes in neuronal dendrites and regulates miRNA activity. *EMBO Rep*, 15(5), 548-556.
- Arimura, N. et Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8(3), 194-205.
- Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P. et Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209), 64-71.

- Bailey, C. H., Kandel, E. R. et Harris, K. M. (2015). Structural components of synaptic plasticity and memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(7), a021758.
- Banerjee, S., Neveu, P. et Kosik, K. S. (2009). A coordinated local translational control point at the synapse involving relief from silencing and MOV10 degradation. *Neuron*, 64(6), 871-884.
- Bar-Ilan, L., Gidon, A. et Segev, I. (2012). The role of dendritic inhibition in shaping the plasticity of excitatory synapses. *Front Neural Circuits*, 6, 118.
- Bargmann, C. I. et Gilliam, T. C. (2012). Genes and Behavior. Dans E. Kandel, J. Schwartz & T. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 39-66) : McGraw-Hill Professional.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233.
- Bartlett, W. P. et Banker, G. A. (1984a). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci*, 4(8), 1944-1953.
- Bartlett, W. P. et Banker, G. A. (1984b). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J Neurosci*, 4(8), 1954-1965.
- Baumgartel, K. et Mansuy, I. M. (2012). Neural functions of calcineurin in synaptic plasticity and memory. *Learn Mem*, 19(9), 375-384.
- Bayer, S. A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol*, 190(1), 87-114.
- Bazzini, A. A., Lee, M. T. et Giraldez, A. J. (2012). Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*, 336(6078), 233-237.

- Bear, M. F. (2007). *Neuroscience : exploring the brain*. (3^e éd.). Baltimore, MD : Lippincott Williams & Wilkins.
- Beattie, E. C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M. et Malenka, R. C. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci*, 3(12), 1291-1300.
- Becker, E. B. et Bonni, A. (2004). Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Prog Neurobiol*, 72(1), 1-25.
- Bethune, J., Artus-Revel, C. G. et Filipowicz, W. (2012). Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Rep*, 13(8), 716-723.
- Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I. et Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, 125(6), 1111-1124.
- Bian, S., Xu, T. L. et Sun, T. (2013). Tuning the cell fate of neurons and glia by microRNAs. *Curr Opin Neurobiol*, 23(6), 928-934.
- Bicker, S., Lackinger, M., Weiss, K. et Schratt, G. (2014). MicroRNA-132, -134, and -138: a microRNA troika rules in neuronal dendrites. *Cell Mol Life Sci*, 71(20), 3987-4005.
- Biebl, M., Cooper, C. M., Winkler, J. et Kuhn, H. G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett*, 291(1), 17-20.
- Bingol, B. et Schuman, E. M. (2006). Activity-dependent dynamics and sequestration of proteasomes in dendritic spines. *Nature*, 441(7097), 1144-1148.
- Bingol, B. et Sheng, M. (2011). Deconstruction for reconstruction: the role of proteolysis in neural plasticity and disease. *Neuron*, 69(1), 22-32.

- Bingol, B., Wang, C. F., Arnott, D., Cheng, D., Peng, J. et Sheng, M. (2010). Autophosphorylated CaMKIIalpha acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines. *Cell*, 140(4), 567-578.
- Blichenberg, A., Rehbein, M., Muller, R., Garner, C. C., Richter, D. et Kindler, S. (2001). Identification of a cis-acting dendritic targeting element in the mRNA encoding the alpha subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Neurosci*, 13(10), 1881-1888.
- Bliss, T., Collingridge, G. et Morris, R. (2009). Synaptic Plasticity in the Hippocampus. Dans P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss & J. O'Keefe (dir.), *The Hippocampus Book* : Oxford University Press.
- Bliss, T. V., Collingridge, G. L. et Morris, R. G. (2014). Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1633), 20130129.
- Bliss, T. V. et Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232(2), 331-356.
- Blitzer, R. D., Connor, J. H., Brown, G. P., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R. et Landau, E. M. (1998). Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science*, 280(5371), 1940-1942.
- Bockaert, J. et Marin, P. (2015). mTOR in Brain Physiology and Pathologies. *Physiol Rev*, 95(4), 1157-1187.
- Bockers, T. M., Segger-Junius, M., Iglauer, P., Bockmann, J., Gundelfinger, E. D., Kreutz, M. R., Richter, D., Kindler, S. et Kreienkamp, H. J. (2004). Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Mol Cell Neurosci*, 26(1), 182-190.

- Bodian, D. (1942). Cytological aspects of synaptic function. *Physiological Reviews*, 22(2), 146-169.
- Bodian, D. (1965). A suggestive relationship of nerve cell Rna with specific synaptic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 53, 418-425.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. et Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J*, 17(1), 170-180.
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M. et Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, 82(2), 444-459.
- Braccioli, L., van Velthoven, C. et Heijnen, C. J. (2013). Exosomes: a new weapon to treat the central nervous system. *Mol Neurobiol*, 1-7.
- Branco, T. et Hausser, M. (2010). The single dendritic branch as a fundamental functional unit in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 20(4), 494-502.
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K. et Price, P. J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.*, 35, 567-576.
- Briggs, J. A., Wolvetang, E. J., Mattick, J. S., Rinn, J. L. et Barry, G. (2015). Mechanisms of long non-coding RNAs in mammalian nervous system development, plasticity, disease, and evolution. *Neuron*, 88(5), 861-877.
- Brock, L. G., Coombs, J. S. et Eccles, J. C. (1952). The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode. *J Physiol*, 117(4), 431-460.
- Bronevetsky, Y. et Ansel, K. M. (2013). Regulation of miRNA biogenesis and turnover in the immune system. *Immunol Rev*, 253(1), 304-316.

- Bronevetsky, Y., Villarino, A. V., Eisley, C. J., Barbeau, R., Barczak, A. J., Heinz, G. A., Kremmer, E., Heissmeyer, V., McManus, M. T., Erle, D. J., Rao, A. et Ansel, K. M. (2013). T cell activation induces proteasomal degradation of Argonaute and rapid remodeling of the microRNA repertoire. *J Exp Med*, 210(2), 417-432.
- Buffington, S. A., Huang, W. et Costa-Mattioli, M. (2014). Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annu Rev Neurosci*, 37, 17-38.
- Burgin, K. E., Waxham, M. N., Rickling, S., Westgate, S. A., Mobley, W. C. et Kelly, P. T. (1990). In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J Neurosci*, 10(6), 1788-1798.
- Burroughs, A. M., Ando, Y., de Hoon, M. J., Tomaru, Y., Suzuki, H., Hayashizaki, Y. et Daub, C. O. (2011). Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biol*, 8(1), 158-177.
- Buxbaum, A. R., Haimovich, G. et Singer, R. H. (2015). In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(2), 95-109.
- Buxbaum, A. R., Wu, B. et Singer, R. H. (2014). Single beta-actin mRNA detection in neurons reveals a mechanism for regulating its translatability. *Science*, 343(6169), 419-422.
- Buxbaum, A. R., Yoon, Y. J., Singer, R. H. et Park, H. Y. (2015). Single-molecule insights into mRNA dynamics in neurons. *Trends Cell Biol*, 25(8), 468-475.
- Cajal, S. R. Y. (1894). The Croonian Lecture: La fine structure des centres nerveux. *Proceedings of the Royal Society of London*, 55(331-335), 444-468.
- Cajigas, I. J., Tushev, G., Will, T. J., tom Dieck, S., Fuerst, N. et Schuman, E. M. (2012). The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron*, 74(3), 453-466.

- Cameron, H. A. et McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 435(4), 406-417.
- Cane, M., Maco, B., Knott, G. et Holtmaat, A. (2014). The relationship between PSD-95 clustering and spine stability in vivo. *J Neurosci*, 34(6), 2075-2086.
- Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q. et Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, 16(21), 2733-2742.
- Ceman, S., O'Donnell, W. T., Reed, M., Patton, S., Pohl, J. et Warren, S. T. (2003). Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum Mol Genet*, 12(24), 3295-3305.
- Chang, H. M., Martinez, N. J., Thornton, J. E., Hagan, J. P., Nguyen, K. D. et Gregory, R. I. (2012). Trim71 cooperates with microRNAs to repress Cdkn1a expression and promote embryonic stem cell proliferation. *Nat Commun*, 3, 923.
- Charych, E. I., Akum, B. F., Goldberg, J. S., Jornsten, R. J., Rongo, C., Zheng, J. Q. et Firestein, B. L. (2006). Activity-independent regulation of dendrite patterning by postsynaptic density protein PSD-95. *J Neurosci*, 26(40), 10164-10176.
- Cheever, A. et Ceman, S. (2009a). Phosphorylation of FMRP inhibits association with Dicer. *RNA*, 15(3), 362-366.
- Cheever, A. et Ceman, S. (2009b). Translation regulation of mRNAs by the fragile X family of proteins through the microRNA pathway. *RNA Biol*, 6(2), 175-178.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. et Hannon, G. J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 465(7298), 584-589.
- Chen, E., Sharma, M. R., Shi, X., Agrawal, R. K. et Joseph, S. (2014). Fragile X mental retardation protein regulates translation by binding directly to the ribosome. *Mol Cell*, 54(3), 407-417.

- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. et Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051), 740-744.
- Cikaluk, D. E., Tahbaz, N., Hendricks, L. C., DiMattia, G. E., Hansen, D., Pilgrim, D. et Hobman, T. C. (1999). GERp95, a membrane-associated protein that belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. *Mol Biol Cell*, 10(10), 3357-3372.
- Citri, A. et Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18-41.
- Collino, F., Deregibus, M. C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., Tetta, C. et Camussi, G. (2010). Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One*, 5(7), e11803.
- Connors, B. W. et Long, M. A. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci*, 27, 393-418.
- Cortes-Mendoza, J., Diaz de Leon-Guerrero, S., Pedraza-Alva, G. et Perez-Martinez, L. (2013). Shaping synaptic plasticity: the role of activity-mediated epigenetic regulation on gene transcription. *Int J Dev Neurosci*, 31(6), 359-369.
- Costa-Mattioli, M. et Monteggia, L. M. (2013). mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 16(11), 1537-1543.
- Cougot, N., Bhattacharyya, S. N., Tapia-Arancibia, L., Bordonne, R., Filipowicz, W., Bertrand, E. et Rage, F. (2008). Dendrites of mammalian neurons contain specialized P-body-like structures that respond to neuronal activation. *J Neurosci*, 28(51), 13793-13804.
- Coultrap, S. J. et Bayer, K. U. (2012). CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci*, 35(10), 607-618.
- Craig, A. M. et Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci*, 17, 267-310.

- Craig, A. M., Graf, E. R. et Linhoff, M. W. (2006). How to build a central synapse: clues from cell culture. *Trends Neurosci*, 29(1), 8-20.
- Craig, T. J. et Henley, J. M. (2012). Protein SUMOylation in spine structure and function. *Curr Opin Neurobiol*, 22(3), 480-487.
- Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C. F., Fenteany, G., Goldberg, A. L. et Rock, K. L. (1997). Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem*, 272(20), 13437-13445.
- da Silva, J. S. et Dotti, C. G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci*, 3(9), 694-704.
- Dailey, M. E. et Smith, S. J. (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci*, 16(9), 2983-2994.
- Darnell, R. B. (2013). RNA protein interaction in neurons. *Annu Rev Neurosci*, 36, 243-270.
- Davis, G. M., Haas, M. A. et Pockock, R. (2015). MicroRNAs: Not "Fine-Tuners" but Key Regulators of Neuronal Development and Function. *Front Neurol*, 6, 245.
- Davis, L., Banker, G. A. et Steward, O. (1987). Selective dendritic transport of RNA in hippocampal neurons in culture. *Nature*, 330(6147), 477-479.
- Davis, T. H., Cuellar, T. L., Koch, S. M., Barker, A. J., Harfe, B. D., McManus, M. T. et Ullian, E. M. (2008). Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J Neurosci*, 28(17), 4322-4330.
- de la Torre-Ubieta, L., Gaudilliere, B., Yang, Y., Ikeuchi, Y., Yamada, T., DiBacco, S., Stegmuller, J., Schuller, U., Salih, D. A., Rowitch, D., Brunet, A. et Bonni, A. (2010). A FOXO-Pak1 transcriptional pathway controls neuronal polarity. *Genes Dev*, 24(8), 799-813.

- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A. et Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398(6727), 518-522.
- Decker, C. J. et Parker, R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9), a012286.
- Didiot, M. C., Subramanian, M., Flatter, E., Mandel, J. L. et Moine, H. (2009). Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly. *Mol Biol Cell*, 20(1), 428-437.
- Diederichs, S. et Haber, D. A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, 131(6), 1097-1108.
- Djuranovic, S., Nahvi, A. et Green, R. (2012). miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*, 336(6078), 237-240.
- Dong, C., Bach, S. V., Haynes, K. A. et Hegde, A. N. (2014). Proteasome modulates positive and negative translational regulators in long-term synaptic plasticity. *J Neurosci*, 34(9), 3171-3182.
- Dong, C., Vashisht, A. et Hegde, A. N. (2014). Proteasome regulates the mediators of cytoplasmic polyadenylation signaling during late-phase long-term potentiation. *Neurosci Lett*, 583, 199-204.
- Donlin-Asp, P. G., Rossoll, W. et Bassell, G. J. (2017). Spatially and temporally regulating translation via mRNA-binding proteins in cellular and neuronal function. *FEBS Lett*, 591(11), 1508-1525.
- Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E. et Meister, G. (2012). microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res*, 40(19), 9850-9862.

- Eacker, S. M., Dawson, T. M. et Dawson, V. L. (2013). The interplay of microRNA and neuronal activity in health and disease. *Front Cell Neurosci*, 7, 136.
- Ebert, M. S. et Sharp, P. A. (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*, 149(3), 515-524.
- Edbauer, D., Neilson, J. R., Foster, K. A., Wang, C. F., Seeburg, D. P., Batterton, M. N., Tada, T., Dolan, B. M., Sharp, P. A. et Sheng, M. (2010). Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, 65(3), 373-384.
- Ederle, H. et Dormann, D. (2017). TDP-43 and FUS en route from the nucleus to the cytoplasm. *FEBS Lett*, 591(11), 1489-1507.
- Ehlers, M. D. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron*, 28(2), 511-525.
- Ehlers, M. D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci*, 6(3), 231-242.
- Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S. et Malinow, R. (2007). PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10), 4176-4181.
- Eichhorn, S. W., Guo, H., McGeary, S. E., Rodriguez-Mias, R. A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S. H., Ghoshal, K., Villen, J. et Bartel, D. P. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell*, 56(1), 104-115.
- El-Husseini, A. E., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A. et Brecht, D. S. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, 290(5495), 1364-1368.
- Engert, F. et Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, 399(6731), 66-70.

- English, J. D. et Sweatt, J. D. (1997). A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem*, 272(31), 19103-19106.
- Erickson, S. L. et Lykke-Andersen, J. (2011). Cytoplasmic mRNP granules at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(3), 293-297.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. et Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4(11), 1313-1317.
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H. et Frisen, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 156(5), 1072-1083.
- Esch, T., Lemmon, V. et Banker, G. (1999). Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, 19(15), 6417-6426.
- Esposito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J. et Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*, 25(44), 10074-10086.
- Eulalio, A., Huntzinger, E. et Izaurralde, E. (2008). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol*, 15(4), 346-353.
- Fabian, M. R. et Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol*, 19(6), 586-593.
- Fatt, P. et Katz, B. (1951). An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol*, 115(3), 320-370.
- Fatt, P. et Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol*, 117(1), 109-128.

- Feig, S. et Lipton, P. (1993). Pairing the cholinergic agonist carbachol with patterned Schaffer collateral stimulation initiates protein synthesis in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites via a muscarinic, NMDA-dependent mechanism. *J Neurosci*, *13*(3), 1010-1021.
- Fernandez-Valverde, S. L., Taft, R. J. et Mattick, J. S. (2010). Dynamic isomiR regulation in *Drosophila* development. *RNA*, *16*(10), 1881-1888.
- Ferreira, R., Santos, T., Amar, A., Gong, A., Chen, T. C., Tahara, S. M., Giannotta, S. L. et Hofman, F. M. (2014). Argonaute-2 promotes miR-18a entry in human brain endothelial cells. *J Am Heart Assoc*, *3*(3), e000968.
- Ferreira, T. A., Blackman, A. V., Oyrer, J., Jayabal, S., Chung, A. J., Watt, A. J., Sjostrom, P. J. et van Meyel, D. J. (2014). Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Methods*, *11*(10), 982-984.
- Filipowicz, W. et Sonenberg, N. (2015). The long unfinished march towards understanding microRNA-mediated repression. *RNA*, *21*(4), 519-524.
- Fineberg, S. K., Kosik, K. S. et Davidson, B. L. (2009). MicroRNAs potentiate neural development. *Neuron*, *64*(3), 303-309.
- Finnegan, E. F. et Pasquinelli, A. E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *48*(1), 51-68.
- Fiorenza, A. et Barco, A. (2016). Role of Dicer and the miRNA system in neuronal plasticity and brain function. *Neurobiol Learn Mem*, *135*, 3-12.
- Fischer, S. E. (2015). RNA Interference and MicroRNA-Mediated Silencing. *Curr Protoc Mol Biol*, *112*, 26 21 21-25.
- Frey, U., Krug, M., Reymann, K. G. et Matthies, H. (1988). Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res*, *452*(1-2), 57-65.

- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. et Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19(1), 92-105.
- Fritzsche, R., Karra, D., Bennett, K. L., Ang, F. Y., Heraud-Farlow, J. E., Tolino, M., Doyle, M., Bauer, K. E., Thomas, S., Planyavsky, M., Arn, E., Bakosova, A., Jungwirth, K., Hormann, A., Palfi, Z., Sandholzer, J., Schwarz, M., Macchi, P., Colinge, J., Superti-Furga, G. et Kiebler, M. A. (2013). Interactome of two diverse RNA granules links mRNA localization to translational repression in neurons. *Cell Rep*, 5(6), 1749-1762.
- Frotscher, M. et Seress, L. (2009). Morphological Development of the Hippocampus. Dans P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss & J. O'Keefe (dir.), *The Hippocampus Book* : Oxford University Press.
- Fu, X., Shah, A. et Baraban, J. M. (2016). Rapid reversal of translational silencing: Emerging role of microRNA degradation pathways in neuronal plasticity. *Neurobiol Learn Mem*, 133, 225-232.
- Fukao, A., Aoyama, T. et Fujiwara, T. (2015). The molecular mechanism of translational control via the communication between the microRNA pathway and RNA-binding proteins. *RNA Biol*, 12(9), 922-926.
- Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., Sonenberg, N., Thoma, C. et Fujiwara, T. (2014). MicroRNAs trigger dissociation of eIF4AI and eIF4AII from target mRNAs in humans. *Mol Cell*, 56(1), 79-89.
- Furshpan, E. J. et Potter, D. D. (1959). Transmission at the Giant Motor Synapses of the Crayfish. *Journal of Physiology-London*, 145(2), 289-&.
- Gao, F. B., Brenman, J. E., Jan, L. Y. et Jan, Y. N. (1999). Genes regulating dendritic outgrowth, branching, and routing in *Drosophila*. *Genes Dev*, 13(19), 2549-2561.
- Gardiner, A. S., Twiss, J. L. et Perrone-Bizzozero, N. I. (2015). Competing interactions of RNA-binding proteins, microRNAs, and their targets control neuronal development and function. *Biomolecules*, 5(4), 2903-2918.

- Garner, C. C., Tucker, R. P. et Matus, A. (1988). Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature*, 336(6200), 674-677.
- Garza-Manero, S., Pichardo-Casas, I., Arias, C., Vaca, L. et Zepeda, A. (2014). Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. *Brain Res*, 1584, 80-93.
- Gaudilliere, B., Konishi, Y., de la Iglesia, N., Yao, G. et Bonni, A. (2004). A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron*, 41(2), 229-241.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D. et Mansuy, I. M. (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*, 418(6901), 970-975.
- Gerstberger, S., Hafner, M. et Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet*, 15(12), 829-845.
- Ghosh, A., Carnahan, J. et Greenberg, M. E. (1994). Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*, 263(5153), 1618-1623.
- Ghosh, U. et Adhya, S. (2016). Non-equivalent roles of AGO1 and AGO2 in mRNA turnover and translation of Cyclin D1 mRNA. *J Biol Chem*, 291(13), 7119-7127.
- Gidon, A. et Segev, I. (2012). Principles governing the operation of synaptic inhibition in dendrites. *Neuron*, 75(2), 330-341.
- Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S., Hammond, S. M., Bartel, D. P. et Schier, A. F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*, 308(5723), 833-838.
- Goldberg, A. L. (2012). Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *J Cell Biol*, 199(4), 583-588.

- Gong, R., Park, C. S., Abbassi, N. R. et Tang, S. J. (2006). Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 281(27), 18802-18815.
- Govindarajan, A., Israely, I., Huang, S. Y. et Tonegawa, S. (2011). The dendritic branch is the preferred integrative unit for protein synthesis-dependent LTP. *Neuron*, 69(1), 132-146.
- Greer, P. L. et Greenberg, M. E. (2008). From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*, 59(6), 846-860.
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N. et Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), 631-640.
- Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F. et Kay, M. A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 441(7092), 537-541.
- Guillemot, F. (2007). Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Prog Neurobiol*, 83(1), 37-52.
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. et Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308), 835-840.
- Gurtan, A. M. et Sharp, P. A. (2013). The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J Mol Biol*, 425(19), 3582-3600.
- Ha, M. et Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(8), 509-524.
- Hamburger, V. et Levi-Montalcini, R. (1949). Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool*, 111(3), 457-501.

- Hamilton, A. M., Oh, W. C., Vega-Ramirez, H., Stein, I. S., Hell, J. W., Patrick, G. N. et Zito, K. (2012). Activity-dependent growth of new dendritic spines is regulated by the proteasome. *Neuron*, 74(6), 1023-1030.
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J. I., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A. P., Parras, C., Schuurmans, C., Guillemot, F. et Polleux, F. (2005). Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron*, 48(1), 45-62.
- Hansen, T. B., Veno, M. T., Jensen, T. I., Schaefer, A., Damgaard, C. K. et Kjems, J. (2016). Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat Commun*, 7, 11538.
- Hanus, C. et Schuman, E. M. (2013). Proteostasis in complex dendrites. *Nat Rev Neurosci*, 14(9), 638-648.
- Harrington, A. W. et Ginty, D. D. (2013). Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. *Nat Rev Neurosci*, 14(3), 177-187.
- Harrison, R. G. (1910). The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *Journal of Experimental Zoology*, 9(4), 787-846.
- Harrison, R. G. (1935). The Croonian Lecture: On the origin and development of the nervous system studied by the methods of experimental embryology. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 118(808), 155-196.
- Harrison, R. G., Greenman, M. J., Mall, F. P. et Jackson, C. M. (1907). Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, 1(5), 116-128.
- Hauptmann, J. et Meister, G. (2013). Argonaute regulation : two roads to the same destination. *Dev Cell*, 25(6), 553-554.
- Hausser, M., Spruston, N. et Stuart, G. J. (2000). Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science*, 290(5492), 739-744.

- Hebb, D. O. (1949 (2002)). *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. Taylor & Francis.
- Hebert, S. S., Papadopoulou, A. S., Smith, P., Galas, M. C., Planel, E., Silahtaroglu, A. N., Sergeant, N., Buee, L. et De Strooper, B. (2010). Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Hum Mol Genet*, *19*(20), 3959-3969.
- Hegde, A. N. (2017). Proteolysis, synaptic plasticity and memory. *Neurobiol Learn Mem*, *138*, 98-110.
- Heimberg, A. M., Sempere, L. F., Moy, V. N., Donoghue, P. C. et Peterson, K. J. (2008). MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(8), 2946-2950.
- Hendrickson, D. G., Hogan, D. J., McCullough, H. L., Myers, J. W., Herschlag, D., Ferrell, J. E. et Brown, P. O. (2009). Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol*, *7*(11), e1000238.
- Henley, J. M. et Wilkinson, K. A. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, *17*(6), 337-350.
- Heraud-Farlow, J. E. et Kiebler, M. A. (2014). The multifunctional Staufen proteins: conserved roles from neurogenesis to synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, *37*(9), 470-479.
- Hevner, R. F., Hodge, R. D., Daza, R. A. et Englund, C. (2006). Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neurosci Res*, *55*(3), 223-233.
- Hirokawa, N. (2006). mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J Neurosci*, *26*(27), 7139-7142.
- Ho, V. M., Lee, J. A. et Martin, K. C. (2011). The cell biology of synaptic plasticity. *Science*, *334*(6056), 623-628.

- Hock, J., Weinmann, L., Ender, C., Rudel, S., Kremmer, E., Raabe, M., Urlaub, H. et Meister, G. (2007). Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep*, 8(11), 1052-1060.
- Hodgkin, A. L. et Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol*, 108(1), 37-77.
- Holland, N. D. (2003). Early central nervous system evolution: an era of skin brains? *Nat Rev Neurosci*, 4(8), 617-627.
- Hollins, S. L. et Cairns, M. J. (2016). MicroRNA: small RNA mediators of the brains genomic response to environmental stress. *Prog Neurobiol*, 143, 61-81.
- Holt, C. E. et Schuman, E. M. (2013). The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons. *Neuron*, 80(3), 648-657.
- Homyk, T., Jr., Szidonya, J. et Suzuki, D. T. (1980). Behavioral mutants of *Drosophila melanogaster*. III. Isolation and mapping of mutations by direct visual observations of behavioral phenotypes. *Mol Gen Genet*, 177(4), 553-565.
- Horman, S. R., Janas, M. M., Litterst, C., Wang, B., MacRae, I. J., Sever, M. J., Morrissey, D. V., Graves, P., Luo, B., Umesalma, S., Qi, H. H., Miraglia, L. J., Novina, C. D. et Orth, A. P. (2013). Akt-mediated phosphorylation of argonaute 2 downregulates cleavage and upregulates translational repression of MicroRNA targets. *Mol Cell*, 50(3), 356-367.
- Hosokawa, T., Rusakov, D. A., Bliss, T. V. et Fine, A. (1995). Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP. *J Neurosci*, 15(8), 5560-5573.
- Hou, L., Antion, M. D., Hu, D., Spencer, C. M., Paylor, R. et Klann, E. (2006). Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron*, 51(4), 441-454.

- Hu, Z. et Li, Z. (2017). miRNAs in synapse development and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 45, 24-31.
- Huang, T., Liu, Y., Huang, M., Zhao, X. et Cheng, L. (2010). Wnt1-cre-mediated conditional loss of Dicer results in malformation of the midbrain and cerebellum and failure of neural crest and dopaminergic differentiation in mice. *J Mol Cell Biol*, 2(3), 152-163.
- Huber, K. M., Kayser, M. S. et Bear, M. F. (2000). Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science*, 288(5469), 1254-1257.
- Huganir, R. L. et Nicoll, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. *Neuron*, 80(3), 704-717.
- Im, H. I. et Kenny, P. J. (2012). MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends Neurosci*, 35(5), 325-334.
- Impey, S., Davare, M., Lesiak, A., Fortin, D., Ando, H., Varlamova, O., Obrietan, K., Soderling, T. R., Goodman, R. H. et Wayman, G. A. (2010). An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Mol Cell Neurosci*, 43(1), 146-156.
- Ivanov, A., Pellegrino, C., Rama, S., Dumalska, I., Salyha, Y., Ben-Ari, Y. et Medina, I. (2006). Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol*, 572(Pt 3), 789-798.
- Iwakawa, H. O. et Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol*, 25(11), 651-665.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. et Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2), 113-127.
- Jan, Y. N. et Jan, L. Y. (2010). Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nat Rev Neurosci*, 11(5), 316-328.

- Jarome, T. J. et Helmstetter, F. J. (2013). The ubiquitin-proteasome system as a critical regulator of synaptic plasticity and long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem*, 105, 107-116.
- Jarome, T. J. et Helmstetter, F. J. (2014). Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Front Mol Neurosci*, 7, 61.
- Jee, D. et Lai, E. C. (2014). Alteration of miRNA activity via context-specific modifications of Argonaute proteins. *Trends Cell Biol*, 24(9), 546-553.
- Jessell, T. M. et Sanes, J. R. (2012). Differentiation and Survival of Nerve Cells. Dans E. Kandel, J. Schwartz & T. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 1187-1208) : McGraw-Hill Professional.
- Jiang, S., Dupont, N., Castillo, E. F. et Deretic, V. (2013). Secretory versus degradative autophagy: unconventional secretion of inflammatory mediators. *Journal of Innate Immunology*, 5(5), 471-479.
- Johnston, M., Geoffroy, M. C., Sobala, A., Hay, R. et Hutvagner, G. (2010). HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol Biol Cell*, 21(9), 1462-1469.
- Joilin, G., Guevremont, D., Ryan, B., Claudianos, C., Cristino, A. S., Abraham, W. C. et Williams, J. M. (2014). Rapid regulation of microRNA following induction of long-term potentiation in vivo. *Front Mol Neurosci*, 7, 98.
- Jonas, S. et Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*, 16(7), 421-433.
- Josa-Prado, F., Henley, J. M. et Wilkinson, K. A. (2015). SUMOylation of Argonaute-2 regulates RNA interference activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 464(4), 1066-1071.
- Jung, H., Gkogkas, C. G., Sonenberg, N. et Holt, C. E. (2014). Remote control of gene function by local translation. *Cell*, 157(1), 26-40.

- Juvvuna, P. K., Khandelia, P., Lee, L. M. et Makeyev, E. V. (2012). Argonaute identity defines the length of mature mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 40(14), 6808-6820.
- Kaech, S. et Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*, 1(5), 2406-2415.
- Kanai, Y., Dohmae, N. et Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA : isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, 43(4), 513-525.
- Kanamori, T., Kanai, M. I., Dairyo, Y., Yasunaga, K., Morikawa, R. K. et Emoto, K. (2013). Compartmentalized calcium transients trigger dendrite pruning in Drosophila sensory neurons. *Science*, 340(6139), 1475-1478.
- Kandel, E. R., Barres, A. B. et Hudspeth, A. J. (2012). Nerve Cells, Neural Circuitry, and Behavior. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 21-38): McGraw-Hill Professional.
- Kandel, E. R. et Hudspeth, A. J. (2012). The Brain and Behavior. Dans E. R. Kandel, H. J. Schwartz & M. T. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 5-20): McGraw-Hill Professional.
- Katz, B. (1950). Depolarization of sensory terminals and the initiation of impulses in the muscle spindle. *J Physiol*, 111(3-4), 261-282.
- Kenny, P. J., Zhou, H., Kim, M., Skariah, G., Khetani, R. S., Drnevich, J., Arcila, M. L., Kosik, K. S. et Ceman, S. (2014). MOV10 and FMRP regulate AGO2 association with microRNA recognition elements. *Cell Rep*, 9(5), 1729-1741.
- Khoutorsky, A., Yanagiya, A., Gkogkas, C. G., Fabian, M. R., Prager-Khoutorsky, M., Cao, R., Gamache, K., Bouthiette, F., Parsyan, A., Sorge, R. E., Mogil, J. S., Nader, K., Lacaille, J. C. et Sonenberg, N. (2013). Control of synaptic plasticity and memory via suppression of poly(A)-binding protein. *Neuron*, 78(2), 298-311.
- Kiebler, M. A. et Bassell, G. J. (2006). Neuronal RNA granules : movers and makers. *Neuron*, 51(6), 685-690.

- Kim, Y. K., Kim, B. et Kim, V. N. (2016). Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(13), E1881-1889.
- Klein, M. E., Lioy, D. T., Ma, L., Impey, S., Mandel, G. et Goodman, R. H. (2007). Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat Neurosci*, 10(12), 1513-1514.
- Klein, R. et Kania, A. (2014). Ephrin signalling in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 27, 16-24.
- Knowles, R. B., Sabry, J. H., Martone, M. E., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Bassell, G. J. et Kosik, K. S. (1996). Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci*, 16(24), 7812-7820.
- Kobayashi, H., Yamamoto, S., Maruo, T. et Murakami, F. (2005). Identification of a cis-acting element required for dendritic targeting of activity-regulated cytoskeleton-associated protein mRNA. *Eur J Neurosci*, 22(12), 2977-2984.
- Koester, J. et Siegelbaum, S. A. (2012a). Membrane Potential and the Passive Electrical Properties of the Neuron. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 126-147) : McGraw-Hill Professional.
- Koester, J. et Siegelbaum, S. A. (2012b). Propagated Signaling: The Action Potential. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 148-171): McGraw-Hill Professional.
- Konopka, W., Kiryk, A., Novak, M., Herwerth, M., Parkitna, J. R., Wawrzyniak, M., Kowarsch, A., Michaluk, P., Dzwonek, J., Arnsperger, T., Wilczynski, G., Merkschlager, M., Theis, F. J., Kohr, G., Kaczmarek, L. et Schutz, G. (2010). MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J Neurosci*, 30(44), 14835-14842.
- Kopec, C. D., Li, B., Wei, W., Boehm, J. et Malinow, R. (2006). Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci*, 26(7), 2000-2009.

- Kopec, C. D., Real, E., Kessels, H. W. et Malinow, R. (2007). GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses. *J Neurosci*, 27(50), 13706-13718.
- Kosik, K. S. (2016). Life at low copy number: how dendrites manage with so few mRNAs. *Neuron*, 92(6), 1168-1180.
- Kostandy, B. B. (2012). The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci*, 33(2), 223-237.
- Kriegstein, A. et Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-184.
- Krol, J., Busskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M. B., Ribí, S., Richter, J., Duebel, J., Bicker, S., Fehling, H. J., Schubeler, D., Oertner, T. G., Schrott, G., Bibel, M., Roska, B. et Filipowicz, W. (2010). Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell*, 141(4), 618-631.
- Krol, J., Loedige, I. et Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11(9), 597-610.
- Kuhn, C. D. et Joshua-Tor, L. (2013). Eukaryotic Argonautes come into focus. *Trends Biochem Sci*, 38(5), 263-271.
- Kumar, N. M. et Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*, 84(3), 381-388.
- Leal, G., Comprido, D. et Duarte, C. B. (2014). BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76, 639-656.
- Lebeau, G., Maher-Laporte, M., Topolnik, L., Laurent, C. E., Sossin, W., Desgroseillers, L. et Lacaille, J. C. (2008). Stauf1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol*, 28(9), 2896-2907.

- Lebeau, G., Miller, L. C., Tartas, M., McAdam, R., Laplante, I., Badeaux, F., DesGroseillers, L., Sossin, W. S. et Lacaille, J. C. (2011). Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons. *Learn Mem*, 18(5), 314-326.
- Lee, C. T., Risom, T. et Strauss, W. M. (2007). Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA Cell Biol*, 26(4), 209-218.
- Lee, H. K. (2006). Synaptic plasticity and phosphorylation. *Pharmacol Ther*, 112(3), 810-832.
- Lee, H. K., Kameyama, K., Huganir, R. L. et Bear, M. F. (1998). NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron*, 21(5), 1151-1162.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S. et Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 21(17), 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. et Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23(20), 4051-4060.
- Leung, A. K. (2015). The whereabouts of microRNA actions: cytoplasm and beyond. *Trends Cell Biol*, 25(10), 601-610.
- Leung, A. K., Calabrese, J. M. et Sharp, P. A. (2006). Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(48), 18125-18130.
- Leuschner, F., Dutta, P., Gorbatov, R., Novobrantseva, T. I., Donahoe, J. S., Courties, G., Lee, K. M., Kim, J. I., Markmann, J. F. et Marinelli, B. (2011). Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nature biotechnology*, 29(11), 1005-1010.

- Li, L., Stefan, M. I. et Le Novere, N. (2012). Calcium input frequency, duration and amplitude differentially modulate the relative activation of calcineurin and CaMKII. *PLoS One*, 7(9), e43810.
- Liao, D., Zhang, X., O'Brien, R., Ehlers, M. D. et Huganir, R. L. (1999). Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons. *Nat Neurosci*, 2(1), 37-43.
- Lipton, J. O. et Sahin, M. (2014). The neurology of mTOR. *Neuron*, 84(2), 275-291.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L. et Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305(5689), 1437-1441.
- Liu, J., Rivas, F. V., Wohlschlegel, J., Yates, J. R., 3rd, Parker, R. et Hannon, G. J. (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*, 7(12), 1261-1266.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. et Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7(7), 719-723.
- Loedige, I., Gaidatzis, D., Sack, R., Meister, G. et Filipowicz, W. (2013). The mammalian TRIM-NHL protein TRIM71/LIN-41 is a repressor of mRNA function. *Nucleic Acids Res*, 41(1), 518-532.
- Loewi, O. (1921). Über humorale übertragbarkeit der herznervenwirkung. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 189(1), 239-242.
- Loewi, O. et Navratil, E. (1926). Über humorale übertragbarkeit der herznervenwirkung. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 214(1), 678-688.
- Lohmann, C. et Kessels, H. W. (2014). The developmental stages of synaptic plasticity. *J Physiol*, 592(1), 13-31.

- Lopez-Munoz, F., Boya, J. et Alamo, C. (2006). Neuron theory, the cornerstone of neuroscience, on the centenary of the Nobel Prize award to Santiago Ramon y Cajal. *Brain Res Bull*, 70(4-6), 391-405.
- Lu, W., Man, H., Ju, W., Trimble, W. S., MacDonald, J. F. et Wang, Y. T. (2001). Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 29(1), 243-254.
- Lugli, G., Larson, J., Martone, M. E., Jones, Y. et Smalheiser, N. R. (2005). Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J Neurochem*, 94(4), 896-905.
- Lugli, G., Torvik, V. I., Larson, J. et Smalheiser, N. R. (2008). Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J Neurochem*, 106(2), 650-661.
- Luo, L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 18, 601-635.
- Luscher, C. et Malenka, R. C. (2012). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(6).
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A. et Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14(2), 433-445.
- Makarova, J. A., Shkurnikov, M. U., Wicklein, D., Lange, T., Samatov, T. R., Turchinovich, A. A. et Tonevitsky, A. G. (2016). Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem*, 51(3-4), 33-49.
- Makeyev, E. V., Zhang, J., Carrasco, M. A. et Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 27(3), 435-448.

- Malenka, R. C. et Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1), 5-21.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R. et Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*, 283(5409), 1923-1927.
- Martin, K. C. et Ephrussi, A. (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell*, 136(4), 719-730.
- Martin, S., Wilkinson, K. A., Nishimune, A. et Henley, J. M. (2007). Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*, 8(12), 948-959.
- Martinez, N. J. et Gregory, R. I. (2013). Argonaute2 expression is post-transcriptionally coupled to microRNA abundance. *RNA*, 19(5), 605-612.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M. et Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*, 4(11), 1086-1092.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. et Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429(6993), 761-766.
- Mayford, M., Baranes, D., Podsypanina, K. et Kandel, E. R. (1996). The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 13250-13255.
- Mayford, M., Siegelbaum, S. A. et Kandel, E. R. (2012). Synapses and memory storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(6).
- Mayr, C., Hemann, M. T. et Bartel, D. P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*, 315(5818), 1576-1579.

- Mazumder, A., Bose, M., Chakraborty, A., Chakrabarti, S. et Bhattacharyya, S. N. (2013). A transient reversal of miRNA-mediated repression controls macrophage activation. *EMBO Rep*, 14(11), 1008-1016.
- Mazzarello, P. (1999). A unifying concept: the history of cell theory. *Nat Cell Biol*, 1(1), E13-15.
- McAllister, A. K. (2000). Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex*, 10(10), 963-973.
- McKenzie, A. J., Hoshino, D., Hong, N. H., Cha, D. J., Franklin, J. L., Coffey, R. J., Patton, J. G. et Weaver, A. M. (2016). KRAS-MEK signaling controls Ago2 sorting into exosomes. *Cell Reports*, 15(5), 978-987.
- McNeill, E. et Van Vactor, D. (2012). MicroRNAs shape the neuronal landscape. *Neuron*, 75(3), 363-379.
- Meijer, H. A., Kong, Y. W., Lu, W. T., Wilczynska, A., Spriggs, R. V., Robinson, S. W., Godfrey, J. D., Willis, A. E. et Bushell, M. (2013). Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science*, 340(6128), 82-85.
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins : functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet*, 14(7), 447-459.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. et Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15(2), 185-197.
- Meyer, D., Bonhoeffer, T. et Scheuss, V. (2014). Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron*, 82(2), 430-443.
- Miller, S., Yasuda, M., Coats, J. K., Jones, Y., Martone, M. E. et Mayford, M. (2002). Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron*, 36(3), 507-519.

- Milosevic, N. T. et Ristanovic, D. (2007). The Sholl analysis of neuronal cell images: semi-log or log-log method? *J Theor Biol*, 245(1), 130-140.
- Mishima, T., Mizuguchi, Y., Kawahigashi, Y., Takizawa, T. et Takizawa, T. (2007). RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS. *Brain Res*, 1131(1), 37-43.
- Molnar, E. (2011). Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Semin Cell Dev Biol*, 22(5), 506-513.
- Morel, L., Regan, M., Higashimori, H., Ng, S. K., Esau, C., Vidensky, S., Rothstein, J. et Yang, Y. (2013). Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *J Biol Chem*, 288(10), 7105-7116.
- Motti, D., Bixby, J. L. et Lemmon, V. P. (2012). MicroRNAs and neuronal development. *Semin Fetal Neonatal Med*, 17(6), 347-352.
- Muddashetty, R. S., Kelic, S., Gross, C., Xu, M. et Bassell, G. J. (2007). Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, 27(20), 5338-5348.
- Muddashetty, R. S., Nalavadi, V. C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, S. T. et Bassell, G. J. (2011). Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Mol Cell*, 42(5), 673-688.
- Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikar, S. et Malenka, R. C. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 369(6480), 486-488.
- Mulkey, R. M., Herron, C. E. et Malenka, R. C. (1993). An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science*, 261(5124), 1051-1055.

- Muller, C., Schafer, I., Luhmann, H. J. et White, R. (2015). Oligodendroglial Argonaute protein Ago2 associates with molecules of the Mbp mRNA localization machinery and is a downstream target of Fyn kinase. *Front Cell Neurosci*, 9, 328.
- Nadel, L. et Willner, J. (1989). Some implications of postnatal maturation of the hippocampus. *Neurology and neurobiology*, 52, 17-31.
- Nalavadi, V. C., Muddashetty, R. S., Gross, C. et Bassell, G. J. (2012). Dephosphorylation-induced ubiquitination and degradation of FMRP in dendrites: a role in immediate early mGluR-stimulated translation. *J Neurosci*, 32(8), 2582-2587.
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L. et Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol*, 64, 313-353.
- Northcutt, R. G. (2012). Evolution of centralized nervous systems: two schools of evolutionary thought. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 Suppl 1, 10626-10633.
- Oh, W. C., Hill, T. C. et Zito, K. (2013). Synapse-specific and size-dependent mechanisms of spine structural plasticity accompanying synaptic weakening. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(4), E305-312.
- Olde Loohuis, N. F., Kos, A., Martens, G. J., Van Bokhoven, H., Nadif Kasri, N. et Aschrafi, A. (2012). MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell Mol Life Sci*, 69(1), 89-102.
- Olsen, P. H. et Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*, 216(2), 671-680.
- Osten, P., Wisden, W. et Sprengel, R. (2009). Molecular Mechanisms of Synaptic Function in the Hippocampus: Neurotransmitter Exocytosis and Glutamatergic, GABAergic, and Cholinergic Transmission. Dans P. M. Andersen, R.; Amaral, D.; Bliss, T.; & O'Keefe, J. (dir.), *The Hippocampus Book*: Oxford University Press.

- Pai, B., Siripornmongkolchai, T., Berentsen, B., Pakzad, A., Vieuille, C., Pallesen, S., Pajak, M., Simpson, T. I., Armstrong, J. D., Wibrand, K. et Bramham, C. R. (2014). NMDA receptor-dependent regulation of miRNA expression and association with Argonaute during LTP in vivo. *Front Cell Neurosci*, 7, 285.
- Palay, S. L. (1956). Synapses in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol*, 2(4 Suppl), 193-202.
- Palay, S. L. et Palade, G. E. (1955). The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol*, 1(1), 69-88.
- Papa, M., Bundman, M. C., Greenberger, V. et Segal, M. (1995). Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J Neurosci*, 15(1 Pt 1), 1-11.
- Pare, J. M., Tahbaz, N., Lopez-Orozco, J., LaPointe, P., Lasko, P. et Hobman, T. C. (2009). Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies. *Mol Biol Cell*, 20(14), 3273-3284.
- Parrish, J. Z., Emoto, K., Kim, M. D. et Jan, Y. N. (2007). Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. *Annu Rev Neurosci*, 30, 399-423.
- Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*, 13(4), 271-282.
- Pasquinelli, A. E. (2015). MicroRNAs: heralds of the noncoding RNA revolution. *RNA*, 21(4), 709-710.
- Patranabis, S. et Bhattacharyya, S. N. (2016). Phosphorylation of Ago2 and subsequent inactivation of let-7a RNP-specific microRNAs control differentiation of mammalian sympathetic neurons. *Mol Cell Biol*, 36(8), 1260-1271.

- Petri, R., Malmevik, J., Fasching, L., Akerblom, M. et Jakobsson, J. (2014). miRNAs in brain development. *Exp Cell Res*, 321(1), 84-89.
- Pichardo-Casas, I., Goff, L. A., Swerdel, M. R., Athie, A., Davila, J., Ramos-Brossier, M., Lapid-Volosin, M., Friedman, W. J., Hart, R. P. et Vaca, L. (2012). Expression profiling of synaptic microRNAs from the adult rat brain identifies regional differences and seizure-induced dynamic modulation. *Brain Res*, 1436, 20-33.
- Pogue, A. I., Hill, J. M. et Lukiw, W. J. (2014). MicroRNA (miRNA): sequence and stability, viroid-like properties, and disease association in the CNS. *Brain Res*, 1584, 73-79.
- Potenza, N., Papa, U. et Russo, A. (2009). Differential expression of Dicer and Argonaute genes during the differentiation of human neuroblastoma cells. *Cell Biol Int*, 33(7), 734-738.
- Puram, S. V. et Bonni, A. (2013). Cell-intrinsic drivers of dendrite morphogenesis. *Development*, 140(23), 4657-4671.
- Purves, D. (2005). *Neurosciences*. (3^e éd.). Bruxelles : De Boeck Université.
- Qi, H. H., Ongusaha, P. P., Myllyharju, J., Cheng, D., Pakkanen, O., Shi, Y., Lee, S. W., Peng, J. et Shi, Y. (2008). Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature*, 455(7211), 421-424.
- Qian, X., Goderie, S. K., Shen, Q., Stern, J. H. et Temple, S. (1998). Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells. *Development*, 125(16), 3143-3152.
- Qureshi, I. A. et Mehler, M. F. (2012). Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, 13(8), 528-541.
- Rakic, P. et Nowakowski, R. S. (1981). The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. *J Comp Neurol*, 196(1), 99-128.
- Ramon, Y. C. S. (1952). Structure and connections of neurons. *Bull Los Angel Neuro Soc*, 17(1-2), 5-46.

- Rao, A. et Craig, A. M. (1997). Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron*, 19(4), 801-812.
- Rao, A. et Steward, O. (1991). Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specializations are locally synthesized: analysis of proteins synthesized within synaptosomes. *J Neurosci*, 11(9), 2881-2895.
- Ratti, A. et Buratti, E. (2016). Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J Neurochem*, 138 Suppl 1, 95-111.
- Reid, D. W. et Nichhitta, C. V. (2015). Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(4), 221-231.
- Richter, Joel D. (2010). Translational control of synaptic plasticity. *Biochemical Society Transactions*, 38(6), 1527-1530.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. et Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 14(10A), 1902-1910.
- Rogerson, T., Cai, D. J., Frank, A., Sano, Y., Shobe, J., Lopez-Aranda, M. F. et Silva, A. J. (2014). Synaptic tagging during memory allocation. *Nat Rev Neurosci*, 15(3), 157-169.
- Rook, M. S., Lu, M. et Kosik, K. S. (2000). CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J Neurosci*, 20(17), 6385-6393.
- Rosenberg, T., Gal-Ben-Ari, S., Dieterich, D. C., Kreutz, M. R., Ziv, N. E., Gundelfinger, E. D. et Rosenblum, K. (2014). The roles of protein expression in synaptic plasticity and memory consolidation. *Front Mol Neurosci*, 7, 86.
- Rother, S. et Meister, G. (2011). Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie*, 93(11), 1905-1915.

- Rudel, S., Wang, Y., Lenobel, R., Korner, R., Hsiao, H. H., Urlaub, H., Patel, D. et Meister, G. (2011). Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding. *Nucleic Acids Res*, 39(6), 2330-2343.
- Rusakov, D. A. et Kullmann, D. M. (1998). Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J Neurosci*, 18(9), 3158-3170.
- Ryan, B., Joilin, G. et Williams, J. M. (2015). Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Front Mol Neurosci*, 8, 4.
- Rybak, A., Fuchs, H., Hadian, K., Smirnova, L., Wulczyn, E. A., Michel, G., Nitsch, R., Krappmann, D. et Wulczyn, F. G. (2009). The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat Cell Biol*, 11(12), 1411-1420.
- Sahin, U., Lapaquette, P., Andrieux, A., Faure, G. et Dejean, A. (2014). Sumoylation of human argonaute 2 at lysine-402 regulates its stability. *PLoS One*, 9(7), e102957.
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potalicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M. et Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell*, 20(1), 131-139.
- Sakarya, O., Armstrong, K. A., Adamska, M., Adamski, M., Wang, I. F., Tidor, B., Degnan, B. M., Oakley, T. H. et Kosik, K. S. (2007). A post-synaptic scaffold at the origin of the animal kingdom. *PLoS One*, 2(6), e506.
- Sala, C. et Segal, M. (2014). Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev*, 94(1), 141-188.
- Sambandan, S., Akbalik, G., Kochen, L., Rinne, J., Kahlstatt, J., Glock, C., Tushev, G., Alvarez-Castelao, B., Heckel, A. et Schuman, E. M. (2017). Activity-dependent spatially localized miRNA maturation in neuronal dendrites. *Science*, 355(6325), 634-637.

- Sanes, R. J. et Jessell, M. T. (2012a). Experience and the Refinement of Synaptic Connections. Dans E. Kandel, J. Schwartz & T. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science*, (5^e éd., p. 1259-1282) : McGraw-Hill Professional.
- Sanes, R. J. et Jessell, M. T. (2012b). Formation and Elimination of Synapses. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 1233-1282): McGraw-Hill Professional.
- Sanes, R. J. et Jessell, M. T. (2012c). The Growth and Guidance of Axons. Dans E. R. Kandel, H. J. Schwartz & M. T. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 1209-1231) : McGraw-Hill Professional.
- Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S. et Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics*, 82(3), 323-330.
- Scheetz, A. J., Nairn, A. C. et Constantine-Paton, M. (2000). NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses. *Nat Neurosci*, 3(3), 211-216.
- Schleiden, M. J. (1838). *Beiträge zur Phytogenesis*. Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.
- Schoenen, J. (1982). Dendritic organization of the human spinal cord: the motoneurons. *J Comp Neurol*, 211(3), 226-247.
- Schratt, G. M., Nigh, E. A., Chen, W. G., Hu, L. et Greenberg, M. E. (2004). BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci*, 24(33), 7366-7377.
- Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M. et Greenberg, M. E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*, 439(7074), 283-289.

- Schwanhausser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. et Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347), 337-342.
- Schwann, T. (1839). Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen. *Berlin, Germany: Verlag der Sander'schen Buchhandlung*.
- Schwartz, H. J., Barres, A. B. et Goldman, E. J. (2012a). The Cells of the Nervous System. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 71-98): McGraw-Hill Professional.
- Schwartz, H. J. et Javitch, A. J. (2012). Neurotransmitters. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 289 - 305): McGraw-Hill Professional.
- Schwartz, J. H., Barres, B. A. et Goldman, J. E. (2012b). The Cells of the Nervous System. Dans E. Kandel, J. Schwartz & T. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 71-99) : McGraw-Hill Professional.
- Shankar, S., Pitchiaya, S., Malik, R., Kothari, V., Hosono, Y., Yocum, A. K., Gundlapalli, H., White, Y., Firestone, A. et Cao, X. (2016). KRAS engages AGO2 to enhance cellular transformation. *Cell Rep*, 14, 1448–1461.
- Shen, J., Xia, W., Khotskaya, Y. B., Huo, L., Nakanishi, K., Lim, S. O., Du, Y., Wang, Y., Chang, W. C., Chen, C. H., Hsu, J. L., Wu, Y., Lam, Y. C., James, B. P., Liu, X., Liu, C. G., Patel, D. J. et Hung, M. C. (2013). EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature*, 497(7449), 383-387.
- Shenoy, A. et Blelloch, R. H. (2014). Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(9), 565-576.
- Sherrington, C. (1910). *The integrative action of the nervous system*. CUP Archive.

- Sherrington, C. S. (1894). On the anatomical constitution of nerves of skeletal muscles; with remarks on recurrent fibres in the ventral spinal nerve-root. *J Physiol*, 17(3-4), 210-258.
- Sherrington, C. S. (1897). On the question whether any fibres of the mammalian dorsal (afferent) spinal root are of intraspinal origin. *J Physiol*, 21(2-3), 209-212.
- Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 87(4), 387-406.
- Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P. F., Busch, C. J., Kane, C., Hubel, K., Dekker, F., Hedberg, C., Rengarajan, B., Drepper, C., Waldmann, H., Kauppinen, S., Greenberg, M. E., Draguhn, A., Rehmsmeier, M., Martinez, J. et Schratt, G. M. (2009). A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the dephosphorylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat Cell Biol*, 11(6), 705-716.
- Siegel, G., Saba, R. et Schratt, G. (2011). microRNAs in neurons: manifold regulatory roles at the synapse. *Curr Opin Genet Dev*, 21(4), 491-497.
- Siegelbaum, A. S. K., E. R.; & Südhof C. T. (2012). Transmitter Release. Dans E. Kandel, J. Schwartz & T. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 260-287): McGraw-Hill Professional.
- Siegelbaum, S. A., Clapham, D. E. et Schwartz, H. J. (2012). Modulation of Synaptic Transmission: Second Messengers. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 236-259): McGraw-Hill Professional.
- Siegelbaum, S. A. et Kandel, E. R. (2012a). Overview of Synaptic Transmission. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 177-188): McGraw-Hill Professional.

- Siegelbaum, S. A. et Kandel, E. R. (2012b). Prefrontal Cortex, Hippocampus, and the Biology of Explicit Memory Storage. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 1487-1520) : McGraw-Hill Professional.
- Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R. et Südhof, C. T. (2012). Transmitter Release. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 260-287): McGraw-Hill Professional.
- Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R. et Yuste, R. (2012). Synaptic Integration in the Central Nervous System. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 210-259): McGraw-Hill Professional.
- Siegelbaum, S. A. et Koester, J. (2012). Ion Channels. Dans E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (dir.), *Principles of Neural Science* (5^e éd., p. 100-124) : McGraw-Hill Professional.
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., Tsirka, S. E. et Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7(4), 483-495.
- Sik, A., Hajos, N., Gulacsi, A., Mody, I. et Freund, T. F. (1998). The absence of a major Ca²⁺ signaling pathway in GABAergic neurons of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 3245-3250.
- Siman, R., Noszek, J. C. et Kegerise, C. (1989). Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J Neurosci*, 9(5), 1579-1590.
- Simons, M. et Raposo, G. (2009). Exosomes–vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*, 21(4), 575-581.
- Skutella, T. et Nitsch, R. (2001). New molecules for hippocampal development. *Trends Neurosci*, 24(2), 107-113.

- Smalheiser, N. R. (2014). The RNA-centred view of the synapse: non-coding RNAs and synaptic plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1652).
- Smalheiser, N. R., Lugli, G., Thimmapuram, J., Cook, E. H. et Larson, J. (2011). Endogenous siRNAs and noncoding RNA-derived small RNAs are expressed in adult mouse hippocampus and are up-regulated in olfactory discrimination training. *RNA*, 17(1), 166-181.
- Smibert, P., Yang, J. S., Azzam, G., Liu, J. L. et Lai, E. C. (2013). Homeostatic control of Argonaute stability by microRNA availability. *Nat Struct Mol Biol*, 20(7), 789-795.
- Soderling, T. R. et Derkach, V. A. (2000). Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci*, 23(2), 75-80.
- Sonenberg, N. et Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731-745.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J. et Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689), 1434-1437.
- Sosanya, N. M., Huang, P. P., Cacheaux, L. P., Chen, C. J., Nguyen, K., Perrone-Bizzozero, N. I. et Raab-Graham, K. F. (2013). Degradation of high affinity HuD targets releases Kv1.1 mRNA from miR-129 repression by mTORC1. *J Cell Biol*, 202(1), 53-69.
- Spruston, N. et McBain, C. (2009). Structural and Functional Properties of Hippocampal Neurons. Dans P. M. Andersen, R.; Amaral, D.; Bliss, T.; & O'Keefe, J. (dir.), *The Hippocampus Book*: Oxford University Press.
- Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R. B. et Cohen, S. M. (2005). Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell*, 123(6), 1133-1146.
- Stein, I. S., Gray, J. A. et Zito, K. (2015). Non-ionotropic NMDA receptor signaling drives activity-induced dendritic spine shrinkage. *J Neurosci*, 35(35), 12303-12308.

- Steward, O., Falk, P. M. et Torre, E. R. (1996). Ultrastructural basis for gene expression at the synapse: synapse-associated polyribosome complexes. *J Neurocytol*, 25(12), 717-734.
- Steward, O. et Levy, W. B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci*, 2(3), 284-291.
- Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L. et Worley, P. F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*, 21(4), 741-751.
- Storchel, P. H., Thummler, J., Siegel, G., Aksoy-Aksel, A., Zampa, F., Sumer, S. et Schrott, G. (2015). A large-scale functional screen identifies Noval1 and Ncoa3 as regulators of neuronal miRNA function. *EMBO J*, 34(17), 2237-2254.
- Sur, M. et Rubenstein, J. L. (2005). Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science*, 310(5749), 805-810.
- Swanger, S. A. et Bassell, G. J. (2011). Making and breaking synapses through local mRNA regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 21(4), 414-421.
- Swarts, D. C., Makarova, K., Wang, Y., Nakanishi, K., Ketting, R. F., Koonin, E. V., Patel, D. J. et van der Oost, J. (2014). The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 21(9), 743-753.
- Taft, C. E. et Turrigiano, G. G. (2014). PSD-95 promotes the stabilization of young synaptic contacts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1633), 20130134.
- Takeuchi, T., Duzkiewicz, A. J. et Morris, R. G. (2014). The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1633), 20130288.
- Takumi, Y., Ramirez-Leon, V., Laake, P., Rinvik, E. et Ottersen, O. P. (1999). Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci*, 2(7), 618-624.

- Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G. C. et Kasai, H. (2008). Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science*, 319(5870), 1683-1687.
- Tawa, N. E., Jr., Odessey, R. et Goldberg, A. L. (1997). Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest*, 100(1), 197-203.
- Thalhammer, A. et Cingolani, L. A. (2014). Cell adhesion and homeostatic synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 78, 23-30.
- Thomas, G. M. et Huganir, R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 5(3), 173-183.
- Tiedge, H. et Brosius, J. (1996). Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 16(22), 7171-7181.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M. et Persson, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*, 10(3), 475-489.
- Tiruchinapalli, D. M., Oleynikov, Y., Kelic, S., Shenoy, S. M., Hartley, A., Stanton, P. K., Singer, R. H. et Bassell, G. J. (2003). Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J Neurosci*, 23(8), 3251-3261.
- Tolias, K. F., Bikoff, J. B., Burette, A., Paradis, S., Harrar, D., Tavazoie, S., Weinberg, R. J. et Greenberg, M. E. (2005). The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron*, 45(4), 525-538.
- Tongiorgi, E., Armellin, M., Giulianini, P. G., Bregola, G., Zucchini, S., Paradiso, B., Steward, O., Cattaneo, A. et Simonato, M. (2004). Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. *J Neurosci*, 24(30), 6842-6852.

- Tongiorgi, E., Righi, M. et Cattaneo, A. (1997). Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 17(24), 9492-9505.
- Torre, E. R. et Steward, O. (1992). Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. *J Neurosci*, 12(3), 762-772.
- Valdmanis, P. N., Gu, S., Schuermann, N., Sethupathy, P., Grimm, D. et Kay, M. A. (2012). Expression determinants of mammalian argonaute proteins in mediating gene silencing. *Nucleic Acids Res*, 40(8), 3704-3713.
- Valnegri, P., Puram, S. V. et Bonni, A. (2015). Regulation of dendrite morphogenesis by extrinsic cues. *Trends Neurosci*, 38(7), 439-447.
- van Gestel, M. A., van Erp, S., Sanders, L. E., Brans, M. A., Luijendijk, M. C., Merkestein, M., Pasterkamp, R. J. et Adan, R. A. (2014). shRNA-induced saturation of the microRNA pathway in the rat brain. *Gene Ther*, 21(2), 205-211.
- van Spronsen, M., van Battum, E. Y., Kuijpers, M., Vangoor, V. R., Rietman, M. L., Pothof, J., Gumy, L. F., van Ijcken, W. F., Akhmanova, A., Pasterkamp, R. J. et Hoogenraad, C. C. (2013). Developmental and activity-dependent miRNA expression profiling in primary hippocampal neuron cultures. *PLoS One*, 8(10), e74907.
- Vasudevan, S. et Steitz, J. A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, 128(6), 1105-1118.
- Vidigal, J. A. et Ventura, A. (2015). The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol*, 25(3), 137-147.
- Vitureira, N. et Goda, Y. (2013). Cell biology in neuroscience: the interplay between Hebbian and homeostatic synaptic plasticity. *J Cell Biol*, 203(2), 175-186.

- Vo, N., Klein, M. E., Varlamova, O., Keller, D. M., Yamamoto, T., Goodman, R. H. et Impey, S. (2005). A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(45), 16426-16431.
- Vogel-Ciernia, A., Matheos, D. P., Barrett, R. M., Kramar, E. A., Azzawi, S., Chen, Y., Magnan, C. N., Zeller, M., Sylvain, A., Haettig, J., Jia, Y., Tran, A., Dang, R., Post, R. J., Chabrier, M., Babayan, A. H., Wu, J. I., Crabtree, G. R., Baldi, P., Baram, T. Z., Lynch, G. et Wood, M. A. (2013). The neuron-specific chromatin regulatory subunit BAF53b is necessary for synaptic plasticity and memory. *Nat Neurosci*, *16*(5), 552-561.
- Vogel-Ciernia, A. et Wood, M. A. (2014). Neuron-specific chromatin remodeling: a missing link in epigenetic mechanisms underlying synaptic plasticity, memory, and intellectual disability disorders. *Neuropharmacology*, *80*, 18-27.
- Wallace, C. S., Lyford, G. L., Worley, P. F. et Steward, O. (1998). Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *J Neurosci*, *18*(1), 26-35.
- Wang, D., Zhang, Z., O'Loughlin, E., Lee, T., Houel, S., O'Carroll, D., Tarakhovsky, A., Ahn, N. G. et Yi, R. (2012). Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development. *Genes Dev*, *26*(7), 693-704.
- Wang, S. S., Denk, W. et Haussler, M. (2000). Coincidence detection in single dendritic spines mediated by calcium release. *Nat Neurosci*, *3*(12), 1266-1273.
- Wayman, G. A., Davare, M., Ando, H., Fortin, D., Varlamova, O., Cheng, H. Y., Marks, D., Obrietan, K., Soderling, T. R., Goodman, R. H. et Impey, S. (2008). An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(26), 9093-9098.
- Weiss, K., Antoniou, A. et Schratt, G. (2015). Non-coding mechanisms of local mRNA translation in neuronal dendrites. *Eur J Cell Biol*, *94*(7-9), 363-367.

- West, A. E. et Greenberg, M. E. (2011). Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(6).
- Westholm, J. O. et Lai, E. C. (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, 93(11), 1897-1904.
- Wibbrand, K., Pai, B., Siripornmongkolchai, T., Bittins, M., Berentsen, B., Ofte, M. L., Weigel, A., Skaftnesmo, K. O. et Bramham, C. R. (2012). MicroRNA regulation of the synaptic plasticity-related gene Arc. *PLoS One*, 7(7), e41688.
- Wibbrand, K., Panja, D., Tiron, A., Ofte, M. L., Skaftnesmo, K. O., Lee, C. S., Pena, J. T., Tuschl, T. et Bramham, C. R. (2010). Differential regulation of mature and precursor microRNA expression by NMDA and metabotropic glutamate receptor activation during LTP in the adult dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci*, 31(4), 636-645.
- Wilczynska, A. et Bushell, M. (2015). The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ*, 22(1), 22-33.
- Winder, D. G. et Sweatt, J. D. (2001). Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 2(7), 461-474.
- Winter, J. et Diederichs, S. (2011). Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA Biol*, 8(6), 1149-1157.
- Woolfrey, K. M. et Dell'Acqua, M. L. (2015). Coordination of protein phosphorylation and Dpephosphorylation in synaptic plasticity. *J Biol Chem*, 290(48), 28604-28612.
- Wu, C., So, J., Davis-Dusenbery, B. N., Qi, H. H., Bloch, D. B., Shi, Y., Lagna, G. et Hata, A. (2011). Hypoxia potentiates microRNA-mediated gene silencing through posttranslational modification of Argonaute2. *Mol Cell Biol*, 31(23), 4760-4774.

- Wu, J. I., Lessard, J., Olave, I. A., Qiu, Z., Ghosh, A., Graef, I. A. et Crabtree, G. R. (2007). Regulation of dendritic development by neuron-specific chromatin remodeling complexes. *Neuron*, 56(1), 94-108.
- Wu, Y. K., Fujishima, K. et Kengaku, M. (2015). Differentiation of apical and basal dendrites in pyramidal cells and granule cells in dissociated hippocampal cultures. *PLoS One*, 10(2), e0118482.
- Xin, H., Li, Y., Liu, Z., Wang, X., Shang, X., Cui, Y., Zhang, Z. G. et Chopp, M. (2013). MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. *Stem cells*, 31(12), 2737-2746.
- Yang, H., Zhang, L., An, J., Zhang, Q., Liu, C., He, B. et Hao, D.-J. (2016). MicroRNA-mediated reprogramming of somatic cells into neural stem cells or neurons. *Mol Neurobiology*, 1-14.
- Yang, J. S. et Lai, E. C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell*, 43(6), 892-903.
- Yang, J. S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R., Papapetrou, E. P., Sadelain, M., O'Carroll, D. et Lai, E. C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(34), 15163-15168.
- Yang, M., Haase, A. D., Huang, F. K., Coulis, G., Rivera, K. D., Dickinson, B. C., Chang, C. J., Pappin, D. J., Neubert, T. A., Hannon, G. J., Boivin, B. et Tonks, N. K. (2014). Dephosphorylation of tyrosine 393 in argonaute 2 by protein tyrosine phosphatase 1B regulates gene silencing in oncogenic RAS-induced senescence. *Mol Cell*, 55(5), 782-790.
- Ye, Y., Xu, H., Su, X. et He, X. (2016). Role of microRNA in governing synaptic plasticity. *Neural Plast*, 2016, 4959523.

- Yin, Y., Edelman, G. M. et Vanderklish, P. W. (2002). The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneuroosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4), 2368-2373.
- Yoon, Y. J., Wu, B., Buxbaum, A. R., Das, S., Tsai, A., English, B. P., Grimm, J. B., Lavis, L. D. et Singer, R. H. (2016). Glutamate-induced RNA localization and translation in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(44), E6877-E6886.
- Yoshii, A. et Constantine-Paton, M. (2010). Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*, 70(5), 304-322.
- Zeitelhofer, M., Karra, D., Macchi, P., Tolino, M., Thomas, S., Schwarz, M., Kiebler, M. et Dahm, R. (2008). Dynamic interaction between P-bodies and transport ribonucleoprotein particles in dendrites of mature hippocampal neurons. *J Neurosci*, 28(30), 7555-7562.
- Zeitelhofer, M., Macchi, P. et Dahm, R. (2008). Perplexing bodies: The putative roles of P-bodies in neurons. *RNA Biol*, 5(4), 244-248.
- Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X. et Graves, P. R. (2008). Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem J*, 413(3), 429-436.
- Zhou, Q., Homma, K. J. et Poo, M. M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44(5), 749-757.
- Zieg, J., Greer, P. L. et Greenberg, M. E. (2008). SnapShot: Ca(2+)-dependent transcription in neurons. *Cell*, 134(6), 1080-1080 e1082.
- Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T. et Svoboda, K. (2009). Rapid functional maturation of nascent dendritic spines. *Neuron*, 61(2), 247-258.
- Ziv, N. E. et Smith, S. J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, 17(1), 91-102.