

Université de Montréal

**Rôles des protéines Staufén 1 et 2 dans la plasticité synaptique des cellules
pyramidales hippocampiques**

par
Geneviève Lebeau

Département de physiologie
Faculté de médecine

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

Janvier, 2011

© Geneviève Lebeau, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Rôles des protéines Staufen 1 et 2 dans la plasticité synaptique des cellules
pyramidales hippocampiques**

présentée par :
Geneviève Lebeau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

M. Louis-Éric Trudeau,
président-rapporteur

M. Jean-Claude Lacaille,
directeur de recherche

M. Wayne Sossin,
co-directeur de recherche

M. Jannic Boehm,
membre du jury

Mme. Anne McKinney,
examineur externe

M. Vincent Castellucci,
représentant du doyen de la FESP

RÉSUMÉ

La mémoire et l'apprentissage sont des phénomènes complexes qui demeurent encore incertains quant aux origines cellulaire et moléculaire. Il est maintenant connu que des changements au niveau des synapses, comme la plasticité synaptique, pourraient déterminer la base cellulaire de la formation de la mémoire. Alors que la potentialisation à long-terme (LTP) représente un renforcement de l'efficacité de transmission synaptique, la dépression à long-terme (LTD) constitue une diminution de l'efficacité des connexions synaptiques.

Des études ont mis à jour certains mécanismes qui participent à ce phénomène de plasticité synaptique, notamment, les mécanismes d'induction et d'expression, ainsi que les changements morphologiques des épines dendritiques. La grande majorité des synapses excitatrices glutamatergiques se situe au niveau des épines dendritiques et la présence de la machinerie traductionnelle près de ces protubérances suggère fortement l'existence d'une traduction locale d'ARNm. Ces ARNm seraient d'ailleurs acheminés dans les dendrites par des protéines pouvant lier les ARNm et assurer leur transport jusqu'aux synapses activées. Le rôle des protéines Staufen (Stau1 et Stau2) dans le transport, la localisation et dans la régulation de la traduction de certains ARNm est bien établi. Toutefois, leur rôle précis dans la plasticité synaptique demeure encore inconnu.

Ainsi, cette thèse de doctorat évalue l'importance des protéines Staufen pour le transport et la régulation d'ARNm dans la plasticité synaptique. Nous avons identifié des fonctions spécifiques à chaque isoforme; Stau1 et Stau2 étant respectivement impliquées dans la *late*-LTP et la LTD dépendante des récepteurs mGluR. Cette spécificité s'applique également au rôle que chaque isoforme joue dans la morphogenèse des épines dendritiques, puisque Stau1 semble nécessaire au maintien des épines dendritiques matures, alors que Stau2 serait davantage impliquée dans le développement des épines. D'autre part, nos travaux ont permis de déterminer que la morphogenèse des épines dendritiques dépendante de Stau1 était régulée par une plasticité synaptique endogène dépendante des récepteurs NMDA. Finalement, nous avons précisé les mécanismes de

régulation de l'ARNm de la Map1b par Stau2 et démontré l'importance de Stau2 pour la production et l'assemblage des granules contenant les transcrits de la Map1b nécessaires pour la LTD dépendante des mGluR.

Les travaux de cette thèse démontrent les rôles spécifiques des protéines Stau1 et Stau2 dans la régulation de la plasticité synaptique par les protéines Stau1 et Stau2. Nos travaux ont permis d'approfondir les connaissances actuelles sur les mécanismes de régulation des ARNm par les protéines Staufen dans la plasticité synaptique.

MOTS-CLÉS EN FRANÇAIS: Staufen, hippocampe, plasticité synaptique, granules d'ARN, traduction, épines dendritiques.

ABSTRACT

Learning and memory are complex processes that are not completely understood at the cellular and molecular levels. It is however accepted that persistent modifications of synaptic connections, like synaptic plasticity, could be responsible for the encoding of new memories. Whereas long-term potentiation (LTP) is classically defined as a persistent and stable enhancement of synaptic connections, long-term depression (LTD) is a reduction in the efficacy of neuronal synapses.

Numerous studies have identified some of the mechanisms of this phenomenon, in particular, the induction and expression mechanisms, as well as the changes in dendritic spine morphology. The most abundant type of synapse in the hippocampus is the excitatory glutamatergic synapse made on dendritic spines; the presence of the translational machinery in dendrites near spines strongly supports the concept of local mRNA translation. Moreover, those mRNA are transported in dendrites to activated synapses by RNA binding-proteins (RBP). Stau proteins (Stau1 and Stau2) function in transport, localization and translational regulation of mRNA are now established. However, their precise roles in synaptic plasticity are still unknown.

Thus, this Ph.D. thesis evaluates the importance of Stau proteins in mRNA transport and regulation in synaptic plasticity. We have identified specific functions for each isoform; while Stau1 is implicated in late-LTP, Stau2 is required for mGluR-LTD. This specificity is also relevant for dendritic spine morphogenesis since Stau1 is involved in mature dendritic spine maintenance while Stau2 participates in dendritic spine morphogenesis at a developmental stage. Moreover, our studies have indicated that Stau1 involvement in spine morphogenesis is dependent on ongoing NMDA receptor-mediated plasticity. Finally, our results suggest that Stau2 is implicated in a particular form of synaptic plasticity through transport and regulation of specific mRNA granules required for mGluR-LTD such as Map1b.

Our work uncovers specific roles of Stau1 and Stau2 in regulation of synaptic plasticity. These studies help to better understand mechanisms involving mRNA regulation by Staufen in long-term synaptic plasticity and memory.

ENGLISH KEY WORDS: Staufen, hippocampus, synaptic plasticity, RNA granules, translation, dendritic spines

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier les membres de mon jury de thèse, Messieurs Louis-Éric Trudeau, Jannic Boehm et Vincent Castellucci, de l'Université de Montréal ainsi que Mme Anne McKinney, de l'Université McGill pour avoir accepté de lire et d'examiner cette thèse.

Je tiens à remercier spécialement Messieurs Jean-Claude Lacaille, de l'Université de Montréal, et Wayne Sossin, de l'Université McGill, mes directeurs de recherche, premièrement, pour m'avoir donné l'opportunité d'entreprendre mes études graduées en Sciences Neurologiques, puis, pour la qualité du support et de la formation que j'ai pu recevoir tout au long de mon doctorat. Merci à M. Luc DesGroseillers, qui m'a fait découvrir l'univers de Staufen et qui a toujours eu de bons conseils. Merci aussi à M. Vincent Castellucci et Mme Adriana DiPolo pour leur contribution à mon comité de parrainage ainsi que le département de Physiologie et le Groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC) pour m'avoir accueilli et supporté tout au long de mes études.

Un merci particulier à Delphine Gobert, mon mentor, qui m'a initiée à la recherche, pour son aide considérable et ses conseils judicieux. Merci aussi à Julie Pepin, Catherine Bourgeois, Frédérique Badeaux et Vicky Arsenault pour leur support technique et à Isabel Laplante, Charles Laurent, Lisa Topolnik, Maylis Tartas, Marjolaine Maher-Laporte, Linda Miller et Robyn McAdam avec qui j'ai collaboré.

Je désire également remercier tous les collègues du laboratoire Lacaille que j'ai eu le plaisir de côtoyer au cours de ces années, en particulier Aude Panatier et Delphine Gobert, qui sont devenues de précieuses amies.

Un grand merci à ma famille et à mes amis pour leurs encouragements et leur support inconditionnel. Finalement, merci à Mathieu, avec qui j'ai partagé les joies et les déceptions du monde de la recherche scientifique, pour m'avoir épaulée durant toutes ces années.

TABLE DES MATIÈRES

<i>RÉSUMÉ</i>	<i>iii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>v</i>
<i>REMERCIEMENTS</i>	<i>vii</i>
<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	<i>viii</i>
<i>LISTE DES FIGURES</i>	<i>xiii</i>
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	<i>xv</i>
<i>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</i>	<i>xvi</i>
<i>AVANT-PROPOS</i>	<i>1</i>
<i>CHAPITRE 1. INTRODUCTION</i>	<i>2</i>
1.1 L'APPRENTISSAGE ET LA MÉMOIRE	2
1.1.1 LA LOCALISATION DE LA MÉMOIRE	2
1.1.2 CLASSIFICATION DE LA MÉMOIRE	4
1.1.2.1 La mémoire explicite	5
1.1.2.2 La mémoire implicite	5
1.1.3 L'IMPORTANCE DE L'HIPPOCAMPE	6
1.2 L'HIPPOCAMPE: ARCHITECTURE ET ORGANISATION FONCTIONNELLE	8
1.2.1 STRUCTURE ANATOMIQUE DE L'HIPPOCAMPE	8
1.2.2 ORGANISATION CELLULAIRE DE L'HIPPOCAMPE	8
1.2.2.1 Le gyrus dentelé	8
1.2.2.2 La corne d'Ammon	10
1.2.2.3 La boucle trisynaptique	11
1.2.2.4 L'importance particulière de chaque région hippocampique	13
1.3 LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À LONG-TERME	15
1.3.1 LA SYNAPSE	15
1.3.1.1 La synapse excitatrice et les récepteurs glutamatergiques	17
1.3.2 LA POTENTIALISATION À LONG-TERME	20
1.3.2.1 La phase précoce de la potentialisation à long-terme	22
1.3.2.1.1 L'expression de la E-LTP: l'augmentation de la libération de neurotransmetteurs	23
1.3.2.1.2 L'expression de la E-LTP: la phosphorylation et l'insertion des récepteurs AMPA	24
1.3.2.2 La phase tardive de la potentialisation à long-terme	26
1.3.2.2.1 L'induction de la L-LTP : la signalisation au noyau	27
1.3.2.2.2 L'activation de la transcription	27
1.3.2.2.3 La traduction de nouvelles protéines	27
1.3.2.2.4 L'expression de la L-LTP	27

1.3.3	LA DÉPRESSION À LONG-TERME	30
1.3.3.1	La dépression dépendante des récepteurs NMDA	31
1.3.3.2	La dépression dépendante des récepteurs mGluR	32
1.3.4	LE RENFORCEMENT SPÉCIFIQUE DES SYNAPSES	35
1.4	LA MORPHOLOGIE DES ÉPINES DENDRITIQUES	37
1.4.1	LA STRUCTURE DES ÉPINES DENDRITIQUES	37
1.4.1.1	Classification	37
1.4.1.2	La composition des épines dendritiques	38
1.4.2	LES FONCTIONS DES ÉPINES DENDRITIQUES	41
1.4.2.1	Site des synapses excitatrices glutamatergiques	41
1.4.2.2	Compartiment de diffusion	41
1.4.2.3	Spécificité synaptique	42
1.4.2.4	Plasticité	42
1.4.3	MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DES ÉPINES	46
1.4.4	PATHOLOGIES ASSOCIÉES	46
1.5	LA TRADUCTION LOCALE DES ARNm	47
1.5.1	SYNTHÈSE LOCALE DE PROTÉINES	47
1.5.2	RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE LOCALE DE PROTÉINES	48
1.5.2.1	Polyadénylation de l'ARNm	49
1.5.2.2	La phase d'initiation de la traduction	49
1.5.2.3	La phase d'élongation de la traduction	49
1.5.2.4	L'activité synaptique et la synthèse locale de protéines	50
1.5.3	SYNTHÈSE LOCALE DE PROTÉINES ET PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À LONG-TERME	51
1.6	LE TRANSPORT D'ARNm	52
1.6.1	L'ORIGINE NUCLÉAIRE DU TRANSPORT D'ARNM	53
1.6.1.1	Régulation du ciblage dendritique des ARNm	53
1.6.2	DIVERSITÉ DES COMPLEXES DE TRANSPORT D'ARNm DANS LES NEURONES	54
1.6.3	LOCALISATION DENDRITIQUE DES ARNm	57
1.6.3.1	Les ARNm localisés aux dendrites	57
1.6.4	PROTÉINES LIANT L'ARNm	59
1.6.4.1	FMRP	60
1.6.4.2	ZBP	61
1.6.4.3	CPEB	61
1.6.4.4	Staufen	62
1.7	LA PROTÉINE STAUFEN	62
1.7.1	LES PROTÉINES STAUFEN 1 ET STAUFEN 2	62
1.7.1.1	Organisation structure-fonction	63
1.7.1.2	Distribution intracellulaire	65
1.7.2	LES PARTENAIRES PROTÉIQUES	66
1.7.3	LES RÔLES	67
1.7.4	LES ARNm ASSOCIÉS	70
CHAPITRE II. BUT DE LA THÈSE		72
2.1	PROBLÉMATIQUE	72
2.2	OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	72
CHAPITRE III. PREMIÈRE SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX		74
3.1	PRÉAMBULE	74
3.2	ABSTRACT	74

3.3	INTRODUCTION	75
3.4	MATERIALS AND METHODS	76
3.4.1	ORGANOTYPIC HIPPOCAMPAL SLICE CULTURES	76
3.4.2	HEK293 CELLS	77
3.4.3	SIRNAS AND TRANSFECTIONS	77
3.4.4	ELECTROPHYSIOLOGY	78
3.4.5	IMMUNOCYTOCHEMISTRY	79
3.4.6	WESTERN BLOTTING	80
3.4.7	IMAGING AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS	80
3.4.8	STATISTICAL ANALYSIS	80
3.5	RESULTS	81
3.5.1	DOWN-REGULATION OF STAU1 BY siRNA TRANSFECTION	81
3.5.2	STAU1 DOWN-REGULATION IMPAIRS SPECIFICALLY LATE LTP	83
3.5.3	STAU1 DOWN-REGULATION REDUCES MINIATURE SYNAPTIC ACTIVITY	85
3.5.4	STAU1 DOWN-REGULATION INDUCES DENDRITIC SPINE MORPHOLOGY CHANGES	86
3.6	DISCUSSION	88
3.6.1	ROLE OF STAU1 IN LONG-TERM SYNAPTIC PLASTICITY	89
3.6.2	ROLE OF STAU1 IN SPINE MORPHOGENESIS AND SPONTANEOUS MINIATURE SYNAPTIC ACTIVITY	90
3.6.3	STAUFEN ISOFORMS AND FUNCTIONAL IMPLICATIONS	91
3.7	ACKNOWLEDGMENTS	93
3.8	REFERENCES	93
3.9	FIGURES AND LEGENDS	99

CHAPITRE IV. DEUXIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

111

4.1	PRÉAMBULE	111
4.2	ABSTRACT	111
4.3	INTRODUCTION	112
4.4	METHODS	113
4.4.1	ORGANOTYPIC HIPPOCAMPAL SLICE CULTURES	113
4.4.2	SIRNAS AND TRANSFECTIONS	114
4.4.3	ELECTROPHYSIOLOGY	114
4.4.4	IMAGING AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS	114
4.5	RESULTS	115
4.6	DISCUSSION	117
4.7	ACKNOWLEDGMENTS	120
4.8	REFERENCES	120
4.9	FIGURES AND LEGENDS	124

CHAPITRE V. TROISIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

127

5.1	PRÉAMBULE	127
5.2	ABSTRACT	127

5.3	INTRODUCTION	128
5.4	RESULTS	130
5.4.1	DOWN-REGULATION OF STAU2 BY siRNA TRANSFECTION	130
5.4.2	STAU2 KNOCKDOWN DOES NOT BLOCK L-LTP	131
5.4.3	mGLUR-LTD IS IMPAIRED BY STAU2 KNOCKDOWN	132
5.4.4	STAU2 DOWN-REGULATION ALTERS SPINE MORPHOLOGY IN YOUNG BUT NOT OLDER SLICE CULTURES	133
5.4.5	MINIATURE SYNAPTIC ACTIVITY IS NOT AFFECTED BY STAU2 KNOCKDOWN	134
5.4.6	STAU2 KNOCKDOWN REDUCES ENDOGENOUS MAP1B PROTEIN IN DENDRITES	135
5.4.7	STAU2 KNOCKDOWN REDUCES THE AMOUNT OF MAP1B mRNA IN DENDRITES	135
5.4.8	LUC-24xMS2BS-MAP1B 3'UTR mRNA IS FOUND IN BOTH RNA GRANULES AND RNA PARTICLES	137
5.4.9	STAU2 AND P0 DISSOCIATE FROM LUC-24xMS2BS-MAP1B 3'UTR mRNA UPON DHPG STIMULATION	137
5.5	DISCUSSION	139
5.5.1	SPECIFICITY OF RNA-TRANSPORT COMPLEXES	139
5.5.2	COMPARISON OF STAU2 AND FMRP KNOCKDOWN IN mGLUR-LTD	140
5.5.3	DENDRITIC SPINE DEFECTS ARE NOT CRITICAL FOR STAU2-DEPENDENT mGLUR-LTD	140
5.5.4	STAU2 REGULATES MAP1B mRNA DISTRIBUTION DURING mGLUR-LTD	141
5.5.5	STAU2 MAY REGULATE A SPECIFIC mRNA GRANULE	141
5.5.6	ONLY A SMALL PERCENTAGE OF THE MS2-LABELED PUNCTA APPEAR REGULATED	142
5.5.7	MODEL FOR STAU 2 FUNCTION	142
5.6	MATERIALS AND METHODS	143
5.6.1	ORGANOTYPIC HIPPOCAMPAL SLICE CULTURES	143
5.6.2	HEK293 CELLS	144
5.6.3	SIRNAS AND TRANSFECTIONS	144
5.6.4	ELECTROPHYSIOLOGY	145
5.6.5	PRIMARY HIPPOCAMPAL NEURONS	146
5.6.6	PRIMARY CULTURE TRANSFECTIONS	146
5.6.7	PLASMIDS	147
5.6.8	DHPG TREATMENT AND IMMUNOCYTOCHEMISTRY	147
5.6.9	WESTERN BLOTTING	148
5.6.10	IMAGING, MORPHOLOGICAL AND PUNCTA ANALYSIS	148
5.7	ACKNOWLEDGMENTS	149
5.8	REFERENCES	149
5.9	FIGURES AND LEGENDS	155
CHAPITRE VI. DISCUSSION		172
6.1	RAPPEL DES PRINCIPAUX RÉSULTATS	172
6.2	LE RÔLE DE STAUFEN 1 DANS LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE	172
6.2.1	STAUFEN 1 EST IMPLIQUÉE DANS LA LTP	173
6.2.2	STAUFEN1 PARTICIPE AU MAINTIEN DES ÉPINES MATURES ET DES CONNEXIONS SYNAPTIQUES	173
6.2.2.1	L'action de Staufen 1 sur les épines dendritiques implique la plasticité synaptique dépendante des récepteurs NMDA	174
6.2.3	MODÈLE DE RÉGULATION D'ARNm PAR STAU1 DANS LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE	176
6.2.4	LES ARNm ASSOCIÉS À STAUFEN1	181
6.3	LE RÔLE DE STAUFEN2 DANS LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE	183
6.3.1	STAUFEN 2 EST IMPLIQUÉE DANS LA LTD DÉPENDANTE DES mGLUR	183
6.3.2	STAUFEN2 JOUE UN RÔLE DANS LE DÉVELOPPEMENT DES ÉPINES DENDRITIQUES	185

6.3.3	STAUFEN2 EST IMPLIQUÉE DANS LE TRANSPORT ET LA RÉGULATION DES GRANULES CONTENANT L'ARNm DE LA MAP1B	186
6.3.3.1	Les ARNm associés à Staufen2	186
6.3.4	MODÈLE DE RÉGULATION D'ARNm PAR STAU2 DANS LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE	188
6.3.5	STAUFEN2 ET FMRP	192
6.4	L'IMPORTANCE DES DOMAINES RBD POUR LA FONCTION DE STAUFEN	194
6.5	RÔLE DE STAUFEN <i>IN VIVO</i>	195
CHAPITRE VII. CONCLUSION		197
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE		198

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I. INTRODUCTION

Figure 1. Les différents systèmes de mémoire à long-terme	5
Figure 2. L'organisation générale de la formation hippocampique.	9
Figure 3. La synapse chimique.	16
Figure 4. Les mécanismes de la phase précoce de la LTP (E-LTP).	25
Figure 5. Les mécanismes de la phase tardive de la LTP (L-LTP).	28
Figure 6. Les mécanismes de la dépression dépendante des mGluR.	34
Figure 7. Trois hypothèses pour expliquer le renforcement spécifique des synapses.	36
Figure 8. Classification morphologique des épines dendritiques.	38
Figure 9. Les composantes de l'épine dendritique.	40
Figure 10. Changement morphologique des épines dendritiques dans la plasticité synaptique.	45
Figure 11. Les isoformes de la protéine Staufén.	64
Figure 12. Configuration du dsRBD3 de Staufén.	65

CHAPITRE III. PREMIÈRE SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Figure 1. Down-regulation of Stau1 by siRNA in HEK293 cells and in cultured hippocampal neurons.	99
Figure 2. Down-regulation of Stau1 by siRNA in organotypic hippocampal slice cultures.	101
Figure 3. Stau1 siRNA transfection impairs chemically induced late-LTP in hippocampal slice cultures.	103
Figure 4. Stau1 siRNA transfection does not impair early-LTP in hippocampal slice cultures.	104
Figure 5. Stau1 siRNA transfection does not affect mGluR-dependent LTD in hippocampal slice cultures.	106
Figure 6. Stau1 siRNA transfection reduces frequency and amplitude of mEPSCs.	106
Figure 7. Stau1 siRNA transfection affects dendritic spine morphology.	107
Figure 8. Dendritic spine morphology changes induced by Stau1 down-regulation using Stau1 shRNA and rescue by co-expression of Stau155 Δ sh1.	109

CHAPITRE IV. DEUXIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Figure 1. Spine changes induced by Stau1 siRNA are prevented by NMDA receptor blockade	124
Figure 2. Impairment of FSK-induced L-LTP after Stau1 knockdown during	125

CHAPITRE V. TROISIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Figure 1. Knockdown of Stau2 by siRNA in HEK293 cells, hippocampal slice cultures and primary hippocampal neurons.	155
Figure 2. Stau2 siRNA does not prevent FSK-induced L-LTP.	157
Figure 3. Stau2 siRNA impairs mGluR-induced protein synthesis-dependent LTD.	158
Figure 4. Stau2 siRNA does not affect pyramidal cell spine morphology in older mature slice cultures.	159
Figure 5. Spontaneous miniature synaptic activity is not affected by Stau2 knockdown.	161
Figure 6. Stau2 knockdown decreases endogenous Map1b protein level and prevents DHPG-induced increases of Map1b in dendrites.	162
Figure 7. Stau2 knockdown reduces transport of Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR mRNA.	164
Figure 8. Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR mRNA dissociates from Stau2 upon application of DHPG.	165
Figure 9. Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR mRNA dissociation from P0 upon application of DHPG is prevented by Stau2 siRNA knockdown.	168
Figure S1. Export of NLS-MS2-mCherry when mRNA is present.	168
Figure S2. Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR mRNA co-localization with Stau2 and P0.	169
Figure S3. DHPG treatment does not affect the number of Stau2 puncta, mRNA puncta and P0 puncta.	169
Figure S4. Model of Stau2 regulation of Map1b mRNA granules and mGluR-LTD.	170

CHAPITRE VI. DISCUSSION

Figure 13. Modèle illustrant l'implication de Stau1 dans la morphogenèse des épines dendritiques.	176
Figure 14. Modèle illustrant l'implication de Stau1 dans le transport constitutif d'ARNm.	178
Figure 15. Modèle illustrant le rôle de Stau1 dans le transport d'ARNm nouvellement transcrit lors de la L-LTP induite par la FSK.	181
Figure 16. Modèle illustrant le rôle de Stau2 dans la régulation des granules d'ARNm de la Map1b lors de la mGluR-LTD.	191

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I. INTRODUCTION

Tableau 1. Récepteurs ionotropes au glutamate.	18
Tableau 2. Récepteurs métabotropes au glutamate.	19
Tableau 3. Diversité des complexes de transport d'ARNm dans les neurones.	55
Tableau 4. Protéines associées avec les complexes ribonucléoprotéiques contenant Stau1 chez l'homme.	67

CHAPITRE IV. TROISIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Table 1. Spine changes induced by NMDA receptor blockade, high Mg²⁺ and Stau1 siRNA treatment.	126
--	------------

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

3'UTR	région non-codante de la partie 3' de l'ARNm (<i>3'untranslated region</i>)
4E-BP	protéine de liaison au facteur eIF4E (<i>eIF4E binding protein</i>)
5'UTR	région non-codante de la partie 5' de l'ARNm (<i>5'untranslated region</i>)
Ach	acétylcholine
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPA	acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-1-4-isoxazole propionique
AP5	acide 2-amino-5-phosphonovalérique
Arc	<i>activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CA1	corne d'Ammon 1
CA2	corne d'Ammon 2
CA3	corne d'Ammon 3
CaM	calmoduline
CaMKII α	protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline II α (<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α</i>)
CaMKIV	protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline IV (<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV</i>)
CCDV	canal calcique dépendant du voltage
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CPE	<i>cytoplasmic polyadenylation element</i>
CPEB	<i>CPE-binding protein</i>
CRE	élément de réponse à l'AMPc (<i>cAMP responsive element</i>)
CREB	protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (<i>cAMP responsive element binding protein</i>)
CPEB	<i>polyadenylation-element-binding protein</i>
dsRBP	<i>double-stranded RNA-binding protein</i>
DAG	diacylglycérol
DHPG	3,5-Dihydroxyphénylglycine
DNQX	6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione
eEF2	facteur eukaryotique d'élongation de la traduction 2 (<i>eukaryotic translation elongation factor2</i>)
eIF4E	facteur eukaryotique d'initiation 4E (<i>eukaryotic initiation factor 4E</i>)
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EYFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FISH	technique d'hybridation fluorescente (<i>fluorescent in situ hybridization</i>)
FMR1	<i>fragile X mental retardation 1(gene)</i>
FMRP	<i>fragile X mental retardation protein</i>
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
FSK	forskoline

GABA	acide γ -aminobutyrique
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GRIP	<i>glutamate receptor interacting protein</i>
HEK	cellules embryonnaires humaines de rein (<i>Human Embryonic Kidney cells</i>)
HFS	stimulation à haute fréquence (<i>high-frequency stimulation</i>)
IP3	inositol triphosphate
KIF	<i>kinesin superfamily protein</i>
L/M	<i>lacunosum/moleculare</i>
LTD	dépression à long-terme (<i>long-term depression</i>)
LTF	facilitation à long-terme (<i>long-term facilitation</i>)
LTP	potentialisation à long-terme (<i>long-term potentiation</i>)
Map1b	<i>microtubule-associated protein 1b</i>
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
MAPK	protéine kinase activée par les mitogènes (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MCPG	α -méthyl-4-carboxyphénylglycine
mGluR	récepteur métabotrope au glutamate
MSOP	α -méthylsérine-O-phosphate
mTOR	protéine kinase cible de la rapamycine (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i>
PI3K	protéine kinase dépendante de l'inositol triphosphate (<i>phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase</i>)
PKA	protéine kinase A (dépendante de l'AMPc)
PKC	protéine kinase C (dépendante du calcium et des phospholipides)
PKM ζ	protéine kinase M ζ
PLC	phospholipase C
PP1	protéine phosphatase 1
PP-LFS	<i>paired-pulse low-frequency stimulation</i>
PRP	<i>plasticity-related protein</i>
PSD	densité postsynaptique (<i>postsynaptic density</i>)
PTP	<i>protein tyrosine phosphatase</i>
RBP	<i>RNA-binding protein</i>
RNP	<i>ribonucleoprotein particule</i>
SAD	<i>spontaneous activity-driven depression</i>
SAP	<i>spontaneous activity-driven potentiation</i>
Ser	résidu sérine
SBS	<i>staufen-binding site</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMD	<i>staufen-mediated decay</i>
SNC	système nerveux central
Stau	staufen
STF	facilitation à court-terme (<i>short-term facilitation</i>)
TBD	<i>tubulin-binding domain</i>
TBS	stimulation thêta en bouffée (<i>theta burst stimulation</i>)
ZBP1	<i>zipcode binding protein 1</i>

AVANT-PROPOS

Dans le cadre de cette thèse intitulée «Rôles des protéines Staufen 1 et 2 dans la plasticité synaptique des cellules pyramidales hippocampiques», j'ai étudié l'implication des protéines Staufen 1 et 2 dans la plasticité synaptique dans l'hippocampe de rat. De plus, j'ai tenté d'approfondir les mécanismes de régulation des ARNm aux niveaux physiologique et morphologique spécifiques à Staufen 1 et 2.

Avant d'exposer le détail des résultats expérimentaux obtenus, une introduction générale traite d'abord des différents concepts essentiels à la compréhension de mon projet de thèse et servira à mettre le sujet de recherche en contexte. De plus, cette introduction témoignera de l'état de l'avancement des connaissances dans les domaines liés aux travaux expérimentaux présentés dans cette thèse.

Pour débiter cette introduction générale, il sera question de l'implication de l'hippocampe dans la mémoire et l'apprentissage. Cette première section précise l'importance de l'hippocampe pour la mémoire et supporte le choix de cette structure comme modèle expérimental dans nos recherches. Ensuite, l'organisation fonctionnelle et les mécanismes importants pour la fonction de cette structure seront décrits. La section suivante s'attarde à la description de la plasticité synaptique de l'hippocampe et plus particulièrement de la potentialisation à long-terme et de la dépression à long-terme. Les changements qui surviennent au niveau cellulaire lors de ces phénomènes seront détaillés. Une description morphologique et fonctionnelle des épines dendritiques sera effectuée par la suite. Dans la section suivante, une attention particulière sera portée à la synthèse protéique et son rôle dans la plasticité synaptique. Ensuite, le transport des ARNm sera abordé et les principaux complexes ribonucléoprotéiques associés à cette fonction seront exposés. Enfin, la dernière section traite plus précisément de la protéine Staufen et de son rôle dans le transport et la régulation des ARNm dans le but de bien mettre en contexte la problématique soulevée par le corps de la présente thèse.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 L'APPRENTISSAGE ET LA MÉMOIRE

L'une des activités les plus impressionnantes de notre cerveau est sans aucun doute l'apprentissage, un processus par lequel le système nerveux peut acquérir et conserver de nouvelles informations. La mémoire, quant à elle, est le résultat de cet apprentissage, semblable à une trace concrète conservée dans nos réseaux neuronaux. Elle réfère plus précisément à l'encodage et au stockage de ces nouvelles informations et évoque également la restitution de ces connaissances. D'ailleurs, l'interaction entre plusieurs sous-systèmes est requise afin de construire une mémoire efficace. Cependant, malgré l'intérêt que les notions d'apprentissage et de mémoire peuvent susciter, il reste encore beaucoup à découvrir dans ce domaine. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la mémoire fournira une avancée considérable dans l'étude de cette fonction cognitive.

1.1.1 LA LOCALISATION DE LA MÉMOIRE

C'est au début du 19^e siècle qu'émergent les premières réflexions intéressantes au sujet de l'emplacement de la mémoire. À l'époque, philosophes, psychologues et scientifiques débattent de cette question. Franz Joseph Gall fut le premier à énoncer la théorie d'une localisation corticale, suggérant que le cortex cérébral est composé de parties distinctes, chacune ayant une fonction cognitive particulière (Milner et al., 1998; Kandel et al., 2000). Suite à ces études, Pierre Flourens, physiologiste français, fait des recherches sur les conséquences de lésions au cerveau et propose plutôt que chaque partie du cerveau participe et exécute indépendamment les différentes fonctions cognitives supérieures (phénomène d'équipotentialité). Selon lui, une lésion localisée affecterait également toutes les fonctions supérieures (Milner et al., 1998; Kandel and Pittenger, 1999; Kandel et al., 2000). Les théories de la localisation corticale et de l'équipotentialité des fonctions cognitives seront débattues pendant plusieurs années, jusqu'à ce que les travaux de Pierre-Paul Broca et Carl Wernicke, tous deux neurologues, démontrèrent clairement l'importance de la spécialisation des régions du cortex cérébral (Milner et al.,

1998; Kandel and Pittenger, 1999; Kandel et al., 2000). Au début du 20^e siècle, le neuropsychologue américain, Karl Lashley, formule la loi sur l'action de masse, selon laquelle les déficits mnésiques sont en étroite corrélation avec l'étendue des lésions corticales, et non de la localisation spécifique (Lashley, 1929). Toutefois, suite aux nombreux travaux effectués dans le domaine, il devenait de plus en plus évident qu'il n'existerait pas un seul centre de la mémoire mais plutôt un ensemble de régions qui participeraient à la représentation et au rappel de souvenirs.

Des données déterminantes sur la localisation des processus mnésiques chez l'humain ont été obtenues par le neurochirurgien Wilder Penfield. Lors de chirurgies visant à soustraire des foyers épileptiques, il nota que la stimulation électrique de certaines parties du cortex temporal évoquait des souvenirs chez des patients éveillés. Quelques années plus tard, l'importance de l'intégrité des structures composant le lobe temporal pour la mémoire explicite a été mise en évidence par William Scoville, neurochirurgien et Brenda Milner, neuropsychologue, suite à leur description du patient H.M (Scoville and Milner, 1957). H.M. souffrait de graves crises épileptiques, conséquence d'un traumatisme crânien subi dans son enfance. Incapable de mener une existence normale, il a été décidé de procéder à l'élimination d'un foyer épileptique. L'intervention consistait en l'ablation bilatérale des structures médiales du lobe temporal. Les crises furent largement réduites suite à l'opération, toutefois, H.M. souffrait maintenant de graves déficits de mémoire. Plus précisément, il avait une mémoire à court terme intacte, (quelques secondes à quelques minutes) ainsi qu'une excellente mémoire à long-terme pour les événements qui avaient eu lieu longtemps avant l'opération. Par contre, H.M. souffrait d'amnésie antérograde et était pratiquement incapable de retenir toute nouvelle information. Il lui était ainsi impossible de transférer les informations nouvellement acquises en mémoire à long-terme. Le cas du patient H.M. est aujourd'hui très célèbre, mais il n'est pourtant pas unique. Suite à cette première description, plusieurs cas de patients ayant subi une lésion au niveau du lobe temporal et démontrant d'importants troubles de la mémoire ont été rapportés.

Il est maintenant reconnu qu'une lésion bien délimitée n'affectera pas toutes les formes de mémoire et qu'il y a une dissociation entre différentes tâches mnésiques. L'apprentissage d'une tâche motrice par le patient H.M. démontré par Milner (Milner, 1972) constitue une des premières évidences qu'il existe plusieurs systèmes de mémoire. Ces études ont pu démontrer l'importance des structures du lobe temporal médian pour la formation de la mémoire explicite, et améliorer les connaissances sur la localisation et la compréhension de cette fonction cognitive complexe. Dans l'ensemble, ces travaux confirment que la mémoire n'est pas un processus unitaire mais bien une association de sous-systèmes en constante interaction. Ainsi, les études de Milner et de ses collègues ont permis d'établir une description systématique de plusieurs systèmes de mémoire qui interagissent entre eux et qui sont distincts sur le plan anatomique et selon le niveau de conscience requis.

1.1.2 CLASSIFICATION DE LA MÉMOIRE

Malgré l'impact de l'étude du patient H.M, le concept des différents systèmes de mémoire avait néanmoins été abordé auparavant. Déjà en 1949, Gilbert Ryle, philosophe britannique, faisait une distinction entre le «savoir quoi » et le «savoir comment». Cette différenciation a mené à la définition des grands systèmes de mémoire connus aujourd'hui : la mémoire explicite et la mémoire implicite (Milner et al., 1998; Kandel et al., 2000; Andersen, 2007). Notamment, les travaux de Larry Squire et collègues ont permis d'éclaircir les mécanismes impliqués dans les processus mnésiques (Squire and Zola-Morgan, 1991). La distinction la plus fondamentale repose sur la différence entre la mémoire explicite (déclarative) et la mémoire implicite (non-déclarative), selon que l'on peut ou non en exprimer verbalement le contenu (**Figure 1**).

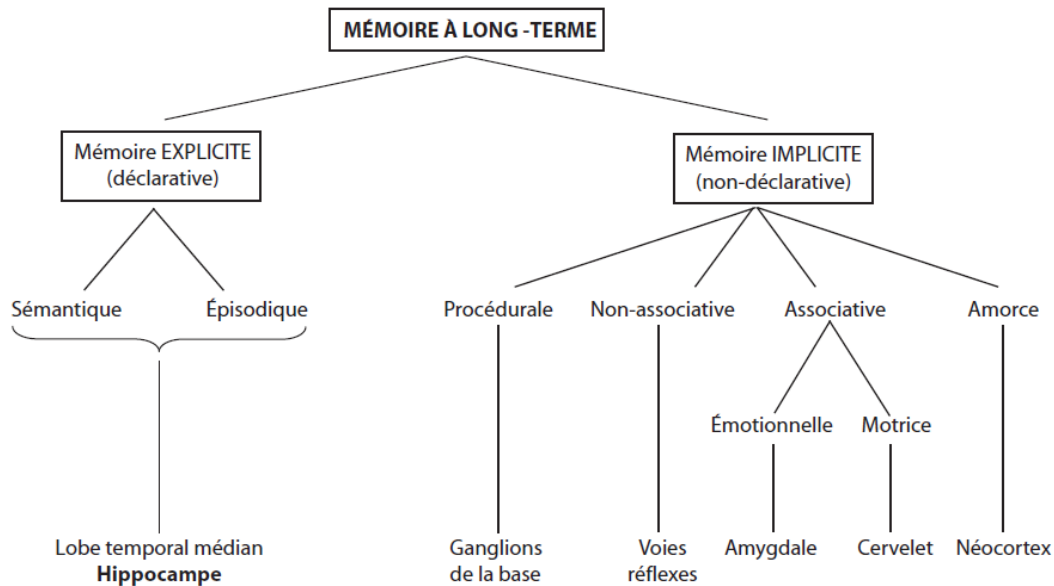


Figure 1. Les différents systèmes de mémoire à long-terme

La mémoire à long-terme peut être explicite ou implicite, selon le type d'information encodée et stockée. Chaque forme de mémoire utilise des structures et des réseaux neuronaux différents. Figure adaptée de Squire (2004).

1.1.2.1 La mémoire explicite

La mémoire explicite fait référence à la mémoire des faits et des événements et elle dépend de l'intégrité du lobe temporal médian. Elle concerne le stockage de connaissances qui peuvent émerger à la conscience et qui ont la possibilité d'être encodées sous forme de symboles et exprimées par le langage, d'où l'adjectif «déclarative». La mémoire explicite est hautement flexible et implique habituellement l'association de plusieurs parcelles d'information, contrairement à la mémoire implicite qui est davantage rigide. La mémoire explicite peut être divisée en deux sous-groupes : la *mémoire sémantique* et la *mémoire épisodique*. La première est le système par lequel un individu emmagasine ses connaissances générales, alors que la seconde réfère à la mémoire autobiographique, c'est-à-dire des expériences et des événements personnels (Squire and Zola, 1996; Milner et al., 1998; Kandel et al., 2000) (**Figure 1**).

1.1.2.2 La mémoire implicite

La mémoire implicite n'est pas accessible à la conscience et ne s'exprime pas avec des mots, mais plutôt à l'aide de performances et d'habiletés, d'où la qualification de non-

déclarative ou inconsciente. D'ailleurs, le rappel d'une information emmagasinée dans la mémoire implicite se fait automatiquement, sans les efforts de rappel exigés par la mémoire explicite (Squire and Zola, 1996; Milner et al., 1998; Kandel et al., 2000). En fait, la mémoire implicite est très peu flexible et nécessite généralement que les conditions d'encodage et de rappel soient similaires (Kandel et al., 2000). Il existe plusieurs formes de mémoire implicite. La *mémoire procédurale* est la mémoire des habiletés motrices qui permet, de façon inconsciente, l'amélioration progressive des performances motrices d'un individu à force de répétition. La *mémoire non-associative*, impliquant les voies réflexes, permet de retenir les propriétés d'un seul stimulus et d'y réagir de façon appropriée. La *mémoire associative* permet, quant à elle, de conditionner la relation entre un stimulus et sa conséquence, et implique l'amygdale et le cervelet. Finalement, la *mémoire d'amorce* se définit par une modification de l'habileté à reconnaître ou identifier un stimulus qui survient suite à l'exposition préalable d'une information pertinente sur le contexte (Squire and Zola, 1996; Milner et al., 1998; Kandel et al., 2000) (**Figure 1**).

1.1.3 L'IMPORTANCE DE L'HIPPOCAMPE

Les travaux de Scoville et Milner supposent que l'hippocampe peut occuper un rôle important dans la formation de la mémoire explicite (Scoville and Milner, 1957; Milner et al., 1998). Ces hypothèses se basent sur le fait qu'une lésion restreinte, à l'amygdale notamment, n'altère pas la mémoire explicite (Scoville and Milner, 1957; Andersen, 2007). D'autre part, l'amnésie antérograde (incapacité d'acquérir de nouveaux souvenirs) n'est observée que lors d'une chirurgie ou d'une lésion qui englobe la région de l'hippocampe. Des données cliniques ainsi que des études expérimentales confirment que chacune des régions du lobe temporal médian occuperait une fonction précise dans la mémoire explicite (Kandel et al., 2000). Ainsi, une lésion de l'hippocampe ou des structures qui lui sont reliées (complexe subiculaire et les cortex entorhinal, perirhinal et parahippocampal) entraîne des déficits spécifiques dans la formation de souvenirs déclaratifs. Ce n'est qu'avec les observations du cas du patient R.B., par Larry Squire et collaborateurs, qu'il fut possible d'affirmer que des dommages limités à l'hippocampe étaient suffisant pour affecter la mémoire explicite (Zola-Morgan et al., 1986; Kandel et

al., 2000). Le patient R.B., victime d'une ischémie, a par la suite développé une amnésie antérograde profonde, semblable à celle de H.M., quoique moins importante (Zola-Morgan et al., 1986). R.B. présentait une lésion circonscrite à l'hippocampe, plus précisément limitée à la couche pyramidale de la région CA1. Ainsi, le cas du patient R.B. confirmait la responsabilité de l'hippocampe dans la formation de nouveaux souvenirs, sans pour autant exclure l'implication des autres structures du lobe temporal. Le cas de R.B. est d'une importance particulière puisqu'il a permis de confirmer qu'une lésion de l'hippocampe peut provoquer une amnésie antérograde et affecter grandement la formation de la mémoire explicite à long-terme.

L'hippocampe est sans contredit une structure essentielle pour la mémoire déclarative. Toutefois, puisque les patients H.M et R.B. pouvaient toujours se remémorer des épisodes survenus dans leur enfance, il est fort probable que des lésions du lobe temporal médian ne soient pas complètement responsables de la détérioration des souvenirs épisodiques et sémantiques (Scoville and Milner, 1957; Kandel et al., 2000). Ces observations ont permis l'élaboration d'un modèle de la consolidation de la mémoire. Ainsi, l'hippocampe serait indispensable pour le relais de l'information lors de l'acquisition et de la consolidation avant le transfert des informations dans les régions néocorticales appropriées (Milner et al., 1998; Kandel and Pittenger, 1999; Kandel et al., 2000). Selon ce modèle, l'hippocampe ne serait donc pas un site d'entreposage permanent des informations (Squire and Alvarez, 1995). D'autre part, il a été démontré qu'une lésion de l'hippocampe chez des rongeurs entraîne des déficits de mémoire spatiale et contextuelle. En effet, il existe des cellules individuelles hippocampiques (*place cells*) qui encodent des informations spatiales (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Plus récemment, des expériences en imagerie fonctionnelle ont proposé que l'hippocampe de l'hémisphère droit serait plus sollicité par la mémoire visuo-spatiale alors que l'hippocampe de l'hémisphère dominant gauche serait davantage activé lors d'activités sollicitant la mémoire verbale ou narrative des objets, des mots et des personnes (Kandel et al., 2000; Burgess et al., 2002).

En somme, l'hippocampe joue un rôle prépondérant dans la formation de mémoires à long-terme, d'où sa grande importance comme modèle expérimental de recherche. Puisque notre étude porte sur cette structure, la prochaine section fera état de l'arrangement anatomique, de l'organisation cellulaire et de la connectivité des circuits hippocampiques.

1.2 L'HIPPOCAMPE: ARCHITECTURE ET ORGANISATION FONCTIONNELLE

L'hippocampe doit son nom à sa ressemblance avec l'animal, aussi connu sous le nom de cheval de mer (du grec *hippokampos*). La relative simplicité de l'organisation des couches cellulaires principales combinées à une distribution laminaire hautement organisée de ses afférences a fait de cette structure un modèle utile pour les études en neurobiologie.

1.2.1 STRUCTURE ANATOMIQUE DE L'HIPPOCAMPE

L'hippocampe fait partie d'une structure nommée la formation hippocampique, qui est située dans le lobe temporal médian. La formation hippocampique est composée de quatre structures : (1) le gyrus dentelé, (2) l'hippocampe ou la corne d'Ammon (comprenant les champs CA1, CA2 et CA3), (3) le subiculum et (4) le cortex entorhinal (**Figure 2**). De façon générale, le terme hippocampe désigne l'ensemble formé de la corne d'Ammon et du gyrus dentelé. (Lorente de No, 1934) et c'est d'ailleurs cette terminologie qui sera adoptée tout au long de cette thèse.

1.2.2 ORGANISATION CELLULAIRE DE L'HIPPOCAMPE

1.2.2.1 Le gyrus dentelé

Le gyrus dentelé est caractérisé par sa forme en U ou en V et se compose de trois couches cellulaires. La couche moléculaire (ou dendritique) se retrouve près de la fissure hippocampique; la couche granulaire (ou principale), très dense, est facilement identifiable puisqu'elle forme cette section particulière en U et finalement, la couche

polymorphique (hilus) constitue la troisième couche du gyrus dentelé (**Figure 2**) (Amaral and Witter, 1989; Andersen, 2007).

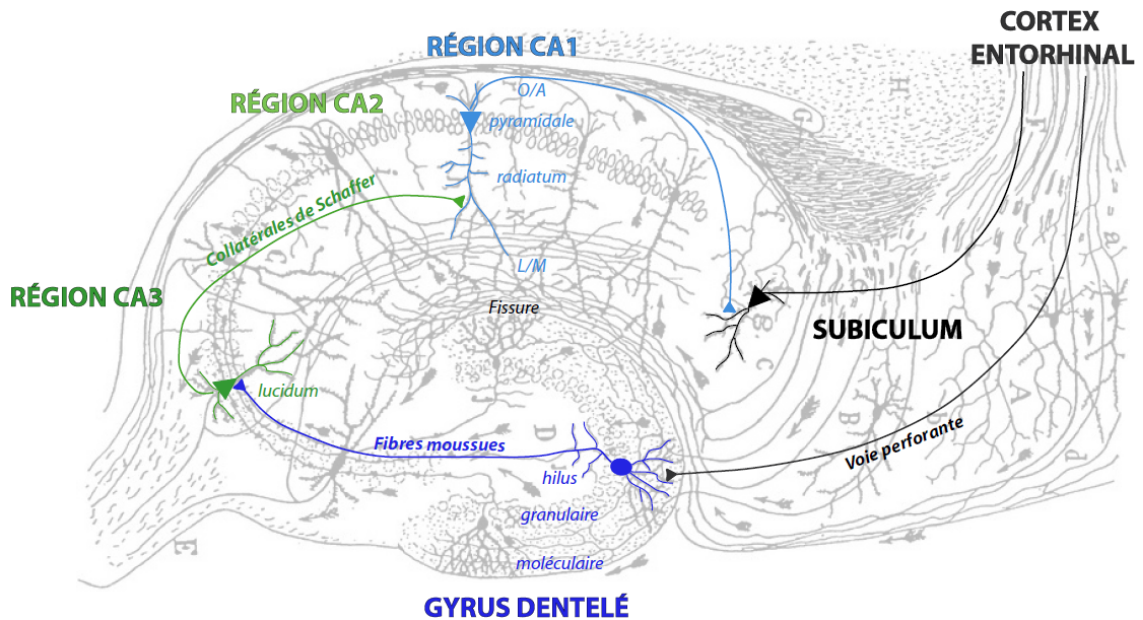


Figure 2. L'organisation générale de la formation hippocampique.

Schéma représentant l'organisation en couche de la corne d'Ammon et du gyrus dentelé de même que les voies de la boucle trisynaptique : la voie perforante; la voie des fibres moussues et la voie des collatérales de Schaffer. Figure adaptée de Ramon y Cajal (1911).

La couche moléculaire est principalement acellulaire, mais contient néanmoins quelques interneurons. Les principales cellules du gyrus dentelé sont les cellules granulaires qui forment une couche dense (de 4 à 8 corps cellulaires) nommée couche granulaire. Les cellules de cette couche sont assez petites et leurs dendrites se ramifient en de nombreuses branches très fines et couvertes d'épines (Freund and Buzsaki, 1996). Elles reçoivent principalement des afférences du cortex entorhinal. Leurs axones, aussi appelés fibres moussues, en raison de leurs terminaisons caractéristiques, projettent vers les cellules du CA3. Cette connexion constitue le premier relais de la boucle trisynaptique, qui est un circuit unidirectionnel formé de trois différentes synapses décrit plus en détail à la section 1.2.2.3 (**Figure 2**). Les cellules moussues, situées dans la couche polymorphique du hile, reçoivent des afférences provenant des fibres moussues et projettent leur axone vers d'autres régions du gyrus dentelé. Le gyrus dentelé contient

également plusieurs plusieurs types d'interneurones inhibiteurs utilisant le GABA comme neurotransmetteurs (Ramon y Cajal, 1911; Lorente de No, 1934).

1.2.2.2 La corne d'Ammon

Suite aux travaux de Ramon y Cajal, Lorente de Nó a approfondi l'analyse de la composition cellulaire de l'hippocampe en suggérant une structure en 3 champs, de CA1 à CA3 (Lorente de No, 1934). Dans le présent document, nous ferons référence à la région CA3 comme la région adjacente au gyrus dentelé et la région CA1, la région accolée au subiculum (**Figure 2**). La région CA2, très peu caractérisée, est souvent intégrée à la région CA3. Toutefois, une récente étude souligne un rôle particulier des cellules pyramidales de la région CA2 dans le circuit cortico-hippocampique (Chevalyere and Siegelbaum, 2010).

La corne d'Ammon présente une organisation laminaire (Amaral and Witter, 1989; Andersen, 2007). La couche *stratum oriens*, adjacente à la couche pyramidale, contient les dendrites basales des cellules pyramidales. Cette couche renferme des connexions CA3-CA3 associationnelles ainsi que des collatérales en provenance du champ CA3. En superficie du *stratum oriens*, se retrouve une couche mince et fibreuse, l'*alveus* qui regroupe les axones des cellules pyramidales. La couche *pyramidale* est une rangée compacte formée des somas de cellules pyramidales (cellules principales; 3 à 6 somas de large). Très dense dans la région CA1, cette couche est plus dispersée dans la région CA3. Au niveau du CA3 seulement, on retrouve une couche étroite adjacente à la couche pyramidale, qui regroupe les fibres moussues : le *stratum lucidum*. La couche *stratum radiatum*, est composée de connexions CA3-CA3 associationnelles et de plusieurs collatérales de Schaffer en provenance du CA3. Les collatérales de Schaffer sont les axones des cellules pyramidales du CA3 qui forment des synapses sur les dendrites apicales des cellules pyramidales du CA1 (Freund and Buzsaki, 1996; Andersen, 2007). La couche *stratum lacunosum-moleculare* (L-M), la couche la plus profonde, est directement juxtaposée à la fissure hippocampique et renferme surtout des fibres de la voie temporo-ammonique et leurs terminaisons. (Freund and Buzsaki, 1996; Andersen, 2007) (**Figure 2**).

Les cellules majoritaires de l'hippocampe sont les cellules pyramidales. Elles sont caractérisées par un corps cellulaire triangulaire. Les cellules pyramidales sont composées d'un arbre dendritique basal qui s'étend dans la couche *oriens* et d'une portion dendritique apicale qui s'allonge jusqu'à la fissure hippocampique (Amaral and Witter, 1989; Andersen, 2007). L'ensemble de leur arbre dendritique est recouvert d'épines. Les cellules pyramidales de la région CA3 sont généralement plus larges que les cellules pyramidales du champ CA1 et constituent la principale cible des axones provenant des cellules granulaires ou des fibres moussues. Une fonction a récemment été proposée pour les cellules pyramidales du CA2. Ces dernières seraient une cible importante des afférences corticales excitatrices de l'hippocampe et pourraient potentiellement exciter les cellules pyramidales de la région CA1 (Chevalyere and Siegelbaum, 2010). Les cellules pyramidales de la région CA1 reçoivent leurs afférences des collatérales de Schaffer (**Figure 2**). Leur axone émet peu de collatérales dans la région CA1 et projettent principalement vers le subiculum et le cortex entorhinal (Amaral and Witter, 1989; Freund and Buzsaki, 1996). Finalement, il existe un ensemble hétérogène d'interneurones inhibiteurs dispersés dans les différentes couches cellulaires du gyrus dentelé et dans la corne d'Ammon qui contrôlent l'excitabilité des cellules de projection (Freund and Buzsaki, 1996).

1.2.2.3 La boucle trisynaptique

Les connexions hippocampiques sont hautement organisées. Un circuit neuronal excitateur trisynaptique en boucle par lequel l'information en provenance du cortex entorhinal y retourne après avoir emprunté le réseau de l'hippocampe (Amaral and Witter, 1989) est formé par l'ensemble des cellules granulaires du gyrus dentelé et des cellules pyramidales de la corne d'Ammon. Démontré pour la première fois par Per Andersen, l'ensemble de connexions unidirectionnelles constituant cette boucle est composé des voies : (1) **perforante**, (2) **des fibres moussues** et (3) **des collatérales de Schaffer** (Andersen et al., 1969) (**Figure 2**).

Les projections du cortex entorhinal au gyrus dentelé représentent la principale porte d'entrée des informations dans l'hippocampe et constituent donc le premier relais de

cette boucle trisynaptique dénommé **voie perforante (Figure 2)**. Le gyrus dentelé ne projette pas en retour au cortex entorhinal, formant une voie unidirectionnelle (Andersen, 2007). Il serait important de souligner que certaines projections entorhinales de la voie perforante atteignent aussi directement les cellules pyramidales et les interneurons de la région CA1 de l'hippocampe ainsi que le subiculum pour former la voie temporo-ammonique (Witter et al., 2000).

Les cellules granulaires projettent à leur tour des axones, appelés fibres moussues, qui forment la seconde étape du circuit trisynaptique : la **voie des fibres moussues (Figure 2)**. Les axones, qui quittent le hilus et longent la couche pyramidale de la région CA3, forment des terminaisons particulières, les boutons « en passant », qui font contact avec les dendrites proximales des cellules pyramidales de la région CA3 au niveau de la couche *stratum lucidum*. Les fibres moussues forment également des projections collatérales excitatrices dans la couche polymorphique du gyrus dentelé.

Les projections partant des cellules pyramidales du CA3 forment d'une part les fibres commissurales se dirigeant vers l'hippocampe controlatéral via le corps calleux, et d'autre part, la **voie des collatérales de Schaffer**, dernière étape du relais trisynaptique qui relie la région du CA3 à la région du CA1 (**Figure 2**). Les collatérales de Schaffer innervent les dendrites des cellules pyramidales du CA1 situées dans les *strata radiatum* et *oriens*. (Amaral and Witter, 1989; Freund and Buzsaki, 1996; Andersen, 2007). De plus, les cellules pyramidales du CA3 forment des connexions rétroactives au niveau des couches *radiatum* et *oriens* de la région CA3. Selon que ces projections se ramifient dans l'hippocampe ipsilatéral ou dans l'hippocampe controlatéral, elles sont nommées projections associationnelles et commissurales, respectivement (Amaral and Witter, 1989; Freund and Buzsaki, 1996; Andersen, 2007). D'ailleurs, l'abondance de ces connexions récurrentes est en partie responsable de l'hyperexcitabilité et de l'instabilité qui caractérise la région CA3, favorisant le développement d'une éventuelle activité épileptiforme (Shepherd, 2004).

Les cellules pyramidales de la région CA1 ferment ensuite le circuit trisynaptique excitateur en retournant éventuellement l'information au subiculum et au cortex entorhinal. Ainsi, le cortex entorhinal joue un rôle particulier dans l'acheminement de l'information au niveau de la formation hippocampique. En effet, en plus d'être la principale porte d'entrée des informations qui seront traitées dans l'hippocampe, le cortex entorhinal constituerait le relais par lequel ces informations seront acheminées par la suite vers le néocortex (Andersen, 2007) pour un stockage à long terme.

1.2.2.4 L'importance particulière de chaque région hippocampique

Le rôle de l'hippocampe dans l'apprentissage et la mémoire est maintenant reconnu. Son implication dans une multitude de tâches d'apprentissage (conditionnement par la peur, reconnaissance d'objets, exploration spatiale...), démontre toute la complexité de la fonction mnésique de cette structure (Marr, 1971; McNaughton and Morris, 1987). Afin de différencier des épisodes/mémoires semblables, l'hippocampe doit rapidement former des représentations distinctes des éléments spatial et temporel de l'événement en cours (*pattern separation*). De plus, parce qu'il est impossible de répliquer parfaitement un épisode spécifique, l'hippocampe doit également être en mesure d'utiliser des indices partiels dans le but de récupérer des représentations emmagasinées antérieurement (*pattern completion*). Ces différentes fonctions seraient assurées par l'hétérogénéité fonctionnelle de chacune des régions de l'hippocampe (Rolls and Kesner, 2006; Andersen, 2007).

Le gyrus dentelé. Plusieurs modèles théoriques proposent que le gyrus dentelé occupe un rôle essentiel dans la séparation des patrons d'information (*pattern separation*), un processus qui permettrait de réduire la similitude et augmenter la différence entre des situations/contextes composés d'éléments semblables (Treves and Rolls, 1992). La divergence des afférences provenant du cortex entorhinal sur les cellules granulaires et les connexions éparses des fibres moussues sur les cellules pyramidales de la région CA3 seraient responsables de l'orthogonalité des patrons d'activité (Marr, 1971; Jung and McNaughton, 1993; Colgin et al., 2008).

La région CA3. Afin d'encoder la mémoire épisodique, le cerveau doit faire l'intégration d'épisodes individuels, qui sont composés d'éléments spatial et temporel. La région CA3 participerait à cette fonction en agissant comme un réseau d'auto-association rapide de souvenirs. Contrairement au gyrus dentelé, l'abondance de connexions récurrentes dans la région CA3 permettrait la reconstruction complète d'une représentation à partir de simples indices (Marr, 1971; McNaughton and Morris, 1987; Treves and Rolls, 1992; Rolls and Kesner, 2006), comme par exemple, transformer une représentation spécifique (un visage) en souvenir d'une expérience (fête d'amis) (*pattern completion*) (McNaughton and Morris, 1987; Kumaran and Maguire, 2007).

La région CA1. Le nombre de cellules pyramidales de la région CA1 dépasse largement celui de la région CA3 (Boss et al., 1987), et chaque cellule du CA3 projette sur plusieurs cellules du CA1 (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994). Cette divergence de connexions permettrait de réduire la quantité d'information acheminée par chaque neurone, tout en conservant l'intégralité de l'information retenue (Colgin et al., 2008). Il a également été suggéré que les cellules de la région CA1 seraient responsables d'une représentation unifiée de l'élément mémorisé (Rolls, 1996). De plus, des travaux proposent que la région CA1 serait impliquée dans la détection (*novelty detector*) d'irrégularités entre l'information corticale concernant le moment présent et les prédictions emmagasinées en provenance de la région CA3 (Lisman and Otmakhova, 2001; Fyhn et al., 2002; Nakashiba et al., 2008). Tel que mentionné précédemment, une lésion limitée à cette région est suffisante pour induire des dommages mnésiques importants chez un individu (Zola-Morgan et al., 1986; Milner et al., 1998). De ce fait, le choix de la région CA1 de l'hippocampe est grandement justifié pour des recherches sur les bases cellulaires et moléculaires de la mémoire, surtout si l'on considère son implication dans le traitement de l'information et la formation de la mémoire.

1.3 LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À LONG-TERME

Les mécanismes cellulaires qui sous-tendent la formation de l'apprentissage et de la mémoire ont intéressé de nombreux chercheurs. À la fin du 19^e siècle, Santiago Ramón y Cajal suggéra que l'apprentissage n'est pas le résultat d'une multiplication de cellules nerveuses mais serait plutôt dû à un renforcement des connexions entre les neurones existants, afin d'améliorer la communication entre ceux-ci (Ramon y Cajal, 1911). Des années plus tard, le postulat du neuropsychologue canadien Donald O. Hebb soutient cette hypothèse et stipule que l'activation synchrone de deux neurones aura pour conséquence de renforcer la connexion synaptique entre ces deux neurones (Hebb, 1949). La plasticité de la transmission synaptique, c'est-à-dire, la capacité qu'ont les synapses à modifier leur efficacité de transmission de l'information, représenterait un substrat cellulaire idéal pour soutenir la formation de la mémoire et le stockage d'information. Pour cette raison, la présente section traitera dans un premier temps de la synapse pour ensuite expliquer le phénomène de plasticité synaptique dans l'hippocampe.

1.3.1 LA SYNAPSE

Les neurones communiquent entre eux via les synapses, points de contacts fonctionnels qui permettent un échange d'information stable et efficace entre un neurone présynaptique et un neurone postsynaptique. Il existe deux types de synapses dans le système nerveux : la synapse électrique et la synapse chimique. Les **synapses électriques** permettent le passage direct et passif de courants électriques d'un neurone à un autre à travers des canaux ioniques appelés jonctions communicantes (*gap junctions*). Les **synapses chimiques**, quant à elles, sont beaucoup plus nombreuses dans le SNC et nécessitent la libération de neurotransmetteurs comme supports de communication (Purves and Roucoux, 1999; Kandel et al., 2000). La transmission effectuée par les synapses chimiques est fondée sur une succession complexe d'événements illustrée à la **figure 3**. Le processus débute par l'arrivée d'un potentiel d'action dans la terminaison présynaptique, ce qui entraîne une dépolarisation membranaire, provoquant une entrée de calcium (Ca^{2+}) suite à l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants.

L'élévation calcique intracellulaire déclenche la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique par l'activation de mécanismes de fusion des vésicules synaptiques. Les neurotransmetteurs diffusent ensuite dans la fente synaptique et se lient aux récepteurs postsynaptiques permettant l'ouverture de canaux postsynaptiques. Le signal chimique est alors converti en signal électrique et modifie l'excitabilité du neurone postsynaptique (Purves and Roucoux, 1999; Kandel et al., 2000).

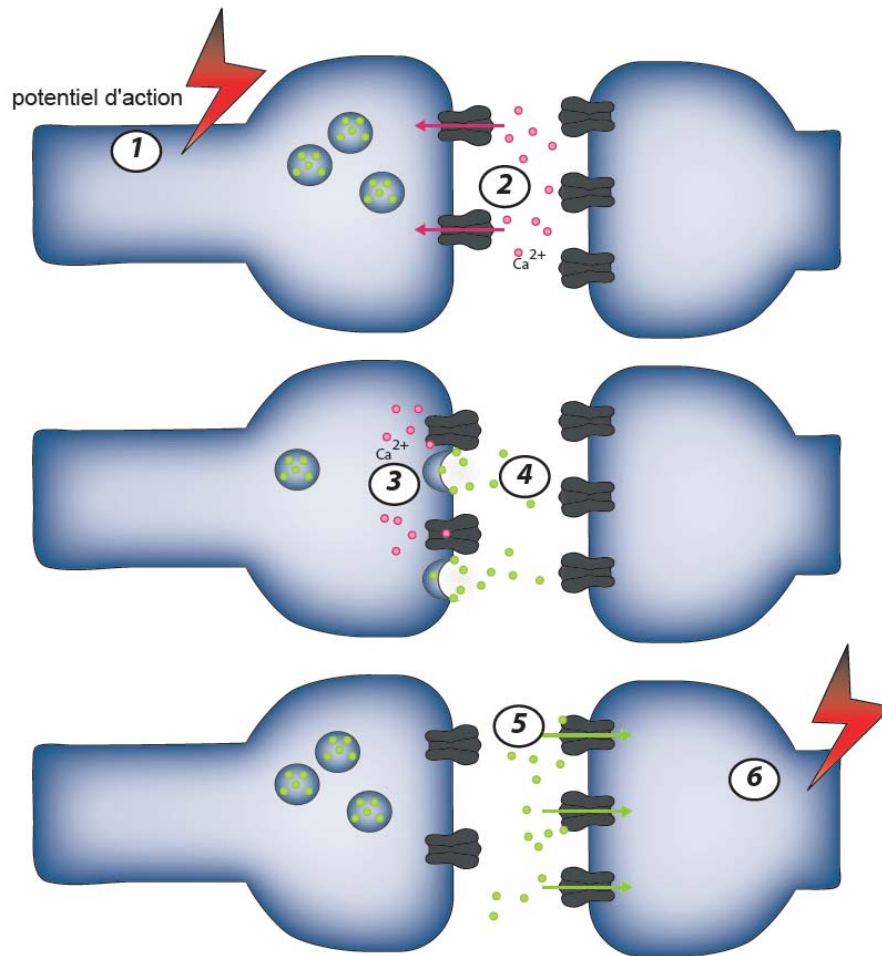


Figure 3. La synapse chimique.

La transmission synaptique se fait en plusieurs étapes : L'arrivée d'un potentiel d'action dépolairise la terminaison présynaptique (1), ce qui provoque l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage et l'entrée de calcium dans la terminaison présynaptique (2). L'entrée massive de calcium active la machinerie de fusion des vésicules synaptiques (3), ce qui permet la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (4). Les neurotransmetteurs se fixent aux récepteurs postsynaptiques et activent les canaux ioniques et/ou les seconds messagers associés (5). La terminaison postsynaptique est alors dépolairisée ou hyperpolarisée (6). Figure adaptée de Kandel et al., (2000).

Malgré leur grande diversité, on distingue deux grandes catégories de neurotransmetteurs selon leur action postsynaptique : les **neurotransmetteurs excitateurs** (comme le glutamate et l'acétylcholine), et les **neurotransmetteurs inhibiteurs** (comme le GABA et la glycine) (Purves and Roucoux, 1999; Kandel et al., 2000). Dans le cadre de cette thèse, nous aborderons uniquement les synapses excitatrices glutamatergiques.

1.3.1.1 La synapse excitatrice et les récepteurs glutamatergiques

Le rôle du glutamate en tant que principal neurotransmetteur excitateur du SNC des vertébrés a longtemps été contesté avant qu'il ne soit définitivement reconnu comme tel (Watkins, 2000). La présente section traite de la synapse glutamatergique, qui peut être décrite comme une structure macromoléculaire dont le fonctionnement repose sur l'interaction et l'organisation de différents partenaires protéiques (Scannevin and Huganir, 2000). Les multiples interactions entre les récepteurs et les protéines qui leur sont associées représentent donc autant de cibles possibles pour la régulation de la transmission synaptique. Il existe différents types de récepteurs au glutamate. Les récepteurs non-NMDA, comme les **récepteurs AMPA** et les **récepteurs kaïnate**, sont des récepteurs-canaux ioniques perméables au sodium (Na^+) et au potassium (K^+). La famille des **récepteurs NMDA** forme également des canaux ioniques sélectifs pour les cations Na^+ , K^+ et Ca^{2+} .

Les récepteurs AMPA (**Tableau 1**) sont des homo ou hétéromères composés de quatre sous-unités (GluR1-4) (Keinanen et al., 1990) qui se retrouvent à la membrane postsynaptique. Les récepteurs se retrouvent le plus souvent sous la forme d'hétéromères GluR1/GluR2 et GluR2/GluR3 (Wenthold et al., 1996). L'activation des récepteurs AMPA déclenche l'ouverture d'un canal perméable au K^+ et au Na^+ et permet la dépolarisation de la membrane du neurone. Dans certain cas, le récepteur peut être perméable au Ca^{2+} , dépendant de la composition des sous-unités du récepteur (plus particulièrement de la présence ou non d'une sous-unité GluR2 éditée) (Hollmann et al., 1991). D'autre part, les récepteurs AMPA sont l'objet d'un trafic cellulaire intense à la membrane postsynaptique (insertion, endocytose, diffusion latérale) et le nombre de

récepteurs AMPA à la synapse semble jouer un rôle important dans la plasticité synaptique (Collingridge et al., 2004).

Les récepteur kainate (**Tableau 1**) se localisent tant postsynaptiquement que présynaptiquement (Huettner, 2003) et leur structure est similaire à celle des récepteurs AMPA. Ce sont des tétramères composés de différentes combinaisons de cinq différentes sous-unités GluR5-7 et KA1,2 (Andersen, 2007). En comparaison des récepteurs AMPA et NMDA, qui sont plus souvent étudiés, la fonction des récepteurs kainate est encore mal définie, et ils semblent surtout être impliqués dans l'épilepsie (Ben-Ari and Cossart, 2000) et dans la modulation de la transmission et de la plasticité synaptique (Contractor et al., 2001).

Tableau 1. Récepteurs ionotropes au glutamate.

Récepteurs	Sous-unités	Ions	Agonistes	Antagonistes
AMPA	GluR1-4 (GluRA-D)	Na ⁺ , K ⁺ (Ca ²⁺)	Glutamate, AMPA, Kainate, Quisqualate	Acide kynurénique, CNQX, DNQX GYKI53655
Kainate	GluR5-7 KA1,2	Na ⁺ , K ⁺ (Ca ²⁺)	Glutamate, Kainate	Acide kynurénique, CNQX, DNQX
NMDA	NR1, NR2A-D	Na ⁺ , K ⁺ Ca ²⁺	Glutamate, NMDA	Acide kynurénique, AP5, MK801, CPP,

Adapté de Andersen (2007).

Principalement postsynaptiques, les récepteurs NMDA (**Tableau 1**) sont beaucoup plus complexes que les récepteurs AMPA et présentent quelques propriétés fonctionnelles particulières. En effet, l'activation de ces récepteurs requiert à la fois la liaison du glutamate et d'un co-agoniste, la glycine. De plus, les récepteurs NMDA sont bloqués par le magnésium extracellulaire (Mg²⁺) tant qu'il n'y a pas dépolarisation du neurone. Ce sont des récepteurs hautement perméables au Ca²⁺, et l'influx calcique provoqué par l'ouverture des récepteurs occupe un rôle central dans les différentes formes de plasticité synaptique. Ce sont des hétérotétramères composés obligatoirement de 2 sous-unités

NR1 et de 2 sous-unités NR2 (A-D) qui sont responsables des propriétés électrophysiologiques des récepteurs, et de leurs interactions avec les protéines intracellulaires.

Les **récepteurs métabotropes du glutamate** (mGluR) (**Tableau 2**) sont formés de sept domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G. Ils agissent sur les canaux ioniques au moyen de l'activation de ces protéines G associées à différentes cascades de signalisation intracellulaire (Purves and Roucoux, 1999; Kandel et al., 2000). La grande famille des mGluR se divise en huit sous-types (mGluR1-8) classés en trois groupes selon leur homologie de séquence, leur pharmacologie et la voie de transduction à laquelle ils sont couplés (groupe I, mGluR1 et 5; groupe II, mGluR2 et 3; groupe III, mGluR4, 6, 7 et 8) (Conn and Pin, 1997; Gladding et al., 2009).

Tableau 2. Récepteurs métabotropes au glutamate.

Groupes	Sous-types	Mécanismes	Agonistes	Antagonistes	Situation synaptique
I	mGluR1,5	↑ Phospholipase C (G _q)	Glutamate, DHPG, 1S,3R-ACPD	MCPG	postsynaptique
II	mGluR2,3	↓ Adénylate cyclase (G _q)	Glutamate, 1S,3R-ACPD, DCG-IV	MCPG, LY341495	présynaptique
III	mGluR4,6-8	↓ Adénylate cyclase (G _i /G _o)	Glutamate, L-AP4	MSOP	présynaptique

Adapté de Andersen (2007).

Les récepteurs du groupe I sont généralement situés à la membrane postsynaptique et se concentrent aux sites pérисynaptiques (Baude et al., 1993). Ils sont couplés à la phospholipase C et leur activation stimule l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP₂), produisant ainsi de l'inositol triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG) (Fagni et al., 2000). Le DAG active la PKC alors que l'IP₃ contribue à la relâche de Ca²⁺ des stocks intracellulaires (Riedel et al., 2003; Andersen, 2007). Les groupes II

et III se retrouvent surtout au niveau présynaptique et sont couplés négativement à l'adénylate cyclase. Seul l'aspect pharmacologique permet de faire la distinction entre les deux groupes puisque seulement le groupe III est spécifiquement activé par l'agoniste L-AP4. Les différents rôles occupés par les mGluR se reflètent dans la diversité de leur localisation aux synapses glutamatergiques.

L'activité peut modifier l'efficacité de communication entre les neurones au niveau de leurs synapses. Les prochaines sections décriront plus en détails le phénomène de la plasticité synaptique, cette capacité que possède le système nerveux à modifier ses connexions synaptiques. Il semble de plus en plus évident que ce processus serait à la base de la formation et du stockage de l'information dans le système nerveux. Il existe plusieurs formes de plasticité synaptique. Celles-ci se déclinent en différentes catégories, dont les principales sont l'habituation, la sensibilisation, la facilitation, la potentialisation et la dépression. De plus, selon les stimuli et les mécanismes induits, ces types de plasticité peuvent être à court ou long-terme. Toutefois, dans le cadre de cette thèse, seulement la potentialisation et la dépression à long-terme seront abordées.

1.3.2 LA POTENTIALISATION À LONG-TERME

Dans les années 1970, Timothy Bliss et Terje Lømo ont rapporté, pour la première fois, des changements persistents de l'efficacité de la transmission synaptique *in vivo*: la potentialisation à long-terme (*long-term potentiation* - LTP) (Bliss and Lomo, 1973). Cette découverte a ouvert la voie à plusieurs études (*in vivo* et *in vitro*) qui ont caractérisé ce phénomène au niveau des voies de la boucle trisynaptique de l'hippocampe. En effet, des travaux subséquents ont clarifié les mécanismes impliqués dans les trois voies, révélant des différences entre les types de synapses. Ainsi, il est maintenant reconnu que la LTP observée au niveau des synapses entre les fibres moussues et les cellules pyramidales de la région CA3 est non-associative; c'est-à-dire qu'elle ne requiert pas l'activité synchrone des éléments pré- et postsynaptiques de la synapse (Grover and Teyler, 1990; Bliss and Collingridge, 1993; Nicoll and Malenka, 1995). De plus, cette LTP ne dépend pas des récepteurs NMDA mais plutôt de l'influx calcique présynaptique durant la tétanisation. En effet, le blocage des récepteurs NMDA

ou de l'influx calcique postsynaptique n'affecte en rien la LTP dans cette voie (Harris and Cotman, 1986; Milner et al., 1998). L'influx calcique stimule la production d'adénylate cyclase, activant la PKA et modifiant la relâche de neurotransmetteur (Huang et al., 1994; Andersen, 2007). Les synapses associées aux voies perforante et des collatérales de Schaffer nécessitent quant à elles une coïncidence de l'activité pré- et postsynaptiques, phénomène nommé associativité, afin de produire une potentialisation de la réponse.

La LTP aux synapses des collatérales de Schaffer se distingue de la LTP aux synapses des fibres moussues. En effet, la LTP aux synapses des cellules du CA1 exige l'activation concomitante de plusieurs afférences, une caractéristique appelée coopérativité (Morris et al., 1986; Morris, 1989; Bliss and Collingridge, 1993). Elle repose sur le fait que d'une part, le glutamate doit se lier au récepteur NMDA postsynaptique et d'autre part, la membrane postsynaptique doit être suffisamment dépolarisée pour lever le bloc du Mg^{2+} sur les récepteurs NMDA. L'activation optimale des récepteurs NMDA nécessite donc que ces deux signaux se produisent simultanément. L'entrée massive de calcium dans le neurone postsynaptique ne sera possible qu'une fois le récepteur NMDA activé. Par la suite, cet influx calcique favorisera l'établissement de la LTP par l'activation de trois différentes protéines kinases : la protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline II (CaMKII) (Malenka et al., 1989; Malinow et al., 1989), la protéine kinase C (PKC) (Malinow et al., 1988) et la tyrosine kinase fyn (Grant et al., 1992). Néanmoins, seulement les synapses activées seront potentialisées, propriété importante de cette forme particulière de LTP appelée spécificité synaptique.

Bref, l'induction de la LTP au niveau des fibres des collatérales de Schaffer repose sur quatre facteurs postsynaptiques : (1) la dépolarisation postsynaptique, (2) l'activation des récepteurs NMDA, (3) l'influx de Ca^{2+} et (4) l'activation de protéines kinases qui agissent comme second messagers dans le neurone postsynaptique. Si les différentes étapes nécessaires à l'induction de la LTP sont bien connues, il n'en est pas de même pour les mécanismes impliqués dans l'expression ou le maintien de la LTP. En effet,

plusieurs débats ont toujours lieu sur la localisation précise de cette phase de la LTP, à savoir si elle est présynaptique, postsynaptique ou les deux à la fois.

La LTP se dissocie en deux phases. La première, dite phase précoce (*early-LTP- E-LTP*) dure de 1 à 3 heures. La E-LTP est classiquement induite par un seul train de stimulation à haute fréquence et requiert la phosphorylation de protéines déjà présentes aux synapses et l'insertion de récepteurs AMPA (Shi et al., 1999). La deuxième, dite phase tardive (*late-LTP- L-LTP*), nécessite plusieurs trains de stimulation à haute fréquence. La L-LTP est associée à la formation de nouvelles synapses, via des modifications de la transcription et la synthèse de nouvelles protéines (Bliss and Collingridge, 1993; Nguyen et al., 1994; Kelleher et al., 2004). Cette plasticité est analogue à celle décrite chez le mollusque marin *Aplysia Californica*, dont le système nerveux central est relativement simple (Castellucci et al., 1970; Castellucci and Kandel, 1976; Castellucci et al., 1978; Kandel, 2001). Ces études effectuées chez l'aplysie ont donc permis d'approfondir les connaissances sur les circuits neuronaux ainsi que les cascades moléculaires nécessaires au développement de la LTP chez les invertébrés (*short et long-term facilitation – STF et LTF*). D'ailleurs, il existe de nombreuses similarités entre les cascades moléculaires retrouvées chez l'aplysie et celles impliquées dans l'induction de la LTP chez les vertébrés. En effet, il est possible de faire l'analogie entre la STF et la LTF chez l'aplysie avec la E-LTP et la L-LTP dans l'hippocampe. Au niveau de la mémoire, ces phases correspondent à la mémoire à court-terme et la mémoire à long-terme. Les prochaines sections détailleront les différents mécanismes impliqués dans l'induction et le maintien de la potentialisation à long-terme aux synapses entre les collatérales de Schaffer et les cellules pyramidales du CA1.

1.3.2.1 La phase précoce de la potentialisation à long-terme

L'entrée de calcium via les récepteurs NMDA au cours de la E-LTP est une étape essentielle à l'induction de la LTP (Lynch et al., 1983; Otmakhova et al., 2000). En effet, l'élévation calcique au niveau postsynaptique active la calmoduline, qui augmente pour sa part l'activité de l'adénylate cyclase ainsi que la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et l'activité de la protéine kinase dépendante de

l'AMPC (PKA) (Chetkovich et al., 1991; Kandel et al., 2000). La PKA participe à la phosphorylation de plusieurs substrats impliqués dans la LTP mais permet aussi l'activation d'autres kinases. L'élévation calcique et la liaison de la calmoduline à la CaMKII induisent des changements conformationnels de ces sous-unités, permettant ainsi leur auto-phosphorylation (Lisman et al., 2002; Xia and Storm, 2005). Lorsque toutes ses sous-unités sont phosphorylées, la CaMKII devient constitutivement active et son activité est alors indépendante des niveaux calciques. D'ailleurs de nombreuses études ont démontré que l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA lors de l'induction de la LTP activait la CaMKII (Fukunaga, 1993; Lisman et al., 2002). De plus, cette activation serait non seulement nécessaire mais également suffisante à l'induction de la LTP (Lisman et al., 2002). Ainsi, l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA participe à l'induction de la LTP en permettant l'activation de différentes kinases importantes comme la CaMKII, la PKA et la PKC (**Figure 4**). Les cascades de signalisation alors enclenchées entameront l'initiation de différents mécanismes d'expression de la LTP qui seront décrits ultérieurement.

1.3.2.1.1 L'expression de la E-LTP: l'augmentation de la libération de neurotransmetteurs

Le renforcement durable de l'efficacité de la transmission synaptique est exprimé par un changement de l'ampleur de la réponse postsynaptique. Des modifications pré- et postsynaptiques sont à la base de ce changement (Kullmann and Nicoll, 1992; Larkman et al., 1992). En effet, la libération de neurotransmetteurs du neurone présynaptique et l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA au niveau postsynaptique sont les principaux facteurs qui induisent la facilitation de la transmission synaptique (**Figure 4**). Plusieurs études ont signalé une augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate après l'induction de la LTP (Bliss et al., 1986; Bliss and Collingridge, 1993). En fait, il y aurait diffusion d'un messenger rétrograde, comme l'acide arachidonique ou l'oxyde nitrique (Bliss and Collingridge, 1993), du neurone postsynaptique vers la terminaison présynaptique, ce qui activerait une série de cascades de signalisation augmentant la libération de neurotransmetteurs (**Figure 4**). La plupart des effets de l'oxyde nitrique sont régulés par les récepteurs NO-GCs (*Nitric oxide receptor guanylyl*

cyclases), causant l'activation de molécules effectrices (protéines kinases, canaux ioniques, phosphodiésterases (Garthwaite, 2008)). Ces résultats suggèrent donc une hausse de la libération de neurotransmetteurs par les neurones présynaptiques (Bliss and Collingridge, 1993; Andersen, 2007).

1.3.2.1.2 L'expression de la E-LTP: la phosphorylation et l'insertion des récepteurs AMPA

Un second mécanisme contribuant à l'augmentation de la transmission synaptique implique la phosphorylation des récepteurs AMPA déjà présents à la membrane postsynaptique (**Figure 4**). La majorité des récepteurs AMPA sont des tétramères composés d'une combinaison des sous-unités GluR1/GluR2 ou GluR2/GluR3 (Kornau et al., 1997). Il a été démontré que la phosphorylation des récepteurs AMPA augmente la conductance unitaire et que l'augmentation des courants associés à ces récepteurs serait un élément essentiel au renforcement synaptique rattaché à la E-LTP (Kauer et al., 1988; Derkach et al., 1999). D'autre part, il est maintenant reconnu que l'induction de la LTP provoque une augmentation de la phosphorylation de certaines sous-unités. En effet, alors que la CaMKII est responsable de la phosphorylation au niveau de la Ser831 (Barria et al., 1997; Lisman, 2003), la PKC intervient au niveau de la Ser818 (Boehm et al., 2006) de la sous-unité GluR1. D'autre part, l'insertion de récepteurs AMPA pourrait également contribuer à cette augmentation de la transmission synaptique (Kerchner and Nicoll, 2008).

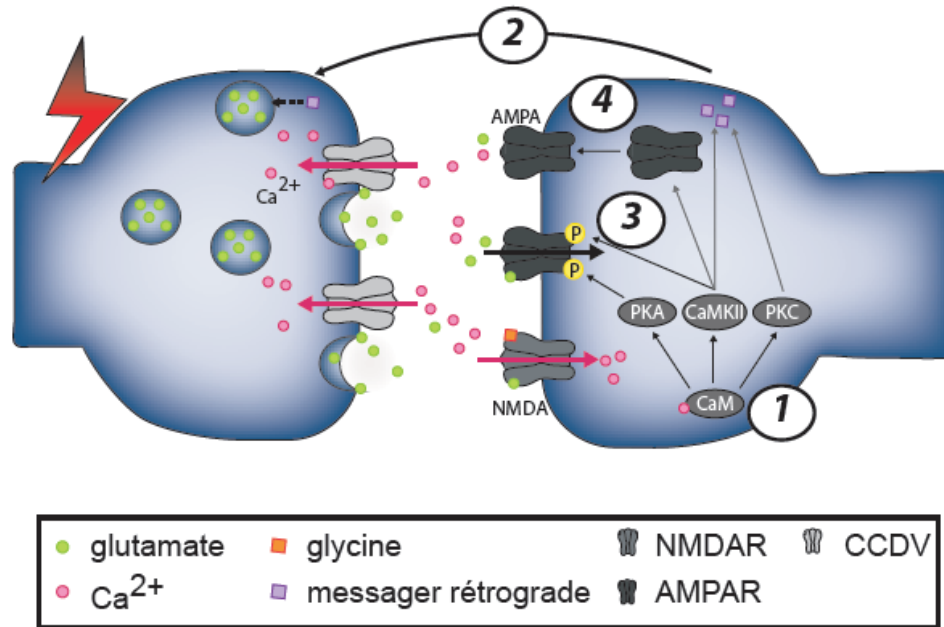


Figure 4. Les mécanismes de la phase précoce de la LTP (E-LTP).

La libération présynaptique de glutamate et la dépolarisation de la terminaison postsynaptique provoquent l'entrée de calcium via les récepteurs NMDA. Cette élévation calcique déclenche différentes cascades de signalisation qui participent au renforcement synaptique durant la E-LTP : l'activation de la PKA, CaMKII et PKC (1); l'augmentation de la libération de neurotransmetteurs au niveau présynaptique via la synthèse et la diffusion d'un messenger rétrograde (carrés mauves) qui peut faciliter l'activation de la machinerie de libération vésiculaire (2); la phosphorylation des récepteurs AMPA déjà présents à la synapse (3) et l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA (4). Figure adaptée de Kandel et al. (2000).

Certaines synapses, dites **silencieuses** (*silent synapses*), sont complètement dépourvues de récepteurs AMPA et ne contiennent à la base que des récepteurs NMDA, et sont par le fait même inactives près du potentiel de repos (Isaac et al., 1995). L'insertion de récepteurs AMPA aux synapses silencieuses pendant la LTP (Liao et al., 1995; Nicoll and Malenka, 1995) active ces synapses, phénomène reconnu comme le «*unsilencing*». En conséquence, l'addition de récepteurs AMPA aux synapses silencieuses, contribue également à l'augmentation de la taille des réponses synaptiques et à la diminution des échecs synaptiques (*synaptic failures*), un indice fréquemment associé à la E-LTP (Bliss and Collingridge, 1993).

L'induction de la LTP, et donc l'activation des récepteurs NMDA provoque une redistribution des récepteurs AMPA du compartiment intracellulaire à la membrane

dendritique (Shi et al., 1999). Cette redistribution dépend de l'identité des sous-unités formant les récepteurs AMPA. En effet, alors que les récepteurs formés des sous-unités GluR1/GluR2 sont ajoutés aux synapses lorsque la LTP est induite, les récepteurs composés des sous-unités GluR2/GluR3 ne font que renouveler de façon constitutive les récepteurs déjà présents à la membrane. Les mécanismes impliqués ne sont pas encore parfaitement connus. Toutefois, il est reconnu que le trafic de GluR1 aux épines dendritiques et la LTP nécessite l'activation de la CaMKII (Hayashi et al., 2000). Le processus d'insertion synaptique des récepteurs AMPA implique plusieurs étapes. Dans un premier temps, une protéine trans-membranaire, la protéine Stargazine recrute les récepteurs AMPA à la surface de la membrane postsynaptique (Chen et al., 2000). Par la suite, via l'interaction de la PKA (Esteban et al., 2003) et de la protéine PSD95, les récepteurs AMPA sont acheminés au site synaptique (Chetkovich et al., 2002; Schnell et al., 2002). La PKC participe également au trafic de la sous-unité GluR1 par phosphorylation de la sous-unité (Boehm et al., 2006)

1.3.2.2 La phase tardive de la potentialisation à long-terme

La L-LTP est une phase plus persistante qui est induite par plusieurs trains de stimulation. Elle peut également être induite chimiquement par une application de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) ou un activateur de l'adénylate cyclase, la forskoline. Cette phase perdure plusieurs heures (Frey et al., 1993; Abel et al., 1997). La L-LTP dépend de la transcription et de la traduction afin de stabiliser et renforcer les changements synaptiques initiés durant la E-LTP (Bliss and Collingridge, 1993; Nguyen et al., 1994). Le modèle proposé suggère que l'activation soutenue des cascades recrutées lors de la E-LTP, surtout l'activation de PKA, engendre un signal rétrograde capable d'activer la transcription au noyau ainsi que la traduction somatique de nouvelles protéines. Les nouveaux transcrits d'ARNm et/ou les protéines sont par la suite acheminés aux dendrites afin de stabiliser la LTP aux synapses potentialisées (West et al., 2002; Kelleher et al., 2004; Andersen, 2007) (**Figure 5**).

1.3.2.2.1 L'induction de la L-LTP : la signalisation au noyau

L'influx calcique est un élément important pour la signalisation et la translocation au noyau des protéines kinases PKA, CaMKIV (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV*) et MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Plusieurs études ont démontré que la PKA est activée de façon persistante durant la L-LTP et que celle-ci est nécessaire pour le recrutement de la transcription CREB-dépendante (Frey et al., 1993; Abel et al., 1997; Nguyen and Woo, 2003). La CaMKIV joue également un rôle pour la phosphorylation et l'activation de CREB lorsqu'elle est relocalisée au noyau pendant la L-LTP (Kang et al., 2001; Andersen, 2007). De plus, la translocation du facteur transducteur de la régulation de l'activité de CREB 1 (*transducer of regulated CREB activity 1 - TORC1*) serait nécessaire à l'activation de CREB et au renforcement de la LTP (Zhou et al., 2006; Kovacs et al., 2007) (**Figure 5**).

1.3.2.2.2 L'activation de la transcription

La protéine CREB (*cAMP-response element binding protein*) est un facteur de transcription qui contrôle l'expression de gènes contenant, dans leur promoteur, la séquence CRE (*cAMP response element*). Une fois phosphorylée, CREB est activée et s'associe à la protéine liant CREB (*CREB binding protein - CBP*). La liaison des deux facteurs déclenche l'induction de la transcription (**Figure 5**).

1.3.2.2.3 La traduction de nouvelles protéines

Suite à la transcription de gènes CREB-dépendants, les ARNm nouvellement synthétisés doivent être acheminés aux synapses pour y être traduits (**Figure 5**). La synthèse protéique est donc un facteur essentiel pour des changements synaptiques à long-terme. Une section entière (1.5) est consacrée à la synthèse protéique.

1.3.2.2.4 L'expression de la L-LTP

L'expression de la L-LTP repose sur des changements coordonnés aux niveaux pré- et postsynaptique (Bolshakov et al., 1997). Des analyses quantiques et des études d'imagerie cellulaire suggèrent que la libération de neurotransmetteurs soit augmentée pendant la LTP (Oliet et al., 1996). L'augmentation de l'expression de récepteurs

AMPA à la surface postsynaptique (Malinow and Malenka, 2002) serait un élément essentiel pour l'expression de la L-LTP. D'autre part, la synthèse protéique contribue à l'augmentation du nombre d'épines dendritiques, l'augmentation de la surface de la PSD ainsi que la sensibilité postsynaptique aux neurotransmetteurs associés à l'expression de la L-LTP (Lynch, 2004). En effet, il a été démontré que les épines plus grosses sont plus stables que les épines plus petites (Holtmaat et al., 2005), mais surtout que les épines plus larges sont associées à des synapses plus larges (Harris et al., 1992) avec plus de récepteurs AMPA. Ainsi, les épines plus grosses seraient plus efficaces que les plus petites. De plus, la stabilisation des épines dendritiques plus grosses est un facteur important dans le maintien de la L-LTP (Matsuzaki et al., 2004; Kopec et al., 2006).

Les différents mécanismes d'expression de la LTP sont engendrés par un ensemble complexe de molécules de signalisation activé par l'induction de la LTP (Sweatt, 1999).

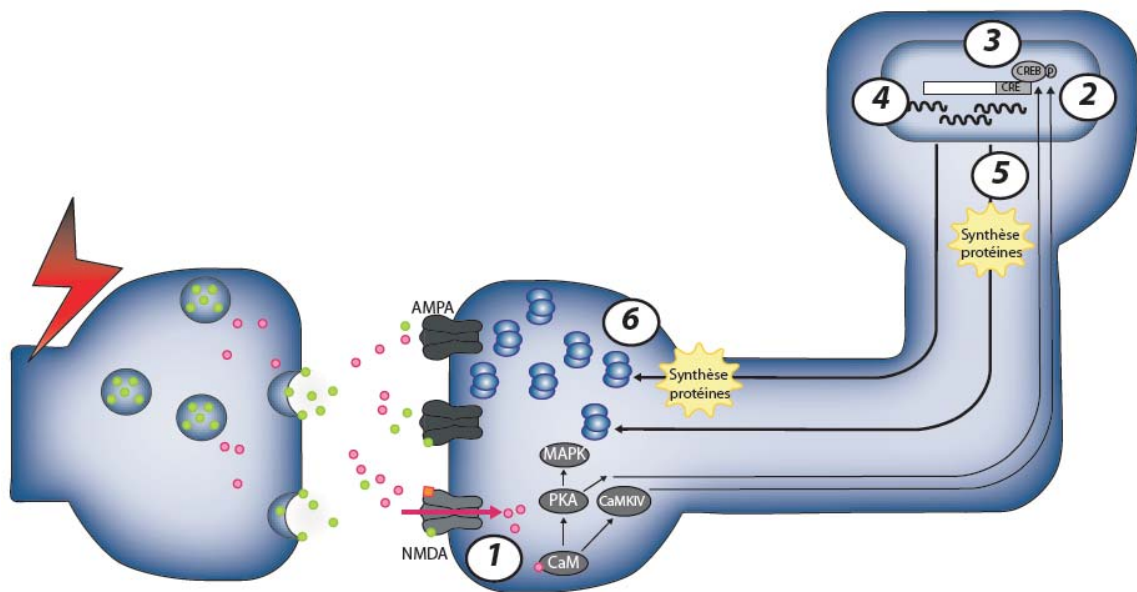


Figure 5. Les mécanismes de la phase tardive de la LTP (L-LTP).

L'activité synaptique soutenue permet une entrée de calcium via les récepteurs NMDA. Cette élévation calcique déclenche différentes cascades de signalisation qui participent à la L-LTP : l'activation et la translocation au noyau de PKA, MAPK et CaMKIV (1); la phosphorylation du facteur de transcription CREB (2); l'activation de la transcription CREB-dépendante (3); la synthèse de nouveaux ARNm (4) qui seront traduits dans le corps cellulaire (5) ou au niveau des dendrites (6). Figure adaptée de Kandel et al. (2000).

La majorité des études se sont attardées sur quatre kinases en particulier : la CaMKII, la MAPK, la PKA et la PKC (Sweatt, 1999). Cependant, il a été démontré que ces kinases ne sont pas essentielles au maintien de la L-LTP, une fois cette dernière établie (Malinow et al., 1988; Otmakhov et al., 1997; Ling et al., 2002). À ce jour, seulement une kinase, la protéine kinase M ζ (PKM ζ) serait essentielle pour le maintien de la phase tardive de la L-LTP et pour la stabilité du stockage de la mémoire spatiale dans l'hippocampe (Sacktor et al., 1993; Bliss et al., 2006; Pastalkova et al., 2006). La particularité de PKM ζ repose sur son activité autonome et constitutive (Hernandez et al., 2003). PKM ζ est formée pendant la LTP par la synthèse de la protéine à partir de l'ARNm de PKM ζ , qui est exprimé spécifiquement dans le cerveau (Hernandez et al., 2003) et qui est transporté aux dendrites (Muslimov et al., 2004). Une fois traduite, la PKM ζ augmente la transmission synaptique excitatrice en augmentant de façon persistente le nombre de récepteurs postsynaptiques AMPA actifs (Ling et al., 2002). De plus, il a été démontré que l'augmentation du niveau de PKM ζ est suffisant et nécessaire au maintien de la L-LTP puisque, d'une part, la perfusion postsynaptique de la kinase produit une potentialisation synaptique soutenue et d'autre part, l'application d'inhibiteurs de PKM ζ renverse la phase tardive de la L-LTP (Ling et al., 2002; Sajikumar et al., 2005; Serrano et al., 2005).

D'autre part, plusieurs travaux ont mis en évidence un rôle majeur pour le facteur neurotrophique BDNF dans la plasticité synaptique et la mémoire à long terme (*LTM-long-term memory*). Plus particulièrement, le BDNF serait suffisant pour induire la transformation de la E-LTP en L-LTP en présence d'inhibiteurs de synthèse de protéines (Shen et al., 2006; Yano et al., 2006; Lu et al., 2008). De plus, il a été démontré que la présence de BDNF serait critique pour l'induction et le maintien de la L-LTP (Bramham and Messaoudi, 2005). Selon le modèle proposé, l'augmentation de BDNF endogène suite à l'induction de la L-LTP supporterait l'expression de la L-LTP (Pang and Lu, 2004). Finalement, tel que décrit précédemment, la spécificité des changements aux synapses activées est une caractéristique particulière de la LTP. Il doit donc exister un mécanisme permettant un ciblage adéquat des protéines nouvellement synthétisées aux synapses appropriées.

Si la plasticité synaptique impliquait exclusivement un renforcement des connexions synaptiques, l'efficacité synaptique serait éventuellement saturée. Malgré le fait que les synapses potentialisées retourneraient probablement à leur seuil initial après un certain temps, l'existence d'un mécanisme permettant de réguler la transmission synaptique de façon bidirectionnelle permettrait une meilleure flexibilité du réseau neuronal. Ainsi, la dépression à long-terme (*long-term depression* – LTD) des synapses de l'hippocampe permet de supporter cette réduction de l'efficacité de la transmission synaptique dépendante de l'activité à long-terme (Andersen, 2007).

Toutefois, il ne faudrait pas omettre les effets de la plasticité synaptique dans les réseaux neuronaux, par rapport aux synapses individuelles. Ces effets devraient être jugés globalement afin de déterminer une éventuelle modification de l'activité synaptique des réseaux. En effet, le phénomène de la plasticité homéostatique considère l'ensemble des mécanismes qui commandent l'efficacité de la transmission synaptique pour l'ensemble d'un neurone. Les circuits excitateurs et inhibiteurs afférents sur un neurone agissent donc de concert pour maintenir un niveau d'activité stable. Ce phénomène permettrait aux réseaux d'acquérir différentes informations (par renforcement ou réduction de l'efficacité des connexions synaptiques).

1.3.3 LA DÉPRESSION À LONG-TERME

La LTD se définit comme étant une réduction de l'efficacité de la transmission synaptique. La LTD peut être induite par une stimulation à basse fréquence prolongée et peut perdurer pendant plusieurs heures (Dudek and Bear, 1992; Malenka and Bear, 2004). Ce type de stimulation peut toutefois induire plusieurs formes de dépression, dont les mécanismes d'induction et de maintien de la plasticité diffèrent (Oliet et al., 1997). Les deux principaux types de LTD sont la LTD dépendante des récepteurs NMDA (*NMDAR-LTD*) (Dudek and Bear, 1992) et la LTD dépendante des récepteurs mGlu (*mGluR-LTD*) (Bashir et al., 1993). La différence entre les LTD dépendantes des récepteurs NMDA et mGluR est significative puisque les deux formes de LTD ne peuvent s'occlure, indiquant l'indépendance des mécanismes d'expression associés à chacune des deux formes (Oliet et al., 1997). Malgré la distinction entre la LTD

dépendante des récepteurs NMDA et la LTD dépendante des mGluR, toutes deux provoquent l'endocytose de certaines sous-unités des récepteurs AMPA ainsi qu'une réduction à long-terme du nombre de récepteurs AMPA à la surface postsynaptique.

Une attention importante est maintenant portée à la LTD dans le SNC en raison de sa possible implication dans l'apprentissage et la mémoire, mais également dans certaines conditions pathologiques. Les prochaines sections s'attardent donc à la description des deux types de LTD.

1.3.3.1 La dépression dépendante des récepteurs NMDA

La LTD dépendante des récepteurs NMDA fut la première forme de dépression synaptique décrite. La LTD dépendante des récepteurs NMDA est habituellement induite par une stimulation à basse fréquence (900 stimuli délivrés à une fréquence variant entre 0.5 et 3 Hz) et est indépendante de la synthèse de protéines (Huber et al., 2000). Cette LTD peut également être induite chimiquement par une brève application de NMDA (Collingridge et al., 1983). Plusieurs évidences suggèrent que l'induction de la LTD dépendante des récepteurs NMDA nécessite une augmentation du niveau de calcium postsynaptique (Dudek and Bear, 1992; Malenka and Bear, 2004). D'ailleurs, le niveau de calcium intracellulaire est un paramètre très important qui déterminera la direction des changements d'efficacité de la transmission synaptique (LTP vs LTD).

La LTD dépendante des récepteurs NMDA requiert l'activation des protéines phosphatases (phosphatase sérine/thréonine (Harris et al., 2004)) alors que les protéines kinases favorisent l'induction de la LTP. La liaison du Ca^{2+} , entré via les récepteurs NMDA, à la calmoduline active la calcineurine (ou protéine phosphatase 2B). Cette dernière déphosphoryle l'inhibiteur 1 (I-1) et permet l'activation de la protéine phosphatase 1 (PP1) (Mulkey et al., 1993). Par la suite, la PP1 déphosphoryle la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA (Ser 845) permettant l'internalisation des récepteurs AMPA, contribuant à l'expression de cette forme de LTD (Collingridge et al.; Mulkey et al., 1993; Collingridge et al., 2004). L'activation de ces phosphatases contribuerait

également à la déphosphorylation de kinases importantes, comme les PKA et PKC (Kameyama et al., 1998; Lee et al., 1998; Hrabetova and Sacktor, 2001).

Durant la LTD dépendante des récepteurs NMDA, la principale cible qui affectera l'expression synaptique des récepteurs AMPA à la surface est la protéine PSD95, qui permet de positionner la calcineurine près du récepteur NMDA (Bhattacharyya et al., 2009). La déphosphorylation de la protéine PSD95 entraîne son retrait de la synapse, ce qui favorise l'endocytose des récepteurs AMPA (Kim et al., 2007).

La contribution postsynaptique associée à la LTD dépendante des NMDAR est incontestable. Cependant, ceci n'exclut pas une contribution présynaptique. Des études proposent que l'action d'un messager rétrograde, l'oxyde nitrique, ainsi que l'activation de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) diminueraient la relâche vésiculaire après l'induction de la LTD dépendante des récepteurs NMDA (Stanton et al., 2001; Stanton et al., 2003).

1.3.3.2 La dépression dépendante des récepteurs mGluR

La seconde forme de LTD nécessite l'activation de récepteurs mGlu. Dans l'hippocampe, la LTD dépendante des mGluR est typiquement induite par une stimulation à basse fréquence pairée (PP-LFS) ou par application d'un agoniste sélectif des récepteurs mGlu du groupe I, le (R-S) 3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) (Palmer et al., 1997). Dans la région CA1 de l'hippocampe, les récepteurs mGluR5, sont fortement impliqués dans cette forme de LTD, alors que les récepteurs mGluR1 ne semblent pas jouer un rôle fondamental (Luscher and Huber; Volk et al., 2006).

Cette LTD, probablement sous le contrôle des mGluR5, est bloquée par des antagonistes des mGluR de groupe I (Huber et al., 2000) et est indépendante du niveau de calcium postsynaptique dans l'hippocampe (Fitzjohn et al., 2001). Les expériences de Bear et collègues ont permis de déterminer que la LTD dépendante des mGluR repose principalement sur l'activation rapide de la synthèse de protéines (Huber et al., 2000) (**Figure 6**). D'ailleurs, il s'agirait de l'activation d'une synthèse locale de protéines aux synapses puisque l'expression de cette forme de LTD est possible en isolant les

dendrites du corps cellulaire (Huber et al., 2000). Ainsi, ces dernières données suggèrent que l'induction de cette forme de LTD se situerait au niveau postsynaptique. Toutefois, les mécanismes d'induction et d'expression de cette forme de LTD semblent changer au cours du développement. En effet, une étude a démontré que chez l'animal jeune (moins de 15 jours), la LTD dépendante des mGluR ne requiert pas la synthèse de protéines et n'est pas associée à des modifications d'expression des récepteurs AMPA à la surface postsynaptique (Nosyreva and Huber, 2006). Néanmoins, un changement s'opère avec le développement et chez l'animal plus mature (21 jours et plus), l'activation des mGluR induit l'endocytose des récepteurs AMPA et une LTD, qui dépendent toutes deux de la synthèse protéique. Donc notre étude se concentre principalement sur les mécanismes impliqués dans la LTD dépendante des mGluR dans les neurones matures de la région CA1.

La cascade de signalisation enclenchée par l'activation des récepteurs mGluR du groupe I comprend l'hydrolyse du phosphatidylinositol afin de produire de l'IP3 et du DAG, qui activera la PKC (Oliet et al., 1997). Des expériences ont révélé certains rôles de l'activation des cascades de signalisation de la ERK-MAPK, et de la kinase PI3K-Akt-mTOR (*Phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian Target of Rapamycin*) (Gallagher et al., 2004; Hou and Klann, 2004) (**Figure 6**). La LTD dépendante des mGluR induite par le DHPG et l'endocytose subséquente des récepteurs AMPA dans la région CA1 nécessite également la déphosphorylation de certaines sous-unités des récepteurs AMPA par des protéines tyrosine phosphatases (PTP) (Collingridge et al., 2010; Moulton et al., 2006). Il a été démontré dernièrement que la PTP qui déphosphoryle la sous-unité GluR2 des AMPAR pendant la LTD mGluR-dépendante est la protéine STEP (*Striatal Enriched protein Phosphatase*) (Zhang et al., 2008). L'activation des mGluR augmente les niveaux d'expression de la protéine STEP via l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K. L'augmentation d'expression et l'activation de la protéine STEP permettront l'endocytose des récepteurs AMPA via la déphosphorylation de la sous-unité GluR2. (Zhang et al., 2008) (**Figure 6**). Finalement, ce mécanisme se déroule en parallèle d'un phénomène induit par la cascade de signalisation MAPK qui régule l'endocytose dépendante des clathrines des récepteurs AMPA (Gladding et al., 2009)

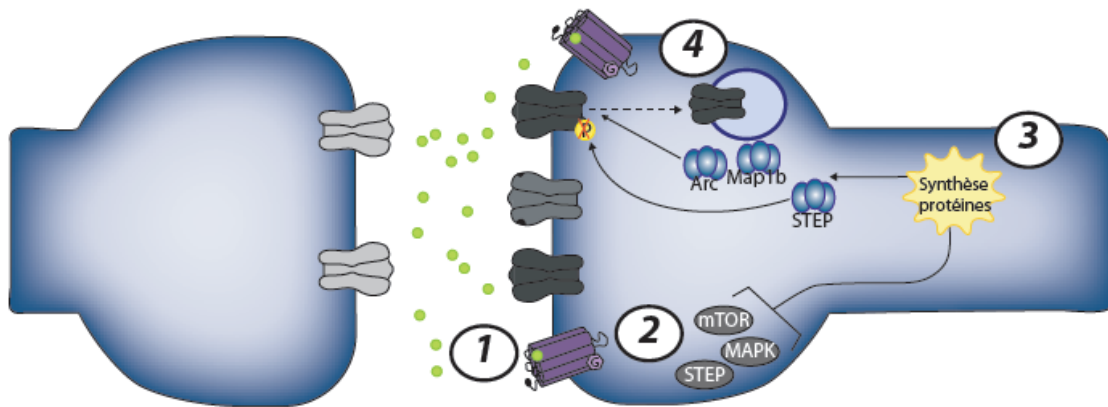


Figure 6. Les mécanismes de la dépression dépendante des mGluR.

L'activation des mGluR du groupe I (1) stimule l'activité de certaines protéines tyrosines phosphatases (STEP) et des cascades de signalisation de MAPK et mTOR (2) qui régulent la synthèse locale de protéines (3). Les protéines nouvellement traduites STEP, Arc et Map1b sont impliquées dans la régulation de l'internalisation des récepteurs AMPA (4). L'endocytose des récepteurs AMPA se traduit par une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique. Figure adaptée de Collingridge et al. (2010), Andersen (2007) et Gladding et al. (2009).

Il existe plusieurs évidences qui montrent que la LTD dépendante des mGluR nécessite une synthèse locale de protéines (Huber et al., 2000; Hou and Klann, 2004; Park et al., 2008; Waung et al., 2008; Zhang et al., 2008). La synthèse de protéines permettrait l'endocytose des récepteurs AMPA et participerait également à la production d'un messenger rétrograde qui serait responsable de moduler la libération de neurotransmetteur au niveau présynaptique (Gladding et al., 2009). En réponse à l'induction de la LTD dépendante des mGluR, la traduction locale facilite le recrutement de protéines à la synapse et permet une régulation efficace de la transmission synaptique. L'identité de certaines protéines nouvellement synthétisées est maintenant connue. De récents travaux ont démontré l'implication de la protéine Arc (*Activity regulated cytoskeleton associated protein* ou *Immediate-early gene arg 3.1*) (Chowdhury et al., 2006; Shepherd et al., 2006; Park et al., 2008) (Figure 6). Dans les dendrites, l'ARNm Arc est rapidement traduit suite à l'activation des récepteurs mGluR du groupe I. Arc s'associe directement avec des composants de la machinerie d'internalisation des récepteurs AMPA (dynamine 2 et endophiline) et favorise l'endocytose et la diminution des récepteurs AMPA de la surface postsynaptique (Chowdhury et al., 2006; Shepherd et al., 2006).

Cette synthèse est nécessaire pour maintenir l'internalisation des récepteurs AMPA et la LTD (Luscher and Huber, 2010; Chowdhury et al., 2006; Shepherd et al., 2006). Les récepteurs mGluR déclenchent aussi la synthèse rapide d'autres protéines participant à la régulation du trafic des récepteurs AMPA, comme les protéines STEP et Map1b (*Microtubule associated protein 1b*) (Davidkova and Carroll, 2007; Waung et al., 2008; Zhang et al., 2008). Alors que la synthèse de STEP permet la déphosphorylation d'une sous-unité des récepteurs AMPA (Zhang et al., 2008) et l'endocytose de ces mêmes récepteurs (Zhang et al., 2008), la protéine Map1b interagit avec une protéine d'ancrage, la protéine GRIP (*Glutamate Receptor Intercating Protein*) (Davidkova and Carroll, 2007). La séquestration de GRIP et du récepteur AMPA qui lui est associé diminue le nombre de récepteurs AMPA à la surface (Davidkova and Carroll, 2007). En somme, l'activation de récepteurs mGluR stimule une traduction coordonnée de protéines qui participent à l'endocytose des récepteurs AMPA.

1.3.4 LE RENFORCEMENT SPÉCIFIQUE DES SYNAPSES

Il a été démontré que la LTP et la LTD nécessitent toutes deux la traduction de nouvelles protéines. Pourtant, alors que la LTP contribue à l'augmentation des réponses synaptiques, la LTD a pour but de les diminuer. Existe-t-il un réservoir protéique commun aux deux formes de plasticité synaptique, utilisé selon les besoins des synapses ou est-ce que, au contraire, chaque forme de plasticité synaptique stimule la production d'un ensemble de protéines différent? À ce jour, plusieurs travaux ont permis d'émettre des hypothèses. Parmi celles-ci, mentionnons une première hypothèse concernant l'adressage sélectif, selon laquelle seules les protéines nécessaires sont traduites au niveau du corps cellulaire et acheminées aux synapses appropriées (**Figure 7**). Une seconde hypothèse, relative au marquage sélectif (*synaptic tagging*) (Frey and Morris, 1997), propose qu'une synapse potentialisée deviendrait marquée de façon temporaire et pourrait «capturer» des protéines spécifiques associées à la plasticité (PRP- *plasticity related protein*), produites au soma et transportées aux dendrites (**Figure 7**). Toutefois, alors que la nature du marqueur synaptique demeure encore nébuleuse (Reymann and Frey, 2007), de récentes études démontrent que la PKM ζ et le facteur BDNF pourraient être des PRP associées spécifiquement à la LTP (Pang and Lu, 2004; Barco et al., 2005;

Sajikumar et al., 2005). Troisièmement, l'hypothèse de la présence d'une synthèse locale (voir section 1.5) propose que les ARNm nouvellement synthétisés sont expédiés vers les dendrites puis traduits localement uniquement aux synapses activées (**Figure 7**).

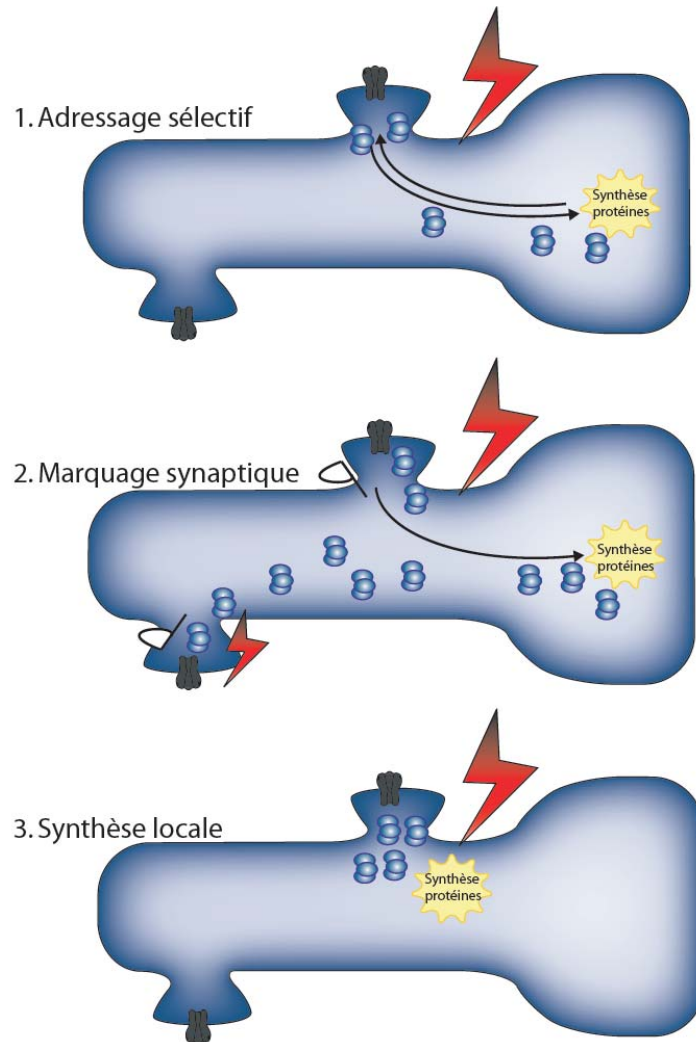


Figure 7. Trois hypothèses pour expliquer le renforcement spécifique des synapses. Différentes hypothèses ont été proposées afin d'expliquer comment les protéines nouvellement traduites pouvaient participer au renforcement spécifique des synapses activées. L'adressage sélectif prédit que les protéines traduites dans le corps cellulaire sont acheminées aux synapses appropriées (1). Le marquage synaptique propose que les protéines traduites dans le corps cellulaire pourraient être «capturées» par des synapses déjà marquées (drapeau blanc) (2). La synthèse locale suggère que les ARNm seraient traduits aux synapses activées seulement (3). Figure adaptée de Frey and Morris (1998).

1.4 LA MORPHOLOGIE DES ÉPINES DENDRITIQUES

La toute première description des épines dendritiques, protubérances membranaires émergeant de la surface neuronale, a été faite par Ramon y Cajal il y a maintenant une centaine d'années (Ramon y Cajal, 1911). Les épines se retrouvent principalement au niveau des dendrites et sont présentes dans une variété de populations neuronales chez les vertébrés (Coss et al., 1980; Nassel and Strausfeld, 1982; Sarnat and Netsky, 1985). Elles constituent le site de contact de la majorité des synapses excitatrices et le cerveau humain en contiendrait plus de 10^{13} (Nimchinsky et al., 2002). Malgré leur importance et leur abondance dans le système nerveux, la recherche commence tout juste à mesurer pleinement toute la complexité et le fonctionnement de ces structures, notamment leur rôle dans la plasticité synaptique. La présente section fera une description de l'état des connaissances concernant la structure, les fonctions, les mécanismes de régulation ainsi que les pathologies associés aux épines dendritiques.

1.4.1 LA STRUCTURE DES ÉPINES DENDRITIQUES

Les épines dendritiques sont des compartiments morphologiques émergeant des dendrites neuronales. Il existe diverses formes et grosseurs d'épines, mais typiquement, elles se présentent avec une tête (volume variant entre $0.001-1 \mu\text{m}^3$) reliée à la base du dendrite par un cou (diamètre $< 0.1 \mu\text{m}$) (Harris and Kater, 1994). Dans une cellule pyramidale adulte de la région du CA1, la densité des épines dendritiques varie entre 2 à 4 épines par micromètre (Harris and Stevens, 1989; Sorra et al., 1998), et elle peut augmenter jusqu'à 10 dans les cellules de Purkinje du cervelet (Harris and Stevens, 1988). D'autre part, la densité et la distribution des épines augmentent en s'éloignant du soma (Valverde, 1967).

1.4.1.1 Classification

La principale nomenclature qui est utilisée partage les épines dendritiques en trois catégories (**Figure 8**) selon la taille de leur tête et de leur cou : *thin*, *mushroom* et *stubby*. Cette classification a été introduite par Peters & Kaiserman-Abramof (Peters and Kaiserman-Abramof, 1970). Toutefois, cette nomenclature sous-estime l'hétérogénéité

morphologique des épines dendritiques existantes et l'on reconnaît maintenant d'autres formes d'épines. En effet, des études en microscopie en temps réel (*live imaging*) ont révélé que les épines sont des structures hautement dynamiques, pouvant changer de forme et de grosseur en quelques secondes (Fischer et al., 1998; Trachtenberg et al., 2002; Yuste and Bonhoeffer, 2004). Les filopodes (Skoff and Hamburger, 1974) (**Figure 8**) sont considérés comme des précurseurs d'épines dendritiques. Faciles à distinguer, ces derniers sont longs et ne possèdent pas de tête à leur extrémité. Le genre *thin* (**Figure 8**) est long ($> 1 \mu\text{m}$) avec un mince cou se terminant par une petite tête. Les épines de type *mushroom* (**Figure 8**) se caractérisent par un petit cou avec une large tête. Les épines dites *stubby* (**Figure 8**) sont courtes, larges ($0.5 \mu\text{m}$), sans cou et peuvent aussi être observées sous une forme de coupe ou perforées (Nimchinsky et al., 2002). Ces dernières classes ne dépassent habituellement pas $1 \mu\text{m}$ en longueur. On peut également observer, à l'occasion, de petits prolongements qui apparaissent sur une épine déjà établie. Ces spinules (*spine head protrusions*) se retrouvent près de la zone active et forment une invagination dans la terminaison présynaptique (Spacek and Harris, 1997; Richards et al., 2005).

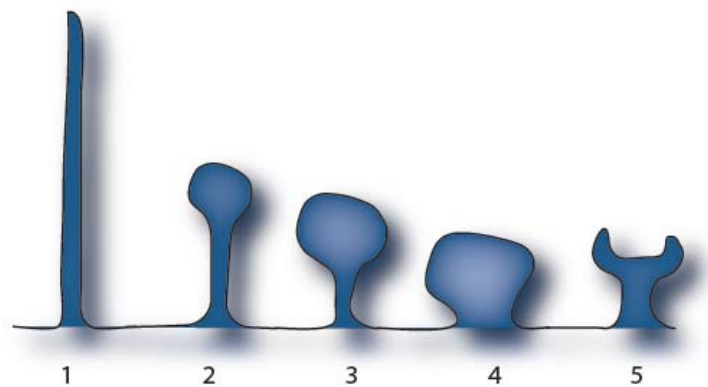


Figure 8. Classification morphologique des épines dendritiques. Malgré leur structure excessivement dynamique, les épines dendritiques peuvent être regroupées en 5 types différents : Filopode (1), *thin* (2), *mushroom* (3), *stubby* (4), forme de coupe ou perforée (5). Figure adaptée de Hering and Sheng (2001).

1.4.1.2 La composition des épines dendritiques

En plus de retrouver les épines dendritiques sous différentes formes et grosseurs, il existe également une diversité au niveau de leur composition moléculaire (Rao et al., 1998; Sorra and Harris, 2000). Classiquement, la morphologie des épines dendritiques et

plus particulièrement la taille de la tête revêtent une importance puisqu'il existe une forte corrélation entre la grosseur de la tête de l'épine et la force/stabilité de la synapse. Ce constat semble être directement lié à la dimension de la densité postsynaptique (*postsynaptic density* - PSD) présente à la surface de l'épine (Kasai et al., 2003; Tada and Sheng, 2006). En effet, les épines plus larges ont des PSD plus importantes et contiennent une plus grande diversité d'organelles (Harris et al., 1992; Spacek and Harris, 1997; Matsuzaki et al., 2004). La PSD est une portion de la membrane postsynaptique qui occupe environ 10% de la surface de l'épine et qui s'aligne parfaitement avec la zone active présynaptique. La majorité des synapses ont une seule PSD par épine, mais il est possible d'observer, en microscopie électronique, une PSD discontinue qui caractérise la configuration perforée (Calverley and Jones, 1990) (**Figure 8**). La PSD est constituée de récepteurs, de canaux et de systèmes de signalisation nécessaires à la transmission synaptique et au couplage de l'activité synaptique avec des phénomènes biochimiques postsynaptiques (**Figure 9**).

Des progrès considérables ont été faits dans le but d'identifier les molécules qui pourraient contrôler la croissance et la maturation des épines dendritiques (Zhang and Benson, 2000; Hering and Sheng, 2001). Ces protéines se divisent en 4 classes (**Figure 9**):

1. Protéines membranaires (récepteurs glutamate, molécules d'adhésion cellulaire)
2. Protéines d'ancrage (PSD95, Shank, Homer)
3. Protéines régulant/liant le cytosquelette (actine, débrine, spinophiline, SPAR)
4. Protéines cytoplasmiques (kinases, phosphatases et autres enzymes)

Dans plus de la moitié des épines dendritiques, on peut observer un prolongement du réticulum endoplasmique lisse (REL) (**Figure 9**) (Matus et al., 1982; Spacek and Harris, 1997). Cette organelle régule la concentration de calcium à l'intérieur de l'épine. Dans 10% des cas, le REL se développe en *spine apparatus* (**Figure 9**) (Spacek and Harris, 1997). Dans les cellules pyramidales du CA1, les épines qui possèdent un tel *spine apparatus* sont les épines de catégorie *mushroom* avec une configuration en coupe (Spacek and Harris, 1997). Le rôle du *spine apparatus* demeure encore méconnu.

Toutefois, son ultrastructure suggère qu'il pourrait être impliqué dans la synthèse et le transport des protéines liées à la membrane (*membrane-bound proteins*), comme c'est le cas pour le REL et l'appareil de Golgi dans le soma. D'autres organelles, telles des polyribosomes, le réticulum endoplasmique rugueux (RER), des vésicules et des endosomes sont fréquemment retrouvées dans les épines dendritiques (Spacek and Harris, 1997). Le cytosquelette d'actine dans les épines se distingue du cytosquelette dendritique par la forte concentration de microfilaments d'actine (F-actine) (Matus et al., 1982). Les microfilaments d'actine sont responsables des changements de forme et contribuent à l'importante motilité de l'épine. Initialement, les microtubules et les filaments intermédiaires n'avaient pas été observés dans les épines, mais une récente étude a révélé l'existence d'un mécanisme moléculaire associant une incursion de microtubules dans l'épine avec la régulation du cytosquelette d'actine (Jaworski et al., 2009).

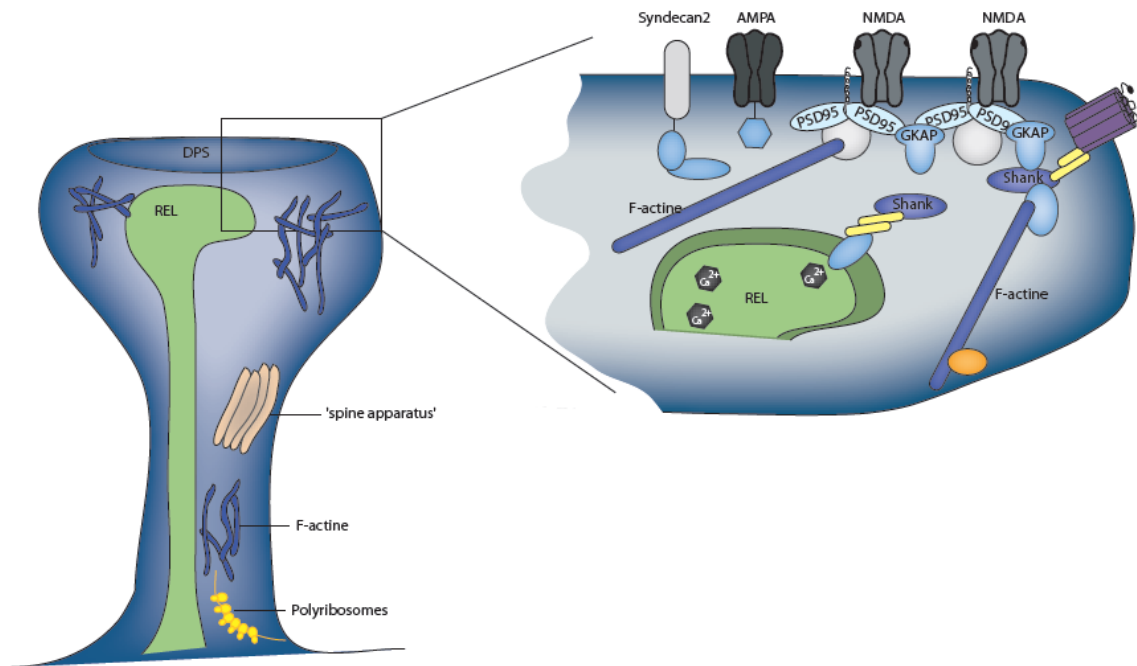


Figure 9. Les composants de l'épine dendritique. Schéma d'une épine dendritique de type *mushroom* avec ses différentes organelles, incluant le réticulum endoplasmique lisse (REL) qui s'étend jusque dans la tête de l'épine. L'agrandissement d'une portion de la densité postsynaptique (PSD) démontre l'interaction entre les récepteurs membranaires, les protéines d'ancrage et le REL, réservoir de Ca²⁺. Figure adaptée de Hering and Sheng (2001).

1.4.2 LES FONCTIONS DES ÉPINES DENDRITIQUES

Le rôle des épines dendritiques est de supporter la multitude de synapses entre les neurones (Fiala et al., 1998). En effet, les dendrites qui possèdent des épines peuvent atteindre un axone à une distance de 1 à 2 μm (Sorra and Harris, 2000). Puisque chacune des épines forme généralement une seule synapse, il n'est pas faux de suggérer que les épines sont en lien étroit avec la création d'un compartiment que l'on pourrait qualifier de spécifique à la synapse plutôt qu'une simple expansion de l'aire postsynaptique. De plus, l'hétérogénéité des formes et de la composition moléculaire suggère fortement qu'il existe différentes fonctions selon le type d'épine. Il est généralement reconnu que les épines reçoivent les afférences synaptiques, mais elles remplissent aussi d'autres fonctions. La présente section décrit les différents rôles aujourd'hui attribués aux épines dendritiques.

1.4.2.1 Site des synapses excitatrices glutamatergiques

La toute première fonction des épines dendritiques est de créer un site pour l'établissement d'une synapse. Dans l'hippocampe, 90% des synapses excitatrices glutamatergiques se forment sur les épines dendritiques alors que les synapses modulatrices inhibitrices et peptidergiques se retrouvent principalement à la base de l'épine et sur le soma des neurones de l'hippocampe (Harris and Stevens, 1989).

1.4.2.2 Compartiment de diffusion

Une fonction importante des épines dendritiques est d'offrir des microcompartiments permettant la ségrégation des réponses chimiques postsynaptiques, comme par exemple, des élévations calciques locales (Sabatini et al., 2001). En effet, à cause du cou qui les sépare de la base du prolongement dendritique, les épines agissent comme des compartiments chimiques semi-autonomes. La géométrie de ce cou peut servir à contrôler la cinétique et l'amplitude des réponses calciques postsynaptiques. D'ailleurs, les propriétés de transport peuvent être étudiées en mesurant la diffusion d'un fluophore dans une épine avec la méthode de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) (Svoboda et al., 1996). Des études ont démontré que le cou de l'épine agit comme une barrière, isolant ainsi la tête de l'épine du prolongement dendritique auquel elle est

rattachée (Nimchinsky et al., 2002). D'autres résultats ont révélé qu'une élévation modérée de calcium intracellulaire pouvait induire la formation ou l'élongation des épines, alors qu'une augmentation trop élevée de la concentration intracellulaire de calcium provoquait la rétraction des épines dendritiques (Korkotian et al., 1999). L'hypothèse proposée suite à ces observations stipule que les épines auraient une fonction neuroprotective (Segal, 1995). Ainsi, les épines éviteraient la propagation des effets nocifs potentiels d'une stimulation excessive en confinant spatialement cette élévation calcique, tout en maintenant la transmission de l'information synaptique (Segal, 1995).

1.4.2.3 Spécificité synaptique

Comme décrit précédemment, il est maintenant reconnu que les épines parviennent à compartimenter le calcium de façon à ce que des changements locaux intracellulaires à l'intérieur d'une synapse ne se propagent pas à une synapse voisine (Yuste and Denk, 1995). Les différentes cinétiques engendrées par la forme du cou de l'épine se traduisent par différents événements de signalisation à la synapse. En effet, selon la nature de la source ou du changement de concentration calcique intra-épine, différentes cascades de signalisation peuvent être déclenchées (Berridge, 1998). L'hétérogénéité synaptique et la régulation différentielle des protéines d'ancrage représentent certainement un facteur important dans l'hétérogénéité physiologique des réponses synaptiques (Rao et al., 1998; Sans et al., 2000). De plus, la présence de polyribosomes dans certaines épines procure un substrat pour la traduction locale et intra-épine des protéines. D'ailleurs, on peut observer la régulation du ciblage des récepteurs à la surface des épines selon le type d'activité synaptique qui est induit (Shi et al., 1999). D'autre part, il est possible de croire que le signal de polyadénylation régulerait la synthèse de protéines et la translocation de certains ARNm spécifiquement à certaines épines (Wells et al., 2000).

1.4.2.4 Plasticité

Les changements fonctionnels et structuraux des épines seraient à la base de la mémoire et de l'apprentissage (Kasai et al.; Hering and Sheng, 2001; Yuste and Bonhoeffer, 2001; Holtmaat and Svoboda, 2009). D'ailleurs, plusieurs études ont tenté de relier les

changements de morphologie des épines dendritiques et les modifications de l'efficacité de transmission synaptique comme la LTP et la LTD. Ces travaux suggèrent que les variations de la morphologie et de la densité des épines reflètent possiblement des mécanismes participant à des changements d'efficacité synaptique à long-terme (Yuste and Bonhoeffer, 2001; Tada and Sheng, 2006; Matsuzaki, 2007). Il est cependant important de faire la distinction entre la formation de nouvelles épines et les changements morphologiques induit par l'activité synaptique.

Les filopodes, sont des structures qui s'élancent et se rétractent rapidement à partir du dendrite et sont reconnus comme étant les précurseurs des épines dendritiques. Ils sont particulièrement nombreux lors de la synaptogenèse et dans les premiers stades de développement, où ils seront éventuellement remplacés par des épines (Harris and Kater, 1994). La formation et la maturation des synapses consistent en grande partie en l'insertion de récepteurs AMPA (Shi et al., 1999) et au recrutement de molécules d'adhésion à la jonction synaptique (Bozdagi et al., 2000), suivis par la stabilisation de la synapse et une diminution de la motilité de l'épine (Matus et al., 2000).

Tout comme la plasticité synaptique, la morphologie des épines dendritiques est bidirectionnelle (**Figure 10**). Les changements morphologiques liés à la plasticité synaptique dépendent de l'activation des récepteurs NMDA et pourraient contribuer à l'établissement ou l'élimination de connexions synaptiques. L'induction de la LTP provoque un grossissement des épines déjà existantes (Matsuzaki et al., 2004; Nagerl et al., 2004; Okamoto et al., 2004). Cette expansion de l'épine requiert les mêmes voies de signalisation que la LTP, c'est-à-dire l'ouverture des récepteurs NMDA et l'activation de la CaMKII (Matsuzaki et al., 2004; Yang et al., 2008; Lee et al., 2009). La LTD est associée à la rétraction des épines dendritiques (Nagerl et al., 2004; Okamoto et al., 2004; Zhou et al., 2004) et dans ce cas-ci, les deux phénomènes ont en commun l'activation des récepteurs NMDA, de la calcineurine et de la phospholipase C (Zhou et al., 2004; Horne and Dell'Acqua, 2007; Wang et al., 2007).

Cependant, par la suite, les voies de signalisation associées aux modifications synaptiques et des épines divergent. Dans le cas de la LTP, l'exocytose, l'activation de la PKA, les interactions entre la portion C-terminale de la sous-unité GluR1 des AMPAR avec ses protéines cibles ainsi que la synthèse de protéines sont tous des éléments essentiels pour l'expression de la LTP mais pas pour l'expansion initiale des épines (Yang et al., 2008). Pour la LTD, l'activation de la PP-1 s'avère nécessaire pour la LTD et non pour le rétrécissement des épines (Zhou et al., 2004; Wang et al., 2007), alors que la cofiline semble jouer un rôle important dans la rétraction des épines sans influencer l'expression de la LTD (Zhou et al., 2004; Wang et al., 2007). Ainsi, ces observations supportent l'existence d'un modèle dans lequel les modifications synaptiques et les changements de morphologie des épines dendritiques ont lieu de manière indépendante. Une hypothèse intéressante suggère que la régulation de la morphologie des épines est étroitement associée à l'addition ou le retrait local de récepteurs AMPA au niveau de la PSD. En effet, il a été démontré qu'une stimulation synaptique mobilise des récepteurs AMPA à la tête de l'épine et entraîne l'élargissement de l'épine (Park et al., 2004; Park et al., 2006) et que cette présence de nouveaux récepteurs AMPA est indispensable pour l'expansion de l'épine (Kopec et al., 2007; Yang et al., 2008). Ces études supportent l'hypothèse d'une dissociation entre les modifications synaptiques et les changements de morphologie des épines. De plus, ces données suggèrent que l'interaction des récepteurs AMPA avec le cytosquelette ainsi que la synthèse de protéine favorisent la stabilisation de l'épine dendritique.

La microscopie à deux photons nous permet maintenant de visualiser, chez l'animal entier, les changements structurels pendant une longue période de temps. Ainsi, des expériences *in vivo* effectués dans le néocortex de souris ont confirmé que les épines dendritiques sont des structures dynamiques (Holtmaat et al., 2005; Knott et al., 2006; Holtmaat et al., 2009). De plus, une récente étude a également démontré que les épines dendritiques subissent des changements de forme et de taille suite à une nouvelle expérience sensorielle (Holtmaat and Svoboda, 2009). L'observation et la manipulation des changements morphologiques des épines dendritiques *in vivo*, représentent des outils intéressants pour l'étude des processus cognitifs et des troubles neurologiques.

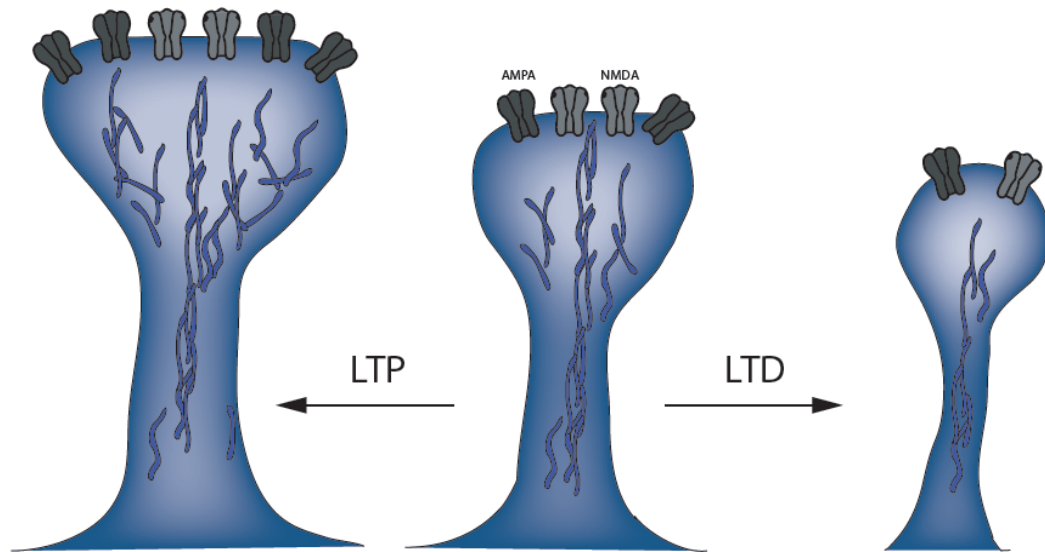


Figure 10. Changement morphologique des épines dendritiques dans la plasticité synaptique. La LTP est associée à l'augmentation de volume de la tête de l'épine, une insertion de récepteurs AMPA à la membrane post-synaptique ainsi qu'une hausse de la polymérisation des filaments d'actine. La dépolymérisation qui accompagne la LTD favorise la rétraction et même la perte d'épines. Figure adaptée de Tada and Sheng (2006).

La constante modification structurale de l'épine ainsi que le trafic de récepteurs contribuent tout deux à la plasticité synaptique. Des données suggèrent que les épines *thin* subissent une plus importante hausse de Ca^{2+} cytosolique suite à une stimulation des NMDAR (Noguchi et al., 2005) et représenteraient donc le meilleur site pour l'induction de la LTP (Malenka and Nicoll, 1999; Matsuzaki et al., 2004), alors que les épines plus matures sont plus stables et démontrent moins de plasticité (Matsuzaki et al., 2004). Les changements qui accompagnent la LTP incluent notamment un élargissement des épines plus petites (**Figure 10**) et une augmentation du nombre d'épines plus grosses. Ces observations ont mené à la formulation du principe suivant : les épines plus petites qui sont plus plastiques, représenteraient les épines de l'apprentissage et les épines plus grosses qui sont matures, correspondraient aux épines de la mémoire (Kasai et al., 2003; Matsuzaki et al., 2004; Matsuzaki, 2007; Xu et al., 2009). D'autre part, des épines pour lesquelles l'activation n'est pas nécessaire ou qui perturberait le phénomène d'apprentissage tendront à disparaître (Matsuzaki, 2007).

1.4.3 MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DES ÉPINES

Puisque la morphologie et la densité des épines dendritiques sont reliées à la transmission synaptique, il y a un intérêt marqué pour les mécanismes de régulation de la morphologie des épines dépendante de l'activité synaptique. Dernièrement, des progrès considérables ont été faits dans l'identification des molécules responsables de la morphogénèse des épines dendritiques. Tout d'abord, les filaments d'actine (F-actine), très dynamiques, sont hautement concentrés dans les épines dendritiques et sont les principaux constituants du cytosquelette. Il a été démontré que la régulation de la polymérisation /dépolymérisation de l'actine serait responsable de la croissance, de la forme et de la motilité des épines (**Figure 10**). De plus, plusieurs équipes ont observé qu'une stimulation induisant la LTP augmente la polymérisation de l'actine dans les épines des neurones de l'hippocampe (Fukazawa et al., 2003; Okamoto et al., 2004; Lin et al., 2005). D'un autre côté, une stimulation induisant la LTD amène une déstabilisation de l'équilibre de la F-actine vers la G-actine (actine globulaire), provoquant ainsi une perte de l'actine postsynaptique et un rétrécissement des épines (Okamoto et al., 2004). Malgré leur aspect microscopique, les épines dendritiques contiennent tout le matériel (molécules et organelles) nécessaire à la signalisation postsynaptique et à la plasticité synaptique (Nimchinsky et al., 2002).

1.4.4 PATHOLOGIES ASSOCIÉES

La plasticité des épines dendritiques est un élément cellulaire essentiel dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Il n'est donc pas surprenant de constater que de nombreuses pathologies sont associées à des anomalies d'ordre morphologique et/ou de densité de ces structures. Dans plusieurs cas de troubles développementaux, les filopodes ne peuvent être convertis en épines, augmentant la population d'épines immatures. On retrouve ce phénotype notamment chez des individus souffrant de retard mental et du syndrome de Down (Hering and Sheng, 2001). Des études faites chez des patients atteints de schizophrénie ont démontré une diminution de la densité des épines des neurones pyramidaux du néocortex (Garey et al., 1998; Glantz and Lewis, 2000). Des anomalies sont également présentes dans les pathologies comme l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer. Dans les deux cas, il y a une perte importante du nombre d'épines

dendritiques (Isokawa, 1998; Knobloch and Mansuy, 2008). Toutefois, il n'a pas encore été possible de déterminer si les anomalies des épines dendritiques sont la cause de ces déséquilibres neurologiques ou si elles sont conséquentes à d'autres événements.

Pour conclure, la plasticité des épines dendritiques aurait une fonction importante dans les mécanismes qui sous-tendent l'apprentissage et la mémoire. Les sections suivantes porteront sur la traduction locale et le transport d'ARNm au niveau des dendrites.

1.5 LA TRADUCTION LOCALE DES ARNm

Plusieurs protéines sont localisées spécifiquement aux synapses. Un principe général de biologie cellulaire suggère que les protéines sont synthétisées dans le soma et ensuite transportées de façon spécifique aux régions synaptiques (**Figure 6**) (Tang and Schuman, 2002). Toutefois, ce concept ne permet pas d'expliquer les particularités de la spécificité synaptique et de la traduction rapide de protéines aux synapses activées (Tang and Schuman, 2002; Bramham, 2008). Donc, il a été suggéré que les neurones utiliseraient des protéines de transport couplées à un mécanisme de marquage synaptique (*synaptic tagging*) dépendant de l'activité synaptique pour acheminer les protéines nouvellement synthétisées sélectivement aux sites marqués (**Figure 6**) (Frey and Morris, 1997; Martin et al., 1997). Une autre alternative propose une traduction locale des protéines aux sites synaptiques (**Figure 6**). Les différentes fonctions possibles de cette traduction locale comprendraient le remplacement de protéines dégradées, l'augmentation des niveaux de protéines existantes ou tout simplement l'expression de nouvelles protéines (Steward and Schuman, 2001). Cette section fera une brève description des différents facteurs qui entrent en jeu dans la régulation de la traduction locale des ARNm.

1.5.1 SYNTHÈSE LOCALE DE PROTÉINES

La localisation sélective de ribosomes à la base des épines dendritiques a amené Steward et Levy à suggérer que les protéines nouvellement synthétisées seraient des constituants

importants des synapses (Steward and Levy, 1982). Ces travaux ont également permis d'invoquer l'existence d'un mécanisme de régulation locale de synthèse protéique. Depuis, grâce à des analyses immunohistochimiques et d'hybridation *in situ*, plusieurs composantes de la machinerie traductionnelle, incluant des protéines ribosomales, des facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction ainsi que des ARN de transfert (ARNt) ont été identifiés dans des compartiments dendritiques (Tiedge and Brosius, 1996; Steward and Schuman, 2001). Ces observations prouvent que les dendrites neuronales possèdent l'équipement nécessaire à la traduction.

De manière générale, il est reconnu que la traduction locale contribuerait à la spécificité synaptique en produisant localement les protéines effectrices à la synapse et en fabriquant une étiquette synaptique (Frey and Morris, 1997; Martin et al., 1997), tel que décrit précédemment à la section 1.3. Bien entendu, ces deux mécanismes ne seraient pas indépendants mais plutôt complémentaires. D'ailleurs, des données suggèrent que ces mécanismes participeraient à l'établissement de la stabilisation de la plasticité à long-terme (Sutton and Schuman, 2005). Les travaux de Kang et Schuman (1996) furent les premiers à mettre en évidence que la synthèse locale de protéines est nécessaire pour la plasticité synaptique à long-terme. Par la suite, il a été démontré que l'induction de la LTP provoquait une augmentation rapide de la CaMKII α dans les dendrites. La vitesse de traduction de la kinase est en désaccord avec un transport somatique de la protéine et suggère fortement que la traduction a lieu dans les dendrites (Ouyang et al., 1997). Worley et collègues ont également démontré que l'ARNm Arc pouvait être traduit localement aux synapses activées (Steward et al., 1998). Néanmoins, les mécanismes associés à la traduction demeurent des phénomènes complexes et les différentes voies de signalisation qui y sont liées ainsi que l'identité des protéines impliquées restent encore peu compris.

1.5.2 RÉGULATION DE LA SYNTHÈSE LOCALE DE PROTÉINES

Les différentes fonctions des nombreuses protéines présentes dans les dendrites suggèrent qu'il existe différents types de stimulus synaptique pouvant déclencher la synthèse d'une protéine en particulier, d'où l'importance d'un contrôle extrêmement

précis des mécanismes de traduction locale. De façon générale, plusieurs mécanismes ont été mis à jour dans la régulation de la traduction. Il y a entre autre, les modifications post-transcriptionnelles des ARNm, l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction.

1.5.2.1 Polyadénylation de l'ARNm

Les modifications post-transcriptionnelles comme la création d'une coiffe-5' (*5'-cap*) et la polyadénylation jouent un rôle important dans la régulation de la traduction des ARNm eucaryotiques (Tang and Schuman, 2002). Il est maintenant connu que la présence d'une queue poly(A) améliore la stabilité de l'ARNm. Un élément commun de ces ARNm est l'existence de courtes séquences au niveau de la région 3'UTR que l'on nomme éléments cytoplasmiques de polyadénylation (*cytoplasmic polyadenylation elements* - CPEs) (Stebbins-Boaz and Richter, 1997). Ces éléments *cis* sont reconnus par une protéine, CPEB (*CPE-binding protein*), qui réprime la traduction.

1.5.2.2 La phase d'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction est une phase limitante dans la synthèse de protéines. Brièvement, le complexe d'initiation doit s'associer à la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm. Le facteur d'initiation de la traduction, eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*), est la protéine qui se lie à la coiffe. D'autres protéines s'y joindront et formeront le complexe d'initiation (Sonenberg and Gingras, 1998). La fonction de eIF4E est régulée par sa phosphorylation ainsi que par l'interaction possible avec d'autres protéines, dont CPEB (Richter and Lorenz, 2002). La présence de plusieurs facteurs de régulation de la traduction (4E-BP, mTOR, p70S6K) au niveau postsynaptique suggère que la machinerie dendritique est suffisante pour initier la synthèse de protéines (Tang et al., 2002).

1.5.2.3 La phase d'élongation de la traduction

Lors de la phase d'élongation, les acides aminés sont ajoutés au polypeptide en formation pendant que le ribosome se déplace de codon en codon au niveau de l'ARNm. Cette étape du processus de traduction serait régulée par l'activité synaptique. Une

kinase spécifique au facteur d'élongation eucaryotique eEF2 (*eukaryotic translation elongation factor 2*) phosphoryle et inactive eEF2, ce qui stoppe la phase d'élongation (Ryazanov et al., 1988). De plus, Scheetz et collègues ont démontré que la kinase eEF2 est impliquée dans la synthèse de protéines à la suite de l'activation des récepteurs NMDA (Scheetz et al., 1997, 2000). eEF2 est nécessaire au déplacement du ribosome le long de l'ARNm et la phosphorylation de eEF2 est donc associée à une baisse de synthèse protéique, possiblement en empêchant son association au ribosome. Par contre, la phosphorylation de eEF2 ne produit pas le même effet sur toutes les protéines. En effet, alors que la baisse de phospho-eEF2 coïncide avec une hausse de synthèse de protéine comme CaMKII α (Scheetz et al., 2000), l'augmentation de phospho-eEF2 est associée à la synthèse de Arc (Chotiner et al., 2003; Kanhema et al., 2006; Park et al., 2008). D'autre part, une autre étude a révélé que l'activation des récepteurs NMDA et mGluR modulerait la synthèse locale de protéines en régulant la kinase eEF2. En effet, ces travaux ont démontré que le knockdown de la kinase eEF2 affectait l'augmentation des niveaux d'ARNm Map1b induite par l'activation des récepteurs NMDA et mGluR. Ces données suggèrent que ces récepteurs peuvent se coupler à la phosphorylation de eEF2, provoquant une augmentation du taux de traduction de Map1b. (Davidkova and Carroll, 2007). Lorsque le polypeptide est complet, les ribosomes se dissocient de l'ARNm au niveau du codon stop à l'aide de facteurs de terminaison (Sutton and Schuman, 2005).

1.5.2.4 L'activité synaptique et la synthèse locale de protéines

Plusieurs travaux indiquent que l'activité synaptique peut contrôler la synthèse de protéines dans les neurones de l'hippocampe. En effet, Harris et collègues ont démontré que l'induction de la L-LTP dans des neurones de la région CA1 provoque un mouvement des polyribosomes situés à la base de l'épine vers l'épine, suggérant ainsi une augmentation de la synthèse protéique locale au site synaptique (Ostroff et al., 2002). Une étude démontre d'ailleurs que le taux dendritique de la protéine CaMKII α augmente rapidement (cinq minutes) après l'induction de la LTP au niveau des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe. Cette hausse rapide du niveau de protéine concorde avec l'hypothèse selon laquelle l'activité synaptique déclenche la

synthèse locale de la protéine CaMKII α à partir de l'ARNm localisé dans les dendrites (Ouyang et al., 1999).

L'activité synaptique peut influencer la synthèse protéique à d'autres niveaux, comme par exemple, le ciblage des ARNm. Des travaux démontrent que la distribution dendritique de l'ARNm *Arc* est contrôlée par l'activité synaptique (Steward et al., 1998). En effet, une forte stimulation induit la transcription du gène *Arc*, suivi du transport de l'ARNm au niveau dendritique. De plus, il y a accumulation dendritique de la protéine suite à une stimulation répétée (Steward et al., 1998). Cette coïncidence entre le ciblage dendritique de l'ARNm de *Arc* et l'accumulation de la protéine aux dendrites activées indique une synthèse de la protéine *Arc* localement.

L'utilisation de la protéine GFP (*green fluorescent protein*) a permis de mettre en évidence la traduction locale des ARNm. L'équipe du Dr Schuman a combiné l'ARN de la GFP avec les régions 3' et 5' de l'ARNm CaMKII α dans le but de reproduire son ciblage dendritique et sa régulation traductionnelle au niveau des neurones de l'hippocampe. Les résultats obtenus démontrent que l'ARNm couplé à la GFP peut être traduit localement suite à l'application du facteur de croissance BDNF. De plus, cette technique a permis de visualiser la synthèse de protéines en temps réel par microscopie confocale à deux photons (Aakalu et al., 2001).

1.5.3 SYNTHÈSE LOCALE DE PROTÉINES ET PLASTICITÉ SYNAPTIQUE À LONG-TERME

Comme décrit dans la section 1.3, les changements synaptiques à long-terme, comme la LTP nécessitent la transcription et la synthèse de nouvelles protéines. Tel que mentionné précédemment, le modèle classique suggère qu'après stimulation, la synapse activée envoie un message au soma, qui entraîne la transcription et la traduction de certaines protéines, qui sont par la suite envoyées à la synapse activée (Frey and Morris, 1997). Toutefois, certaines études proposent une autre alternative. En effet, les groupes de Schuman et Huber ont observé l'expression de la plasticité à long-terme (LTP et LTD mGluR-dépendante) dans des dendrites isolées dans la région CA1 de l'hippocampe. Ces résultats indiquent que la synthèse dendritique locale de protéines complètement

indépendante du soma est suffisante pour soutenir la plasticité à long-terme (Kang and Schuman, 1996; Huber et al., 2000).

La synthèse locale de protéines contribue donc directement aux changements synaptiques à long-terme. La traduction locale de ces protéines nécessite l'acheminement d'ARNm particuliers. La section suivante approfondit les caractéristiques du transport d'ARNm, mécanisme important pour la synthèse locale de protéines.

1.6 LE TRANSPORT D'ARNm

La localisation d'ARNm est un mécanisme critique lors de la différenciation cellulaire et l'embryogenèse. Plusieurs travaux d'hybridation *in situ* ont confirmé l'existence d'une localisation caractéristique d'ARNm spécifiques dans des cellules polarisées comme les levures, les oocytes, les fibroblastes et les neurones (St Johnston, 2005). Dans le système nerveux, la localisation des ARNm occupe un rôle crucial dans le développement et la plasticité synaptique. La première démonstration de l'existence de complexes de transport d'ARNm dans les neurones provient des travaux de Kosik et collègues (1996). À l'aide d'un marqueur d'ARN fluorescent (SYTO14), ils ont observé le mouvement dynamique de particules d'ARNm (Knowles et al., 1996). Par la suite, les travaux de différents laboratoires ont permis l'établissement d'un modèle général. D'une part, les protéines destinées aux axones et aux terminaisons présynaptiques sont traduites dans le corps cellulaire et transportées le long de l'axone par des organelles membranaires ou des complexes protéiques. D'autre part, bien que la majorité des protéines destinées aux dendrites et aux épines dendritiques soit acheminée à partir du corps cellulaire, un assortiment d'ARNm est transporté aux dendrites afin de supporter la traduction locale (Steward and Worley, 2001a; Pfeiffer and Huber, 2006; Schuman et al., 2006; Wells, 2006). La présente section traitera du transport, de l'importance de la localisation des ARNm dans les neurones matures et des composantes moléculaires des complexes de transport d'ARNm.

1.6.1 L'ORIGINE NUCLÉAIRE DU TRANSPORT D'ARNM

Première étape du transfert d'information génétique dans les cellules, la transcription de l'ADN en ARN se déroule dans le noyau. Toutefois, si la synthèse protéique doit avoir lieu dans un compartiment cellulaire distinct, l'ARNm doit être rapidement identifié après la transcription. En effet, on s'attend à ce que cette sélection soit faite dès que possible afin d'éviter que l'ARNm ne soit séquestré dans la machinerie traductionnelle présente à l'intérieur du corps cellulaire (Wells, 2006). La présence de protéines nucléaires dans les granules d'ARNm et les particules de transport suggèrent fortement que la formation de ces complexes a lieu dans le noyau (Farina and Singer, 2002). En effet, des études ont démontré que l'association des ARNm avec des protéines de liaison de l'ARN (*RNA binding proteins* - RBP) impliquées dans le transport survenait dans le noyau afin de former un complexe ribonucléoprotéique (RNP) (Oleynikov and Singer, 2003; Kress et al., 2004). Avant son exportation du noyau, une portion particulière de l'ARNm est reconnue par une RBP, ce qui permettrait ainsi son ciblage dendritique.

1.6.1.1 Régulation du ciblage dendritique des ARNm

La présence d'ARNm spécifiques au niveau dendritique indique que la distribution des ARNm repose davantage sur un mécanisme de transport actif par opposition à une simple diffusion dans le neurone. Ce ciblage dendritique requiert, dans la plupart des cas, un élément *cis* au niveau de l'ARNm (région particulière d'ADN ou d'ARN qui contrôle l'expression). Par exemple, la région 3' non-codante (*3'untranslated region* - 3'UTR) de l'ARNm de la CaMKII α et de la Map2 (*microtubule-associated protein 2*) est nécessaire pour leur localisation dendritique (Mayford et al., 1996; Blichenberg et al., 1999). Pour que l'ARNm soit transporté jusqu'aux dendrites, l'élément *cis* de l'ARNm doit être reconnu par une protéine (facteur *trans*). D'autres facteurs sont ajoutés lors de l'export du noyau, formant ainsi un complexe RNP (Knowles et al., 1996). Le complexe RNP s'associe par la suite à des protéines motrices et chemine le long des dendrites sur les microtubules (Knowles et al., 1996; Kanai et al., 2004; Hirokawa and Takemura, 2005). Durant le transport, les ARNm circulent dans un état de dormance afin de minimiser les erreurs spontanées de production de protéine (Krichevsky and Kosik, 2001). Finalement, un signal spécifique permettra le ciblage de l'ARNm et sa

traduction locale à la synapse activée (Wilhelm and Vale, 1993; Klann and Dever, 2004; Dahm and Kiebler, 2005; Schuman et al., 2006; Dahm et al., 2007; Martin and Ephrussi, 2009). Ainsi, un aspect important de la localisation et de la traduction des ARNm implique un mécanisme par lequel la traduction de l'ARNm est réprimée jusqu'à ce que ce dernier ait atteint sa destination.

L'accessibilité des ARN dendritiques pour la traduction implique que ces derniers soient stables et libérés de leur complexe RNP. Les facteurs *trans* et les protéines impliquées dans le transport d'ARNm sont décrits dans la section suivante.

1.6.2 DIVERSITÉ DES COMPLEXES DE TRANSPORT D'ARNm DANS LES NEURONES

Initialement décrit comme des particules de transport d'ARN servant d'intermédiaires dans le transport des ARNm (Wilhelm and Vale, 1993), l'étude de leur composition et de leur fonction a permis de définir différentes classes de complexes de transport. Deux types de complexes de transport d'ARNm sont définis selon leur association ou non aux ribosomes. Les **particules de transport d'ARNm** sont des structures macromoléculaires qui transportent les ARNm en absence de ribosomes (**Tableau 3**). Ces complexes sont composés d'ARNm, de RBP, de protéines adaptatrices liant les RBP aux protéines motrices, de protéines motrices et d'autres RBP qui participent à la répression des ARNm (Sossin and DesGroseillers, 2006). Les **granules d'ARNm**, quant à eux, contiennent en plus des éléments traductionnels comme les ribosomes. Dans ce cas-ci, les ARNm sont réprimés au stade d'élongation contrairement aux ARNm des particules de transport qui sont bloqués au stade d'initiation de la traduction (Sossin and DesGroseillers, 2006).

Les **corps P** (*processing bodies - P bodies*) sont des structures de stockage d'ARNm réprimés qui contiennent des protéines participant à la dégradation des ARNm (Sheth and Parker, 2003). Dans ces corps P, les ARNm ne sont pas associés à des ribosomes. D'ailleurs, il y a une compétition entre les corps P et les ribosomes pour la liaison à des ARNm et la répression de l'initiation de la traduction pourrait être suffisante à cibler les ARNm aux corps P (Teixeira et al., 2005). Puisque le renouvellement (*turnover*) des

ARNm semblent être important aux sites synaptiques, il est fort probable que des corps P soient présents dans les dendrites (Kedersha and Anderson, 2002).

En réponse au stress, les cellules eucaryotes reprogramment leur production d'ARNm pour s'adapter aux nouvelles conditions. Il s'ensuit un arrêt de la synthèse de protéines qui passe par la séquestration des ARNm à l'intérieur de **granules de stress** (*stress granules*). Les ARNm des granules de stress peuvent être ensuite transférés aux corps P pour être dégradés puisque ces derniers sont liés aux granules de stress (Kedersha et al., 2005). Il a été proposé que les granules de stress pourraient servir de site de triage pour la dégradation ou le stockage des ARNm (Anderson and Kedersha, 2006).

Tableau 3. Diversité des complexes de transport d'ARNm dans les neurones.

	Définitions	Composantes	Références
Corps P	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sites de répression traductionnelle et/ou dégradation de l'ARNm ▪ Machinerie RISC incluant des microARNs ▪ Aucune sous-unité ribosomale 	CPEB, Dcp1a, protéines Lsm, Rck/p54, GW182, Staufen1 , FMRP, TIA-1, TIAR,	(Kohrmann et al., 1999; Zhang et al., 2001; Anderson and Kedersha, 2006; Schrott et al., 2006; Zhang et al., 2006) (Vessey et al., 2006)
Granules de stress	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ARNm réprimés suite à une réponse de stress ▪ Classification, export d'ARNm spécifiques pour le stockage ou la traduction 	TIA-1, TIAR, Rck/p54, CPEB, PABP, G3BP, Pumilio, sous-unité ribosomale 40S Staufen1 et 2 , FMRP,	(Anderson and Kedersha, 2006; Vessey et al., 2006)
Particules de transport d'ARNm	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ARNm réprimés au stade d'initiation de la traduction ▪ Ne contient pas de ribosomes 	Staufen1 et 2 , FMRP, ZBP1, CPEB, Pumilio	(Knowles et al., 1996) (Kohrmann et al., 1999; Zhang et al., 2001; Zhang et al., 2006) (Tang et al., 2001; Huang et al., 2003) (Kanai et al., 2004)
Granules d'ARNm	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ARNm réprimés au stade d'élongation de la traduction ▪ Contient des ribosomes 	Pur α , hnRNPA2, Rck/p54,	

Tableau adapté de Kiebler et Bassell (2006), Sossin et DesGroseillers (2006).

La purification de granules d'ARNm provenant de neurones a permis de révéler quelques composantes de ces complexes de transport. D'abord, Krichevsky et Kosik (Krichevsky and Kosik, 2001) ont identifié, par centrifugation en gradient de sucrose, la présence de complexes plus gros que des polysomes contenant des ribosomes et Staufen1. D'autre part, deux études en protéomique ont identifié la composition

moléculaire des complexes de transport d'ARNm isolés de tissus neuronaux (Kanai et al., 2004; Elvira et al., 2006).

La première étude, effectuée à partir de cerveau de rat adulte, a mis à profit l'interaction entre les granules d'ARNm et la protéine kinésine KIF5 (*Kinesin superfamily* - KIFs) afin d'isoler un granule contenant des ARNm (Kanai et al., 2004). Ces travaux ont permis de démontrer que la kinésine conventionnelle est impliquée dans le transport des granules d'ARNm aux dendrites. De plus, ces travaux ont identifié de nouveaux facteurs *trans* impliqués dans la localisation des ARNm, incluant Pur- α (*Purine-rich single-stranded DNA-binding protein α*), hnRNP U (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U*) et PSF (*PTB-associated splicing factor*). Finalement, cette étude suggère que les granules d'ARNm soient composés de plusieurs RBP dont certaines ne sont pas essentielles pour le transport d'ARNm mais participeraient plutôt à la régulation de l'assemblage des RNP, la stabilité ou la traduction des ARNm.

La seconde étude a utilisé un fractionnement biochimique pour isoler une fraction riche en complexes de transport d'ARNm dans le cerveau de rat en développement (Elvira et al., 2006). Les granules identifiés contenaient des RBP, des ribosomes, des protéines motrices, l'ARNm de la β -actine et plusieurs nouvelles protéines. La composition de ces granules est légèrement différente de celle proposée par Kanai et collègues (Kanai et al., 2004). Ensemble, les résultats de ces deux études démontrent qu'il existe plusieurs types de granules d'ARNm, contenant des populations distinctes de RBP et d'ARNm, et qui pourraient répondre à différents signaux physiologiques.

Les microtubules constituent la principale voie de transport utilisée par les organelles et les complexes macromoléculaires dans les axones et les dendrites. Ces microtubules sont parcourus par des protéines motrices transportant leur cargo, soit les kinésines et les dynéines (Hirokawa, 1998; Hirokawa and Takemura, 2005). Alors que les kinésines participent au transport antérograde, les dynéines permettent un transport rétrograde vers le corps cellulaire (Hirokawa, 2006). Les complexes RNP transportés le long des dendrites se lient à la portion C-terminale de la kinésine KIF5 (Kanai et al., 2004).

Les différentes fonctions des nombreuses protéines présentes dans les dendrites suggèrent qu'il existe différents types de stimulus synaptique pouvant déclencher la synthèse d'une protéine en particulier, d'où l'importance d'un contrôle extrêmement précis des mécanismes de traduction locale.

1.6.3 LOCALISATION DENDRITIQUE DES ARNm

Quels sont les avantages de cette régulation de l'expression génique par la localisation des ARNm? Premièrement, la traduction locale des protéines évite à la cellule d'avoir à réguler l'activité respective de chacune des protéines avant qu'elles ne parviennent à leur site désigné (Martin and Ephrussi, 2009). Deuxièmement, la localisation des ARNm permet à la cellule de réguler l'expression de certains gènes de façon indépendante dans différentes régions et de générer plus rapidement des protéines dans une période de temps donné, permettant ainsi un contrôle restreint de la concentration locale de protéines (Martin and Zukin, 2006; Dahm et al., 2007). Ainsi, la traduction locale fournit un contrôle spatial mais également une économie d'énergie pour la cellule (Martin and Ephrussi, 2009).

1.6.3.1 Les ARNm localisés aux dendrites

La grande majorité des ARNm localisés dans les neurones fut identifiée dans les neurites et dans les dendrites matures (Dahm et al., 2007). Des données récentes suggèrent toutefois une localisation et une traduction locale d'ARNm dans les axones matures et en développement (Dahm et al., 2007). La présente section décrit les ARNm qui sont localisés et traduits dans les dendrites.

β -actine. Le transport ainsi que la traduction locale des transcrits de la β -actine dans les neurones seraient indispensables à divers stades du développement : le guidage axonale, le développement/maturation des synapses et des épines dendritiques (Eom et al., 2003; Leung et al., 2006). Dans le neurone de mammifère, l'ARNm β -actine est reconnu par la protéine *zipcode binding-protein 1* (ZBP1) (Zhang et al., 2001). Dans le neurone en développement, ZBP1 se retrouve dans le cône de croissance, où la traduction locale de β -actine est indispensable pour l'orientation du cône (Zhang et al., 2001; Yao et al.,

2006; Lin and Holt, 2007). Les mécanismes sous-jacents à la localisation de l'ARNm dans les dendrites matures ainsi que son rôle au niveau des sites postsynaptiques demeurent encore peu connus. Toutefois, il a été démontré que la suppression de l'expression de ZBP1 dans des neurones en culture affectait la croissance des filopodes induite par le BDNF (Eom et al., 2003). De plus, un facteur *trans* qui reconnaît l'ARNm pourrait être la RBP Staufen2 puisqu'il a été démontré que la régulation à la baisse de Staufen2 provoque une diminution importante des niveaux dendritiques de l'ARNm β -actine dans les neurones en culture (Goetze et al., 2006).

CaMKII α . La protéine CaMKII α est retrouvée dans plusieurs tissus et présente un fort niveau d'expression dans les neurones. Cette protéine est formée des sous-unités α et β , mais seulement l'ARNm encodant la sous-unité α est détecté dans les dendrites. Des expériences effectuées avec des souris transgéniques ont permis de découvrir que la région 3'UTR de CaMKII α est nécessaire au ciblage dendritique de l'ARNm (Mori et al., 2000; Blichenberg et al., 2001). Les conséquences d'une diminution de la localisation de l'ARNm de la CaMKII α ont été étudiées dans un modèle de souris exprimant une CaMKII α mutée sans la région 3'UTR de la protéine. Les résultats démontrent une importante diminution de la protéine au niveau de la PSD ainsi qu'une réduction significative de la phase tardive de la LTP, accompagnée de déficits mnésiques (Miller et al., 2002). De ce fait, la localisation dendritique de l'ARNm de la CaMKII α permettrait de contrôler la distribution et de réguler les niveaux d'expression de la protéine de façon indépendante dans les épines dendritiques. Les RBP CPEB et Staufen colocalisent avec l'ARNm de la CaMKII α , suggérant un rôle comme facteur *trans* responsable de la localisation de ce transcrit.

Map2. L'ARNm encodant la protéine Map2 fut l'un des premiers ARNm identifié dans les dendrites. La protéine Map2 aurait pour fonction de stabiliser le cytosquelette dendritique et plusieurs isoformes sont exprimés dans les neurones (Garner et al., 1988). Contrairement à l'ARNm de la CaMKII α qui se retrouve au niveau des dendrites distales, les transcrits de la Map2 sont davantage restreints dans les régions proximales *in vivo* (Steward and Wallace, 1995).

Map1b. Map1b est une protéine impliquée dans la modulation des microtubules, dans l'extension de neurites et dans le développement des synapses (Gonzalez-Billault et al., 2004). Il a été démontré que la LTD induite par le DHPG stimule la synthèse de Map1b, qui, en se liant à la protéine d'ancrage GRIP1, favorise l'internalisation des récepteurs AMPA (Davidkova and Carroll, 2007). Des données suggèrent que l'ARNm de la Map1b serait une cible de la protéine FMRP (*Fragile X mental retardation protein*). En effet, des études ont démontré que FMRP peut lier l'ARNm de la Map1b *in vitro* (Darnell et al., 2001; Ramos et al., 2003) et *in vivo* (Zalfa et al., 2003; Lu et al., 2004). L'ARNm de la Map1b se retrouve également dans des granules d'ARN contenant la protéine FMRP, des ribosomes et de l'ARN ribosomal (Antar et al., 2005).

Arc. Arc est une protéine qui interagit avec le cytosquelette neuronal. Dans les conditions de base, les niveaux de Arc sont plutôt bas, mais sont fortement augmentés suite à une stimulation électrique. Ceci permet à l'ARNm d'être localisé rapidement dans les dendrites et de s'accumuler aux sites d'activation (Lyford et al., 1995; Steward et al., 1998). Ce ciblage dendritique nécessite l'activation des récepteurs NMDA (Steward and Worley, 2001b) et suggère que la synthèse de la protéine aurait lieu aux sites postsynaptiques. De plus, Arc participerait aux changements structuraux et fonctionnels à la base de processus cognitifs comme la formation de la mémoire. Ces observations suggèrent que la protéine joue un rôle essentiel dans la stabilisation de la plasticité dépendante de l'activité au niveau de l'hippocampe (Guzowski et al., 2000).

1.6.4 PROTÉINES LIANT L'ARNm

Les facteurs *trans*, généralement des protéines, reconnaissent un code dans la séquence *cis* des ARNm et forment un complexe RNP qui est important pour le transport et/ou la localisation des ARNm (Kindler et al., 2005). De plus, ces facteurs sont capables de réguler à la hausse ou à la baisse les taux de traduction dendritique (Wells, 2006). L'identification de ces facteurs *trans* impliqués dans le trafic des ARNm provient de deux différents types d'études : l'échantillonnage génétique des gènes impliqués dans la localisation des ARNm et la purification par affinité de protéines qui se lient aux

éléments de localisation. FMRP, ZBP, CPEB et Staufen sont les principaux facteurs *trans* mis au jour au cours des dernières années.

1.6.4.1 FMRP

Des mutations de la protéine FMRP sont associées à la forme de retard mental la plus répandue, le syndrome Fragile X du retard mental (Garber et al., 2006). FMRP est une RBP impliquée dans la régulation de la traduction et le trafic d'ARNm dans les dendrites (Zalfa et al., 2006). FMRP est transportée le long des dendrites suite à l'activation des mGluR (Antar et al., 2004), mais son rôle dans la localisation des ARNm demeure mal compris. Il est toutefois connu que FMRP s'associe à des polyribosomes ainsi qu'à la kinésine, permettant la liaison entre les ARNm et les mécanismes de transport dépendants des microtubules (Dictenberg et al., 2008). FMRP est particulièrement importante pour la régulation de la traduction locale dans les dendrites. En effet, la liaison de FMRP à certains ARNm serait responsable de l'inhibition de leur traduction (Laggerbauer et al., 2001; Li et al., 2001). D'ailleurs, au niveau de la synapse, il a été proposé que l'activation des récepteurs mGluR induirait une augmentation de la synthèse de FMRP et donc une importante baisse de la traduction de ces ARNm (Bear et al., 2004). Ce postulat est appuyé par des études effectuées dans les souris knock-out *FMRI*. Dans ce modèle, l'amplitude de la LTD dépendante des mGluR est augmentée et la LTD n'est plus dépendante de la synthèse locale de protéines (Huber et al., 2002). Ces données suggèrent donc qu'une dé-répression des ARNm initialement réprimés par FMRP est indispensable pour cette forme de plasticité synaptique (Nosyreva and Huber, 2006).

FMRP est un élément important dans la régulation de la synthèse protéique puisque la protéine est elle-même modulée par l'induction de la LTD dépendante des mGluR mais aussi parce qu'elle est responsable de la synthèse de protéines importantes dans la plasticité synaptique comme les protéines formant les sous-unités des récepteurs AMPA GluR1/GluR2 et les protéines CaMKII α (Muddashetty et al., 2007) PSD-95 (Todd et al., 2003) et Arc (Narayanan et al., 2007). La synthèse de ces protéines a un impact direct

sur l'endocytose des récepteurs AMPA et sur la réorganisation du cytosquelette d'actine (Gladding et al., 2009).

1.6.4.2 ZBP

Les méthodes de purification par affinité chez des fibroblastes d'embryons de poulet ont permis l'identification d'une protéine, ZBP1 qui se lie à la région 3'UTR de l'ARNm de la β -actine (Ross et al., 1997) et qui se retrouve également dans les neurones (Zhang et al., 2001). Dans le neurone mature ZBP1 joue un rôle dans le transport et le contrôle de la traduction de l'ARNm (Tiruchinapalli et al., 2003). Il a été démontré que ZBP réprime l'initiation de la traduction de l'ARNm de la β -actine (Huttelmaier et al., 2005), et que la protéine est essentielle pour le transport de cet ARNm dans les neurones (Zhang et al., 2001). ZBP1 participe également à la régulation de la traduction de l'ARNm de la β -actine dans le cône de croissance et à l'orientation du cône de croissance en réponse à l'application de BDNF (Zhang et al., 2001; Yao et al., 2006; Lin and Holt, 2007).

1.6.4.3 CPEB

CPEB (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein*) est une protéine de liaison à l'élément cytoplasmique de polyadénylation de l'ARNm (*cytoplasmic polyadenylation element* - CPE). CPEB a tout d'abord été identifiée chez les oocytes de xénope, dans lesquels la protéine régule la polyadénylation de l'ARNm et la traduction (Hake and Richter, 1994). Chez les vertébrés, les protéines CPEB1-4 se retrouvent dans plusieurs régions du cerveau, incluant l'hippocampe, le cervelet et le cortex, et semblent occuper des fonctions distinctes (Mendez and Richter, 2001). CPEB1 se situe aux synapses et est également une composante de la PSD (Wu et al., 1998). CPEB1 régule la traduction induite par la polyadénylation cytoplasmique et le transport des ARNm contenant un CPE (Huang et al., 2003; Richter, 2007). La liaison de CPEB1 à l'ARNm inhibe la traduction de par son interaction avec la protéine eIF4E et la phosphorylation de CPEB1 permet l'élongation de la queue poly(A) (Barnard et al., 2004). Il a également été démontré que les récepteurs NMDA et mGluR activent la traduction dépendante de CPEB1 de différents ARNm dans les neurones de l'hippocampe, suggérant que l'activité synaptique contrôle la synthèse de protéines dépendante de CPEB dans les dendrites

(Wells et al., 2001; Huang et al., 2003; Shin et al., 2004). D'ailleurs, la suppression de l'expression de CPEB1 produit un effet spécifique sur la LTP induite par stimulation en bouffée theta dans l'hippocampe (Alarcon et al., 2004). De plus, certaines formes d'apprentissage et de mémoire dépendantes de l'hippocampe sont grandement affectées par la perte de CPEB1 (Berger-Sweeney et al., 2006; McEvoy et al., 2007), suggérant que CPEB1 occupe une fonction importante dans certains types de plasticité synaptique et mémoire.

1.6.4.4 Staufen

Staufen est probablement le facteur *trans* le mieux caractérisé de par son étroite association au trafic des ARNm dans les neurones (Kiebler and DesGroseillers, 2000). La prochaine section résume la structure et les fonctions de Staufen.

1.7 LA PROTÉINE STAUFEN

La protéine Staufen (Stau) fut initialement identifiée chez la drosophile *D. melanogaster* (St Johnston et al., 1991). Le gène *Staufen* fut désigné comme élément essentiel dans la formation de l'axe antéropostérieur chez la drosophile (Schupbach and Wieschaus, 1986) et représentait le premier facteur protéique identifié comme étant déterminant pour la localisation de l'ARNm (St Johnston, 1995). La protéine fut clonée chez le mammifère par plusieurs groupes (DesGroseillers and Lemieux, 1996; Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999). Staufen est maintenant reconnue et étudiée pour son rôle dans le transport et la localisation des ARNm tant chez la drosophile que chez le mammifère. Cette section portera sur la structure et les fonctions de Staufen.

1.7.1 LES PROTÉINES STAUFEN 1 ET STAUFEN 2

Il existe deux différentes protéines Staufen qui sont codées par des gènes distincts, Staufen 1 (Stau1) et Staufen 2 (Stau2). Chez l'homme, le gène de Stau1 se situe sur le chromosome 20 (DesGroseillers and Lemieux, 1996) et le gène Stau2 sur le chromosome 8 (Buchner et al., 1999). L'épissage alternatif de ces gènes engendre 2

isoformes Stau1 (Stau1⁶³ et Stau1⁵⁵) et 4 isoformes Stau2 (Stau2⁶², Stau2⁵⁹, Stau2⁵⁶ et Stau2⁵²) (**Figure 11**), identifiés selon leur poids moléculaire (Duchaine et al., 2002; Mallardo et al., 2003; Monshausen et al., 2004). Les deux protéines partagent entre 50% et 75% d'homologie dans leur séquence protéique (Furic et al., 2008).

1.7.1.1 Organisation structure-fonction

Une analyse détaillée de la structure primaire de Staufen permet d'identifier un domaine protéique ayant une capacité de liaison à l'ARN double-brin (*double-stranded RNA-binding domain* - dsRBD) (**Figure 11**) (St Johnston et al., 1992). Ces domaines comportent environ 65-70 acides aminés, reconnaissent spécifiquement les structures d'ARN double-brin et sont incapables de se lier à l'ARN simple-brin ou à l'ADN (simple ou double-brin). La composition tridimensionnelle du dsRBD possède une structure de type α - β - β - β - α , où les branches β sont regroupées en feuillets plissés antiparallèles et les hélices de type α sont compactées sur l'une des faces du feuillet β , faisant contact en trois endroits avec le duplex d'ARN (Kharrat et al., 1995) (**Figure 12**). Une série de boucles, de longueurs inégales relie ces motifs de structures secondaires. Il existe deux types de dsRBD. Le dsRBD de type A respecte une séquence consensus sur toute la longueur du domaine, tandis que l'homologie du dsRBD de type B n'est conservé avec le consensus que dans sa portion C-terminale. D'ailleurs, les domaines de type B ne lient habituellement pas l'ARN double-brin de façon efficace et contribueraient davantage à stabiliser la liaison à l'ARN ou aux partenaires protéiques (Doyle and Jantsch, 2003).

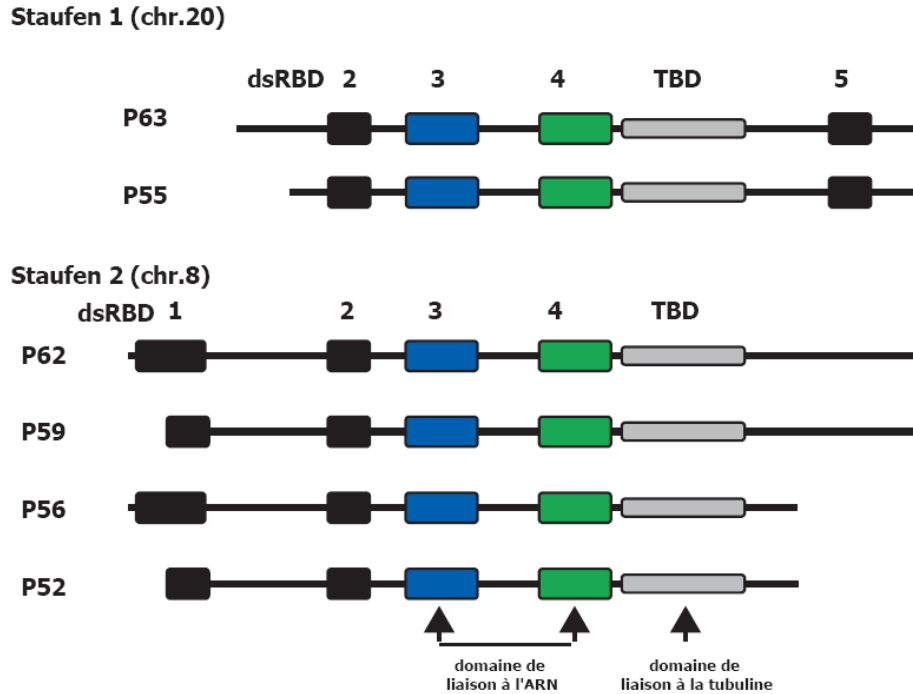


Figure 11. Les isoformes de la protéine Staufen. Représentation schématique des isoformes des protéines Staufen 1 et 2. Stau1 et Stau2 sont composées de domaines liant l'ARN (dsRBD) et d'un domaine liant la tubuline (TBD). Figure adaptée de Miki et al. (2005) et Furic et al. (2008).

Chez la drosophile, Staufen possède cinq domaines liant l'ARN double-brin (numérotés de 1 à 5); trois de pleine longueur de type A (1,3,4) et deux demi domaines de type B (2,5) (St Johnston et al., 1992; Wickham et al., 1999). Lors de l'identification du gène de Stau1 chez le mammifère, il fut constaté que la protéine ne possédait que quatre des cinq dsRBD présents chez la drosophile. Quant à Stau2, certains isoformes contiennent un dsRBD supplémentaire correspondant au dsRBD1 de la protéine chez la drosophile. De plus, on retrouve également dans les deux protéines, chez le mammifère, un domaine de liaison à la tubuline (TBD) (Wickham et al., 1999) (**Figure 11**). Le dsRBD3 est indispensable pour la liaison de l'ARN double-brin et le dsRBD4 a une faible activité de liaison (Wickham et al., 1999).

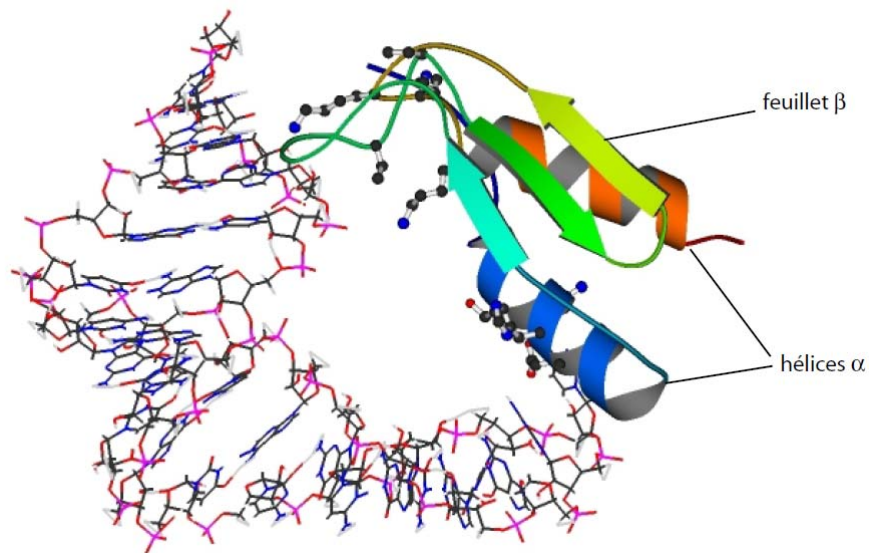


Figure 12. Configuration du dsRBD3 de Staufen. L'hélice α interagit avec l'ARN qui chapeaute l'hélice. Figure adaptée de Ramos et al. (2000).

1.7.1.2 Distribution intracellulaire

Contrairement à Stau2 qui est majoritairement exprimée dans le cerveau, Stau1 se retrouve dans une grande diversité de tissus et de types cellulaires (Wickham et al., 1999; Duchaine et al., 2002). Dans les cellules non polarisées, Stau1 se situe principalement au niveau du cytoplasme avec un faible marquage nucléaire. Stau1 est également associée au cytosquelette ainsi qu'à des structures vésiculaires et peut se retrouver dans le réticulum endoplasmique rugueux (Wickham et al., 1999). Dans les neurones, la distribution des deux protéines est somatodendritique (Kiebler et al., 1999; Tang et al., 2001; Duchaine et al., 2002). De plus, il a été démontré qu'au niveau dendritique, elles se retrouvent à proximité des synapses. Stau1 et Stau2 se présentent sous forme de granules ou particules mobiles associés aux microtubules (Kiebler et al., 1999; Duchaine et al., 2002) et colocalisent avec l'ARNm (Mallardo et al., 2003). DesGroseillers et collègues (2002) ont cependant confirmé que Stau1 et Stau2 ne colocalisent pas au niveau des dendrites distales, suggérant qu'elles forment dans certains cas des complexes de transport distincts.

Bien que Staufen se retrouve de façon prédominante au niveau du cytoplasme, des études récentes ont observé la présence de Stau1 (Le et al., 2000) et Stau2 (Macchi et al.,

2004) dans le nucléole et le noyau. En effet, une étude détaillée de la séquence protéique a révélé que la protéine possède un signal de localisation nucléaire (*nuclear localization signal* - NLS) fonctionnel à la fin du dsRBD3 (Martel et al., 2006). Ces dernières données suggèrent que Staufen pourrait agir en tant que protéine adaptée à l'export de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme.

1.7.2 LES PARTENAIRES PROTÉIQUES

Plusieurs équipes se sont penchées sur la composition des RNP ainsi que sur l'interaction de Staufen avec des partenaires potentiels. Dans un premier temps, des études en microscopie électronique ont montré, en culture neuronale, que Stau1 fait partie de larges granules d'ARN contenant des ribosomes (Krichevsky and Kosik, 2001). De plus, Stau1 fait partie de complexes regroupant Pura, FMRP, et myosin Va (Ohashi et al., 2002). Dernièrement, des travaux effectués chez la souris ont corroboré ces résultats puisqu'ils ont identifié Stau1, Pura et FMRP en tant que constituant des RNP incluant la kinésine conventionnelle (KIF5) (Kanai et al., 2004). De plus, des études en protéomique sur les RNP contenant Stau1 ont révélé que ces RNP contiennent des ribosomes, des éléments du cytosquelette, des moteurs nucléaires ainsi que des protéines pouvant réguler la traduction de certains ARNm (Brendel et al., 2004; Villace et al., 2004). Les protéines identifiées sont présentées dans le **Tableau 4**.

Quant à Stau2, il a été démontré par hybridation *in situ* et par immunohistochimie, que les RNP contenant celle-ci regroupent la protéine motrice kinésine et Map2 (Jeong et al., 2007). À la lumière de ces résultats, nous pouvons affirmer que Stau1 et Stau2 font partie de complexes regroupant les éléments des RNP impliqués dans le transport et la régulation de la traduction d'ARNm.

Tableau 4. Protéines associées avec les complexes ribonucléoprotéiques contenant Stau1 chez l'homme.

Protéine	Identification technique Spectrométrie de masse	Western Blot	Immunofluorescence en microscopie confocale
β -5 Tubuline	+ (187 ^a)	+	+
α -Tubuline	-	+	+
Tau	-	+	+
Staufen2 h	+ (273)	+	+
β -Actine	-	+	+
Myosine (chaîne lourde)	+ (103)	nt	nt
Hélicase A Arn (dépendante de l'ARN)	+ (139)	+	+
Nucléoline	+ (86)	+	+
hnRNP U	+ (91)	-	-
Protéine liant poly-A	+ (107)	+	+
α -Internexine	+ (77)	+	+
Dynéine (chaîne intermédiaire)	+	+	nt
Kinésine	-	+	+
Protéine kinase II ρ -associée	+ (74)	nt	nt
Ras GAP	+ (74)	nt	nt
Rac1	-	+	+
Cdc42	-	+	+
Protéine IQGAP1	+ (87)	+	+
FMRP	-	+	+
Protéine ribosomale P0	+(120)	nt	nt
Protéine ribosomale S4	+(150)	nt	nt
Protéine ribosomale S6	+(120)	+	+
Protéine ribosomale L6	+(103)	nt	nt
Protéine ribosomale L28	+(116)	+	+

^a Score d'identification. Tableau adapté de Villace et al. (2004).

1.7.3 LES RÔLES

Plusieurs études ont démontré l'importance de Staufén pour la liaison et le transport des ARNm dans les oocytes de la drosophile (St Johnston et al., 1991) et les neurones de mammifère (Kiebler et al., 1999; Tang et al., 2001). Chez la drosophile, Staufén est nécessaire pour le transport et la localisation des transcrits *oskar* et *bicoid* dans l'établissement des pôles antérieur et postérieur, respectivement (St Johnston et al., 1991). La protéine est aussi exprimée durant le développement et participe à la localisation du messenger *prospero* lors de la division asymétrique des neuroblastes, et permet de lever la répression traductionnelle de l'ARNm, une fois ce dernier localisé (Broadus et al., 1998; Micklem et al., 2000).

Stau1 semble également être impliquée dans le «*Staufen-mediated decay*» (SMD), qui consiste en un mécanisme de régulation post-transcriptionnel des gènes (Kim et al., 2005). Lorsque Stau1 et un facteur du «*nonsense mediated mRNA decay*» (NMD) Upf1 sont liés au 3'UTR d'un transcrit, ils peuvent déclencher la dégradation de cet ARNm. De plus, il a été observé que la présence d'un site de liaison à Stau1 (*Staufen binding-site* - SBS) dans le 3'UTR d'un ARNm en diminue la stabilité.

L'équipe du Dr. DesGroseillers a démontré que Stau1 peut stimuler la traduction d'un ARNm lorsqu'il lie celui-ci dans sa région 5' UTR (Dugre-Brisson et al., 2005). Stau1 n'agirait pas sur la régulation traductionnelle générale mais participerait à la traduction de transcrits spécifiques, de part son interaction directe à leur extrémité 5'UTR. En effet, cette étude révèle une importante corrélation entre la liaison de Stau1 avec l'extrémité 5' d'un ARN et l'augmentation de la traduction de celui-ci. Ces travaux suggèrent que l'expression et la liaison de Stau1 sont des éléments importants dans la régulation traductionnelle de certains transcrits et que Stau1 contribue également à la dé-répression de la traduction une fois que l'ARNm est localisé.

En plus de ses fonctions cytoplasmiques, *Staufen* pourrait aussi avoir un rôle dans l'export nucléaire de l'ARNm (Kiebler et al., 2005). Deux études indépendantes ont proposé que Stau2 aurait la capacité d'entrer dans le noyau cellulaire et d'agir en tant que protéine «navette» nucléocytoplasmique (Macchi et al., 2004; Miki and Yoneda, 2004). L'étude de la séquence protéique révèle que Stau2 contient un signal de localisation nucléaire (NLS) entre les régions RBD3 et RBD4 (Macchi et al., 2004). Alors que le NLS permettrait l'import de Stau2 dans le noyau, l'export de la protéine serait effectué par une voie impliquant l'exportine-5, un facteur responsable de l'export des ARNt, des microARN et des RBP (Brownawell and Macara, 2002; Kim, 2004). L'hypothèse suggérée par ces études propose que Stau2 lierait l'ARNm dans le noyau et que cette RBP serait transportée hors du noyau dans des granules d'ARN. Stau1, qui se retrouve principalement dans le cytoplasme, a également été observée dans le noyau (Le et al., 2000), suggérant que Stau1 aussi agirait comme une protéine «navette» nucléocytoplasmique.

La plasticité synaptique à long-terme influence la localisation dendritique des ARNm (St Johnston, 1995; Knowles et al., 1996; Kiebler and DesGroseillers, 2000; Steward and Schuman, 2001) et l'interruption de cette localisation particulière dans les cellules pyramidales de l'hippocampe bloque la LTP et la formation de la mémoire (St Johnston, 1995; Miller et al., 2002). Dans les neurones sensoriels de l'aplysie, la distribution de l'ARNm syntaxine est modifiée lors de la LTF induite par l'application de sérotonine. Une étude a démontré que Staufén participe à ce mécanisme (Hu et al., 2003). En effet, en bloquant l'interaction entre Staufén et la région 3'UTR de l'ARNm syntaxine, la distribution de l'ARNm syntaxine et la LTF sont affectées (Liu et al., 2006).

Dans les neurones de mammifères, Staufén est détectée sous forme de complexes RNP mobiles dans les dendrites (Kiebler et al., 1999). Des travaux de microscopie électronique démontrant une colocalisation avec un marqueur fluorescent d'acides ribonucléiques, le SYTO14, ont confirmé la présence de Staufén dans les granules d'ARN (Krichevsky and Kosik, 2001; Tang et al., 2001). Ces recherches suggèrent un rôle pour Staufén dans le transport d'ARNm dans les neurones. Ce rôle est particulièrement important puisque la localisation des ARNm à la synapse ferait partie d'un mécanisme permettant le maintien de la plasticité synaptique et l'établissement de la mémoire (Kiebler and DesGroseillers, 2000; Miller et al., 2002; Martin and Zukin, 2006; Pfeiffer and Huber, 2006; Sutton and Schuman, 2006). Une première étude effectuée sur des neurones en culture de rat a permis d'illustrer le phénomène de transport d'ARNm dans les dendrites (Tang et al., 2001). Les résultats obtenus démontrent que la surexpression de Stau2 augmente la quantité d'ARNm présente dans les dendrites tandis que l'expression d'une version mutée de Stau2 la diminue grandement. Une seconde étude particulièrement intéressante, faite chez la souris rapporte des résultats similaires pour Stau1 (Kanai et al., 2004). L'équipe a utilisé une construction contenant le rapporteur 3'UTR de CaMKII α , qui est un messager reconnu pour sa localisation synaptique. Cette étude précise l'importance qu'occupe Stau1 pour le transport de cet ARNm puisque la suppression de l'expression de Stau1 par l'utilisation d'un ARN interférant dans les neurones supprime la présence du rapporteur 3'UTR de CaMKII α dans les dendrites. Une autre étude a également démontré

l'implication de Staufen dans le transport d'ARNm. Macchi et collaborateurs (2008) ont utilisé une souris mutante qui n'exprime pas le domaine fonctionnel dsRBD3 de Staufen, rendant ainsi impossible la liaison de la protéine à l'ARNm. Ils ont remarqué que le transport des RNP contenant Stau1 et l'ARN β -actine était grandement affecté. De plus, Kiebler et collègues (2007) ont obtenu des résultats semblables suite à la suppression de l'expression de Stau2 en culture neuronale.

Certaines études suggèrent une implication de Staufen dans les mécanismes mnésiques. Chez la drosophile, des travaux ont clairement démontré que Staufen joue un rôle dans la mémoire (Dubnau et al., 2003). Un entraînement olfactif espacé (*spaced training*) permet l'établissement d'une mémoire à long-terme contrairement à un entraînement continu (*massed training*). Chez la drosophile exprimant une forme mutante de Staufen sensible à la température, la mémoire olfactive était déficiente lors d'un entraînement espacé effectué à une température limitant l'expression de Staufen. Ces résultats suggèrent l'importance de Staufen dans le transport d'ARNm impliqués dans l'établissement de la mémoire.

1.7.4 LES ARNm ASSOCIÉS

Tel que mentionné précédemment, il a été démontré chez la drosophile que la localisation des transcrits *bicoid* et *oskar* aux pôles antérieur et postérieur, respectivement est dépendante de Staufen (St Johnston et al., 1991). Staufen est également nécessaire pour la localisation de l'ARNm *prospero* lors de la division asymétrique de neuroblastes (Broadus et al., 1998).

Récemment, des ARNm associés à Stau1 et/ou Stau2 dans les RNP ont été identifiés chez les mammifères par l'équipe du Dr DesGroseillers (Furic et al., 2008). Les ARNm associés à Staufen 1 et 2 dans des cellules humaines HEK293T ont été identifiés à l'aide de micropuces d'ADN. La grande majorité des ARNm identifiés encodent des protéines impliquées dans la régulation des métabolisme et processus cellulaires, du transport, de la transcription et d'activités catalytiques (Furic et al., 2008). Environ 7% des messagers

exprimés dans la lignée HEK293T sont associés à Stau1. De plus, près de 40% de ces ARNm sont également liés à Stau2.

Une étude faisant appel à une approche génomique et effectuée dans le même laboratoire a identifié 1780 ARNm qui se retrouvent dans les RNP-Stau2 dans des extraits de cerveau de rat embryonnaire (Maher-Laporte and DesGroseillers, 2010). Ces ARNm encodent principalement des protéines impliquées dans des processus cellulaires tels que des modifications post-transcriptionnelles, le trafic intracellulaire et la traduction. Après comparaison entre les deux études, environ 22% des ARNm associés à Stau2 chez le mammifère sont également présents dans les RNP-Stau2 de cellules humaines HEK293T. Ce faible pourcentage d'homologie suggère que l'étude a caractérisé une sous-population particulière d'ARNm associés à Stau2 et exprimés dans le cerveau ou que les sous-populations d'ARNm associés à Stau2 diffèrent selon le type de tissu analysé.

Ces observations indiquent que malgré une importante homologie entre les deux protéines, Stau1 et Stau2 font partie de populations distinctes de RNP et qu'elles sont associées à différents ARNm.

CHAPITRE II. BUT DE LA THÈSE

2.1 PROBLÉMATIQUE

Le rôle des protéines Staufen dans le transport, la localisation et dans la régulation de la traduction de certains ARNm est bien établi. Toutefois, leurs rôles précis dans la plasticité synaptique demeurent encore inconnus. Dans cette optique, l'objectif général de cette thèse est de déterminer l'implication des protéines Staufen 1 et 2 dans la plasticité synaptique des cellules pyramidales de l'hippocampe.

2.2 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Puisqu'il a été démontré que dans les neurones, Staufen1 se retrouve dans des granules ou particules d'ARN qui se déplacent le long des microtubules du noyau aux dendrites et que la localisation dendritique et la traduction locale des ARNm pourraient être impliquées dans la plasticité synaptique et la mémoire, le premier projet de cette thèse (**Chapitre III**) visait trois objectifs. Premièrement, déterminer le rôle de Staufen1 dans la plasticité synaptique à long-terme, comme la LTP et la LTD en utilisant une technique de suppression de l'expression de la protéine Staufen1 (*small interfering RNA* - siRNA) dans les cellules pyramidales CA1 de l'hippocampe.

Le deuxième objectif était d'établir si une inhibition de l'expression de Staufen1 dans les neurones est associée à des changements d'ordre fonctionnel aux synapses excitatrices unitaires. Des enregistrements de mEPSCs combinés à une technique de suppression de l'expression de la protéine Staufen1 (siRNA) dans les cellules pyramidales de l'hippocampe ont été utilisés.

Finalement, puisque les synapses sont établies au niveau des épines dendritiques, et que la densité et la morphologie des épines dendritiques sont un indice du nombre et des

propriétés synaptiques, le troisième objectif était d'évaluer, en microscopie confocale, les modifications associées à la morphologie ou la densité des épines dendritiques suite à la suppression de l'expression de Stau1 dans les cellules pyramidales de l'hippocampe.

Puisque les résultats du premier projet ont démontré que Staufen1 était impliquée dans la L-LTP et dans le maintien de la fonction synaptique, le but du deuxième projet (**Chapitre IV**) était de déterminer si les changements morphologiques des épines dendritiques induits par la suppression de l'expression de Staufen1 pouvaient être reliés à une plasticité synaptique endogène dépendante des récepteurs NMDA. Nous avons bloqué la plasticité synaptique dépendante des récepteurs NMDA et avons déterminé l'effet de la suppression de l'expression de Stau1 sur les changements morphologiques des épines dendritiques ainsi que sur la plasticité synaptique.

Le troisième projet de cette thèse visait à distinguer le rôle des deux différents isoformes de Staufen (Stau1 et Stau2). Puisqu'il a été démontré que ces derniers se retrouvent dans différents granules d'ARN, et donc qu'ils seraient associés au transport de différents ARNm, le premier objectif était de déterminer si Stau1 et Stau2 ont des rôles spécifiques dans la plasticité synaptique à long-terme, en évaluant leur implication dans la L-LTP, la L-LTD ainsi que dans la morphologie des épines dendritiques.

Puisque nos résultats ont démontré que le knockdown de Stau2 bloquait la LTD dépendante des mGluR, le second objectif était de déterminer si l'ARNm de la Map1b, un transcrit spécifique à la LTD dépendante des mGluR est transporté et/ou régulé par Stau2 dans des neurones d'hippocampe en culture. Pour ce faire, nous avons utilisé une construction contenant le rapporteur 3'UTR de l'ARNm de la Map1b. Des sites de liaison pour la protéine MS2 couplée à une protéine fluorescente rouge (*mCherry*) ont été ajoutés à l'intérieur du rapporteur, ce qui nous permettait de visualiser le transcrit en microscopie confocale. Nous avons étudié la colocalisation de l'ARNm (rouge) et d'une construction Stau2-YFP (vert) dans différentes conditions : suite à la suppression de l'expression de Stau2 (1), après l'induction de la LTD dépendante des mGluR (2), et après l'induction de la LTD dépendante des mGluR sans l'expression de Stau2 (3).

CHAPITRE III. PREMIÈRE SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

3.1 PRÉAMBULE

Ce chapitre contient la publication suivante :

Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells

Geneviève Lebeau¹, Marjolaine Maher-Laporte², Lisa Topolnik^{1,3}, Charles E. Laurent¹, Wayne Sossin⁴, Luc DesGroseillers² and Jean-Claude Lacaille^{1*}.

Publié dans: *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 28, No 9, May 2008, p2896-2907

Pour cette première publication, j'ai réalisé les expériences d'électrophysiologie (excluant les enregistrements de *patch clamp*) et de microscopie confocale. J'ai également effectué toute l'analyse des résultats, la rédaction, la préparation des figures et la soumission de l'article.

3.2 ABSTRACT

Staufen1 is an RNA-binding protein involved in transport, localization, decay and translational control of mRNA. In neurons, it is present in cell bodies and also in RNA granules which are transported along dendrites. Dendritic mRNA localization might be involved in long-term synaptic plasticity and memory. To determine the role of Stau1 in synaptic function, we examined the effects of Stau1 down-regulation in hippocampal slice cultures using siRNA. Biolistic transfection of Stau1 siRNA resulted in selective down-regulation of Stau1 in slice cultures. Consistent with a role of Stau1 in transporting mRNAs required for synaptic plasticity, Stau1 down-regulation impaired

the late form of chemically-induced long-term potentiation (L-LTP) without affecting early-LTP, mGluR1/5-mediated long-term depression or basal evoked synaptic transmission. Stau1 down-regulation decreased the amplitude and frequency of mEPSCs suggesting a role in maintaining efficacy at hippocampal synapses. At the cellular level, Stau1 down-regulation shifted spine shape from regular to elongated spines, without changes in spine density. The change in spine shape could be rescued by an RNAi resistant Stau1 isoform. Therefore, Stau1 is important for processing and/or transporting in dendrites mRNAs that are critical in regulation of synaptic strength and maintenance of functional connectivity changes underlying hippocampal-dependent learning and memory.

3.3 INTRODUCTION

Staufen is a double-stranded RNA (dsRNA)-binding protein that was first characterized in *Drosophila*, where it is involved in transport and localization of *bicoid* and *oskar* mRNAs in oocytes, and contributes to localization of *prospero* mRNA during neuroblast development (St Johnston, 1995; Broadus et al., 1998; Matsuzaki et al., 1998). In mammals, two different homologues (Stau1 and Stau2) have been identified (DesGroseillers and Lemieux, 1996; Buchner et al., 1999). Stau1 is ubiquitously expressed in mammals (Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999; Duchaine et al., 2002). Whereas Stau2 is found in several tissues, it is nevertheless mainly expressed in the brain (Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999; Duchaine et al., 2002). In neurites, the two paralogues of Staufen are found in distinct RNA granules, suggesting unique functions for each protein (Duchaine et al., 2002; Thomas et al., 2005). A role for Staufen proteins in mRNA transport and translational control has been proposed since they are present in RNA granules that migrate within the dendrites of hippocampal neurons in a microtubule-dependent way (Kiebler et al., 1999; Kohrmann et al., 1999; Krichevsky and Kosik, 2001) and regulate transport of mRNA (Tang et al., 2001; Kanai et al., 2004). Staufen proteins also associated with polysomes (Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999; Duchaine et al., 2002; Luo et al., 2002), and Stau1 was shown to

be involved in the translational control of mRNAs (Dugre-Brisson et al., 2005). Recently, Stau1 was shown to be involved in a specific mRNA decay pathway (Kim et al., 2005), suggesting an additional role in posttranscriptional gene control.

Localization of mRNA in neuronal dendrites has been proposed as a mechanism for establishing synaptic memory and maintaining synaptic plasticity (Kiebler and DesGroseillers, 2000; Sutton and Schuman, 2006). There is considerable evidence for local translation in neuronal dendrites (Tiedge and Brosius, 1996; Pierce et al., 2000; Tang and Schuman, 2002), and local translation is required for various forms of synaptic plasticity, including the late phase of transcription-dependent LTP, beta-adrenergic-dependent LTP, and mGluR-induced LTD (Huber et al., 2000; Bradshaw et al., 2003; Gelinas and Nguyen, 2005). Local synthesis is also important for the growth and maturation of dendritic spines (Tiedge and Brosius, 1996; Ostroff et al., 2002; Tang and Schuman, 2002; Antar et al., 2004). Interestingly, it was also shown that down-regulation of Stau1 by siRNA reduces CaMKII mRNA transport in cultured hippocampal neurons (Kanai et al., 2004). However, the physiological consequences of Stau1 knockdown have not been examined.

In the present study we use RNA interference technique (siRNA) combined with electrophysiological recordings in slice cultures to examine the role of Stau1 in synaptic plasticity. We find an important role for Stau1 specifically in late-LTP. Moreover, knockdown of Stau1 also revealed deficits in spine morphology and spontaneous miniature synaptic activity.

3.4 MATERIALS AND METHODS

3.4.1 ORGANOTYPIC HIPPOCAMPAL SLICE CULTURES

All experiments were done in accordance with animal care guidelines at Université de Montréal. Organotypic hippocampal slices were prepared and maintained in culture as previously described (Stoppini et al., 1991). In brief, Sprague-Dawley rats (postnatal day 7) were anesthetised and decapitated. The brain was removed and dissected in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen Canada, ON) based medium. Cortico-

hippocampal slices (400 μm thick) were obtained with a McIlwain tissue chopper (Campden Instruments, IN). Slices were placed on Millicell culture plate inserts (Millipore, MA) and incubated for 3 days in OptiMem (Invitrogen Canada, ON) based medium at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. Inserts were then transferred to Neurobasal based medium (Invitrogen Canada, ON). Slices were used for experiments after 4-7 days in culture.

3.4.2 HEK293 CELLS

HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Life Science), supplemented with 10% Cosmic calf serum (Hyclone, Logan, UT), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin/streptomycin and 2 mM L-Glutamine (Invitrogen Life Science) and maintained at 37°C saturated with 5% CO₂.

3.4.3 siRNAs AND TRANSFECTIONS

ECFP (Clontech Laboratories, CA) was cloned into the pCDNA-RSV vector. pEYFP-C1 (EYFP) was obtained from Clontech Laboratories (CA). All siRNAs were purchased from Dharmacon (CO). Commercial siCONTROL™ was used as non-targeting control siRNA. siRNA-STAU1 target sequences for rat were 5'-GGACAGCAGUUUAAUGGGAAU-3' (sense sequence) and 5'-PUCCCAUUAACUGCUGUCCUU-3' (antisense sequence). shRNA-STAU1/sh1 and plasmid coding for Stau1⁵⁵ Δ sh1 were described previously (Dugre-Brisson et al., 2005). HEK293 cells were seeded at 2×10^5 in a 6 wells plate and transfected with 60 μmol of either siRNA-CTL, or siRNA-STAU1 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Science). 24 hours post-transfection, cells were transfected again with 100 μmol of the respective siRNA and 1 μg each of plasmids coding for Stau1-HA or Stau2-HA and hnRNP1-myc, used as control. Cells were processed for western blotting 24 hours post-transfection. Biolistic transfection of neurons in organotypic slice cultures was made as previously described (Bourdeau et al., 2007), using a Helios gene gun (Bio-Rad, CA) following manufacturer's instructions. Biolistic transfection of cyanine3-tagged non targeting siRNA (Cy3-siRNA-CTL) and confocal microscopy following fixation of slice cultures were used to verify siRNA delivery in pyramidal cells. Electrophysiological

recordings and cell imaging experiments were performed 48 hours after transfection and the experimenter was blind to transfection treatments.

3.4.4 ELECTROPHYSIOLOGY

Individual slice cultures were transferred to a submerged recording chamber and continuously perfused (at 1-2 ml/min) with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 10 dextrose, 2.5 CaCl₂, (5KCl, 2 MgSO₄ and 2 CaCl₂ for LTD experiments), saturated with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4. Extracellular field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded from CA1 stratum radiatum with a glass microelectrode (2-3 MΩ) filled with 2M NaCl in slices maintained at 25-27°C. A bipolar tungsten electrode placed in stratum radiatum was used for electrical stimulation of Schaffer collaterals. Stimulus intensity (0.1 ms duration) was adjusted to elicit 30-40% of the maximal fEPSP, as determined by an input-output curve for each slice (LTD, 60% of maximal). To reduce spontaneous activity, CA1 and CA3 hippocampal regions were isolated by a surgical cut. The late form of long-term potentiation (L-LTP) was induced chemically by the adenylate cyclase activator forskolin (FSK, 50 μM, Sigma) (Kiebler and DesGroseillers, 2000; Steward and Schuman, 2001). The early phase of LTP was induced using either high-frequency stimulation (100 pulses at 100 Hz applied twice with at 5 min interval) or theta burst stimulation (four pulses at 100 Hz per burst, five bursts at 5 Hz per train) applied twice at 10s intervals. Long-term depression (LTD) was induced chemically by the group I metabotropic glutamate receptor (mGluR) agonist (*S*)-3, 5-dihydroxyphenylglycine (DHPG, 100 μM, Tocris). Miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded in whole-cell patch-clamp mode from EYFP-transfected CA1 pyramidal cells using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in slices maintained at 27-32°C. Recording pipettes (4-5 MΩ) were filled with a solution containing (in mM): 130 CsMeSO₃, 5 CsCl, 2 MgCl₂, 5 diNa-phosphocreatine, 10 HEPES, 2 ATPTris, and 0.4 GTPTris, pH 7.2-7.3, 275-285 mOsm. Bicuculline (Bic; 10 μM) and tetrodotoxin (TTX; 0.5 μM) were added to the extracellular solution, and cells were voltage clamped at -60 mV. Data acquisition (filtered at 2 KHz, digitized at 10 kHz) and analysis were performed using a PC equipped with pClamp9 software (Molecular

Devices). Threshold mEPSC amplitude was set at 3 pA, and typically 150-250 events were collected over a 10-20 minute period.

3.4.5 IMMUNOCYTOCHEMISTRY

Rat primary hippocampal neurons were dissected from E17-E19 Sprague Dawley embryos (Charles River Laboratories) and cultured as described (Banker and Goslin, 1988; Elvira et al., 2006). Briefly, neurons were plated at 80 000 cells/ml on 18-mm diameter glass coverslips (Fisher Scientific) coated with 0.1% poly-D-lysine. Transfections of 20pmol of siRNA and 0,3 µg of plasmid coding for ECFP were performed with 2µl of lipofectamine-2000 reagent (Invitrogene). 48 hours post-transfection, neurons were fixed with 4% paraformaldehyde/ 4% sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) for 20 min. Neurons were then permeabilized with 0.3% Triton X-100/ 2% BSA in PBS for 10min, blocked with 0.1% Triton X-100/ 2% BSA in PBS for 45 min and further washed with the same solution. Neurons were incubated with 2 µg/ml mouse anti-CFP (Roche) and rabbit anti-Staufen1 (1:100) (Wickham et al., 1999) antibodies for 1h, washed and stained with Alexa Fluor 488 dye anti-mouse IgG or Alexa Fluor 594 dye anti-rabbit IgG antibodies (Molecular Probes) for 1h. Following the immuno-labeling procedure, some neuron cultures (as indicated) were incubated with 10 µM of Syto14 (Invitrogen S7576) for 15 min. Coverslips were mounted on slides (Fisher) using Dako fluorescent mounting medium (Dako). Neurons were visualized under an Olympus fv300 confocal microscope using an uplfl 60x1.40 NA oil immersion objective lens. Hippocampal slices were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 phosphate buffer (PB, 4°C, overnight). Slices were cryoprotected in 30% sucrose and recut (60 µm-thick) on a freezing microtome (Leica SM2000R, Germany). Sections were treated with 0.3% H₂O₂ (30 min), preincubated with 2% normal goat serum (NGS) and 0.2% Triton X-100 in 0.1M PBS for 2h at room temperature (RT) and then incubated with primary mouse monoclonal NeuN antibody (1:250, overnight, RT, Chemicon, CA). The next day, sections were placed in biotinylated secondary goat anti-mouse IgG antibody (1:500, 2h, RT, Vector Laboratories). Sections were then re-incubated in the avidin-biotin complex (Elite ABC kit; Vector Laboratories, 1:200, 2h) and visualized using 3, 3'-diaminobenzidine. Sections were rinsed thoroughly between incubations and mounted in DPX.

3.4.6 WESTERN BLOTTING

Protein samples from hippocampal slice or HEK extract were separated on a 10% SDS polyacrylamide gels electrophoresis (PAGE) and transferred on to Amersham Hybond™-P (PVDF) membrane. Immunoblots were performed in PBS/0.2% tween-20 with specific antibodies.

3.4.7 IMAGING AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS

Slices were fixed with 4% paraformaldehyde overnight at 4°C, washed in phosphate buffer and mounted on slides for confocal microscopy. EYFP-transfected CA1 pyramidal neurons were randomly selected based on green fluorescence and characteristic morphology. For spine analysis, Z-stacks consisting of 10-20 sections (512 x 512 pixels, 30-100 µm-long dendritic segments) spaced 0.2-0.4 µm apart were collected from the secondary branches of apical dendrites using a confocal laser scanning microscope LSM 510 (Carl Zeiss, Kirkland QC) equipped with a 63X oil-immersion objective (NA 1.4; Carl Zeiss, Kirkland QC). The length and morphology of dendritic spines was measured using the LSM 510 software. Four to six independent experiments were performed and 1784 protrusions were analyzed from 72 neurons.

3.4.8 STATISTICAL ANALYSIS

Baseline synaptic transmission was monitored for 15 min or 30 min (LTP experiments) and 20 min (LTD experiments) before the induction stimulation protocol or drug administration. The slope of fEPSPs was expressed as a percentage of the baseline average before induction or drug application. Every data point represents an average of normalized data in bins of 2-min (early-LTP), 5-min (late-LTP) or 2.5-min (LTD). Statistical differences were compared between baseline values and values after induction or drug application (Student's paired *t*-test). Data are represented as means ± standard error of the mean (s.e.m), unless otherwise mentioned, and statistical significance was set at $p < 0.05$. Differences between all transfected groups were assessed with ANOVA tests. Comparisons of cumulative distribution of spine length and mEPSC parameters between groups were performed using Kolmogorov-Smirnov tests.

3.5 RESULTS

3.5.1 DOWN-REGULATION OF STAU1 BY siRNA TRANSFECTION

To determine that siRNA can be used for a selective knockdown of Stau1, we tested the efficacy and specificity of the siRNA targeting Stau1 (siRNA-STAU1) by Western blot analysis in human embryonic kidney cells (HEK293), hippocampal neurons in cultures and in hippocampal slice cultures. First, HEK293 cells were co-transfected with plasmids coding for mStau1-HA and hnRNPH1-myc (used as control) and either a non-targeting siRNA (siRNA-CTL) or a siRNA directed against Stau1 (siRNA-STAU1) (Fig. 1A, B). Western blot analyses with anti-HA and anti-myc antibodies indicated a significant reduction in the amounts of Stau1-HA relative to hnRNPH1-myc ($90.0 \pm 3.9\%$ reduction; $n=3$; $p<0.05$; Student's *t*-test) when co-transfected with siRNA-STAU1, compared to siRNA-CTL (Fig. 1A). When plasmids coding for Stau2-HA instead of Stau1-HA were transfected in HEK293 cells, no decrease in the expression of the proteins was observed in the presence of siRNA-STAU1 compared to siRNA-CTL (Fig. 1B). These results indicate that transfection of siRNA-STAU1 is efficient in down-regulating the expression of Stau1 and the down-regulation is specific, leaving Stau2 levels intact. Next, we tested the efficacy of siRNA-STAU1 transfection to down-regulate endogenous Stau1. Hippocampal neurons in cultures were transfected with either siRNA-CTL or siRNA-STAU1 along with a plasmid coding for ECFP as a marker for transfected cells. Immunofluorescence studies using anti-Stau1 antibody were then performed to evaluate Stau1 expression in individual neurons. An important decrease in Stau1 signal was observed in neurons transfected with siRNA-STAU1 compared to untransfected cells in the same culture (Fig. 1C). In contrast, no decrease was seen in neurons transfected with the siRNA-CTL (Fig. 1C). Then, we determined whether the knockdown expression of Stau1 impairs global mRNA transport in dendrites. Cultured neurons were transfected with siRNA-STAU1 along with a plasmid coding for ECFP as a marker for transfected cells. Neurons were labelled with Syto14, a dye that stains RNA, and visualized on a confocal microscope. Comparison of siRNA-STAU1 transfected cells, siRNA-CTL transfected cells (data not shown) and surrounding untransfected cells showed no difference in the global staining of RNA in dendrites (Fig

1D). Therefore, although knockdown expression of Stau1 was shown to impair the dendritic transport of a transcript containing the 3'UTR of α CaMKII (Kanai et al., 2004), it does not prevent the overall transport of mRNA in dendrites suggesting that Stau1 inhibits specific mRNA targets.

Then, Stau1 knockdown was tested in hippocampal slice cultures that were biolistically transfected at 4 d *in vitro* with plasmids coding for EYFP and either siRNA-CTL or siRNA-STAU1. Two days post-transfection, slices were homogenized and proteins analyzed by western blotting using anti-Stau1 antibodies (Fig. 2A). Anti-calnexin antibodies were used as a loading control. Transfection of siRNA-STAU1 caused a significant reduction in the expression level of endogenous Stau1 (Fig. 2A) but not of endogenous Stau2 (Fig. 2B) in slice cultures. The neuronal integrity of transfected slice cultures was verified using NeuN immunolabelling and the transfection procedure did not lead to cell loss (Fig. 2C). The knockdown in expression of endogenous Stau1 in organotypic hippocampal slice cultures was more variable than observed with over-expression of tagged-Stau1 in HEK293 cells ranging from 70% reduction to almost no reduction (average of $31.7 \pm 10.5\%$ n=6, 2 independent experiments; $p < 0.05$; Student's *t*-test). This variability probably reflects the reduced efficiency of transfection in hippocampal slice cultures. To examine this more carefully, we measured the delivery and localization of siRNA in CA1 pyramidal cells in slices using a cyanine3-tagged control siRNA (Cy3-siRNA-CTL) and confocal microscopy (n=6-9; 2 experiments; Fig. 2D, E). We observed that the biolistic transfection mostly occurs at superficial levels of the slice since we found a strong signal in the majority of superficial neurons and a clear gradient of the Cy3-siRNA-CTL from the surface of the slice through deeper levels (z axis). Thus there was only an efficient delivery/transfection in the first 20 to 50 μ m tissue in the slices presumably resulting in specific knockdown of STAU1 only in more superficial neurons, that fortuitously are the same as those recorded in electrophysiology experiments (next section). Since the entire slices were taken for western blot experiments, the results from this analysis underestimate the knockdown in the neurons recorded in field recording experiments. Taken together, these experiments demonstrate the efficacy and specificity of Stau1 siRNA transfection in down-regulating Stau1 expression in cultured slices.

3.5.2 STAU1 DOWN-REGULATION IMPAIRS SPECIFICALLY LATE LTP

Local translation of mRNAs in dendrites is known to play an important role in synaptic plasticity (Kiebler and DesGroseillers, 2000; Steward and Schuman, 2001). Stau1 is a putative candidate protein that may be involved in the regulation of synaptic plasticity since it has been implicated in mRNA trafficking to neuronal dendrites (Kanai et al., 2004; Kim and Kim, 2006) and in translational regulation (Dugre-Brisson et al., 2005). Therefore, we examined the effect of Stau1 down-regulation on long-lasting changes in synaptic plasticity that requires transcription and translation (Nguyen et al., 1994; Kelleher et al., 2004; Kopec et al., 2006). Since standard electrical stimulation protocol (four tetanic trains) for inducing the late form of LTP in acute slices does not reliably induce late-LTP in slice cultures (Kopec et al., 2006), and to maximize the number of synapses that undergo plasticity, LTP was induced chemically, using forskolin (FSK) (Otmakhov et al., 2004; Kopec et al., 2006). FSK elevates cAMP concentrations by activating adenylate cyclase (Chavez-Noriega and Stevens, 1992; Huang et al., 1994; Wong et al., 1999) and elicits spontaneous activity in slice cultures that induce NMDA receptor dependent late LTP (Otmakhov et al., 2004; Kopec et al., 2006). Hippocampal slices were biolistically transfected with plasmid coding for EYFP or co-transfected with EYFP plasmid and either siRNA-CTL or siRNA-STAU1. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded in area CA1 of the hippocampus. In control conditions, application of FSK induced a potentiation of fEPSPs lasting at least 3.5 hours ($142 \pm 14.5\%$ of control for EYFP and $136 \pm 8.8\%$ of control for siRNA-CTL transfections; $n=10$ each; $p<0.05$; Fig. 3A-E). In slices co-transfected with plasmid encoding EYFP and siRNA-STAU1, FSK-induced long-term potentiation was blocked ($106.7 \pm 10.8\%$ of control at 210 min post-FSK, $n=10$; $p>0.05$; Fig. 3A-E). FSK induced similar spontaneous activity in all three conditions, indicating that the block of L-LTP was not due to a failure of FSK to elicit spontaneous activity necessary for LTP induction. To confirm the type of L-LTP induced in our slice culture conditions, we carried out additional control experiments with the NMDA receptor antagonist *D,L*-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) and the transcription inhibitor, actinomycin D (Act D). The FSK-induced L-LTP was blocked by actinomycin D and AP5 (Vehicle: $151.35 \pm 11\%$ of control at 180 min post-FSK, $n=5$, $p<0.05$; ActD:

107.17±17.7%, n=6, p>0.05; AP5: 110±21%, n=6, p> 0.05). Thus, these results complement those obtained in other studies (Otmakhov et al., 2004; Kopec et al., 2006) and show that FSK-induced late-LTP is NMDA receptor- and protein synthesis-dependent, and displays key features of standard electrically-induced L-LTP. To verify that basal evoked synaptic transmission was unaffected by Stau1 down-regulation, we examined the input-output relation and paired-pulse facilitation (PPF) ratio (at interval of 50-150 ms) of fEPSPs. No significant differences were found between slices transfected with plasmid encoding EYFP, siRNA-CTL or siRNA-STAU1 for input-output function (n=8-12; p>0.05; Fig. 3F) or PPF (n=10-14; p>0.05; Fig. 3G). These results indicate that Stau1 down-regulation by siRNA prevented late-LTP but did not affect basal evoked synaptic transmission.

We next tested whether Stau1 down-regulation also affects the early phase of LTP (E-LTP). Two protocols were used to induce E-LTP, theta burst (TBS) and high-frequency (HFS) stimulation. TBS generated similar E-LTP of fEPSP slope in slices transfected with EYFP (131.9± 5.6% of control), siRNA-CTL (134.9±8.2% of control), or siRNA-STAU1 (140.7±9.7% of control; n=6-8; p> 0.05; Fig. 4A-D). Similar E-LTP results were obtained following HFS of slices transfected with EYFP expressor (133.6±9.7% of control), siRNA-CTL (135.1±13.1% of control), or siRNA-STAU1 (136.4±17.1% of control; n=4-5; p>0.05; Fig. 4F-G). Thus, transfection of siRNA-STAU1 did not impair E-LTP, indicating that Stau1 down-regulation interferes specifically with the induction or expression of L-LTP.

Next, we determined whether long-term depression (LTD) is affected by Stau1 down-regulation. Transient activation of mGluR1/5 by application of the selective agonist DHPG produces a long-term depression of excitatory synaptic responses in CA1 pyramidal cells which requires local translation of dendritic mRNAs in mature neurons, but is translation-independent earlier in development such as in the present experiments (Huber et al., 1998; Fitzjohn et al., 1999; Huber et al., 2000; Volk et al., 2006). As expected, application of DHPG (100µM, 10 min) induced LTD of fEPSPs in control slice cultures transfected with plasmid coding for EYFP (62.2±7% of control) or co-transfected with siRNA-CTL (66.7±7.7% of control; n=10; Fig. 5A,B). Transfection of slice cultures with siRNA-STAU1 did not affect DHPG-induced LTD either (61.3±2.8% of

control, $n=10$; $p>0.05$; Fig. 5C-E) indicating that Stau1 down-regulation does not impair translation-independent mGluR-mediated LTD in CA1 hippocampal area.

3.5.3 STAU1 DOWN-REGULATION REDUCES MINIATURE SYNAPTIC ACTIVITY

We next tested whether the deficit in late-LTP after Stau1 down-regulation was associated with functional changes at unitary excitatory synapses. We recorded miniature EPSCs (mEPSCs) in EYFP-transfected CA1 pyramidal cells voltage-clamped at -60 mV and examined the effect of siRNA on amplitude and frequency of synaptic activity (Fig. 6A). Given that shRNA transfection can trigger off-target effects which affect passive membrane properties, including membrane capacitance and input resistance (Alvarez et al., 2006), we first determined whether siRNA transfection in our experiments might produce similar off-target actions. The membrane capacitance (c_m) and input resistance (R_{in}) of transfected pyramidal cells were comparable between the three conditions (EYFP: $R_{in}=193.8\pm 33.6$ M Ω and $c_m=18.5\pm 2.4$ pF; siRNA-CTL: $R_{in}=185\pm 22.8$ M Ω and $c_m=18.6\pm 1.3$ pF; siRNA-STAU1: $R_{in}=196.1\pm 14.3$ M Ω and $c_m=22.6\pm 2.2$ pF; $n=7$, $p>0.05$). The lack of impairment in passive membrane properties after siRNA transfection suggests no such off-target effects of the siRNAs used (Alvarez et al., 2006). In contrast, Stau1 siRNA transfection affected miniature synaptic activity. The cumulative distribution of mEPSC amplitude was significantly decreased in neurons transfected with siRNA-STAU1 relative to neurons transfected with EYFP or siRNA-CTL ($n=7$ each, 3-5slices, 10 independent experiments, $p<0.05$; Kolmogorov-Smirnov test; Fig. 6B). The median of cumulative histograms for mEPSC amplitudes in neurons transfected with siRNA-STAU1 was significantly different compared to that in neurons transfected with EYFP or siRNA-CTL (median \pm standard deviation; EYFP: -18.5 ± 10.9 pA; siRNA-CTL: -20.5 ± 10.9 pA; siRNA-STAU1: -11.75 ± 7 pA, $p<0.001$, Fig. 6B). Also, the cumulative distribution of inter-mEPSC interval was significantly increased in neurons transfected with siRNA-STAU1 ($p<0.05$; Kolmogorov-Smirnov test; Fig. 6C). In this case, the median of cumulative histograms for mEPSC inter-event-interval in neurons transfected with siRNA-STAU1 was significantly different relative to that in neurons transfected with EYFP or siRNA-CTL (EYFP: 0.83 ± 0.8 s; siRNA-CTL: 0.8 ± 0.7 s; siRNA-STAU1: 1.54 ± 1.3 s, $p<0.001$, Fig. 6C). Decreases in mEPSC

amplitude are most consistent with postsynaptic modifications of synapses (receptor numbers or sensitivity), whereas decreases in mEPSC frequency are associated with changes in presynaptic transmitter release or in number of functional synapses (Manabe et al., 1992; Scanziani et al., 1992). Thus, the observed effects on miniature synaptic activity suggest that Stau1 down-regulation is associated with both a reduction of postsynaptic efficacy at individual synapses, as well as a decrease in number of functional synapses or changes in presynaptic transmitter release in pyramidal cells.

3.5.4 STAU1 DOWN-REGULATION INDUCES DENDRITIC SPINE MORPHOLOGY CHANGES

In hippocampal pyramidal neurons, dendritic spines act as independent cellular compartments enabling selective regulation of individual synapses (Harris and Stevens, 1989; Yuste and Denk, 1995). Moreover, the morphology and density of dendritic spines reflect the properties and number of synapses (Harris and Stevens, 1989; Yuste and Denk, 1995). For instance, elongated spines are associated with smaller postsynaptic densities (PSDs) and a higher proportion of silent synapses (Harris and Stevens, 1989; Nusser et al., 1998; Matsuzaki et al., 2001). Therefore, we next examined if changes in unitary synaptic function after Stau1 down-regulation were associated with changes of spine density and morphology in hippocampal CA1 pyramidal cells. Hippocampal slices were transfected with plasmids coding for EYFP, or co-transfected with siRNA-CTL or siRNA-STAU1. First, confocal imaging of EYFP-labelled cells indicated no obvious alteration in the general dendritic arborization of transfected cells in any groups (Fig. 7A). Second, the overall spine density was not significantly different in cells transfected with EYFP alone (0.24 ± 0.01 spines/ μm), siRNA-CTL + EYFP (0.25 ± 0.02 spines/ μm) or siRNA-STAU1 + EYFP (0.26 ± 0.02 spines/ μm ; $p > 0.05$; Fig. 7B), indicating no significant loss of spines in cells of any group. However, significant differences were observed at the level of spine morphology. The length of dendritic spines was significantly longer in cells co-transfected with siRNA-STAU1 + EYFP than in cells transfected with EYFP alone ($128.76 \pm 4.38\%$ of control EYFP) or co-transfected with siRNA-CTL + EYFP ($125.65 \pm 4.27\%$ of control siRNA-CTL; $p < 0.05$; $n = 472, 474,$ and 486 protrusions in EYFP, siRNA-CTL + EYFP and siRNA-STAU1 + EYFP groups, respectively; $n = 4-6$ separate experiments) (Fig. 7C). The cumulative distribution of

spine lengths was significantly different in cells co-transfected with siRNA-STAU1 + EYFP compared to EYFP alone (Fig. 7C; $p < 0.05$).

To characterize further the changes in spine morphology, we examined changes in different classes of spines categorized on the basis of spine length and shape (McKinney, 2005): 1- filopodia, long protrusions ($>1\mu\text{m}$) without a spine head; 2- elongated spines, long protrusions ($>1\mu\text{m}$) with a small head at the tip; and 3- regular spines, short protrusions ($<1\mu\text{m}$) including stubby and mushroom-type spines. Our data showed that in cells co-transfected with siRNA-STAU1 + EYFP, there was a significant increase in the proportion of elongated spines ($137.61 \pm 4.58\%$ compared to EYFP alone [EYFP]; $127.80 \pm 4.38\%$ compared to siRNA-CTL + EYFP [siRNA-CTL]; $p < 0.05$; Fig. 7D) and filopodia ($206.11 \pm 4.67\%$ compared to EYFP alone [EYFP]; $185.03 \pm 4.65\%$ compared to siRNA-CTL + EYFP [siRNA-CTL]; $p < 0.05$; Fig. 7D), and a significant reduction in regular spines ($43.54 \pm 6.35\%$ compared to EYFP alone [EYFP] $48.13 \pm 7.02\%$ compared to siRNA-CTL + EYFP [siRNA-CTL]; $p < 0.05$; Fig. 7D).

As an additional control, we repeated this experiment using a second interfering RNA (sh1) that targets a different Stau1 sequence. In addition, to confirm that the observed phenotype is the result of Stau1 down-regulation and not off-target effects, we expressed a Stau1 isoform that is not recognized by the shRNA (Stau1⁵⁵ Δ sh1) and determined whether this could rescue the phenotype. Spine density was unchanged in shRNA-CTL (0.26 ± 0.02 spines/ μm), shRNA-STAU1/sh1 (0.31 ± 0.03 spines/ μm) or shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵ Δ sh1 (0.29 ± 0.02 spines/ μm ; $p > 0.05$; Fig. 8B) transfected cells. However, spine length was significantly increased in cells transfected with shRNA-STAU1/sh1 relative to cells transfected with shRNA-CTL ($113.45 \pm 2.48\%$) or to cells co-transfected with shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵ Δ sh1 ($117.22 \pm 2.56\%$) ($p < 0.05$; $n = 487, 592$ and 605 protrusions in shRNA-CTL, shRNA-STAU1/sh1 and shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵ Δ sh1 groups, respectively; $n = 4-6$ separate experiments; Fig. 8C). There was no significant difference between cells transfected with shRNA-CTL ($1.18 \pm 0.04\mu\text{m}$) and shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵ Δ sh1 ($1.21 \pm 0.03\mu\text{m}$) indicating that expression of Stau1⁵⁵ Δ sh1 could rescue the effects of the shRNA-STAU1/sh1.

As shown in figure 8D, in cells transfected with shRNA-STAU1/sh1 there was a significant increase in the proportion of elongated spines to $131.68 \pm 5.50\%$ relative to

cells transfected with shRNA-CTL. Co-transfection of Stau1⁵⁵Δsh1 and shRNA-STAU1/sh1 rescued the phenotype; the percentage of elongated spines in shRNA-STAU1/sh1 transfected cells was 147.02±6.14% relative to cells co-transfected with Stau1⁵⁵Δsh1 and shRNA-STAU1/sh1 (p<0.05; Fig. 8D). Similarly for regular spines, in cells transfected with shRNA-STAU1/sh1 there was a significant decrease in their proportion to 65.40±4.99% relative to cells transfected with shRNA-CTL. Again, co-transfection of Stau1⁵⁵Δsh1 and shRNA-STAU1/sh1 rescued the phenotype and the percentage of regular spines in shRNA-STAU1/sh1 transfected cells was 61.88±4.73% relative to cells co-transfected with Stau1⁵⁵Δsh1 and shRNA-STAU1/sh1 (p<0.05; Fig. 8D). There was no significant difference in the proportion of filopodia between the three conditions (shRNA-CTL 10.56±1.51%; shRNA-STAU1/sh1 10.66±1.34%; shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵Δsh1 9.02±1.13%; p> 0.05; Fig. 8D). Thus, transfection with shRNA-STAU1/sh1 resulted generally in similar effects as transfection with siRNA-STAU1, except for the unchanged proportion of filopodia. It is possible that the sh1 interfering RNA endogenously produced from a plasmid following transfection is less effective to down-regulate Stau1 expression than the siRNA. It may also explain the reduced phenotype in spine length observed with Stau1 shRNA as compared to Stau1 siRNA. Overall, this series of results indicate that the increase in spine length after transfection of Stau1 siRNA was due to a shift in spine shape from regular to elongated and filopodia types of spines. Thus, Stau1 down-regulation results in impairment of mature dendritic spine morphology.

3.6 DISCUSSION

Our principal findings are that Stau1 siRNA transfection results in selective down-regulation of Stau1 in hippocampal slice cultures, blocks specifically late phase LTP without affecting early phase LTP or LTD at pyramidal cell synapses, reduces spontaneous miniature synaptic activity and alters morphology of mature dendritic spines of pyramidal cells. Our findings provide evidence for a key role for Stau1 in long-term plasticity and maintenance of mature synaptic connections in hippocampal neurons.

Expression of shRNAs and siRNAs can potentially trigger severe morphological and functional perturbations in neurons via off-target actions (Sledz et al., 2003; Judge et al., 2005; Alvarez et al., 2006). Therefore, we performed several control experiments to validate our experimental approach of transfection in slice cultures. First, we confirmed with NeuN staining the absence of general morphological changes in hippocampal organization in slice cultures. Also, using confocal microscopy and imaging of individual EYFP-labelled cells, we found that dendritic arborisations of pyramidal neurons were unaffected by RNAi transfection (Alvarez et al., 2006). Moreover, spine density was similar in all conditions and spine loss did not occur (Alvarez et al., 2006). Most importantly, we were able to rescue the phenotype of spine length and shape changes associated with Stau1 down-regulation by co-expression of a Stau1 isoform (Stau1⁵⁵Δsh1) not targeted by the Stau1 shRNA. Finally, input resistance and membrane capacitance, passive membrane properties that are affected by off-target actions (Alvarez et al., 2006), were unchanged in neurons transfected with siRNA. Hence, these results strongly indicate that down-regulation of the targeted protein Stau1, and not off-target actions, are responsible for the changes observed in this study.

3.6.1 ROLE OF STAU1 IN LONG-TERM SYNAPTIC PLASTICITY

The late form of LTP is dependent on transcriptional and translational mechanisms (Frey et al., 1988; Nguyen et al., 1994). Inhibition of *de novo* transcription impairs this late LTP, without affecting the early form of LTP that requires post-translational modification of pre-existing proteins. Some of the transcripts generated during induction of L-LTP require local translation since focal dendritic application of protein synthesis inhibitors in slices inhibits L-LTP (Bradshaw et al., 2003). Moreover, Ostroff et al. (2002) have demonstrated the presence of polyribosome in dendritic spines, suggesting that local translation of new proteins may be enhanced at activated synaptic sites after LTP induction. Consistent with the established role of Stau1 in RNA transport (Tang et al., 2001; Kanai et al., 2004; Kim and Kim, 2006), the impairment of L-LTP observed after Stau1 down-regulation is likely due to impaired transport of newly synthesized mRNAs. While we cannot rule out that other deficits in synaptic function seen after Stau1 down-regulation (changes in miniature synaptic activity and spine

morphology) could also contribute to deficits in late-LTP, we think this is unlikely for a number of reasons. First basal evoked synaptic transmission, assessed by input-output curves and paired-pulse facilitation of fEPSPs, was unchanged after Stau1 siRNA transfection. Second, early-LTP and mGluR1/5-dependent LTD were not affected, suggesting that synapses and spines are intact and still capable of undergoing bi-directional plasticity. Third, the use of chemical LTP (Kopec et al., 2006) obviates the possibility that a lack of sufficient synaptic drive during the induction protocol could explain the lack of late LTP. Thus, we believe that the most parsimonious explanation is that impairment in late-LTP is due to the lack of transport and/or local translation of newly synthesized mRNAs.

There are additional correlative studies suggesting a role for RNA transport in late forms of synaptic plasticity and memory. In *Drosophila*, removal of Staufen reduces memory formation (Dubnau et al., 2003), although the mechanism of synaptic plasticity involved in this memory has not been established. Interestingly, Miller et al. (2002) showed that removal of the native 3'UTR of α CaMKII mRNA in mutant mice prevented dendritic localization of α CaMKII mRNA and decreased levels of α CaMKII in dendrites, as well as reducing late-LTP. Since Stau1 has been previously implicated in the transport of α CaMKII mRNA (Kanai et al., 2004), our results would be consistent with a requirement for translation of α CaMKII for late-LTP. However, since in this particular study (Miller et al., 2002), levels of α CaMKII in dendrites were severely decreased before stimulation, it is unclear whether the deficit in long-term memory was due to the acute lack of translation of α CaMKII after tetanization.

3.6.2 ROLE OF STAU1 IN SPINE MORPHOGENESIS AND SPONTANEOUS MINIATURE SYNAPTIC ACTIVITY

Dendritic spines are thought to act as functional units, providing microcompartments for segregating postsynaptic chemical responses, such as calcium elevation (Yuste and Denk, 1995; Sabatini et al., 2001), and for integrating synaptic signals. The significant increase in the percentage of elongated spines and filopodia-like protrusions after Stau1 down-regulation, suggests a close relationship between Stau1 and dendritic spine morphology. The size of the spine head is proportional to the post-

synaptic densities (PSD), the number of postsynaptic α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptors (Nusser et al., 1998; Shi et al., 1999; Turrigiano, 2000), suggesting that growth of the spine head correlates with strengthening of the synapse. Moreover, elongated spines and filopodia-like protrusions have been shown to be postsynaptic components of silent synapses (Matsuzaki et al., 2001). Therefore, an increase in elongated spines and filopodia-like protrusions after Stau1 down-regulation could possibly reflect a down-regulation of synaptic function. This is consistent with the decrease in miniature EPSC frequency and amplitude seen in this study. Interestingly, in several studies on Fragile X syndrome (Comery et al., 1997; Greenough et al., 2001; Zalfa et al., 2006), the marked increase in the proportion of elongated spines and filopodia-like protrusions, is similar to the effect observed with Stau1 down-regulation. Stau1 and FMRP may have similar functions in regulating RNA transport and/or translation.

3.6.3 STAUFEN ISOFORMS AND FUNCTIONAL IMPLICATIONS

Another important finding is that the alterations of spine morphology observed with Stau1 down-regulation have clear correlated functional consequences. We found a reduction in amplitude and frequency of spontaneous miniature synaptic activity that is consistent with the observed reduction in the number of regular spines and hypothesized increase in number of silent synapses (Matsuzaki et al., 2001). Thus Stau1 appears to be involved in the maintenance of mature spine morphology and excitatory synaptic activity. Interestingly, basal evoked synaptic transmission, assessed by fEPSP input-output curves, paired-pulse facilitation, early-LTP and mGluR1/5 LTD induction, were unchanged after siRNA transfection, suggesting that other parallel changes, likely involving inhibitory synaptic function, also take place after Stau1 down-regulation, which result in normal levels of excitability in hippocampal networks.

A recent study suggests that the other Staufen paralogue, Stau2, has an important role in the formation and maintenance of synapses and dendritic spines in cultured hippocampal neurons (Goetze et al., 2006). After Stau2 down-regulation, a significant reduction in the number of dendritic spines and an increase in filopodia-like protrusions were noted. Also, the number of PSD-95 positive synapses and mEPSC amplitude were

markedly reduced. The differences observed after Stau2 down-regulation and those reported here suggest that both paralogues may have distinct, but related functions. Notably, the observed reduction in spine density after Stau2 down-regulation indicates that this isoform is involved in synapse formation and spine morphogenesis (Goetze et al., 2006), while we observe no decreases in the number of spines, suggesting that Stau1 is more involved in synaptic plasticity and associated spine morphology changes. Interestingly, no decrease was observed in mEPSC frequency after Stau2 down-regulation in cultured neurons. It is possible that the environment of cultured neurons may be less permissive for the formation of silent synapses than in hippocampal slice cultures, and thus difference in model systems may explain the lack of change in mEPSC frequency. Alternatively, the decrease in mEPSC frequency observed after Stau1 down-regulation may be related with the deficit in late-LTP which was also present. Stau1 and Stau2 do not co-localize with each other in distal dendrites, suggesting that these proteins are located in distinct RNA granules (Duchaine et al., 2002). Stau1 is known to participate in translational control, consistent with our data for distinct roles of Stau1 and Stau2 in the formation of synapses and spines during development (Goetze et al., 2006). This suggests that different transport mechanisms are used for different pools of mRNAs, which is also supported by the multiple classes of RNA transport particles and granules identified in neurons (Elvira et al., 2006; Sossin and DesGroseillers, 2006).

Our findings with Stau1 shed some light on the importance of mRNA transport to dendrites for regulating synaptic function and long-term plasticity. It will be interesting to examine how Staufen paralogues are associated with RNA granules and whether different RNA granules containing Stau1 and Stau2 transport different sets of mRNA. These are important questions to understand further the role of RNA-binding proteins and mRNA trafficking in synaptic plasticity and associated functional connectivity changes underlying hippocampal-dependent learning and memory.

3.7 ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Julie Pepin for excellent technical assistance.

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Synaptic Transmission and Plasticity Group) and the Canada Research Chair Program (J.-C.L.; Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology). WSS is a William Dawson scholar and FRSQ Chercheur National. G.L and L.T. were supported by Savoy Foundation. MML was supported by a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

3.8 REFERENCES

- Alvarez VA, Ridenour DA, Sabatini BL (2006) Retraction of synapses and dendritic spines induced by off-target effects of RNA interference. *J Neurosci* 26:7820-7825.
- Antar LN, Afroz R, Dictenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ (2004) Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci* 24:2648-2655.
- Banker G, Goslin K (1988) Developments in neuronal cell culture. *Nature* 336:185-186.
- Bourdeau ML, Morin F, Laurent CE, Azzi M, Lacaille JC (2007) Kv4.3-mediated A-type K⁺ currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 27:1942-1953.
- Bradshaw KD, Emptage NJ, Bliss TV (2003) A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP. *Eur J Neurosci* 18:3150-3152.
- Broadus J, Fuerstenberg S, Doe CQ (1998) Stufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391:792-795.

- Buchner G, Bassi MT, Andolfi G, Ballabio A, Franco B (1999) Identification of a novel homolog of the *Drosophila* *staufen* protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* 62:113-118.
- Chavez-Noriega LE, Stevens CF (1992) Modulation of synaptic efficacy in field CA1 of the rat hippocampus by forskolin. *Brain Res* 574:85-92.
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5401-5404.
- DesGroseillers L, Lemieux N (1996) Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (*STAU*) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 36:527-529.
- Dubnau J, Chiang AS, Grady L, Barditch J, Gossweiler S, McNeil J, Smith P, Buldoc F, Scott R, Certa U, Broger C, Tully T (2003) The *staufen/pumilio* pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* 13:286-296.
- Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L (2002) *Staufen2* isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115:3285-3295.
- Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L (2005) Interaction of *Staufen1* with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33:4797-4812.
- Elvira G, Massie B, DesGroseillers L (2006) The zinc-finger protein ZFR is critical for *Staufen 2* isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons. *J Neurochem* 96:105-117.
- Fitzjohn SM, Kingston AE, Lodge D, Collingridge GL (1999) DHPG-induced LTD in area CA1 of juvenile rat hippocampus; characterisation and sensitivity to novel mGlu receptor antagonists. *Neuropharmacology* 38:1577-1583.
- Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H (1988) Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res* 452:57-65.

- Gelinas JN, Nguyen PV (2005) Beta-adrenergic receptor activation facilitates induction of a protein synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* 25:3294-3303.
- Goetze B, Tuebing F, Xie Y, Dorostkar MM, Thomas S, Pehl U, Boehm S, Macchi P, Kiebler MA (2006) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* 172:221-231.
- Greenough WT, Klintsova AY, Irwin SA, Galvez R, Bates KE, Weiler IJ (2001) Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7101-7106.
- Harris KM, Stevens JK (1989) Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9:2982-2997.
- Huang YY, Li XC, Kandel ER (1994) cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* 79:69-79.
- Huber KM, Sawtell NB, Bear MF (1998) Effects of the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG on phosphoinositide turnover and synaptic plasticity in visual cortex. *J Neurosci* 18:1-9.
- Huber KM, Kayser MS, Bear MF (2000) Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* 288:1254-1257.
- Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23:457-462.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-525.
- Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S (2004) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116:467-479.
- Kiebler MA, DesGroseillers L (2000) Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* 25:19-28.

- Kiebler MA, Hemraj I, Verkade P, Kohrmann M, Fortes P, Marion RM, Ortin J, Dotti CG (1999) The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* 19:288-297.
- Kim KC, Kim HK (2006) Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci Lett* 397:48-52.
- Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120:195-208.
- Kohrmann M, Luo M, Kaether C, DesGroseillers L, Dotti CG, Kiebler MA (1999) Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 10:2945-2953.
- Kopec CD, Li B, Wei W, Boehm J, Malinow R (2006) Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci* 26:2000-2009.
- Krichevsky AM, Kosik KS (2001) Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* 32:683-696.
- Luo M, Duchaine TF, DesGroseillers L (2002) Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J* 365:817-824.
- Manabe T, Renner P, Nicoll RA (1992) Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* 355:50-55.
- Marion RM, Fortes P, Beloso A, Dotti C, Ortin J (1999) A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19:2212-2219.
- Matsuzaki F, Ohshiro T, Ikeshima-Kataoka H, Izumi H (1998) miranda localizes staufen and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development* 125:4089-4098.
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, 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* 4:1086-1092.

- McKinney RA (2005) Physiological roles of spine motility: development, plasticity and disorders. *Biochem Soc Trans* 33:1299-1302.
- Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M (2002) Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36:507-519.
- Nguyen PV, Abel T, Kandel ER (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265:1104-1107.
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21:545-559.
- Ostroff LE, Fiala JC, Allwardt B, Harris KM (2002) Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* 35:535-545.
- Otmakhov N, Khibnik L, Otmakhova N, Carpenter S, Riahi S, Asrican B, Lisman J (2004) Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J Neurophysiol* 91:1955-1962.
- Pierce JP, van Leyen K, McCarthy JB (2000) Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:311-313.
- Sabatini BL, Maravall M, Svoboda K (2001) Ca²⁺ signaling in dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 11:349-356.
- Scanziani M, Capogna M, Gahwiler BH, Thompson SM (1992) Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* 9:919-927.
- Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R (1999) Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284:1811-1816.
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-839.
- Sossin WS, DesGroseillers L (2006) Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* 7:1581-1589.

- St Johnston D (1995) The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 81:161-170.
- Steward O, Schuman EM (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* 24:299-325.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.
- Sutton MA, Schuman EM (2006) Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127:49-58.
- Tang SJ, Schuman EM (2002) Protein synthesis in the dendrite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:521-529.
- Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E (2001) A role for a rat homolog of stauferin in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 32:463-475.
- Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Loschi M, Pasquini JM, Correale J, Kindler S, Boccaccio GL (2005) Stauferin recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* 16:405-420.
- Tiedge H, Brosius J (1996) Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 16:7171-7181.
- Turrigiano GG (2000) AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity. *Neuron* 26:5-8.
- Volk LJ, Daly CA, Huber KM (2006) Differential roles for group 1 mGluR subtypes in induction and expression of chemically induced hippocampal long-term depression. *J Neurophysiol* 95:2427-2438.
- Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L (1999) Mammalian stauferin is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19:2220-2230.
- Wong ST, Athos J, Figueroa XA, Pineda VV, Schaefer ML, Chavkin CC, Muglia LJ, Storm DR (1999) Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* 23:787-798.

Yuste R, Denk W (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682-684.

Zalfa F, Achsel T, Bagni C (2006) mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:265-269.

3.9 FIGURES AND LEGENDS

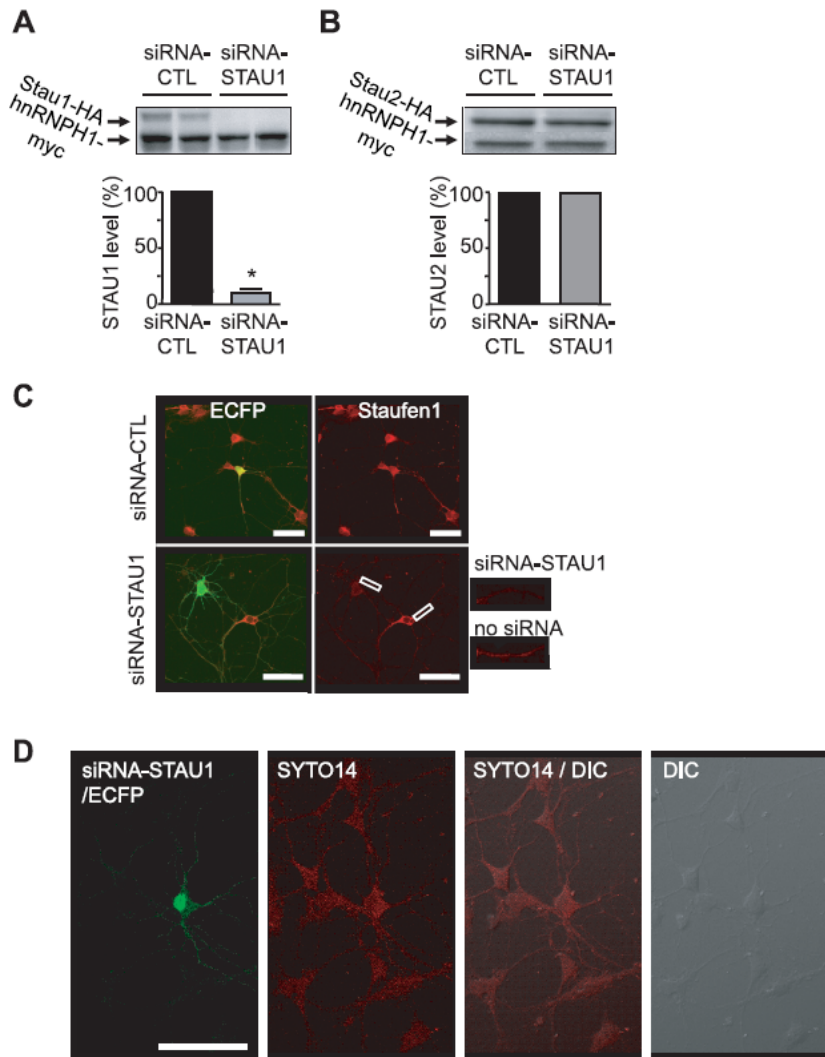


Figure 1. Down-regulation of Stau1 by siRNA in HEK293 cells and in cultured hippocampal neurons. **A, B,** HEK293 cells were co-transfected with plasmids coding for hnRNPH1-myc and either mStau1-HA (*A*) or mStau2-HA (*B*) and either siRNA-CTL or siRNA-STAU1. Expression of the proteins was monitored by western blotting using

anti-HA and anti-myc antibodies and plotted as the percentage of expression of Stau1-HA compared to that of hnRNP1-myc. Expression of Stau1-HA in cells with siRNA-CTL was set to 100%. Protein expression level (%) of Stau1, but not of Stau2, is significantly down-regulated in cells transfected with siRNA-STAU1. **C**, Immunostaining for Stau1 in untransfected neurons and in neurons co-expressing ECFP and siRNA-CTL (top) or ECFP and siRNA-STAU1 (bottom). Stau1 expression was decreased in siRNA-STAU1 transfected cells compared to untransfected cells. Scale bar, 50 μm . **D**, Syto14 labelling in untransfected neurons and in neurons co-expressing ECFP and siRNA-STAU1. Stau1 down-regulation does not prevent the overall transport of mRNA in dendrites suggesting that Stau1 inhibits specific mRNA targets. Scale bar, 50 μm .

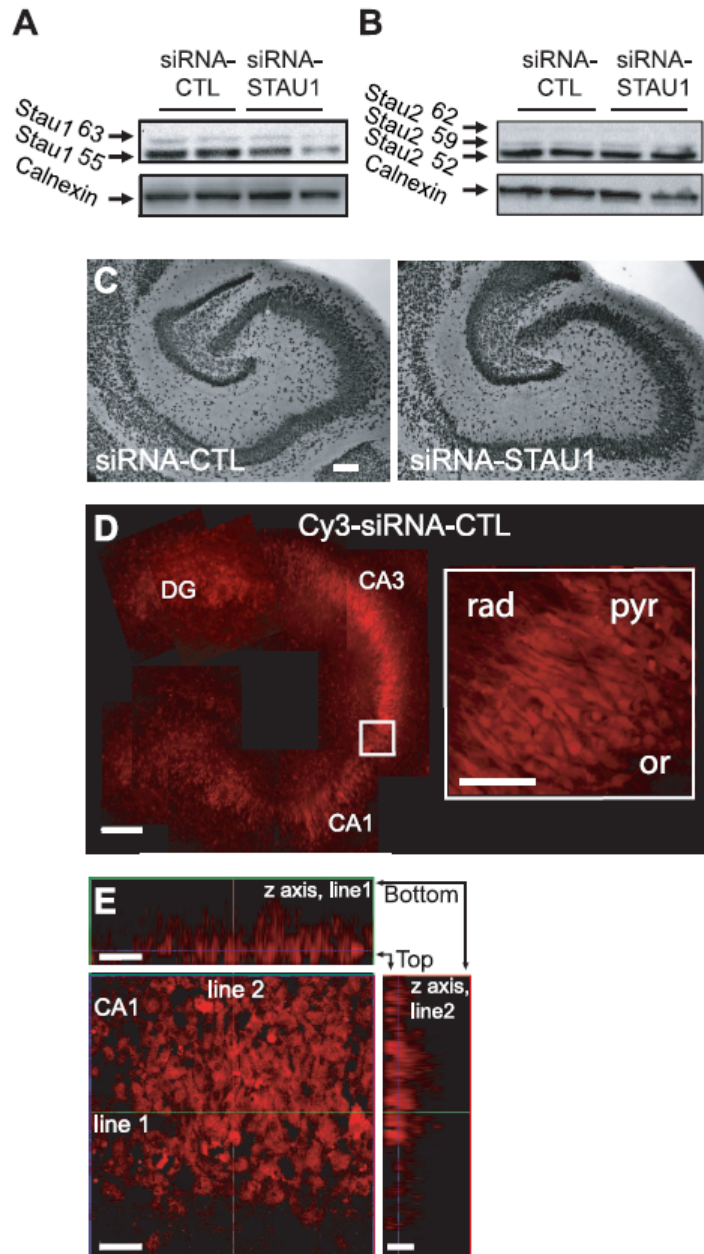


Figure 2. Down-regulation of Stau1 by siRNA in organotypic hippocampal slice cultures. **A, B,** Slice cultures were biolistically transfected with siRNA-CTL or siRNA-STAU1. Protein expression was monitored by western blotting using anti-Stau1 (**A**) or anti-Stau2 (**B**) antibodies. Examples from four representative slices are shown illustrating the selective down-regulation of endogenous Stau1 but not Stau2 expression levels ($n= 6, 2$ experiments). **C,** Immunocytochemical labelling for NeuN, showing intact neuronal populations in hippocampal slice cultures biolistically transfected with siRNA-CTL or siRNA-STAU1. Scale bar, 100 μ m. **D, E,** Confocal images of

representative hippocampal slice cultures biolistically transfected with Cy3-siRNA-CTL illustrating delivery of siRNA in CA1 pyramidal cells (*D*) and localization in superficial tissue in slices (Z-stack projections in *E*). *D*: Scale bar, 100 μm . ***Inset***, CA1 region, *or* stratum oriens, *pyr* stratum pyramidale, *rad* stratum radiatum. Scale bar, 50 μm . *E*: Scale bar, 20 μm .

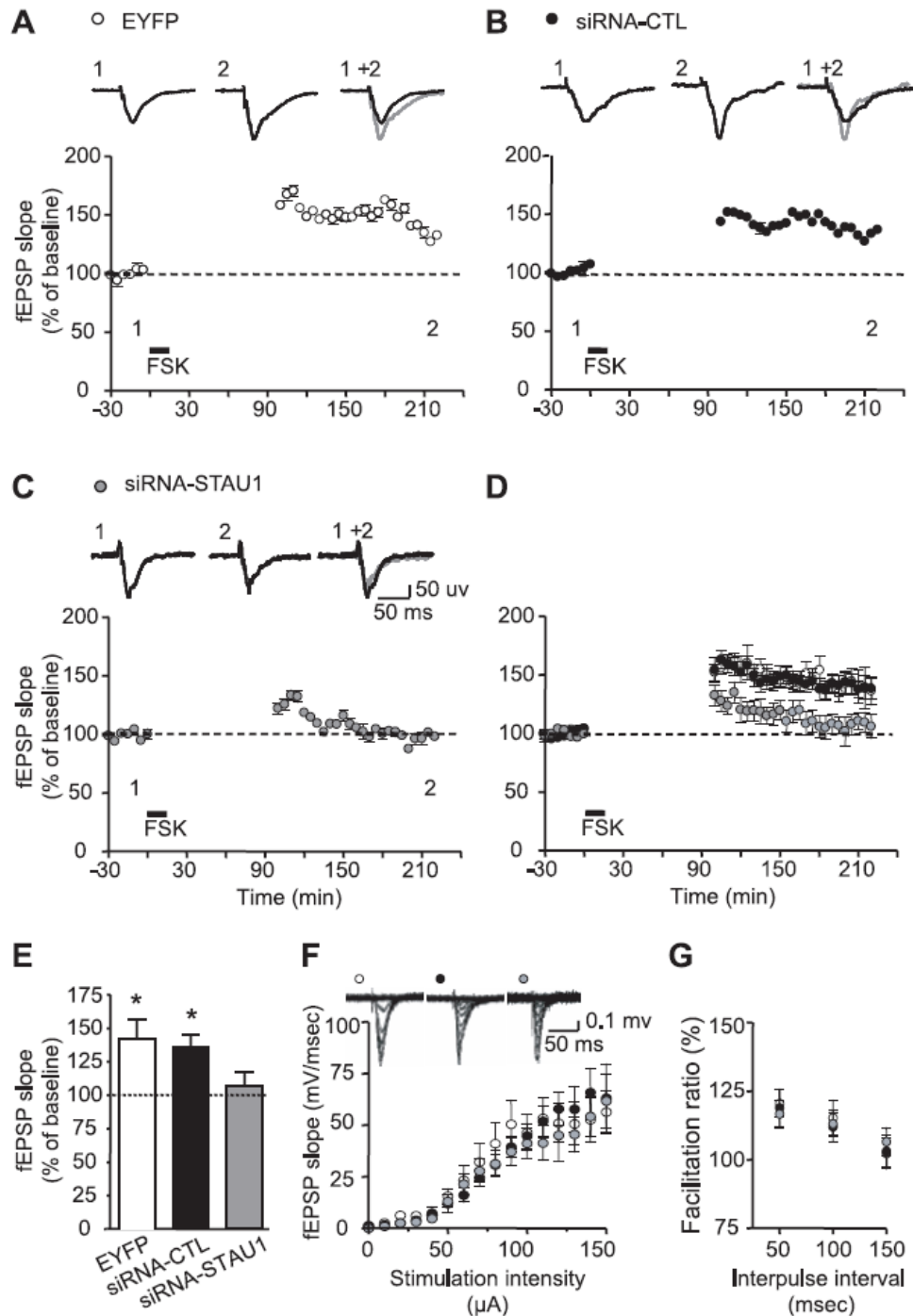


Figure 3. Stau1 siRNA transfection impairs chemically induced late-LTP in hippocampal slice cultures. **A-C**, Plots of normalized fEPSP slope in representative experiments with slice cultures transfected with plasmids coding for EYFP alone (*A*) or in combination with siRNA-CTL (*B*) or siRNA-STAU1 (*C*). Corresponding field potentials before (black) and after (gray) FSK application (50 μ M, 15 min) are shown above. fEPSP measures for the period from 0 to 90 min were excluded because of FSK-induced spontaneous activity interfering with accurate measurements of evoked fEPSPs (Kopeck et al., 2006). **D**, Summary plots of fEPSP changes for all group data (n=10 slices in each condition). **E**, Summary bar graph showing changes in fEPSP slope at 220 minutes post-FSK. Significant late-LTP was present in slices transfected with EYFP and siRNA-CTL but absent in slices transfected with siRNA-STAU1, indicating that down-regulation of Stau1 prevents L-LTP. **F**, Graph of input-output relation of fEPSP slope as function of stimulation intensity indicating no significant difference between groups with EYFP, siRNA-CTL or siRNA-STAU1 transfection. **G**, Summary plot for all slices showing similar paired-pulse facilitation ratio (50-150 ms intervals) in groups with EYFP, siRNA-CTL or siRNA-STAU1 transfection. * p<0.05.

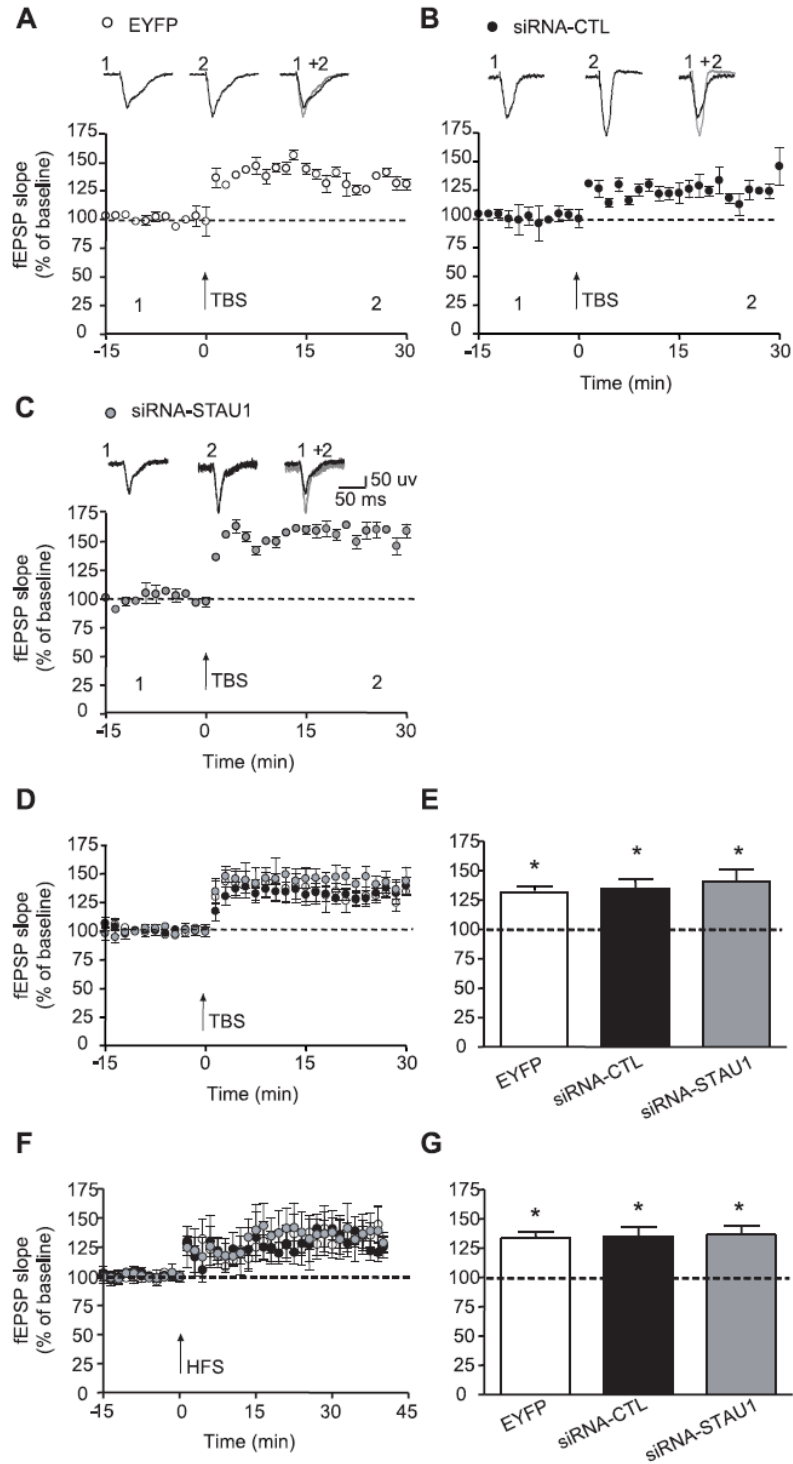


Figure 4. Stau1 siRNA transfection does not impair early-LTP in hippocampal slice cultures. A-C, Plots of normalized fEPSP slope showing early-LTP induced by theta burst stimulation (TBS; arrow) in slice cultures transfected with plasmids coding for EYFP alone (A) or in combination with siRNA-CTL (B) or siRNA-STAU1 (C). Corresponding field potentials before (black) and after (gray) TBS are shown above. D,

Summary plots of fEPSP changes induced by TBS for all groups (n=6 slices in each condition). **E**, Summary bar graph showing LTP of fEPSP slope at 30 min post-TBS in all conditions and indicating that Stau1 siRNA transfection did not impair TBS-induced early-LTP. **F-G**, Similar summary plots (*F*) and bar graph (*G*) of fEPSP changes induced by high frequency stimulation (HFS; arrow) for all groups (n=4-5 slices in each condition), illustrating that Stau1 did not influence HFS-induced early-LTP. * p< 0.05.

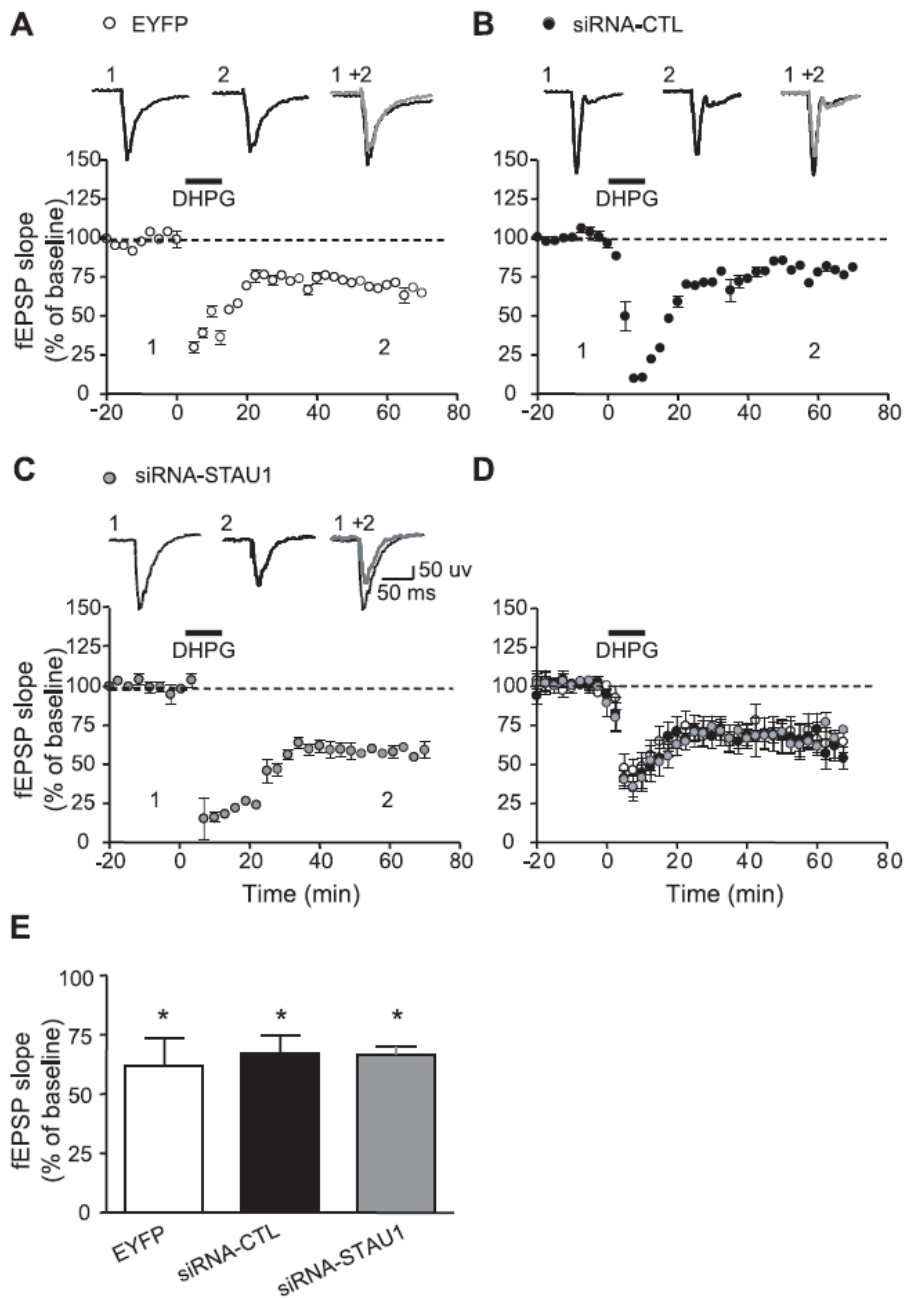


Figure 5. Stau1 siRNA transfection does not affect mGluR-dependent LTD in hippocampal slice cultures. A-C, Plots of normalized fEPSP slope showing LTD induced by the mGluR1/5 agonist DHPG (100 μ M, 10 min) in slice cultures transfected with plasmids coding for EYFP alone (A) or in combination with siRNA-CTL (B) or siRNA-STAU1 (C). Corresponding field potentials before (black) and after (gray) DHPG application are shown above. D, Summary plots of fEPSP changes induced by DHPG for all groups (n=10 slices in each condition). E, Summary bar graph showing LTD of fEPSP slope at 80 min post-DHPG in all conditions and indicating that Stau1 siRNA transfection did not impair mGluR-dependent LTD. * $p < 0.05$.

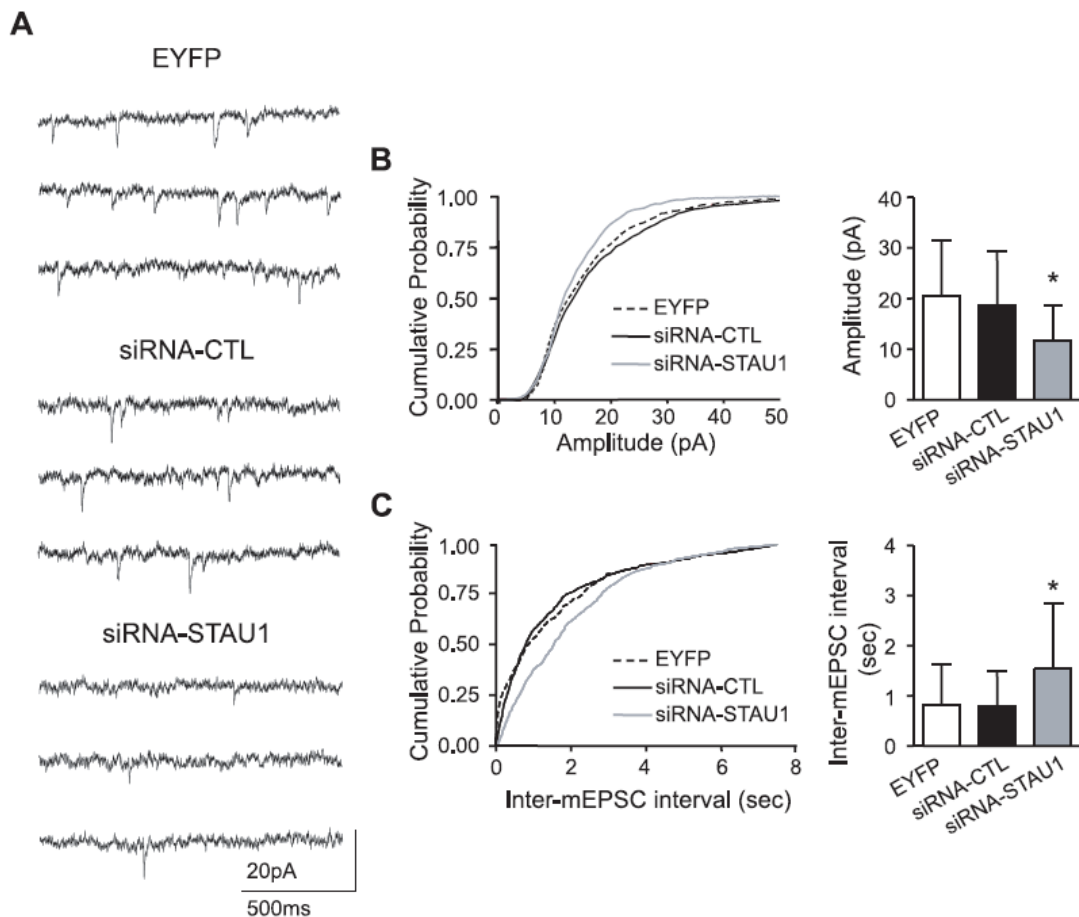


Figure 6. Stau1 siRNA transfection reduces frequency and amplitude of mEPSCs.

A, Representative traces from pyramidal neurons transfected with plasmid coding for EYFP (top) or co-transfected with siRNA-CTL (middle) or siRNA-STAU1 (bottom). **B-C**, Summary plots of cumulative distribution and summary bar graph of median of mEPSC amplitude (pA) (B) and inter-mEPSC intervals (sec) (C) for the corresponding

groups (n = 7-9 cells in each group) showing decrease in amplitude and frequency of mEPSCs in neurons transfected with siRNA-STAU1. Error bars represent SD.

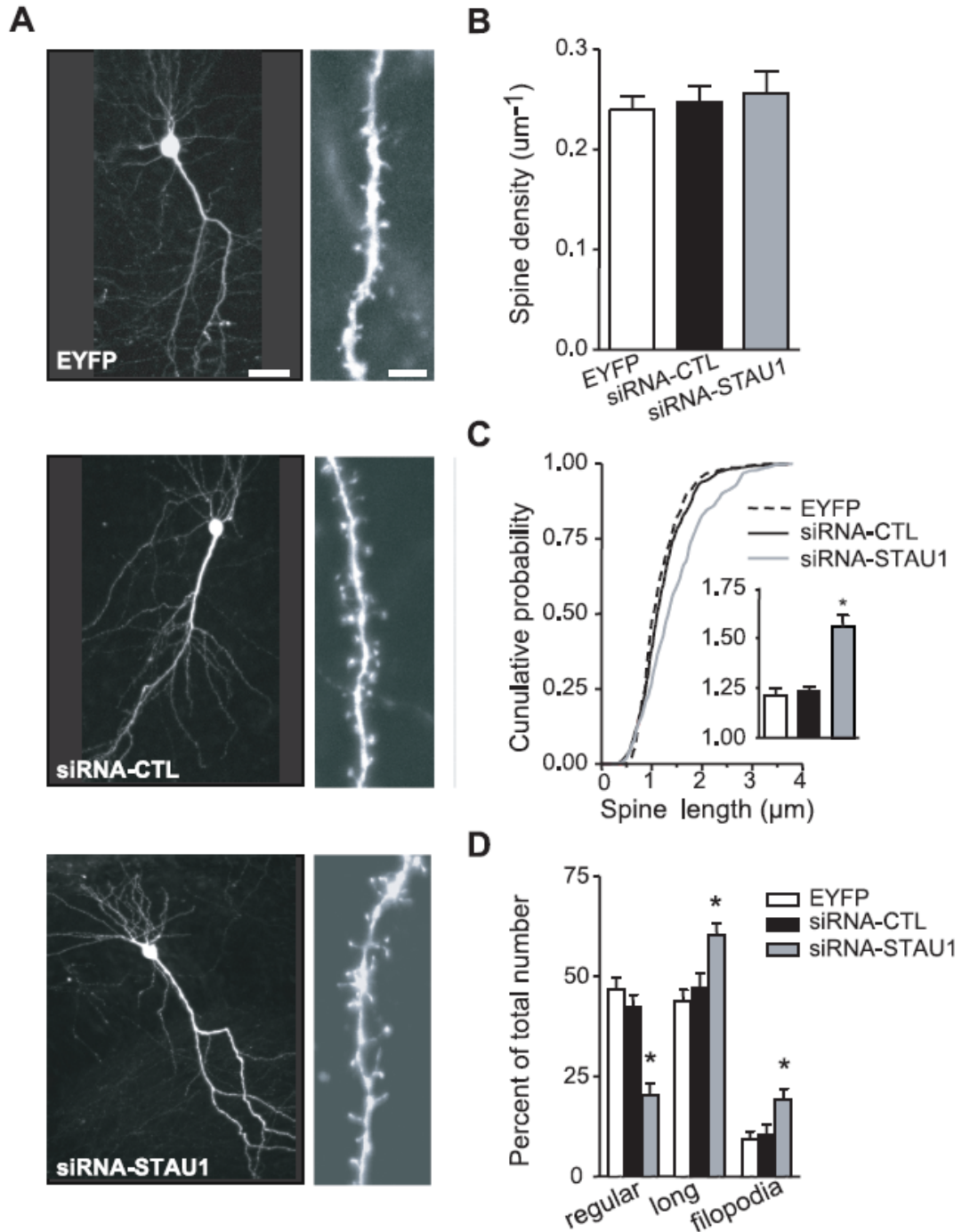


Figure 7. Stau1 siRNA transfection affects dendritic spine morphology. **A**, Confocal images of representative CA1 pyramidal cells (left) and apical dendrites (right) after transfection with plasmid coding for EYFP (top) or co-transfection with siRNA-CTL

(middle) or siRNA-STAU1 (bottom). **B**, Summary bar graph of spine density (per micron) of dendrite, showing unchanged density in all conditions. **C**, Cumulative plots of the distribution of spine length for each group, with summary bar graph of spine length in the inset, showing increased spine length after transfection of siRNA-STAU1. **D**, Summary bar graph of number of regular, elongated or filopodia types of spines in cells of each group, showing decrease in regular and increases in elongated and filopodia types of spines after siRNA-STAU1 transfection.* $p < 0.05$.

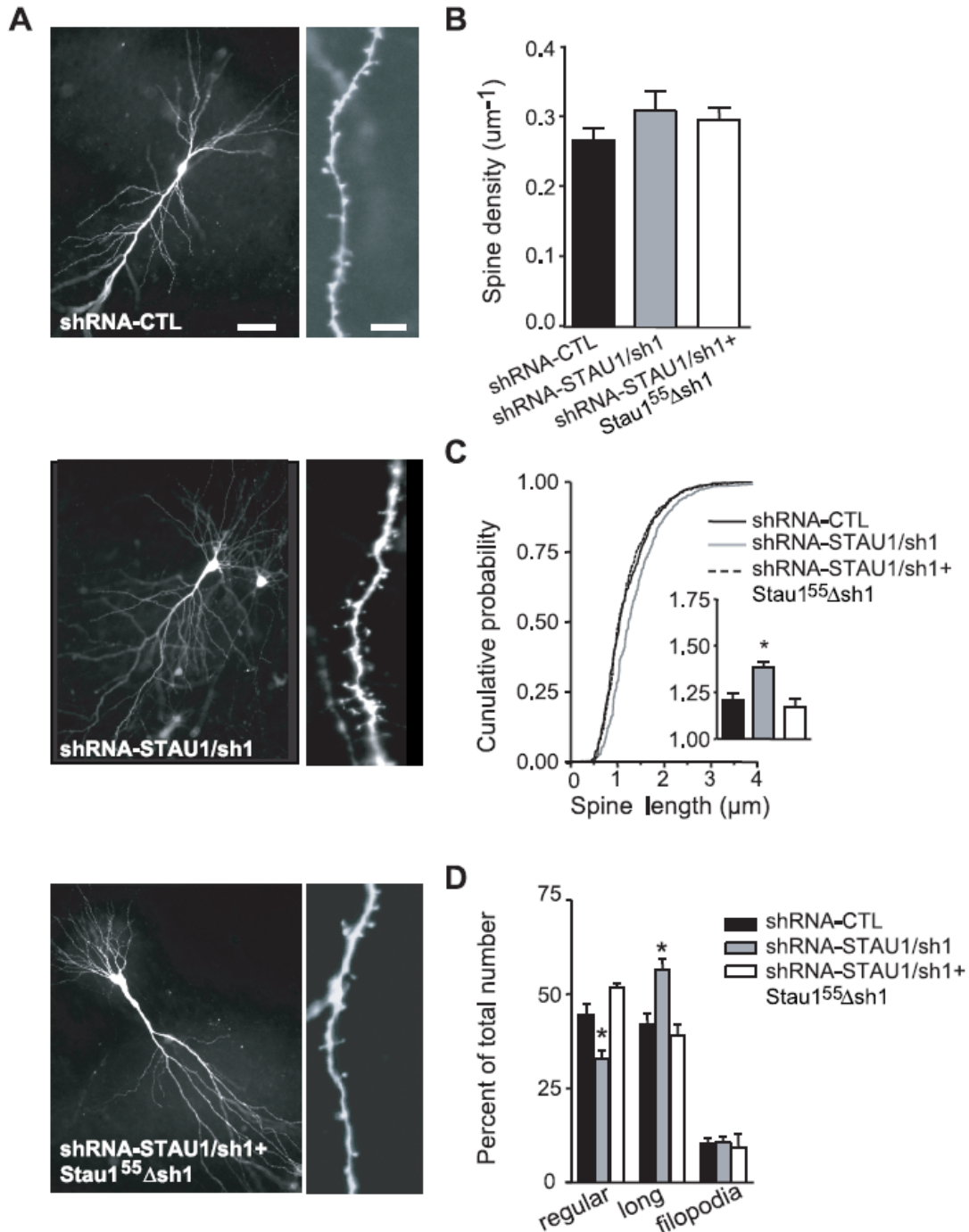


Figure 8. Dendritic spine morphology changes induced by Stau1 down-regulation using Stau1 shRNA and rescue by co-expression of Stau1⁵⁵Δsh1. **A**, Confocal images of representative CA1 pyramidal cells (left) and apical dendrites (right) after co-transfection of plasmid coding for EYFP and shRNA-CTL (top), shRNA-STAU1/sh1 (middle) or shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵Δsh1 (bottom). **B**, Summary bar graph of spine density (per micron) of dendrite, showing unchanged density in all conditions. **C**,

Cumulative plots of the distribution of spine length for each group, with summary bar graph of spine length in the inset, showing increased spine length after transfection of shRNA-STAU1/sh1, and rescue by shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵Δsh1 transfection. **D**, Summary bar graph of number of regular, elongated or filopodia types of spines in cells of each group, showing decrease in regular and increases in elongated types of spines after shRNA-STAU1/sh1 transfection and rescue by shRNA-STAU1/sh1 + Stau1⁵⁵Δsh1 transfection.* p<0.05.

CHAPITRE IV. DEUXIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

4.1 PRÉAMBULE

Ce chapitre contient la publication suivante :

mRNA binding protein Staufen 1-dependent regulation of pyramidal cell spine morphology via NMDA receptor-mediated synaptic plasticity

Geneviève Lebeau¹, Luc DesGroseillers², Wayne Sossin³ and Jean-Claude Lacaille^{1*}.

Accepté pour publication dans : *Molecular Brain*, MS 1706159270541708R1, mai 2011.

Pour ce deuxième projet, j'ai réalisé l'ensemble des expériences d'électrophysiologie et de microscopie confocale. J'ai également effectué toute l'analyse des résultats, la rédaction, la préparation des figures et la soumission de l'article.

4.2 ABSTRACT

Staufens (Stau) are RNA-binding proteins involved in mRNA transport, localization, decay and translational control. The Staufen 1 (Stau1) isoform was recently identified as necessary for the protein synthesis-dependent late phase long-term potentiation (late-LTP) and for the maintenance of mature dendritic spines and synaptic activity in hippocampal CA1 pyramidal cells, strongly suggesting a role of mRNA regulation by Stau1 in these processes. However, the causal relationship between these impairments in synaptic function (spine shape and basal synaptic activity) and plasticity (late-LTP) remains unclear. Here, we determine that the effects of Stau1 knockdown on spine shape and size are mimicked by blocking NMDA receptors (or elevating extracellular Mg^{2+}) and that Stau1 knockdown in the presence of NMDA receptor

blockade (or high Mg^{2+}) has no further effect on spine shape and size. Moreover, the effect of Stau1 knockdown on late-LTP cannot be explained by these effects, since when tested in normal medium, slice cultures that had been treated with high Mg^{2+} (to impair NMDA receptor function) in combination with a control siRNA still exhibited late-LTP, while siRNA to Stau1 was still effective in blocking late-LTP. Our results indicate that Stau1 involvement in spine morphogenesis is dependent on ongoing NMDA receptor-mediated plasticity, but its effects on late-LTP are independent of these changes. These findings clarify the role of Stau1-dependent mRNA regulation in physiological and morphological changes underlying long-term synaptic plasticity in pyramidal cells.

4.3 INTRODUCTION

Localization of mRNAs to synaptic sites and their subsequent translation have emerged as important mechanisms contributing to synapse-specific plasticity (Kiebler and DesGroseillers, 2000; Sutton and Schuman, 2006). Thus, mRNA binding proteins (RBPs), which are key players in the transport of mRNAs, may be selectively implicated in various forms of plasticity that depend on the transport and local translation of specific transcripts. Staufen (Stau) (Kanai et al., 2004; Dugre-Brisson et al., 2005), fragile X mental retardation protein (FMRP) (Miyashiro et al., 2003; Zalfa et al., 2003), zipcode-binding proteins (Fusco et al., 2003) and cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB) (Wu et al., 1998; Huang et al., 2003) are RBPs known to be implicated in mRNA dendritic localization and translation in neurons.

Notably, Stau is implicated in regulation of mRNAs required for memory formation in *Drosophila* and *Aplysia* (Dubnau et al., 2003; Liu et al., 2006). In mammals, the two members of the Stau family, Stau1 and Stau2, are present in distinct ribonucleoprotein (RNP) complexes (Duchaine et al., 2002) and associate with different mRNAs (Furic et al., 2008). Stau1 is required for the transport of mRNAs necessary for long-term potentiation at hippocampal synapses, as knockdown of Stau1 impaired dendritic transport of $CaMKII\alpha$ mRNA in hippocampal neurons (Kanai et al., 2004). Moreover, downregulation of Stau1 also prevented the translation-dependent late phase

LTP (late-LTP) induced by forskolin in CA1 pyramidal cells. However, the translation-independent early phase LTP was intact, suggesting an essential role of Stau1-dependent mRNA regulation in protein synthesis associated with late-LTP (Lebeau et al., 2008). Interestingly, we recently found that Stau2-dependent regulation of mRNA was essential specifically for translation-dependent mGluR long-term depression, uncovering selective mechanisms of mRNA regulation for different forms of translation-dependent long-term synaptic plasticity (Lebeau et al., 2011).

Long-term changes in synaptic function are associated with changes in dendritic spines (Harris and Stevens, 1989; Yuste and Denk, 1995). Indeed, we found that, in association with the impairment in late-LTP, Stau1 knockdown resulted in a shift from regular short spines to longer thin spines, suggesting a role in the formation and/or maintenance of mature spine shape (Lebeau et al., 2008). However, since a form of NMDA-mediated plasticity, referred to as spontaneous activity-driven potentiation (SAP) (Barria and Malinow, 2005), may be ongoing in our slice culture conditions and induce changes in spine shape (Kopeck et al., 2007; Li et al., 2007; Yang et al., 2008), it is unknown whether the effects of Stau1 knockdown on late-LTP were due to its actions on spine morphogenesis, or vice versa. Thus, our aims were to test directly if preventing SAP by blocking NMDAR function (or elevating extracellular Mg^{2+}) would influence the changes in dendritic spine morphology induced by Stau1 knockdown, and whether the changes induced by blocking SAP were in turn required for the effect on Stau1 knockdown on late-LTP. We found that while Stau1 is involved in spine morphogenesis through NMDAR-mediated SAP, the change in spine morphogenesis was not important for the effect of Stau1 on late-LTP.

4.4 METHODS

4.4.1 ORGANOTYPIC HIPPOCAMPAL SLICE CULTURES

Organotypic hippocampal slices were prepared and maintained in culture as previously described (Bourdeau et al., 2007; Lebeau et al., 2008).

4.4.2 siRNAs AND TRANSFECTIONS

siRNA target sequences for rat were as described (Lebeau et al., 2008). Biolistic transfection of neurons in organotypic slice cultures was performed using a Helios gene gun (Bio-Rad, CA) following manufacturer's instructions as previously (Bourdeau et al., 2007; Lebeau et al., 2008). Electrophysiological recordings and cell imaging experiments were performed 48 hours after transfection and the experimenter was blind to transfection treatments.

4.4.3 ELECTROPHYSIOLOGY

Individual slice cultures were transferred to a submerged-type recording chamber continuously perfused (at 1-2 ml/min) with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 10 dextrose, 2.5 CaCl₂, 2 μM adenosine, saturated with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4, as previously (Lebeau et al., 2008). Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were evoked by Schaffer collateral stimulation (30s⁻¹) and recorded from CA1 stratum radiatum with a glass microelectrode (2-3 MΩ) filled with 2M NaCl, as previously (Lebeau et al., 2008).

4.4.4 IMAGING AND MORPHOLOGICAL ANALYSIS

Slices were fixed with 4% paraformaldehyde and EYFP-transfected CA1 pyramidal neurons were randomly selected based on green fluorescence and characteristic morphology. Z-stacks were collected from the secondary branches of apical dendrites using a confocal laser scanning microscope LSM 510 (Carl Zeiss, Kirkland QC) and spines were analyzed using LSM 510 software and analyzed as previously (Lebeau et al., 2008). Briefly, spines were categorized in three different classes on the basis of length and shape (Lebeau et al., 2008): 1- filopodia, long protrusions (>1 μm) without a spine head; 2- elongated spines, long protrusions (>1 μm) with a small head at the tip; and 3- regular spines, short protrusions (<1 μm) including stubby and mushroom-type spines.

4.5 RESULTS

To examine the effect of Stau1 downregulation on dendritic spine morphology of CA1 pyramidal cells, organotypic hippocampal slice cultures were biolistically cotransfected with either siRNA-CTL or siRNA-STAU1 and plasmid coding for EYFP, as previously (Lebeau et al., 2008). Confocal imaging of EYFP-labelled cells showed no apparent alteration in the general dendritic arborisation of transfected cells in any groups (Fig. 1A). To prevent SAP, slice cultures were transfected and maintained for 48h in medium containing elevated extracellular Mg^{2+} concentration (12 mM) or the selective NMDA receptor antagonist AP5 (100 μ M) (Kopec et al., 2007; Li et al., 2007; Yang et al., 2008). In siRNA-CTL transfected cells, spine density was reduced in high Mg^{2+} but not in AP5 (Table 1 and Fig. 1B). The different effect may be due to additional actions of high Mg^{2+} , such as inhibition of transmitter release (Muller and Finkelstein, 1974), which might affect spine density. In siRNA-STAU1 transfected cells, spine density was unchanged relative to siRNA-CTL cells in any condition (Table 1), indicating no significant loss of spines after Stau1 knockdown, consistent with previous report (Lebeau et al., 2008).

Although spine density was not affected by Stau1 down-regulation, spine length and shape were modified (Table 1). Interestingly, blocking SAP had the same effect on spine length and shape as Stau1 knockdown. Indeed, spine length was increased in medium containing high Mg^{2+} or AP5 (compared to normal medium) in siRNA-CTL transfected cells (Table 1 and Fig.1C), consistent with the idea that impairing NMDAR-mediated SAP prevents the formation of mature short spines. A similar increase in spine length was also observed in siRNA-STAU1 transfected cells (compared to siRNA-CTL) in normal medium as previously reported (Lebeau et al., 2008). However, siRNA-STAU1 transfection in slices incubated in high Mg^{2+} or AP5 had no further effect on spine length (compared to siRNA-CTL CTL in high Mg^{2+} or AP5, respectively) (Table 1 and Fig.1C), suggesting that NMDAR-mediated SAP blockade occludes Stau1 knockdown consequences on spine length. Likewise in the case of spine shape, changes in the proportion of regular and elongated spines were similar in siRNA-CTL transfected cells treated with high Mg^{2+} or AP5 (compared to normal medium) and in siRNA-

STAU1 transfected cells in normal medium (compared to siRNA-CTL in normal medium): a decrease in regular spines and an increase in elongated spines (Table 1 and Fig.1D). Once again, there was no further effect of high Mg^{2+} or AP5 medium in siRNA-STAU1 transfected cells (relative to siRNA-CTL in high Mg^{2+} or AP5, respectively). These results indicate that NMDAR-mediated SAP blockade occludes Stau1 knockdown consequences on spine shape. Overall, these results suggest that SAP, mediated by NMDA receptors, leads to changes in spine size and shape over time in slice cultures and that these effects require Stau1. Thus, blocking either NMDA receptor mediated activity or Stau1 expression has the same effect on spine size and shape, and there are no additive effects when the two treatments are combined.

Next, we determined if blocking the changes in spine morphology during SAP caused the loss of late-LTP seen with Stau1 down-regulation. Electrophysiological experiments were performed after maintaining slice cultures in elevated Mg^{2+} medium for 48 hours after siRNA transfection. We took advantage of the fact that whereas biolistic DNA plasmid transfection in organotypic slice cultures lead to only a small percentage of transfected neurons (<10%), delivery of siRNAs is much more efficient (Lebeau et al., 2008). Using a fluorescently labelled siRNA (cyanine-3-tagged control siRNA) and confocal microscopy, high levels of siRNA are detected in most of the superficial principal neurons in slices, where the electrophysiological recordings are performed (see Figure 2 in Lebeau et al., 2008). The higher transfection efficiency may be due to the requirement for plasmid DNAs to penetrate not only the plasma membrane but also the nuclear membrane for effectiveness, while siRNA is effective in the cytoplasm. Extracellular field potentials (fEPSPs) were recorded in CA1 hippocampus in normal ACSF (containing normal extracellular Mg^{2+}), and forskolin (FSK; 50 μ M, 15 min) was used for chemical induction of late-LTP, as previously (Lebeau et al., 2008). This form of L-LTP is NMDA receptor-mediated and is blocked by actinomycin D (Lebeau et al., 2008). Application of FSK induced a potentiation of fEPSPs lasting at least 3.5h in slices transfected with siRNA-CTL (fEPSP slope 161.71% \pm 20.18% of control; n=8; P<0.05) (Fig. 2A and B). In slices transfected with siRNA-STAU1, FSK-induced late-LTP was blocked (116.09% \pm 10.68% of control; n=8; P>0.05) (Fig. 2A and B). The spontaneous synaptic activity which is induced by FSK application to

activate NMDA receptors and which results in transient depression of fEPSPs (Lebeau et al., 2008) was similarly observed in both groups. Moreover, basal evoked synaptic transmission was unchanged after knockdown of Stau1, as shown by input-output function (n=6 to 9; P>0.05) (Fig. 2C) and paired-pulse facilitation ratio (at intervals of 50 to 150 ms) of fEPSPs (n=6 to 9; P>0.05) (Fig. 2D). Since under these conditions both siRNA-CTL and siRNA-STAU1 treated cultures had the same changes in spine shape and size due to the previous block of SAP, these changes cannot explain the loss of late-LTP in the Stau1 knockdown.

4.6 DISCUSSION

Our principal findings suggest that the mRNA binding protein Stau1 is implicated in the transport or regulation of mRNAs that are involved in long-term alterations of pyramidal cell dendritic spine morphology through NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. NMDA receptors are crucial for synaptic plasticity and learning and memory (Bliss and Collingridge, 1993). During LTP induction, Ca²⁺ entry through NMDAR activates multiple signalling pathways (Sheng and Kim, 2002). The maintenance of the enduring changes in synaptic efficacy consists in two phases. An early phase (early-LTP) is protein synthesis-independent and is characterized by phosphorylation of pre-existing proteins present at the synapse and synaptic insertion of AMPA receptors (Malinow and Malenka, 2002). A longer-lasting late phase of LTP (late-LTP) is transcription- and translation-dependent (Kelleher et al., 2004) and is presumably associated with structural alterations of synapses that are reflected in part by changes in dendritic spine morphology (Yang et al., 2008). Indeed, normal NMDA receptor function is thought to support morphological and structural stability of spines (Alvarez et al., 2007) and blockade of NMDA receptor activity favours the formation of immature type of spines (McKinney et al., 1999). In addition, spontaneous activity in hippocampal slice cultures induces NMDAR-mediated potentiation of synaptic transmission, referred to as spontaneous activity-driven potentiation (SAP; (Barria and Malinow, 2005)). During SAP, NMDAR-activity leads to synaptic insertion of GluR1

(Barria and Malinow, 2005) and a stable increase in spine size (Li et al., 2007), analogous to changes occurring during LTP (Kopeck et al., 2007). Our findings are consistent with a model in which NMDAR-dependent signalling activates Stau1-dependent mechanisms of mRNA regulation during LTP and SAP induction, which lead to translation of mRNAs necessary for a long-lasting increase in synaptic efficacy, ultimately reflected as stable increases in mature spine shape. Stau1 effects on spine morphology and late LTP may also reflect different cell biological processes (both requiring NMDA receptors and/or transmitter release from presynaptic neurons), with spine morphology changes reflecting a slow function over a much longer time scale (dependent on SAP and RNA transport), and late LTP implicating a more rapid regulation of RNA transport. In addition, we cannot rule out the possibility that more subtle effects of Stau1 on spine morphology, undetected in the present study, may be related to its blocking effect on late LTP.

Our findings that knockdown of Stau1 impairs late-LTP, without affecting the early form of LTP or basal transmission (Lebeau et al., 2008), is consistent with Stau1 regulation of the translation/transport of mRNAs, but the specific role that Stau1 plays is still not clear. In the context of late-LTP, the mRNAs that are translated can consist of previously transcribed plasticity-related mRNAs that were transported constitutively to synapses prior to LTP induction (Kelleher et al., 2004) or newly transcribed mRNAs that need to be transported to the activated synapse for local translation (Bramham et al., 2008). Activity-dependent localization of specific mRNAs in dendrites has been demonstrated in cultured neurons (Tongiorgi et al., 1997; Mori et al., 2000; Rook et al., 2000) and *in vivo* (Steward et al., 1998; Steward and Worley, 2001), providing compelling support for the idea that glutamate receptor signalling may regulate dendritic mRNA transport and docking at postsynaptic sites in long-term plasticity. Stau1 was shown to be involved in the constitutive transport in dendrites of plasticity-related mRNAs such as CaMKII α mRNA (Kanai et al., 2004) supporting a role for Stau1 in constitutive transport of plasticity-related mRNAs. Mutant mice with impaired dendritic translation of CaMKII α mRNA show impairments in late-LTP and hippocampal-dependent memory (Miller et al., 2002). Thus, CaMKII α mRNA is a likely mRNA regulated by Stau1 during both LTP (Miller et al., 2002) and SAP (Barria and Malinow,

2005). It remains to be determined if other mRNAs known to be regulated in late-LTP, like Arc and PKM ζ (Guzowski et al., 2000; Serrano et al., 2005; Plath et al., 2006), are similarly regulated in Stau1-dependent fashion. Thus, LTP and SAP could be blocked due to the lack of these mRNAs in dendrites when plasticity is induced. It is also possible that Stau1 is critical for the translation/transport of mRNAs induced by LTP. Indeed, neuronal activity induced by depolarization was shown to significantly increase RNP containing Stau2 in dendrites of cultured neurons (Kim and Kim, 2006), indicating a role of Stau2 in activity-dependent transport of mRNA. Further studies will be required to define the precise manner by which Stau1 regulates SAP and LTP.

In a recent study with a mutant mouse expressing a truncated Stau1 protein lacking the functional RNA-binding domain 3 (RBD3), cultured hippocampal neurons displayed deficits in dendritic delivery of Stau1-containing RNP, as well as reduced dendritic tree and fewer synapses, indicating that Stau1 is crucial for synapse development *in vitro* (Vessey et al., 2008). These mice showed impaired locomotor activity but no significant deficit in hippocampal-dependent learning and memory, although the lack of a deficit in hippocampal function may reflect compensatory changes involving other proteins or genetic background effects (Vessey et al., 2008). It would be interesting to determine if impairments in late-LTP are present in these mice to examine if Stau1-dependent mRNA regulation in long-term plasticity is dependent on the functional RBD3 domain.

In conclusion, we found that Stau1 involvement in spine morphogenesis is dependent on NMDA receptor-mediated plasticity in hippocampal pyramidal cells. We also found that Stau1 is required for late-LTP, independently of its role in spine morphogenesis. These findings clarify the role of Stau1-dependent mRNA regulation in the physiological and morphological changes at pyramidal cell synapses during long-term plasticity underlying hippocampal-dependent learning and memory.

4.7 ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Team in Memory Grant, grant #CTP-79858, JCL; CIHR grant MOP 15121, WS), Fonds de la recherche en santé du Québec (Groupe de recherche sur le système nerveux central; grant #5249; JCL, WS, LD) and the Canada Research Chair Program (Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology; grant #950-213424; JCL). GL was supported by a Savoy Foundation studentship. The authors would like to thank Julie Pepin and Catherine Bourgeois for excellent technical assistance.

4.8 REFERENCES

- Alvarez VA, Ridenour DA, Sabatini BL (2007) Distinct structural and ionotropic roles of NMDA receptors in controlling spine and synapse stability. *J Neurosci* 27:7365-7376.
- Barria A, Malinow R (2005) NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* 48:289-301.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bourdeau ML, Morin F, Laurent CE, Azzi M, Lacaille JC (2007) Kv4.3-mediated A-type K⁺ currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 27:1942-1953.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF (2008) The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28:11760-11767.
- Dubnau J, Chiang AS, Grady L, Barditch J, Gossweiler S, McNeil J, Smith P, Buldoc F, Scott R, Certa U, Broger C, Tully T (2003) The *staufen/pumilio* pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* 13:286-296.
- Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L (2002) *Staufen2* isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115:3285-3295.

- Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33:4797-4812.
- Furic L, Maher-Laporte M, DesGroseillers L (2008) A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *Rna* 14:324-335.
- Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, Bertrand E (2003) Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol* 13:161-167.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993-4001.
- Harris KM, Stevens JK (1989) Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9:2982-2997.
- Huang YS, Carson JH, Barbarese E, Richter JD (2003) Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes Dev* 17:638-653.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-525.
- Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S (2004) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116:467-479.
- Kiebler MA, DesGroseillers L (2000) Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* 25:19-28.
- Kim KC, Kim HK (2006) Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci Lett* 397:48-52.
- Kopec CD, Real E, Kessels HW, Malinow R (2007) GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses. *J Neurosci* 27:13706-13718.
- Lebeau G, Maher-Laporte M, Topolnik L, Laurent CE, Sossin W, Desgroseillers L, Lacaille JC (2008) Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term

- potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol* 28:2896-2907.
- Lebeau G, Miller LC, Tartas M, McAdam R, Laplante I, Badeaux F, DesGroseillers L, Sossin W, Lacaille JC (2011) Staufén 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons. *Learn Mem*, 18:314-326.
- Li B, Woo RS, Mei L, Malinow R (2007) The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron* 54:583-597.
- Liu J, Hu JY, Wu F, Schwartz JH, Schacher S (2006) Two mRNA-binding proteins regulate the distribution of syntaxin mRNA in *Aplysia* sensory neurons. *J Neurosci* 26:5204-5214.
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-126.
- McKinney RA, Capogna M, Durr R, Gähwiler BH, Thompson SM (1999) Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat Neurosci* 2:44-49.
- Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M (2002) Disruption of dendritic translation of CaMKII α impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36:507-519.
- Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, Becker KG, Barret T, Liu L, Carbonetto S, Weiler IJ, Greenough WT, Eberwine J (2003) RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in *Fmr1* null mice. *Neuron* 37:417-431.
- Mori Y, Imaizumi K, Katayama T, Yoneda T, Tohyama M (2000) Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of α -CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat Neurosci* 3:1079-1084.
- Muller RU, Finkelstein A (1974) The electrostatic basis of Mg⁺⁺ inhibition of transmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:923-926.
- Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, Kobalz U, Stawrakakis A, Fernandez E, Waltereit R, Bick-Sander A, Therstappen E, Cooke SF, Blanquet V, Wurst W, Salmen B, Bosl MR, Lipp HP, Grant SG, Bliss TV, Wolfer DP, Kuhl D (2006)

- Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52:437-444.
- Rook MS, Lu M, Kosik KS (2000) CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J Neurosci* 20:6385-6393.
- Serrano P, Yao Y, Sacktor TC (2005) Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta maintains late-phase long-term potentiation. *J Neurosci* 25:1979-1984.
- Sheng M, Kim MJ (2002) Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298:776-780.
- Steward O, Worley PF (2001) Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* 30:227-240.
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF (1998) Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21:741-751.
- Sutton MA, Schuman EM (2006) Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127:49-58.
- Tongiorgi E, Righi M, Cattaneo A (1997) Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J Neurosci* 17:9492-9505.
- Vessey JP, Macchi P, Stein JM, Mikl M, Hawker KN, Vogelsang P, Wieczorek K, Vendra G, Riefler J, Tubing F, Aparicio SA, Abel T, Kiebler MA (2008) A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16374-16379.
- Wu L, Wells D, Tay J, Mendis D, Abbott MA, Barnitt A, Quinlan E, Heynen A, Fallon JR, Richter JD (1998) CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* 21:1129-1139.
- Yang Y, Wang XB, Frerking M, Zhou Q (2008) Spine expansion and stabilization associated with long-term potentiation. *J Neurosci* 28:5740-5751.
- Yuste R, Denk W (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682-684.

Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A, Reis S, Oostra B, Bagni C (2003)
 The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates
 the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* 112:317-327.

4.9 FIGURES AND LEGENDS

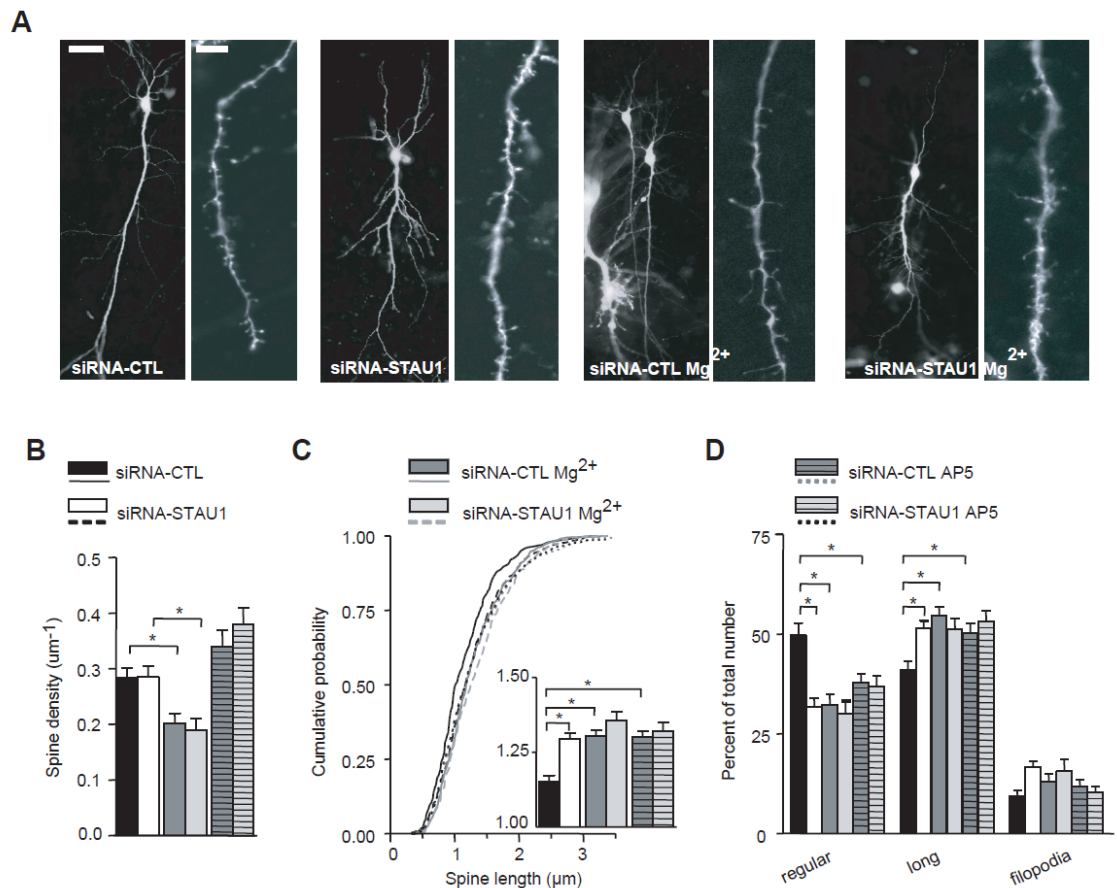


Figure 1. Spine changes induced by Stau1 siRNA are prevented by NMDA receptor blockade and high Mg^{2+} . (A) Confocal images of representative YFP-expressing CA1 pyramidal cells (left) and apical dendrites (right) after co-transfection with siRNA-CTL or siRNA-STAU1 and maintained in normal or elevated Mg^{2+} (12 mM) to impair NMDAR function. (B) Spine density was reduced by high Mg^{2+} treatment but not with the NMDA receptor antagonist AP5 (100 μM), and was unchanged by Stau1 siRNA transfection. (C) Cumulative plots of the distribution of spine length for each condition, with summary bar graph of spine length in the inset, showing increased spine length in

medium containing high Mg^{2+} or AP5. Spine length was increased after Stau1 siRNA transfection in normal medium but not in Mg^{2+} and AP5 treated slices. (D) Summary bar graph of number of regular, elongated and filopodia types of spines in each condition, showing decrease in regular and increase in elongated spines in high Mg^{2+} or AP5. Stau1 siRNA transfection decreased regular and increased elongated spines in normal medium but not in high Mg^{2+} or AP5, suggesting that Stau1 effects on spine shape are due to actions on endogenous NMDA receptor-mediated plasticity. Scale bars 25 μm , 5 μm . *, $P < 0.05$, t-test. Error bars represent s.e.m.

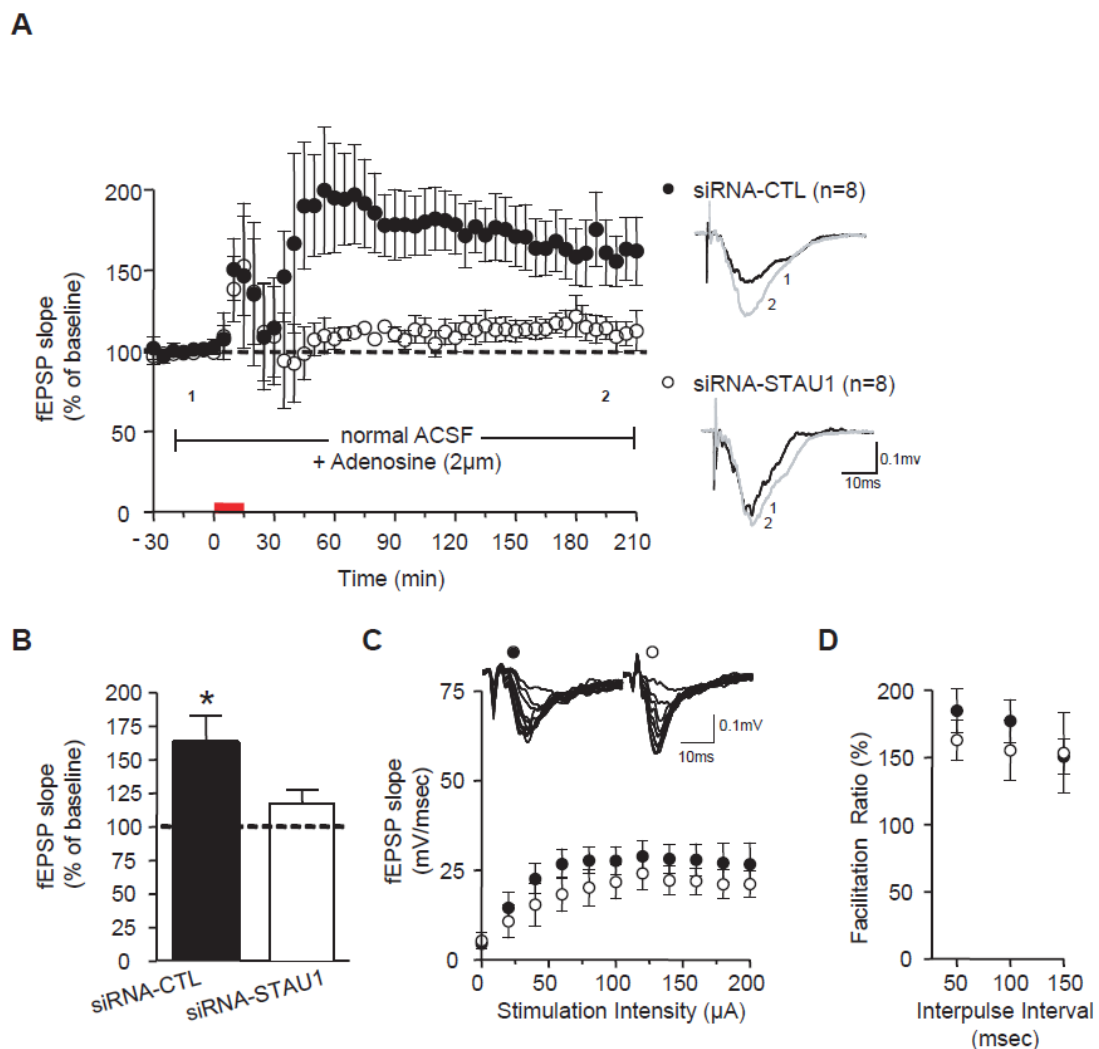


Figure 2. Impairment of FSK-induced L-LTP after Stau1 knockdown during high Mg^{2+} treatment. (A) Potentiation of fEPSP slope induced by FSK application (50 μM , 15 min) in cultured slices maintained in medium containing high Mg^{2+} for 48 hours after

siRNA-CTL or siRNA-STAU1 transfection. For electrophysiological experiments, slices were tested in conditions with normal NMDA receptor function. Corresponding field potentials before (black line) and after (gray line) FSK application are shown at right. (B) Summary bar graph showing changes in fEPSPs slope 200 min post-FSK application. Significant L-LTP was present in slices transfected with siRNA-CTL but absent in slices transfected with siRNA-STAU1, indicating that Stau1 knockdown still prevents L-LTP after siRNA-STAU1 transfection in high Mg^{2+} . *, $P < 0.05$, t-test. Error bars represent s.e.m. (C-D) Stau1 siRNA transfection did not affect basal synaptic transmission (C, input-output function; D, paired-pulse facilitation ratio).

Table 1. Spine changes induced by NMDA receptor blockade, high Mg^{2+} and Stau1 siRNA treatment.

	siRNA-CTL			siRNA-STAU1		
	Normal medium	High Mg^{2+} (12 mM)	AP5 (100 μM)	Normal medium	High Mg^{2+} (12 mM)	AP5 (100 μM)
Spine density (spine/ μm)	0.29 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02*	0.34 \pm 0.03	0.28 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	0.34 \pm 0.03
Spine length (μm)	1.15 \pm 0.02	1.3 \pm 0.02*	1.3 \pm 0.02*	1.29 \pm 0.02 [§]	1.35 \pm 0.03	1.32 \pm 0.03
Spine shape (% of total)						
Regular	49.75 \pm 3.1	32.3 \pm 2.7*	37.9 \pm 2.2*	31.77 \pm 2.2 [§]	30.19 \pm 3	36.8 \pm 2.6
Elongated	40.92 \pm 2.3	54.68 \pm 2.3*	50.3 \pm 2.3*	51.49 \pm 2 [§]	51.35 \pm 2.7	53.1 \pm 2.7
Filopodia	9.33 \pm 1.5	13.02 \pm 1.9	11.8 \pm 1.6	16.74 \pm 1.4	15.57 \pm 3	10.2 \pm 1.5

- Data expressed as mean \pm s.e.m from 16-27 neurons per group, 4-8 independent experiments per group; in total 3129 protrusions were analyzed from 101 neurons.

- * indicates significant difference in siRNA-CTL relative to normal medium; $P < 0.05$, ANOVA.

- [§] indicates significant difference in siRNA-STAU1 relative to siRNA-CTL in individual condition; $P < 0.05$, ANOVA.

CHAPITRE V. TROISIÈME SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

5.1 PRÉAMBULE

Ce chapitre contient la publication suivante :

Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons

Geneviève Lebeau^{1‡}, Linda C. Miller^{2‡}, Maylis Tartas¹, Robyn McAdam², Isabel Laplante¹, Frédérique Badeaux³, Luc DesGroseillers³, Wayne S. Sossin^{2*}, and Jean-Claude Lacaille^{1*}.

Publié dans : Learning and Memory, May 2011 18: 314-326

Pour cette troisième publication, j'ai réalisé les expériences d'électrophysiologie (excluant les enregistrements de *patch clamp*) et de microscopie confocale (excluant la préparation et les traitements des cultures de neurones dissociés et cellules HEK). J'ai également effectué toute l'analyse des résultats, la rédaction, la préparation des figures et la soumission de l'article.

5.2 ABSTRACT

The two members of the Staufen family of RNA binding proteins, Stau1 and Stau2, are present in distinct ribonucleoprotein complexes and associate with different mRNAs. Stau1 is required for protein synthesis-dependent long-term potentiation (L-LTP) in hippocampal pyramidal cells. However, the role of Stau2 in synaptic plasticity remains unexplored. We found that unlike Stau1, Stau2 is not required for L-LTP. In contrast, Stau2, but not Stau1 is necessary for DHPG-induced protein synthesis-dependent long-

term depression (mGluR-LTD). While Stau2 is involved in early development of spines, its down-regulation does not alter spine morphology, nor spontaneous miniature synaptic activity, in older cultures where LTD occurs. In addition, Stau2, but not Stau1, knockdown reduces the dendritic localization of Map1b mRNA, a specific transcript involved in mGluR-LTD. Moreover, mGluR stimulation with DHPG induces Map1b, but not Map2, mRNA dissociation from mRNA granules containing Stau2 and the ribosomal protein P0. This dissociation was not observed in cells in which Stau2 was depleted. Finally, Stau2 knockdown reduces basal Map1b protein expression in dendrites and prevents DHPG-induced increases in dendritic Map1b protein level. We suggest a role for Stau2 in the generation and regulation of Map1b mRNA containing granules that are required for mGluR-LTD.

5.3 INTRODUCTION

mRNA transport allows for production of proteins at a specific place and time (Holt and Bullock, 2009). Sequences in the mRNA determine localization by providing binding sites for mRNA binding proteins that mediate inclusion into specialized mRNA-protein transport complexes (Andreassi and Riccio, 2009). These complexes 1) enable repression of the mRNA during transport, 2) provide association with motor proteins and 3) confer specific mechanisms for translation activation of the mRNA (Sanchez-Carbente Mdel and Desgroseillers, 2008). These RNA-protein transport complexes can be broadly separated into two types: 1) RNA granules containing ribosomes postulated to correspond to stalled polysomes, 2) RNA transport complexes lacking ribosomes and stalled at translation initiation (Sossin and DesGroseillers, 2006).

Neurons use mRNA transport during development to regulate axon determination (Morita and Sobue, 2009), growth cone turning (Lin and Holt, 2007), neurite outgrowth (Hengst et al., 2009), and synapse maturation (Miniaci et al., 2008; Sebeo et al., 2009). After maturation, neurons use local translation both to concentrate proteins at specific sites and to respond to inputs in a local fashion by local changes in

the proteome that regulate synaptic strength (Sutton and Schuman, 2006; Bramham and Wells, 2007; Sanchez-Carbente Mdel and Desgroseillers, 2008).

In particular, local translation of mRNAs is important for the late forms of long-term potentiation (L-LTP) and mGluR long-term depression (LTD) (Huber et al., 2000a; Bradshaw et al., 2003). In mGluR-LTD, pre-localized mRNAs are translationally activated and thus transcription is not required (Huber et al., 2000a). The newly-formed proteins mediate LTD by stimulating the endocytosis of AMPA receptors and allowing retention of these receptors in an internal pool (Bramham et al., 2008; Waung et al., 2008). Specifically, both Arc and Map1b are translationally up-regulated during mGluR-LTD and known to be required for the maintenance of this form of plasticity (Davidkova and Carroll, 2007; Waung et al., 2008). In L-LTP, translation of both pre-existing mRNAs and mRNAs transported after *de novo* synthesis, are important for the maintenance of L-LTP.

It would be interesting if particular RNA binding proteins were involved in specific forms of plasticity, suggesting co-regulation of plasticity-related proteins. Recently, we showed that the RNA binding protein Staufen 1 (Stau1) is required for L-LTP (Lebeau et al., 2008). In vertebrates, there are two members of the Staufen protein family, Stau1 and Staufen 2 (Stau2) that are constituents of distinct RNA granules in neurons (Duchaine et al., 2002). In this manuscript, we compare the effects of removing Stau1 and Stau2 on L-LTP and mGluR-LTD. Strikingly, Stau1 down-regulation impairs only L-LTP while Stau2 knockdown alters only mGluR-LTD demonstrating specific roles for these two proteins in distinct forms of plasticity. Removal of Stau2 specifically decreases transport of a reporter with the Map1b 3'UTR while DHPG, an inducer of mGluR-LTD, dissociates Stau2 from Map1b 3'UTR puncta that co-localize with the ribosomal protein P0, suggesting an action on mRNA granules.

5.4 RESULTS

5.4.1 DOWN-REGULATION OF STAU2 BY siRNA TRANSFECTION

The efficacy and specificity of the siRNAs against Stau1 and Stau2 were tested by Western blot analysis in human embryonic kidney cells (HEK293) and in mature hippocampal slice cultures (21-24 days). First, HEK293 cells were co-transfected with plasmids coding for mStau1-HA or mStau2-HA and hnRNPH1-myc (used as control), as well as either a non-targeting siRNA (siRNA-CTL) or siRNA directed against Stau1 or Stau2 (siRNA-STAU1, siRNA-STAU2-1 and siRNA-STAU2-2) (Fig. 1A and B). Western blot analysis with anti-HA and anti-myc antibodies indicated a significant reduction in the amounts of Stau2-HA relative to hnRNPH1-myc when co-transfected with siRNA-STAU2-1 ($39.7 \pm 3.2\%$ of control; $n=3$; $*P < 0.05$; Student's *t*-test) and siRNA-STAU2-2 ($34.3 \pm 3.9\%$ of control; $n=3$; $*P < 0.05$; Student's *t*-test), compared to siRNA-CTL (Fig. 1A and B). When plasmid coding for Stau1-HA instead of Stau2-HA was transfected in HEK293 cells, no significant decrease in the expression of Stau1 protein was observed in the presence of either siRNA-STAU2 compared to siRNA-CTL (siRNA-STAU2-1: $92.0 \pm 5.1\%$ of control; siRNA-STAU2-2: $76.3 \pm 6.2\%$ of control $n=3$; $P > 0.05$; Student's *t*-test) (Fig. 1A and B). These results indicate that transfection of both siRNAs against Stau2 is efficient in down-regulating the expression of Stau2 and the down-regulation is specific, leaving Stau1 levels intact. We observed the same efficacy and specificity of Stau1 siRNA on Stau1-HA and Stau2-HA expression levels (Stau1-HA: $26.7 \pm 7.5\%$ of control; $*P < 0.05$; Stau2-HA: $96.3 \pm 8.7\%$ of control; $n=3$; $P > 0.05$; Student's *t*-test) (Fig. 1A and B).

Next, we tested the efficacy of siRNA-STAU2-1 transfection to down-regulate endogenous Stau2. Biolistic siRNA delivery was performed in 14 DIV slice cultures with either a nontargeting siRNA (siRNA-CTL), or siRNA directed against Stau1 (siRNA-STAU1) or Stau2 (siRNA-STAU2-1). While biolistic DNA plasmid transfection in organotypic slice cultures lead to only a small percentage of transfected neurons (1-2%; (Wellmann et al., 1999; Boda et al., 2004; Govek et al., 2004)), we have found that delivery of siRNAs is much more efficient (Lebeau et al., 2008). Indeed, using a fluorescently labelled siRNA, one can detect high levels of siRNA in most of the

superficial principal neurons in slices where the electrophysiological recordings are performed (Lebeau et al., 2008). The higher transfection efficiency may be due to the requirement for plasmid DNAs to penetrate not only the plasma membrane but also the nuclear membrane for effectiveness, while siRNA is effective in the cytoplasm. Efficient knockdown using siRNA in organotypic slice cultures have also been seen in other studies (Murphy et al., 2008; Dominguez et al., 2009). Two days post-transfection, slices were homogenized and analyzed by western blotting using anti-Stau2 antibody (Fig. 1C). Slices transfected with siRNA-STAU2-1 revealed a significant reduction in endogenous Stau2 expression level compared to slices transfected with siRNA-CTL ($58.1 \pm 8.8\%$ of control; $n=6$, two independent experiments; $*P<0.05$) (Fig. 1D). Since the entire slices were taken for western blot experiments, while only the neurons at the superficial level receive siRNA, the results from this analysis underestimate the knockdown in the neurons recorded in field recording experiments (Lebeau et al., 2008). Stau2 expression levels were not significantly altered in slices transfected with siRNA-STAU1 ($83.4 \pm 15.5\%$ of control). These results indicate that transfection of siRNA-STAU2-1 is efficient and specific in down-regulating the expression of Stau2 protein. Efficacy and selective knockdown of Stau1 endogenous protein levels by siRNA-STAU1 were tested previously (Lebeau et al., 2008) and a 32% decrease of protein level expression was observed, similar to the 42% decrease seen for Stau2. Next, we verified Stau2 knockdown efficacy in individual cells by transfecting primary hippocampal cultures with siRNA-CTL or siRNA-STAU2-1 on 13 DIV and fixing the cells on 15 DIV. The neurons were immunostained for endogenous Stau2, confirming that the knockdown was effective in dendrites and soma (Fig. 1E-G).

5.4.2 STAU2 KNOCKDOWN DOES NOT BLOCK L-LTP

Local translation of mRNAs in dendrites is required for synaptic plasticity (Kiebler and DesGroseillers, 2000; Steward and Schuman, 2001). The RNA-binding proteins Stau1 and Stau2, known to be involved in mRNA trafficking to neuronal dendrites (Kanai et al., 2004; Kim and Kim, 2006) and translational regulation (Dugre-Brisson et al., 2005), are good candidates for regulating synaptic plasticity. Indeed, we recently showed that Stau1 is involved in the late form of LTP (L-LTP) (Lebeau et al.,

2008), a synaptic plasticity process that requires both transcription and translation translation (Krug et al., 1984; Frey et al., 1988; Otani et al., 1989; Nguyen et al., 1994). However the role of Stau2 in synaptic plasticity remains undetermined. Therefore, we first studied the consequence of Stau2 knockdown on forskolin (FSK)-induced L-LTP of CA1 fEPSPs in young mature hippocampal slice cultures (11-14 days) and compared it to that reported for Stau1. This L-LTP is NMDAR dependent and blocked by actinomycin D (Lebeau et al., 2008). Slice cultures were biolistically cotransfected with plasmid coding for EYFP and either siRNA-CTL, siRNA-STAU1 or siRNA-STAU2-1. In slices transfected with siRNA-CTL, application of FSK induced L-LTP of fEPSPs lasting at least 3.5 hr ($164.9 \pm 13.3\%$ of control; $n=5$; $*P<0.05$) (Fig. 2A and 2B). As expected, FSK-induced L-LTP was blocked in slices transfected with siRNA-STAU1 ($105.6 \pm 7.9\%$ of control; $n=7$; $P>0.05$) (Fig. 2A and 2B). In contrast FSK-induced L-LTP was not impaired after Stau2 knockdown ($175.0 \pm 12.8\%$ of control; $n=5$; $*P<0.05$) (Fig. 2A and 2B). The depression of fEPSP responses in the first 60 minutes after LTP induction are due to FSK-induced spontaneous activity, interfering with fEPSPs measures (Otmakhov et al., 2004; Kopec et al., 2006). Similar forskolin-induced spontaneous synaptic activity was observed in all three groups. Moreover, basal synaptic transmission was unchanged after knockdown of Stau1 or Stau2, as shown by input-output function ($n= 6$ to 8 ; $P>0.05$) (Fig. 2C) and paired-pulse facilitation ratio (at intervals of 50 to 150ms) of fEPSPs ($n = 4$ to 8 ; $P>0.05$) (Fig. 2D). These results indicate that Stau2 is not required for FSK-induced L-LTP and thus Stau1 and Stau2 do not share a similar role in this form of synaptic plasticity.

5.4.3 mGLUR-LTD IS IMPAIRED BY STAU2 KNOCKDOWN

Next, we determined whether Stau2 is involved in translation-dependent mGluR1/5-mediated long-term depression (mGluR-LTD) in slice cultures. Activation of mGluR1/5 by the selective agonist DHPG produces LTD which requires local translation of dendritic mRNAs in mature neurons, but not earlier in development (Huber et al., 1998; Fitzjohn et al., 1999; Huber et al., 2000b). First, we established that mGluR1/5-mediated LTD is protein synthesis-dependent in our slice culture model. As expected, application of DHPG in older mature slice cultures (21-24 days) induced LTD

of fEPSPs in siRNA-CTL transfected slices ($63.1 \pm 2.9\%$ of control; $n=5$; $*P<0.05$) (Fig. 3A and 3D) which was dependent on protein synthesis as it was completely blocked by application of rapamycin ($98.1 \pm 9.3\%$ of control; $n=7$; $P>0.05$) (Fig. 3A and 3D).

Next, we examined the importance of Stau2 expression for mGluR-LTD. We showed previously that Stau1 knockdown does not affect translation-independent DHPG-induced LTD in young mature hippocampal slice cultures (11-14 days) (Lebeau et al., 2008). Thus, we tested translation-dependent mGluR-LTD in older mature slice cultures (21-24 days) transfected with either siRNA-STAU1, siRNA-STAU2-1, siRNA-STAU2-2 or siRNA-CTL. Stau1 down-regulation had no effect on mGluR-LTD since application of DHPG induced a similar fEPSP depression in slices transfected with siRNA-STAU1 ($74.0 \pm 13.7\%$ of control; $n=7$; $*P<0.05$) (Fig. 3A and 3D). These results suggest that Stau1 is not implicated in protein synthesis-dependent mGluR-LTD. In contrast, knockdown of Stau2 by two different siRNAs prevented mGluR-LTD (siRNA-CTL: $53.2 \pm 6.9\%$ of control; $n=8$; $*P<0.05$; siRNA-STAU2-1: $94.2 \pm 8.1\%$ of control; $n=7$; $P>0.05$; siRNA-STAU2-2: $97.1 \pm 5.9\%$ of control; $n=8$; $P>0.05$) (Fig. 3B-D). These results indicate that, in contrast to Stau1, Stau2 is necessary for mGluR-LTD. Taken together, our results provide strong evidence for subtype-specific roles of Stau1 and Stau2 in translation-dependent forms of long-term plasticity, with Stau1 critically implicated in FSK-induced L-LTP and Stau2 essentially involved in mGluR1/5-mediated LTD.

5.4.4 STAU2 DOWN-REGULATION ALTERS SPINE MORPHOLOGY IN YOUNG BUT NOT OLDER SLICE CULTURES

It was previously shown that Stau2 down-regulation alters spine morphogenesis (Goetze et al., 2006). In order to understand at a cellular level the role of Stau2 in mGluR-LTD, we next examined if Stau2 knockdown induces some changes in dendritic spine density and morphology in young (11-14 days) and older (21-24 days) mature slice cultures where protein synthesis-dependent mGluR-LTD occurs. Therefore, hippocampal slices were transfected with plasmids coding for EYFP and either siRNA-STAU2-1 or siRNA-CTL. Confocal imaging of EYFP-labelled cells showed no apparent alteration in the general dendritic arborisation in any group (Fig. 4A). The overall spine

density was unchanged among cells of young (11-14 days) versus older (21-24 days) groups and also was unaltered after Stau2 knockdown in either group, indicating first no notable increase in spine number in older mature slices, and second no loss of spines after Stau2 knockdown (Fig. 4B). To further characterize changes in spine morphology, we studied the distribution of different classes of protrusions categorized on length, shape and spine head occurrence (McKinney, 2005; Lebeau et al., 2008). In accordance with results obtained after Stau2 knockdown in neuronal cultures (Goetze et al., 2006), increases in spine length and incidence of elongated type of spines were observed in siRNA-STAU2-1 transfected cells of young (11-14 days) mature slices. The cumulative distribution of spine length was different, the mean spine length was increased ($1.18 \pm 0.03 \mu\text{m}$ for siRNA-STAU2-1 versus $1.09 \pm 0.02 \mu\text{m}$ for siRNA-CTL; * $P < 0.05$) (Fig. 4C) and the proportion of elongated spines was augmented ($46.4 \pm 2.1\%$ of total spine number for siRNA-STAU2-1 compared to $39.4 \pm 2.4\%$ for siRNA-CTL; * $P < 0.05$) (Fig. 4D). In contrast, no changes in dendritic spine length and proportion of elongated spines were seen after Stau2 knockdown in older (21-24 days) mature slice cultures (Fig. 4C and 4D). Thus, Stau2 appears to have a role early in the development of dendritic spine morphogenesis. However, this function is no longer present in older (21-24 days) mature slice cultures at stages when Stau2 plays an essential role in mGluR-LTD, indicating a dissociation of its role in spine alterations and mGluR-LTD.

5.4.5 MINIATURE SYNAPTIC ACTIVITY IS NOT AFFECTED BY STAU2 KNOCKDOWN

We next tested whether Stau2 down-regulation was associated with functional changes at unitary excitatory synapses in older mature slices (21-24 days). We recorded miniature EPSCs (mEPSCs) in EYFP-transfected CA1 pyramidal cells voltage-clamped at -60 mV and examined the effect of siRNA on amplitude and frequency of synaptic activity (Fig. 5A). Stau2 siRNA transfection did not affect miniature synaptic activity. The cumulative distribution of mEPSC amplitude and frequency were unchanged in neurons transfected with siRNA-STAU2-1 relative to neurons transfected with siRNA-CTL ($n=6$ each, 6 slices, 4 independent experiments, $p < 0.05$; Kolmogorov-Smirnov test; Fig. 5B, 5C). The lack of effect on miniature synaptic activity in mature slices suggests

that Stau2 down-regulation does not affect basal transmission at individual excitatory synapses, which is consistent with the unaffected spine morphology.

5.4.6 STAU2 KNOCKDOWN REDUCES ENDOGENOUS MAP1B PROTEIN IN DENDRITES

Staufens are RNA binding proteins, thus we examined next whether the block of mGluR-LTD was associated with changes in translation of mRNAs known to be involved in this plasticity. Map1b protein level increases during DHPG-induced LTD and this increase is required for endocytosis of AMPARs (Hou et al., 2006; Davidkova and Carroll, 2007). We thus investigated whether Stau2 knockdown regulated endogenous Map1b levels using immunocytochemistry in cultured hippocampal neurons at 48 hours post-transfection with siRNA-CTL or siRNA-STAU2-1. Map1b was extensively expressed in dendrites of hippocampal neurons transfected with siRNA-CTL and 20 μ M DHPG treatment significantly increased dendritic levels of Map1b protein (120.9 ± 4.04 % of vehicle-treated siRNA-CTL; * $P < 0.05$; ANOVA) (Fig. 6A and 6B). Knockdown of Stau2 significantly decreased the level of endogenous Map1b protein ($55.80 \pm 4.68\%$ of vehicle-treated siRNA-CTL; ** $P < 0.01$; ANOVA) and prevented the DHPG-induced increase in Map1b protein levels ($58.15 \pm 6.30\%$ of vehicle-treated siRNA-CTL; ** $P < 0.01$; ANOVA) (Fig. 6A and 6B). Our results reveal a functional link between Stau2 and expression of endogenous Map1b protein in dendrites. Moreover, these observations are consistent with a model where knockdown of Stau2 blocks mGluR-LTD by preventing translation of mGluR-LTD related mRNAs.

5.4.7 STAU2 KNOCKDOWN REDUCES THE AMOUNT OF MAP1B mRNA IN DENDRITES

We then tested at the molecular level if Stau2 down-regulation alters the transport /distribution of Map1b mRNA. We made use of the MS2 reporter system where a chimeric mRNA that contains multiple MS2 binding sites (MS2bs) in its 3'UTR is detected by the binding of a fluorescently tagged MS2 protein (Rook et al., 2000). In this study, we used the luciferase ORF on which was fused 24 copies of the MS2 binding site and either the Map1b, the α -CaMKII or the MAP2 3'UTR. Map1b, α -CaMKII and MAP2 3'UTR contain dendritic targeting elements and α -CaMKII is an mRNA translated during L-LTP and a known target of Stau1 (Kanai et al., 2004). When

these mRNA reporters were co-transfected into hippocampal neurons with NLS-MS2-mCherry, distinct puncta were seen in dendrites more than 50 μm from the cell body indicating that the mRNAs are being transported (Fig. S1). Very few puncta were seen in the absence of a co-transfected MS2bs-containing mRNA (Fig. S1). Primary hippocampal cultures (13 DIV) were co-transfected with a plasmid coding for EYFP to visualize the neuron and with siRNA-CTL, siRNA-STAU1 or siRNA-STAU2-1, Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR or Luc-24xMS2bs-CaMKII 3'UTR and NLS-MS2-mCherry. Cells were fixed 48h post-transfection. The number of mRNA: MS2-mCherry puncta were determined by Image J software (with the analyze particles task) and counted in 30-50 μm segments of dendrites at least 50 μm from the cell body to determine the effect of the knockdown on the transport of the reporter mRNAs. There was a significant decrease in the number of Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA puncta in cells transfected with siRNA-STAU2-1 compared to siRNA-CTL (Fig. 7E and 7F) (0.14 ± 0.01 puncta/ μm compared to 0.22 ± 0.02 puncta/ μm ; * $P < 0.05$; $n = 41$ and 34 dendritic segments, respectively; 3-4 independent experiments, ANOVA) while there was no decrease in the number of control Luc-24xMS2bs puncta (Fig. 7A and 7B) or Luc-24xMS2bs-CaMKII mRNA puncta (Fig. 7C and 7D) (0.21 ± 0.02 puncta/ μm compared to 0.23 ± 0.02 puncta/ μm). In contrast knockdown of Stau1 specifically decreased the transport of Luc-24xMS2bs-CaMKII mRNA (0.18 ± 0.01 puncta/ μm compared to 0.23 ± 0.01 puncta/ μm in control, # $P < 0.05$ one-tailed test, ANOVA) and did not affect the transport of Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA (0.25 ± 0.02 puncta/ μm compared to 0.22 ± 0.02 puncta/ μm) nor control Luc-24xMS2bs puncta (Fig. 7A-F). This specificity of Stau1 and Stau2 interactions with L-LTP and mGluR-LTD related mRNAs, respectively, is consistent with the effect of their respective knockdown on synaptic plasticity in slice cultures. The lack of an effect of Stau2 knockdown on transported levels of the CAMKII and Map2 3'UTR reporter mRNAs suggest that Stau2 knockdown does not prevent transport of all mRNAs.

5.4.8 LUC-24XMS2BS-MAP1B 3'UTR MRNA IS FOUND IN BOTH RNA GRANULES AND RNA PARTICLES

We next wanted to determine the type of structure (RNA granules containing ribosomes or RNA transport structures lacking ribosomes) in which Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA was found. Primary hippocampal neurons were co-transfected with plasmids coding for Stau2-GFP, NLS-MS2-mCherry and Luc-24xMS2bs-Map1b at 13 DIV. Cells were also immunostained with antibodies for the ribosomal marker P0 to follow the association of the mRNA constructs with ribosomes and, thus, distinguish between RNA granules and RNA transport particles (Sossin and DesGroseillers, 2006). This experiment revealed that, of the total Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA puncta, $37.4 \pm 4.5\%$ contained Stau2-GFP (Fig. 8C) while $21.6 \pm 3.9\%$ were P0 immunopositive (Fig. 9A). Moreover, $12.2 \pm 2.2\%$ of the Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA puncta co-localized with both Stau2-GFP and P0 (Fig. S2). Therefore, about one-third of the Stau2-positive Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA puncta have the characteristics of RNA granules (positive for P0) whereas more than half of Luc-24xMS2bs-Map1b RNA granules (positive for P0) contained Stau2-GFP. These results suggest that Map1b mRNA can be found in both RNA granules as well as RNA particles, and that a large percentage of the Map1b mRNA-containing granules are associated with Stau2.

5.4.9 STAU2 AND P0 DISSOCIATE FROM LUC-24XMS2BS-MAP1B 3'UTR MRNA UPON DHPG STIMULATION

Local *de novo* synthesis of Map1b protein is required for mGluR-LTD. Translational activation may involve dissociation of an mRNA-protein complex (Krichevsky and Kosik, 2001; Huttelmaier et al., 2005). We thus asked if we could detect changes in the composition of Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR puncta after application of the mGluR-LTD induction protocol. Primary hippocampal neurons were co-transfected with plasmids coding for Stau2-GFP, NLS-MS2-mCherry and either Luc-24xMS2bs-Map1b or Luc-24xMS2bs-Map2 3'UTR at 13 DIV. 48 hours post-transfection, cells were treated with 20 μ M DHPG or vehicle, and fixed 10 min later. First, the number of puncta in dendritic areas more than 50 μ m from the cell body was analyzed for each transfection condition. No differences were found in the total number

of puncta before and after DHPG treatment (Fig. S3), suggesting that DHPG treatment did not change overall expression and/or transport of these mRNA-protein transport complexes.

We next determined the percentage of co-localization of Stau2 and mRNAs for each condition. Interestingly co-localization of Stau2 with Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA was decreased after DHPG treatment (from $32.96 \pm 3.84\%$ to $21.92 \pm 3\%$ of total Stau2 puncta, Fig. 8A and 8B; from $37.43 \pm 4.5\%$ to $24.32 \pm 3.66\%$ of total Map1b puncta, Fig. 8C and 8D; $*P < 0.05$; $n = 25-31$ dendritic segments; 4 independent experiments). In contrast there was no change in the co-localization of Stau2 with Luc-24xMS2bs-Map2 mRNA after DHPG treatment ($35.07 \pm 3.31\%$ and $33.91 \pm 3.59\%$ of total Stau2 puncta; $34.58 \pm 3.5\%$ and $35.21 \pm 3.4\%$ of total Map2 puncta; Fig. 8A-D). Thus it appears that there is a subset of Stau2 granules that respond to DHPG treatment and these contain Map1b mRNA, and vice versa.

Similarly, we observed a decrease in the co-localization of Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA with P0 after DHPG treatment (from $21.61 \pm 3.93\%$ to $10.93 \pm 2.91\%$ of total Map1b puncta; $*P < 0.05$; $n = 22$ and 23 segments; 4 different experiments) (Fig. 9A and 9B). Interestingly, the decrease in the co-localization of Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA and P0 after DHPG treatment was abolished when Stau2 was knocked down with siRNA-STAU2-1. In these conditions, the co-localization of Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA with P0 did not change after DHPG ($28.83 \pm 4.66\%$ and $29.31 \pm 6.16\%$ of total Map1b puncta; $P > 0.05$; $n = 19$ and 20 segments; 4 different experiments; Fig. 9A and 9B), suggesting that Map1b mRNA and P0 dissociation induced by mGluR activation is dependent on Stau2 and that Map1b mRNA not co-localized with Stau2 is not regulated by activation of mGluR during LTD. As control, Luc-24xMS2bs-Map2 mRNA co-localization with P0 was not significantly changed after DHPG treatment (Fig. 9). Altogether, these experiments indicate that mRNA complexes containing Staufen, P0 and Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA are dissociated in response to mGluR activation, suggesting a Stau2-dependent regulation of Map1b mRNA-containing granules during mGluR-LTD induction.

5.5 DISCUSSION

In neurons, localization of mRNAs at the synapse followed by their regulated translation is a mechanism for synaptic plasticity and thus learning and memory (Klann and Dever, 2004). Our study provides evidence for a specific role for Stau2 protein in a particular form of plasticity, mGluR1/5-mediated LTD through regulation of mRNAs required for mGluR-LTD such as Map1b (Fig. S4). Specifically, knockdown of Stau2 blocks this form of LTD, decreases both endogenous Map1b protein expression and the level of a reporter with the MAP1b 3'-UTR that is transported to dendrites, and prevents mGluR1/5-induced dissociation of the Map1b 3'-UTR reporter from P0-containing mRNA granules.

5.5.1 SPECIFICITY OF RNA-TRANSPORT COMPLEXES

An important issue in the role of translation in synaptic plasticity is whether different forms of plasticity induce translation of distinct proteins, or whether the translational regulation is general for all forms of stimulation and the type of plasticity is determined by individual synaptic modification. The phenomenon of cross-tagging suggests that both L-LTP and protein-synthesis dependent LTD stimuli lead to the production of a common set of proteins that are then selected to be used based on the modification of the synapse (Sajikumar and Frey, 2004). While the results cannot be directly compared since LTD elicited *in vivo* with low frequency stimuli (cross-tagging experiments) is probably mechanistically different from the mGluR-LTD elicited in our studies, our results suggest that specific transport complexes are involved in distinct forms of plasticity. The deficit in L-LTP by Stau1 down-regulation and the impairment of DHPG-induced LTD by Stau2 knockdown strongly support the existence of different mechanisms of regulation for distinct pools of mRNAs and subtype-specific roles for Stau1 and Stau2 in distinct translation-dependent forms of long-term plasticity. Another possibility could be that the partial Stau2 knockdown we observed in slice cultures is sufficient to impair mGluR-LTD but not FSK-induced L-LTP, while a complete knockdown might affect both. Stau2 knockdown animals will be required to test this hypothesis.

5.5.2 COMPARISON OF STAU2 AND FMRP KNOCKDOWN IN mGLUR-LTD

Another major mRNA binding protein implicated in mGluR-LTD is FMRP. Comparison of mGluR-LTD studies following Stau2 and FMRP depletion suggests that their roles are more complementary than redundant, since removal of FMRP and Stau2 do not have similar effects. Knockdown of FMRP does not block mGluR-LTD but enhances it and makes it protein synthesis-independent (Hou et al., 2006; Nosyreva and Huber, 2006). In contrast, knockdown of Stau2 blocks mGluR-LTD. Removal of Stau2 reduces dendritic levels of an mGluR-LTD regulated mRNA, while FMRP does not (Bear et al., 2004). While FMRP co-localizes with the Map1b puncta in our study (data not shown), it should be noted that the G quartet thought to be the specific element that associates Map1b with FMRP is in the 5'UTR of Map1b and is not present in our Map1b 3'UTR construct. However, this G quartet has not been shown to be required for FMRP regulation of Map1b translation, and FMRP associates with mRNAs using a number of possible motifs.

5.5.3 DENDRITIC SPINE DEFECTS ARE NOT CRITICAL FOR STAU2-DEPENDENT mGLUR-LTD

As mediators of mRNA transport and translation, some mRNA binding proteins affect spine morphology and this deficiency may underlie genetic neurological diseases. Goezte and al (2006) have shown that Stau2 deficient neurons present a loss of dendritic spines and an increase in filopodia. Our results in young slice cultures also suggest that Stau2 is implicated in synapse formation and spine morphogenesis, although we did not observe a decrease in spine density. This might be due to the use of organotypic slices as opposed to cultured neurons. However, while Stau2 may be important for early development of spines, by the time the neurons have matured, and at the time we are examining translation-dependent mGluR-LTD, the defects are no longer evident. Moreover, in accordance with the intact spine phenotype observed in mature slices after Stau2 knockdown, mEPSCs frequency and amplitude were unchanged, suggesting that basal synaptic function is not affected. Thus the effects of Stau2 knockdown on plasticity are likely due to changes in protein synthesis after induction of mGluR-LTD rather than spine defects.

5.5.4 STAU2 REGULATES MAP1B mRNA DISTRIBUTION DURING mGLUR-LTD

Previous studies showed that Stau1 and Stau2 localize in distinct granules (Duchaine et al., 2002; Thomas et al., 2005) and carry distinct mRNAs (Furic et al., 2008). Consistent with this, we found that siRNA to Stau2, but not to Stau1, specifically lowered the levels of the Map1b 3'UTR mRNA reporter in dendrites. In contrast siRNA to Stau1, as previously reported (Kanai et al., 2004), decreased the levels of α -CaMKII 3'UTR mRNA reporter. Consistently, a recent genome wide identification of Stau2-bound mRNAs in embryonic rat brains identified Map1b mRNA as a target of Stau2 whereas MAP2 and α -CaMKII mRNAs were absent in Stau2-containing complexes (Maher-Laporte and DesGroseillers, 2010).

5.5.5 STAU2 MAY REGULATE A SPECIFIC MRNA GRANULE

Transport of mRNA in dendrites is well established (Carson et al., 2008; Martin and Ephrussi, 2009), however it is unclear whether mRNAs are transported as stalled polysomes in RNA granules, or as nascent mRNAs in RNA transport particles (Sossin and DesGroseillers, 2006). These two models differ in the mechanism of repression during transport, either at elongation for RNA granules or initiation for RNA transport particles. Indeed, a major controversy in the FMRP field is whether the repression mediated by FMRP is at the level of initiation or elongation (Zalfa et al., 2006). While our data is not definitive, the DHPG-induced dissociation of Map1b 3'UTR mRNA reporter from P0 staining is consistent with the model that this mRNA was part of an RNA granule. The dissociation would result in a dispersal of the stalled polysomes to near the threshold of antibody detection. For mRNAs in transport particles, we would have expected to see either no change in the co-localization with ribosomes, or an increase with the formation of polysomes, depending on the sensitivity of the detection technique. However, at this time we cannot rule out the alternative explanation that the dissociation of Map1b 3'UTR mRNA reporter and P0 is due to the completion of translation and reformation of repressed RNA particles not containing ribosomes. The distinction between regulation of RNA granules and transport particles may be important in terms of the time between granule release and production of full length protein. mRNAs in stalled polysomes have already been initiated and presumably have produced

partial fragments of protein. Once released the translation process would resume and the rate of synthesis would only depend on elongation factors. In contrast, mRNAs in transport particles have not gone through an initial round of translation and so initiation is the rate limiting step.

5.5.6 ONLY A SMALL PERCENTAGE OF THE MS2-LABELED PUNCTA APPEAR REGULATED

The use of the MS2 system for following mRNA in cells comes with a few concerns. Despite using an mRNA construct lacking any known localization signals (Luc-24xMS2bs), and looking in dendrites where we would expect minimal contribution from random diffusion, we still saw a comparable number of MS2 puncta (Fig. 7). This may be due to undiscovered localization signals in the luciferase or MS2bs sequences, or to a degree of non-specific binding to transported RNA-protein complexes seen with overexpression. Thus, overexpression of a construct may allow some targeting unseen with endogenous mRNAs. If so, the effect on transport may be underestimated if some of the signal, even 50 μm from the soma, is non-specific. Despite this, we were able to detect significant changes in mRNA localization after disruption of Stau1 or Stau2.

Similarly, to document dissociation of Stau2 from the granule, we examined neurons over-expressing Stau2 although over-expression of RNA binding proteins may perturb RNA trafficking. Nevertheless, we did observe dissociation of Stau2 from Map1b 3'UTR mRNA reporter but not from Map2 3'UTR mRNA reporter under the same conditions, thus demonstrating the specificity of the effect.

5.5.7 MODEL FOR STAU 2 FUNCTION

In the absence of Stau2, we observe both a decrease in the number of Map1b 3'UTR mRNA reporter puncta in dendrites as well as a decrease in the ability of DHPG to dissociate Map1b 3'UTR mRNA reporter from P0 staining, suggesting that during mGluR-LTD induction a Stau2-dependent dissociation of Map1b mRNA from P0-containing mRNA granules leads to local protein synthesis resulting in AMPAR internalization and mGluR-LTD (Fig. S4). A number of possible explanations are consistent with our data (Fig. S4). One possibility is that specific mRNA granules

sensitive to DHPG are not formed in the absence of Stau2. The lack of these granules would explain both the reduced transport of Map1b 3'UTR mRNA reporter in dendrites and the lack of its dissociation. This would also explain the decrease in basal Map1b protein levels in dendrites. Stau2 has been proposed to regulate pre-granule formation in the nucleus and to mediate transport along microtubules (Kiebler et al., 2005; Miki et al., 2005). Thus, interactions of mRNA with Stau2 in the nucleus may recruit additional factors required for the transport and release in the cytoplasm and the effects of Stau2 knockdown may be in the recruitment of these factors. Second, these granules may be present, but Stau2 would be required specifically for loading Map1b 3'UTR mRNA reporter into these granules. Finally, Map1b 3'UTR mRNA reporter may be present in granules but Stau2 may be specifically required for their translational activation (dissociation of Map1b mRNA and ribosomes from granules). Further characterization of these mRNA-protein complexes and the role of Stau2 will be required to differentiate between these possibilities.

In conclusion, our study demonstrates that Stau1 and Stau2 operate different functions in long-term synaptic plasticity. This specificity is related to their regulation of distinct RNA granules. Our results suggest that Stau2 is implicated in the transport and regulation of Map1b mRNA-containing granules. It will be interesting to characterize further the association of Staufen and mRNA-protein complexes to better understand mechanisms of long-term synaptic plasticity and memory, as well as their role in neurological disorders.

5.6 MATERIALS AND METHODS

5.6.1 ORGANOTYPIC HIPPOCAMPAL SLICE CULTURES

Organotypic hippocampal slices were prepared and maintained in culture as previously described (Stoppini et al., 1991; Lebeau et al., 2008). In brief, Sprague-Dawley rats (postnatal day 7; PN7) were anesthetized and decapitated. The brain was removed and dissected in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen Canada, ON) based medium. Cortico-hippocampal slices (400 µm thick) were obtained with a McIlwain

tissue chopper (Campden Instruments, IN). Slices were placed on Millicell culture plate inserts (Millipore, MA) and incubated for 3 days in OptiMem (Invitrogen Canada, ON) based medium at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. Inserts were then transferred to Neurobasal based medium (Invitrogen Canada, ON). Slices were used for experiments after 4-7 days in culture for young mature slice cultures (PN7 + 4-7DIV = 11-14 days old) or 14-17 days for older mature slice cultures (PN7 + 14-17DIV = 21-24 days old).

5.6.2 HEK293 CELLS

HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Life Science), supplemented with 10% Cosmic calf serum (Hyclone, Logan, UT), 5 µg/ml penicillin/streptomycin and 2 mM L-Glutamine (Invitrogen Life Science) and maintained at 37°C saturated with 5% CO₂.

5.6.3 siRNAs AND TRANSFECTIONS

pEYFP-C1 (EYFP) was obtained from Clontech Laboratories (CA). All siRNAs were purchased from Dharmacon (CO). Commercial siCONTROLTM was used as non-targeting control siRNA. siRNA target sequences for rat were:

- siRNA-STAU1: 5'-GGACAGCAGUUUAAUGGGGAUU-3' (sense sequence) and 5'-PUCCCAUAAAACUGCUGUCCUU-3' (antisense sequence) (Lebeau et al., 2008);

- siRNA-STAU2-1: 5'-AGAUAUGAACCAACCUUCAdTdT-3' (sense sequence) and 5'-PUGAAGGUUGGUUCAUAUCUdTdT-3' (antisense sequence) (Goetze et al., 2006);

- siRNA-STAU2-2: 5'-CCUACAGAAUGAGCCAAUUUU-3' (sense sequence) and 5'-PAAUUGGCUCAUUCUGUAGGUU-3' (antisense sequence) (Goetze et al., 2006).

HEK293 cells were seeded at 2×10^5 in a 6 wells plate and transfected with 60 pmol of either siRNA-CTL, siRNA-STAU1, siRNA-STAU2-1 or siRNA-STAU2-2 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Science). 24 hours post-transfection, cells were transfected again with 100 pmol of the respective siRNA and 1 µg each of plasmids coding for Stau1-HA or Stau-2-HA and hnRNPH1-myc, used as control. Cells were processed for western blotting 24 hours post-transfection. Biolistic transfection of

neurons in organotypic slice cultures was performed as previously described (Lebeau et al., 2008), using a Helios gene gun (Bio-Rad, CA) following manufacturer's instructions. Electrophysiological recordings and cell imaging experiments were performed 48 hours after transfection and the experimenter was blind to transfection treatments.

5.6.4 ELECTROPHYSIOLOGY

Individual slice cultures were transferred to a submerged-type recording chamber and continuously perfused (at 1-2 ml/min) with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 10 dextrose, 2.5 CaCl₂, (5 KCl, 2 MgSO₄ and 2 CaCl₂ for LTD experiments), saturated with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4. Extracellular field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded from CA1 stratum radiatum with a glass microelectrode (2-3 M Ω) filled with 2 M NaCl in slices maintained at 25-27°C. Data acquisition (filtered at 2 KHz, digitized at 10 kHz) and analysis were performed using a PC equipped with pClamp9 software (Molecular Devices). A bipolar tungsten electrode placed in stratum radiatum was used for electrical stimulation of Schaffer collaterals. The input-output function was determined at the beginning of each experiment (example in Fig. 2C) to verify optimal placement of electrodes. Note that fEPSPs are typically smaller in amplitude in cultured slices than in acutely prepared slices, because of flattening of the slice in culture conditions. However with optimal electrode placement, fEPSPs were clearly above detection level and fEPSP slope was reliably measured (see also (Lebeau et al., 2008)). Stimulus intensity (0.1 ms duration) was adjusted to elicit 30-40% of the maximal fEPSP, as determined by an input-output curve for each slice (LTD, 60% of maximal). To reduce spontaneous activity, CA1 and CA3 hippocampal regions were isolated by a surgical cut. The late form of long-term potentiation (L-LTP) was induced chemically by the adenylate cyclase activator forskolin (FSK, 50 μ M, Sigma) (Kelleher et al., 2004; Kopec et al., 2006). Long-term depression (LTD) was induced chemically by the group I metabotropic glutamate receptor (mGluR) agonist (*S*)-3, 5-dihydroxyphenylglycine (DHPG, 100 μ M, Ascent). Miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded in whole-cell patch-clamp mode from EYFP-transfected

CA1 pyramidal cells using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) in slices maintained at 30-32°C. Recording pipettes (4-5 MΩ) were filled with a solution containing (in mM): 130 CsMeSO₃, 5 CsCl, 2 MgCl₂, 5 diNa-phosphocreatine, 10 HEPES, 2 ATPTris, and 0.4 GTPTris, pH 7.2–7.3, 275-285 mOsm. Bicuculline (Bic; 10 μM) and tetrodotoxin (TTX; 0.5 μM) were added to the extracellular solution, and cells were voltage clamped at -60 mV. Data acquisition (filtered at 2 KHz, digitized at 10 kHz) and analysis were performed using a PC equipped with pClamp9 software (Molecular Devices). Threshold mEPSC amplitude was set at 3 pA, and typically 150-250 events were collected over a 10-20 minute period.

5.6.5 PRIMARY HIPPOCAMPAL NEURONS

Rat primary hippocampal neurons were dissected from E17-E19 Sprague Dawley embryos (Charles River Laboratories) and cultured as described (Banker and Goslin, 1988; Elvira et al., 2006). Briefly, neurons were plated at 80 000 cells/ml on 18-mm diameter glass coverslips (Fisher Scientific) coated with 0.1% poly-D-lysine. Cells were cultured in Neurobasal medium supplemented with 0.25X GlutaMax, 1% B27 supplement, 1% N2 supplement, and Penicillin/Streptomycin (Gibco, Invitrogen). On day 4 and day 11 after plating half of the media was exchanged for fresh media.

5.6.6 PRIMARY CULTURE TRANSFECTIONS

Transfections of 20 pmol of siRNA and 0.3 μg of plasmid coding for EYFP were performed with 2 μl of Lipofectamine-2000 reagent (Invitrogen). For puncta analysis neurons were transfected on day 13 after plating using Lipofectamine 2000. Briefly, 3 μL Lipofectamine 2000/50 μL Neurobasal was combined with 2-3 μg DNA and/or 20 pmol siRNA/50 μL Neurobasal after 5 min. After 20 min, the conditioned media was removed from the cells and saved and the 100 μL DNA/Lipofectamine mixture added. The cells were placed at 37°C for 10 min. The transfection media was removed and replaced with conditioned media. DNA used was purified using double banded CsCl or an endotoxin-free Maxi Prep kit (Qiagen).

5.6.7 PLASMIDS

pcDNA-CMV-NLS-HA-MS2-mCherry and pcDNA-CMV-Stau1-Topaz were constructed as previously described (Wickham et al., 1999). pcDNA-SMV-Stau2-GFP was a kind gift from Dr. Michael A. Kiebler (Medical University of Vienna). Luc-24x-MS2 was cloned into pcDNA-RSV. The dendritic targeting element of rat MAP2 3'UTR was cloned as previously described (Gobert et al., 2008). The full length mouse CaMKII 3'UTR (Mayford et al., 1996; Smith and McMahon, 2005) was cloned from a previously characterized reporter plasmid (Aakalu et al., 2001) and the full length rat Map1b 3'UTR (Accession #: NM_019217.1) was cloned from whole rat brain cDNA using the primers 5'-AAAGATATCAAACCGCAGCCGACCACACC-3' and 5'-TTTCTCGAGGATGTCTCAACACACAAGTGAAC-3' (underlined are the EcoRV and XhoI restriction sites, respectively, for cloning purpose). These were inserted into the RSV-Luc-24xMS2bs construct to give RSV-Luc-24xMS2bs-Map2 3'UTR, RSV-Luc-24xMS2bs-CaMKII 3'UTR and RSV-Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR, respectively.

5.6.8 DHPG TREATMENT AND IMMUNOCYTOCHEMISTRY

48 hours post-transfection cultured neurons were treated with 20 μ M DHPG (Davidkova and Carroll, 2007) (Tocris, Ascent) or vehicle in culture medium for 10 min at 37°C. Immediately after treatment neurons were rinsed with 1xHBSS (Gibco), fixed in 4% paraformaldehyde/PBS containing 4% sucrose and rinsed 3x with rinsing buffer (0.5 mM MgCl₂, 0.1 M glycine, 1xPBS). Fixed cells were permeabilized (0.1% Tx100, 0.02% NaN₃, 1xPBS) and blocked (5% BSA, 5% goat serum, 0.1% Tx100, 0.02% NaN₃, 1xPBS) at room temperature. The coverslips were placed cell side up on parafilm and incubated in a humid container at 4°C overnight with primary antibody in dilution buffer (0.5% BSA, 5% goat serum, 0.1% Tx100, 0.02% NaN₃, 1xPBS). The cells were washed 3x with 1xPBS and incubated in a humid container at room temperature for 1 hour with secondary antibody in dilution buffer. The cells were washed 3x with 1xPBS and 2x with dH₂O prior to mounting on glass slides with Dako fluorescent mounting media (Dako). The primary antibodies used were mouse monoclonal anti-Staufen2 antibodies (Duchaine et al., 2002), human anti-P0 antibodies (ImmunoVision, Inc) and anti-Map1b (Santa Cruz). The secondary antibodies used were AlexaFluor 647 goat anti-mouse

(dilution 1:200) and goat anti-human IgG (dilution 1:1000) from Molecular Probes (Invitrogen).

5.6.9 WESTERN BLOTTING

Protein samples from hippocampal slices or HEK cell extracts were separated on a 10% SDS polyacrylamide gels electrophoresis (PAGE) and transferred on to Amersham Hybond™-P (PVDF) membrane. Immunoblots were performed in PBS/0.2% tween-20 with specific antibodies.

5.6.10 IMAGING, MORPHOLOGICAL AND PUNCTA ANALYSIS

For spine analysis, organotypic slice cultures were fixed with 4% paraformaldehyde overnight at 4°C, washed in phosphate buffer and mounted on slides for confocal microscopy. EYFP-transfected CA1 pyramidal neurons were randomly selected based on green fluorescence and characteristic morphology. Z-stacks consisting of 10-20 sections (512 x 512 pixels, 30-100 µm-long dendritic segments) spaced 0.2-0.4 µm apart were collected from the secondary branches of apical dendrites using a confocal laser scanning microscope LSM 510 (Carl Zeiss, Kirkland QC) equipped with a 63X oil-immersion objective (NA 1.4; Carl Zeiss, Kirkland QC). The length and morphology of dendritic spines were analyzed using the LSM 510 software. Three to four independent experiments were performed and 1505 protrusions were analyzed from 30 neurons. For puncta analysis on dissociated cultured hippocampal neurons, Z-stacks consisting of 10-14 sections (512 x 512 pixels, 30-50 µm-long dendritic segments) spaced 0.4 µm apart were collected from sections of neurites situated at least 50 µm from the cell body. Image J software was used for puncta analysis and the "analyze particles task" was used to count particles between 0.3-1.5 µm in diameter. Co-localization was analyzed and quantified by thresholding the images and minimal background changes were made for the analysis. For the figures, colors were inverted to ease visualization of the puncta. For co-localization analysis, the coordinates (x,y) of GFP particles were compared to the coordinates of MS2-mCherry and/or anti-P0 particles in the same region; if particle coordinates overlapped; they were considered to be co-localized (Rook et al., 2000). For Map1b immunocytochemistry on dissociated hippocampal neurons, sections of neurites

situated from 50 to 100 μm of the cell body were selected for analysis. These regions of interest (ROI) were background subtracted and were analyzed using Image J software. For each condition, 16-18 cells were analyzed from 4 different experiments.

5.7 ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Team Grant; JCL; CIHR grant MOP 15121; WS), Fonds de la recherche en santé du Québec (Groupe de recherche sur le système nerveux central; JCL, WS, LD) and the Canada Research Chair Program (Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology; JCL). WSS is a James McGill scholar and FRSQ Chercheur National. GL was supported by a Savoy Foundation studentship. LM was supported by a Fonds de la recherche en santé du Québec studentship. The authors would like to thank Julie Pepin and Catherine Bourgeois for excellent technical assistance.

5.8 REFERENCES

- Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, Jiang C, Schuman EM (2001) Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 30:489-502.
- Andreassi C, Riccio A (2009) To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol* 19:465-474.
- Banker G, Goslin K (1988) Developments in neuronal cell culture. *Nature* 336:185-186.
- Bear MF, Huber KM, Warren ST (2004) The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* 27:370-377.
- Boda B, Alberi S, Nikonenko I, Node-Langlois R, Jourdain P, Moosmayer M, Parisi-Jourdain L, Muller D (2004) The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J Neurosci* 24:10816-10825.
- Bradshaw KD, Emptage NJ, Bliss TV (2003) A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP. *Eur J Neurosci* 18:3150-3152.

- Bramham CR, Wells DG (2007) Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 8:776-789.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF (2008) The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28:11760-11767.
- Carson JH, Gao Y, Tataavarty V, Levin MK, Korza G, Francone VP, Kosturko LD, Maggipinto MJ, Barbarese E (2008) Multiplexed RNA trafficking in oligodendrocytes and neurons. *Biochim Biophys Acta* 1779:453-458.
- Davidkova G, Carroll RC (2007) Characterization of the role of microtubule-associated protein 1B in metabotropic glutamate receptor-mediated endocytosis of AMPA receptors in hippocampus. *J Neurosci* 27:13273-13278.
- Dominguez R, Hu E, Zhou M, Baudry M (2009) 17beta-estradiol-mediated neuroprotection and ERK activation require a pertussis toxin-sensitive mechanism involving GRK2 and beta-arrestin-1. *J Neurosci* 29:4228-4238.
- Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L (2002) Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115:3285-3295.
- Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33:4797-4812.
- Elvira G, Massie B, DesGroseillers L (2006) The zinc-finger protein ZFR is critical for Staufen 2 isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons. *J Neurochem* 96:105-117.
- Fitzjohn SM, Kingston AE, Lodge D, Collingridge GL (1999) DHPG-induced LTD in area CA1 of juvenile rat hippocampus; characterisation and sensitivity to novel mGlu receptor antagonists. *Neuropharmacology* 38:1577-1583.
- Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H (1988) Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res* 452:57-65.
- Furic L, Maher-Laporte M, DesGroseillers L (2008) A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *Rna* 14:324-335.

- Gobert D, Topolnik L, Azzi M, Huang L, Badeaux F, Desgroseillers L, Sossin WS, Lacaille JC (2008) Forskolin induction of late-LTP and up-regulation of 5' TOP mRNAs translation via mTOR, ERK, and PI3K in hippocampal pyramidal cells. *J Neurochem* 106:1160-1174.
- Goetze B, Tuebing F, Xie Y, Dorostkar MM, Thomas S, Pehl U, Boehm S, Macchi P, Kiebler MA (2006) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* 172:221-231.
- Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci* 7:364-372.
- Hengst U, Deglincerti A, Kim HJ, Jeon NL, Jaffrey SR (2009) Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein. *Nat Cell Biol* 11:1024-1030.
- Holt CE, Bullock SL (2009) Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* 326:1212-1216.
- Hou L, Antion MD, Hu D, Spencer CM, Paylor R, Klann E (2006) Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron* 51:441-454.
- Huber G, Marz W, Martin JR, Malherbe P, Richards JG, Sueoka N, Ohm T, Hoffmann MM (2000a) Characterization of transgenic mice expressing apolipoprotein E4(C112R) and apolipoprotein E4(L28P; C112R). *Neuroscience* 101:211-218.
- Huber KM, Sawtell NB, Bear MF (1998) Effects of the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG on phosphoinositide turnover and synaptic plasticity in visual cortex. *J Neurosci* 18:1-9.
- Huber KM, Kayser MS, Bear MF (2000b) Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* 288:1254-1257.
- Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438:512-515.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-525.

- Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S (2004) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116:467-479.
- Kiebler MA, DesGroseillers L (2000) Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* 25:19-28.
- Kiebler MA, Jansen RP, Dahm R, Macchi P (2005) A putative nuclear function for mammalian Staufen. *Trends Biochem Sci* 30:228-231.
- Kim KC, Kim HK (2006) Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci Lett* 397:48-52.
- Klann E, Dever TE (2004) Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:931-942.
- Kopec CD, Li B, Wei W, Boehm J, Malinow R (2006) Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci* 26:2000-2009.
- Krichevsky AM, Kosik KS (2001) Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* 32:683-696.
- Krug M, Lossner B, Ott T (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull* 13:39-42.
- Lebeau G, Maher-Laporte M, Topolnik L, Laurent CE, Sossin W, Desgroseillers L, Lacaille JC (2008) Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol* 28:2896-2907.
- Lin AC, Holt CE (2007) Local translation and directional steering in axons. *Embo J* 26:3729-3736.
- Maher-Laporte M, DesGroseillers L Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains. *BMB Rep* 43:344-348.
- Martin KC, Ephrussi A (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136:719-730.
- Mayford M, Baranes D, Podsypanina K, Kandel ER (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* 93:13250-13255.

- McKinney RA (2005) Physiological roles of spine motility: development, plasticity and disorders. *Biochem Soc Trans* 33:1299-1302.
- Miki T, Takano K, Yoneda Y (2005) The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleocytoplasmic shuttling function. *Cell Struct Funct* 30:51-56.
- Miniaci MC, Kim JH, Puthanveetil SV, Si K, Zhu H, Kandel ER, Bailey CH (2008) Sustained CPEB-dependent local protein synthesis is required to stabilize synaptic growth for persistence of long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* 59:1024-1036.
- Morita T, Sobue K (2009) Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J Biol Chem* 284:27734-27745.
- Murphy N, Bonner HP, Ward MW, Murphy BM, Prehn JH, Henshall DC (2008) Depletion of 14-3-3 zeta elicits endoplasmic reticulum stress and cell death, and increases vulnerability to kainate-induced injury in mouse hippocampal cultures. *J Neurochem* 106:978-988.
- Nguyen PV, Abel T, Kandel ER (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265:1104-1107.
- Nosyreva ED, Huber KM (2006) Metabotropic receptor-dependent long-term depression persists in the absence of protein synthesis in the mouse model of fragile X syndrome. *J Neurophysiol* 95:3291-3295.
- Otani S, Marshall CJ, Tate WP, Goddard GV, Abraham WC (1989) Maintenance of long-term potentiation in rat dentate gyrus requires protein synthesis but not messenger RNA synthesis immediately post-tetanicization. *Neuroscience* 28:519-526.
- Otmakhov N, Tao-Cheng JH, Carpenter S, Asrican B, Dosemeci A, Reese TS, Lisman J (2004) Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation. *J Neurosci* 24:9324-9331.
- Rook MS, Lu M, Kosik KS (2000) CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J Neurosci* 20:6385-6393.

- Sajikumar S, Frey JU (2004) Late-associativity, synaptic tagging, and the role of dopamine during LTP and LTD. *Neurobiol Learn Mem* 82:12-25.
- Sanchez-Carbente Mdel R, Desgroseillers L (2008) Understanding the importance of mRNA transport in memory. *Prog Brain Res* 169:41-58.
- Sebeo J, Hsiao K, Bozdagi O, Dumitriu D, Ge Y, Zhou Q, Benson DL (2009) Requirement for protein synthesis at developing synapses. *J Neurosci* 29:9778-9793.
- Smith CC, McMahon LL (2005) Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J Neurosci* 25:7780-7791.
- Sossin WS, DesGroseillers L (2006) Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* 7:1581-1589.
- Steward O, Schuman EM (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* 24:299-325.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.
- Sutton MA, Schuman EM (2006) Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127:49-58.
- Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Loschi M, Pasquini JM, Correale J, Kindler S, Boccaccio GL (2005) Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* 16:405-420.
- Waung MW, Pfeiffer BE, Nosyreva ED, Ronesi JA, Huber KM (2008) Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron* 59:84-97.
- Wellmann H, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (1999) Optimized protocol for biolistic transfection of brain slices and dissociated cultured neurons with a hand-held gene gun. *J Neurosci Methods* 92:55-64.
- Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L (1999) Mammalian stauferin is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19:2220-2230.

Zalfa F, Achsel T, Bagni C (2006) mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:265-269.

5.9 FIGURES AND LEGENDS

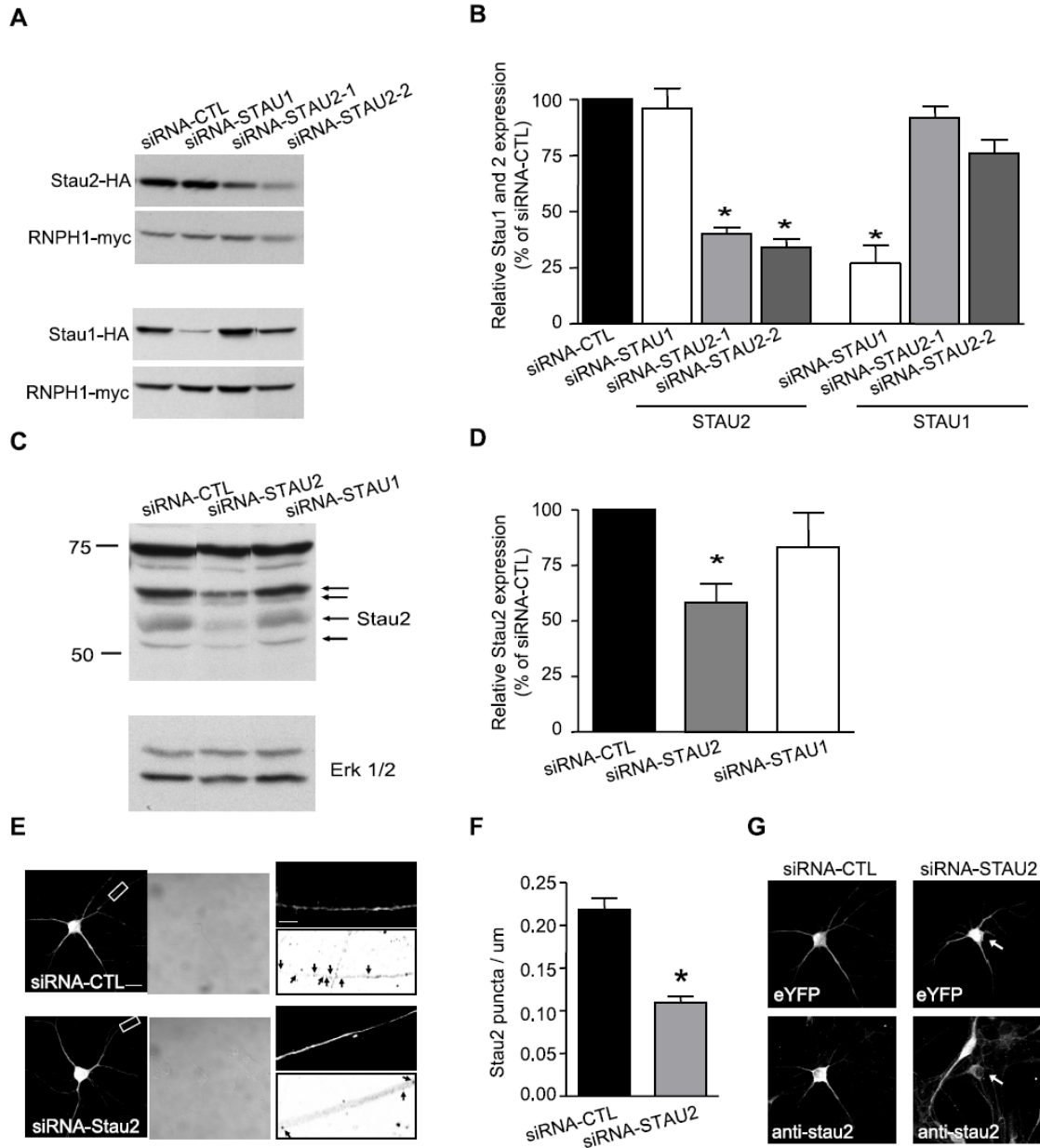


Figure 1. Knockdown of Stau2 by siRNA in HEK293 cells, hippocampal slice cultures and primary hippocampal neurons. (A, B) Stau2 protein expression level

was monitored by Western blotting in HEK293 cells. HEK293 cells were co-transfected with plasmids coding for hnRNPH1-myc and either mStau2-HA or mStau1-HA, as well as either siRNA-CTL, siRNA-STAU1, siRNA-STAU2-1 or siRNA-STAU2-2 (A). Expression of the proteins were analyzed using anti-HA and anti-myc antibodies and plotted as the percentage of expression of Stau1-HA or Stau2-HA compared to that of hnRNPH1-myc (B). Expression of Stau2-HA and Stau1-HA in cells with siRNA-CTL was set to 100%. Protein expression level (%) of Stau2, but not of Stau1, is significantly down-regulated in cells transfected with both siRNAs against Stau2. Protein expression level (%) of Stau1, but not of Stau2, is significantly down-regulated in cells transfected with siRNA-STAU1. (C,D). Stau2 protein expression level was monitored by Western blotting in older mature hippocampal slice cultures (21-24 days) biolistically transfected with siRNA-CTL, siRNA-STAU2-1 or siRNA-STAU1. Stau2-1 siRNA significantly decreases the amount of the four endogenous Stau2 isoforms (arrows point to 62, 59, 56 and 52 kDa, respectively) (normalized to Erk level). (E-G) Representative neurons from primary cultures cotransfected with EYFP and siRNA-CTL or si-RNA-STAU2-1, and stained for endogenous Stau2. Left panels: EYFP expressing neurons with the box indicating the area shown in the right panels. Centre panels: DIC images of the neurons. Right panels: top image is the EYFP expressing dendrite, bottom image is the endogenous Stau2. Arrows indicate Stau2 puncta. (F) Quantification of the number of Stau2 puncta/ μm more than 50 μm from the cell body (n = 30, siRNA-CTL; n=33, siRNA-STAU2-1, 3 to 4 independent experiments). (G) Left panels: siRNA-CTL transfected neurons. Right panels: siRNA-STAU2-1 transfected neurons. Top images represent eYFP expression, bottom images are the endogenous Stau2. Arrows in right panels indicate siRNA-STAU2-1 transfected cell beside an untransfected cell. *, $P < 0.05$, t-test. Error bars represent s.e.m., Scale bars, 20 μm and 10 μm for inset.

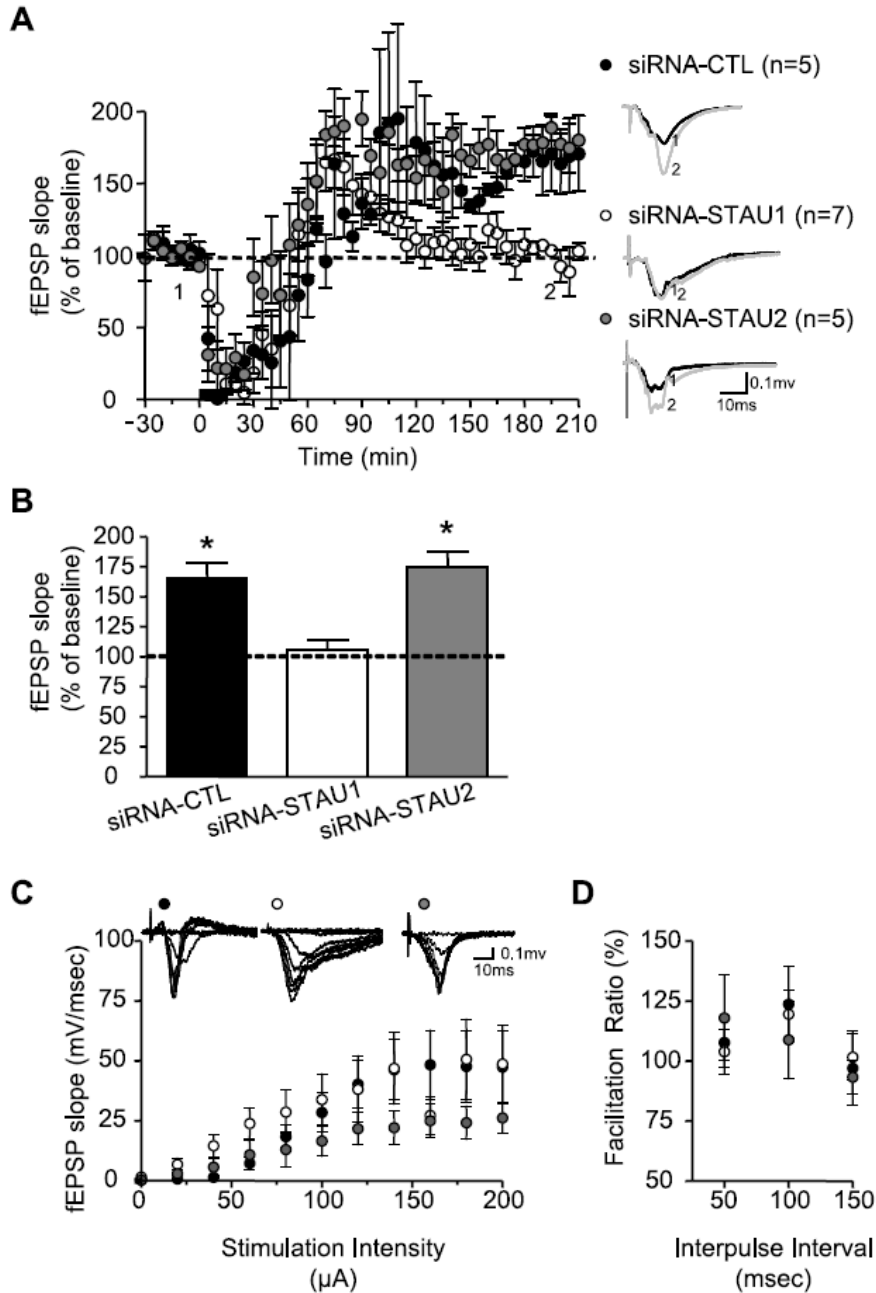


Figure 2. Stau2 siRNA does not prevent FSK-induced L-LTP. (A) Potentiation of fEPSP slope induced by FSK application (50 μ M, 15 min) in mature cultured slices transfected with siRNA-CTL, siRNA-STAU1 and siRNA-STAU2-1. Corresponding field potentials before (black line) and after (gray line) FSK application are shown at right. (B) Summary bar graph showing changes in fEPSPs slope 200 min post-FSK application. Significant L-LTP was present in slices transfected with siRNA-CTL and siRNA-STAU2-1 but absent in slices transfected with siRNA-STAU1, indicating that

only Stau1 knockdown prevents L-LTP. *, $P < 0.05$, t-test. Error bars represent s.e.m. (C-D) Stau1 and Stau2 siRNA transfection did not affect basal synaptic transmission (C, input-output function; D, paired-pulse facilitation ratio).

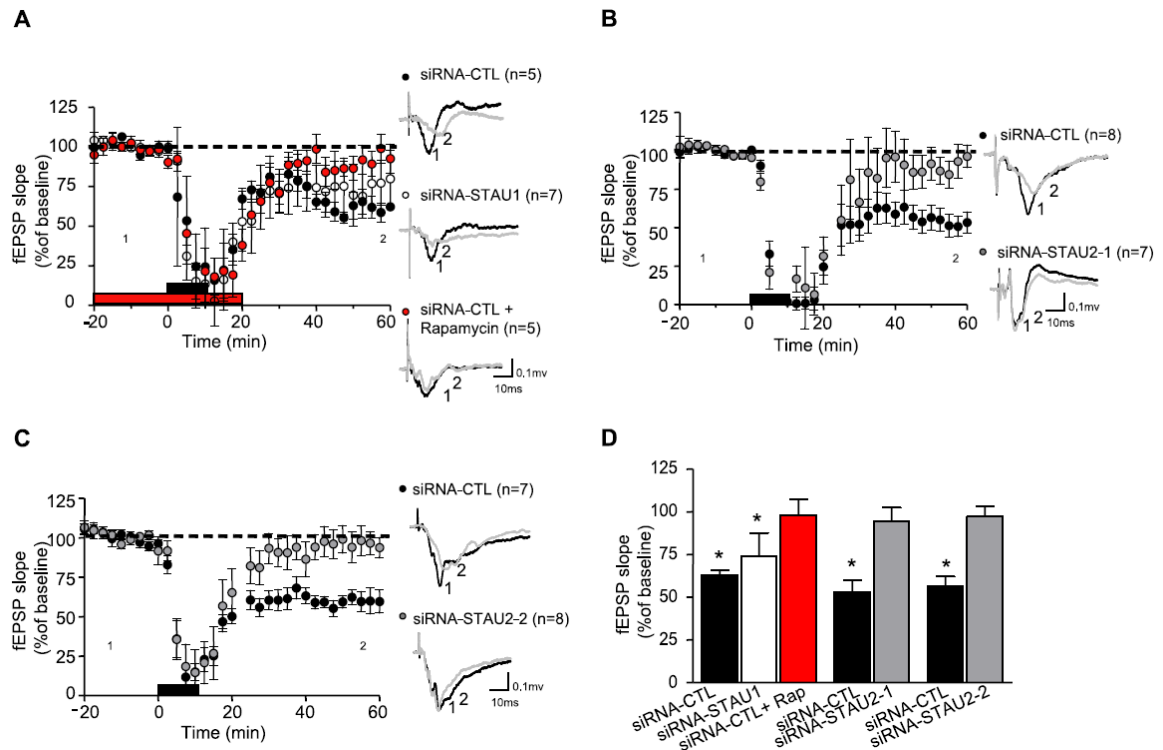


Figure 3. Stau2 siRNA impairs mGluR-induced protein synthesis-dependent LTD.

(A) Long-term depression of fEPSP slope induced by DHPG application ($100 \mu\text{M}$, 10 min) in older mature slice cultures transfected with siRNA-CTL and siRNA-STAU1. LTD is blocked by the protein synthesis inhibitor rapamycin (200 nM , 20 min before and after LTD induction; siRNA-CTL transfection). Corresponding field potentials before (black line) and after (gray line) DHPG application are shown at right. (B-C) DHPG-induced LTD is blocked by two different Stau2 siRNAs, siRNA-STAU2-1 (B) and siRNA-STAU2-2 (C). Corresponding field potentials before (black line) and after (gray line) DHPG application are shown at right. (D) Summary bar graph showing changes in fEPSPs slope 60 min post-DHPG application. Significant LTD was present in slices transfected with siRNA-CTL and siRNA-STAU1, but was blocked by rapamycin, indicating that mGluR-induced LTD is protein synthesis-dependent in older mature slice cultures. Stau2 siRNA transfection prevented DHPG-induced LTD, indicating that only Stau2 knockdown impairs mGluR-LTD. *, $P < 0.05$, t-test. Error bars represent s.e.m.

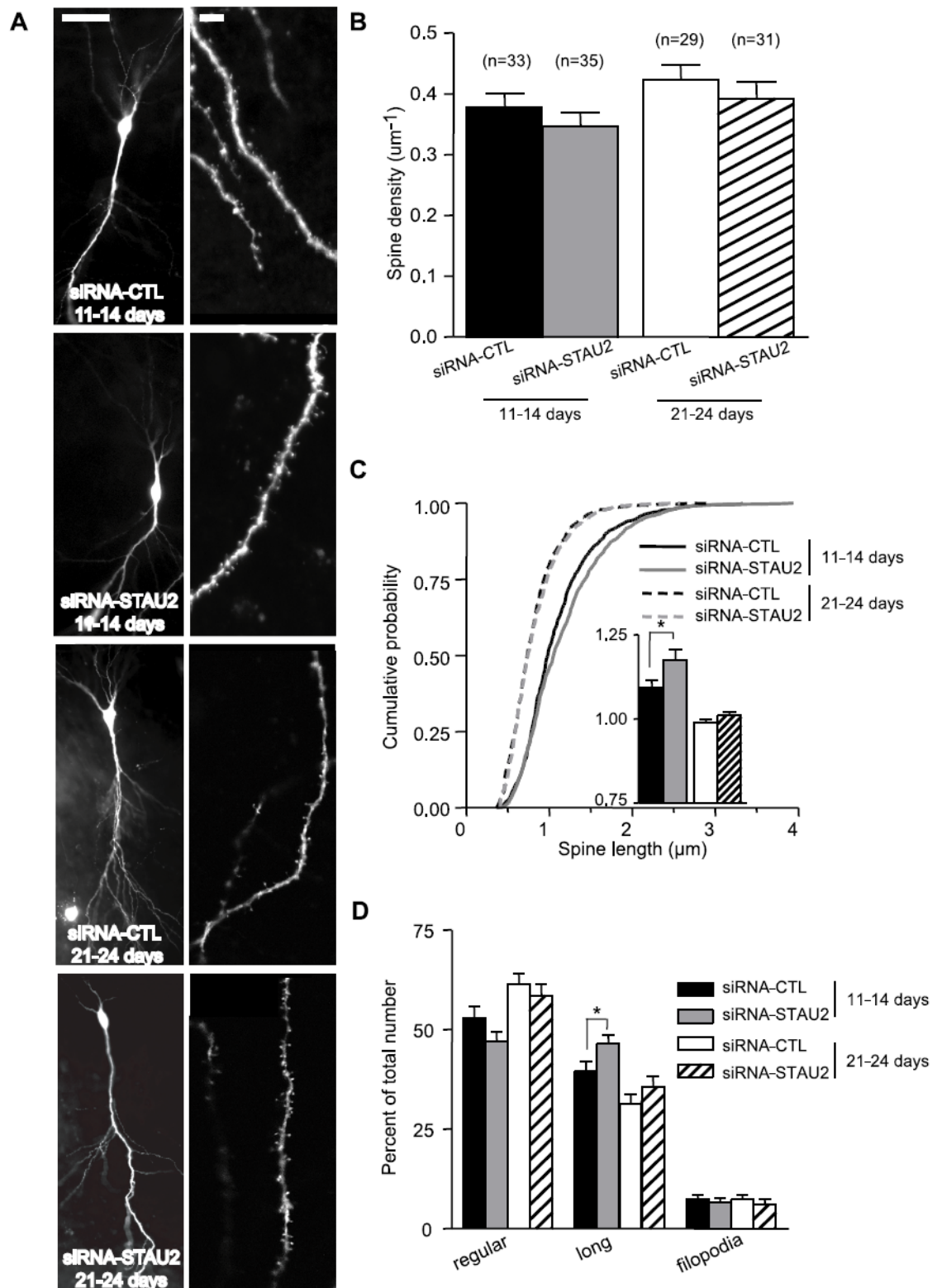


Figure 4. Stau2 siRNA does not affect pyramidal cell spine morphology in older mature slice cultures. (A) Confocal images of representative CA1 pyramidal cells (left)

and apical dendrites (right) after transfection with siRNA-CTL and siRNA-STAU2-1 in young (11-14 days) and older (21-24 days) mature slice cultures. (B) Spine density was unchanged by Stau2 siRNA transfection in either age group. (C) Cumulative plots of the distribution of spine length for each group, with summary bar graph of spine length in the inset, showing increased spine length after Stau2 siRNA transfection only in young mature slice cultures. (D) Summary bar graph of number of regular, elongated and filopodium types of spines in each group, showing increase in elongated spines after Stau2 siRNA transfection only in young mature slice cultures. Scale bars 25 μm , 5 μm . *, $P < 0.05$, t-test. Error bars represent s.e.m.

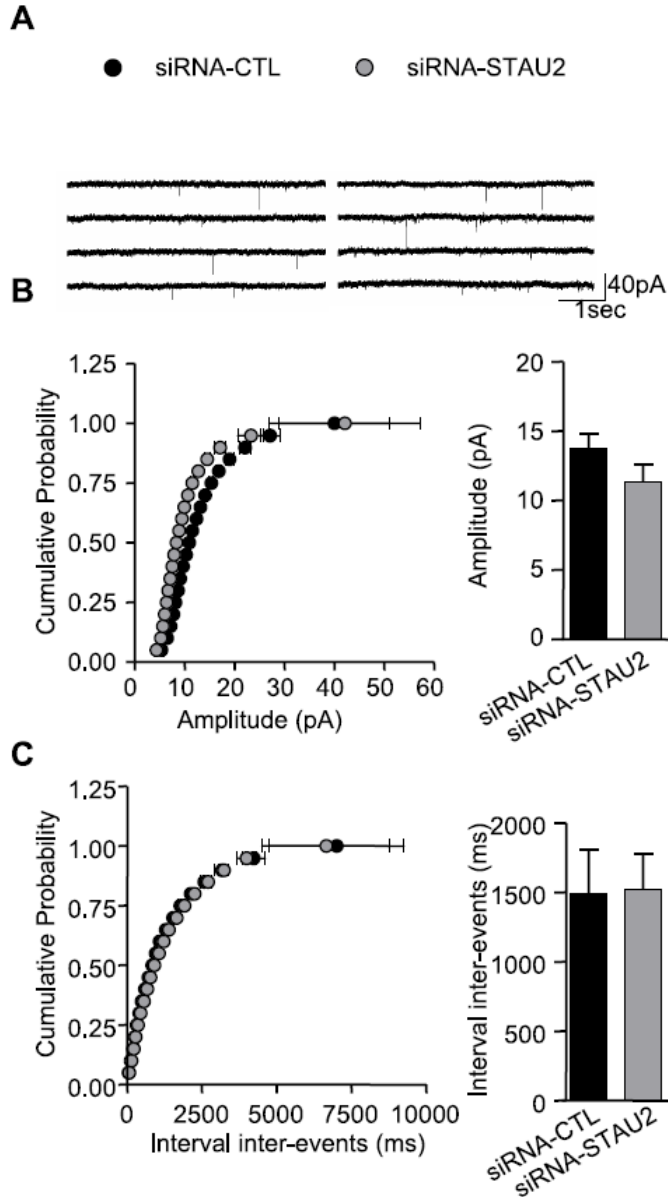


Figure 5. Spontaneous miniature synaptic activity is not affected by Stau2 knockdown.

Stau2 siRNA transfection does not impair frequency and amplitude of mEPSCs. (A) Representative traces from pyramidal neurons transfected with siRNA-CTL (left) or siRNA-STAU2-1 (right) in older (21-24 days) mature slice cultures. (B-C) Summary plots of cumulative distribution and summary bar graph of mEPSC amplitude (pA) (B) and inter-mEPSC intervals (msec) (C) for the corresponding groups (n = 6 cells in each group) showing no changes in amplitude and frequency of mEPSCs in neurons transfected with siRNA-STAU2-1. Error bars represent sem.

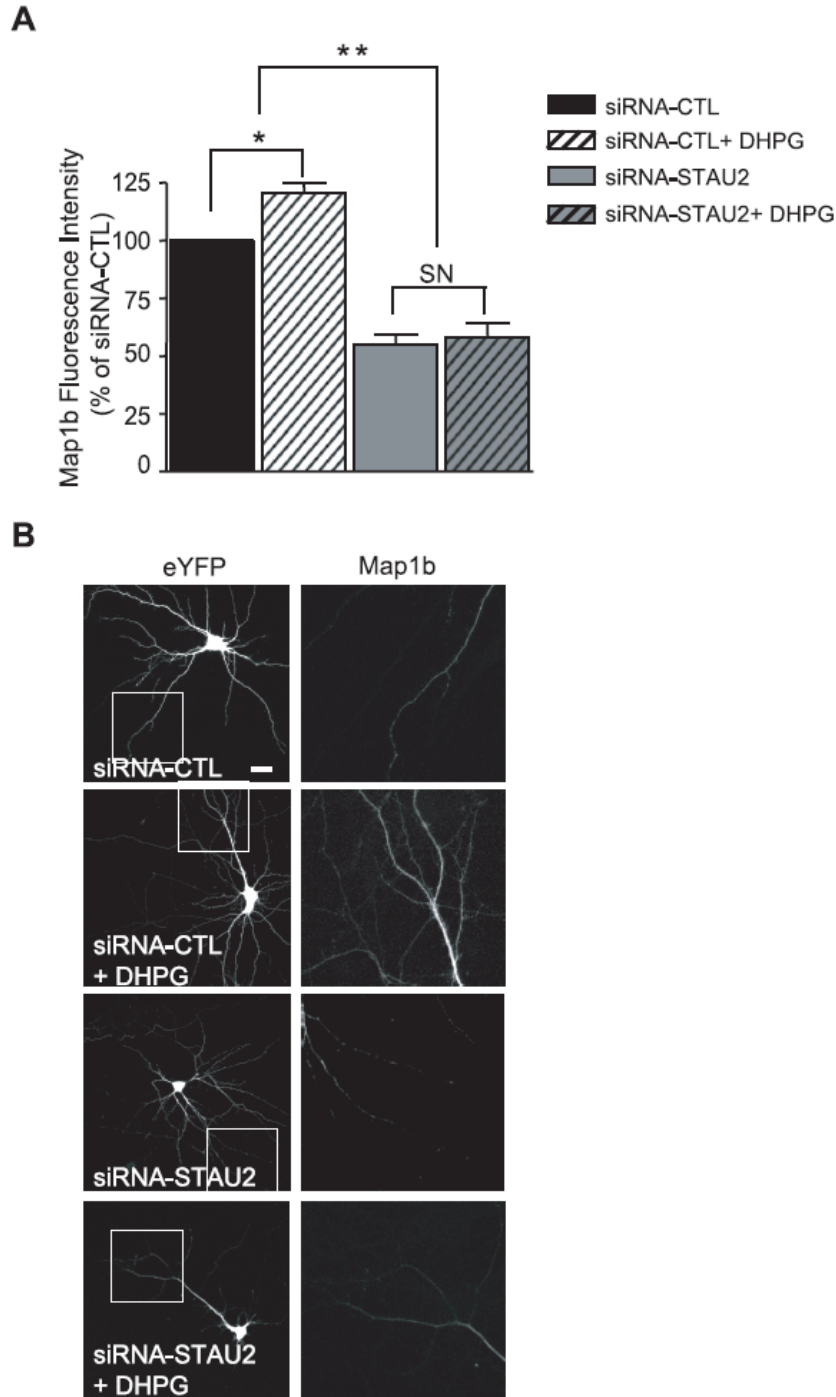


Figure 6. Stau2 knockdown decreases endogenous Map1b protein level and prevents DHPG-induced increases of Map1b in dendrites. (A, B) Immunocytochemistry for endogenous Map1b protein in neurons transfected with EYFP and siRNA-CTL or siRNA-STAU2-1. (A) Summary bar graph of endogenous Map1b protein level in dendrites (50 to 100 μ m from the cell body), with and without DHPG treatment (20 μ M). (B) Confocal images of representative neurons transfected with

siRNA-CTL and siRNA-STAU2-1, with or without DHPG treatment (eYFP, left; Map1b, right). Boxed area in the left panels indicates region shown at higher magnification in right panels. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, ANOVA. Error bars represent s.e.m. Scale bar 20 μm

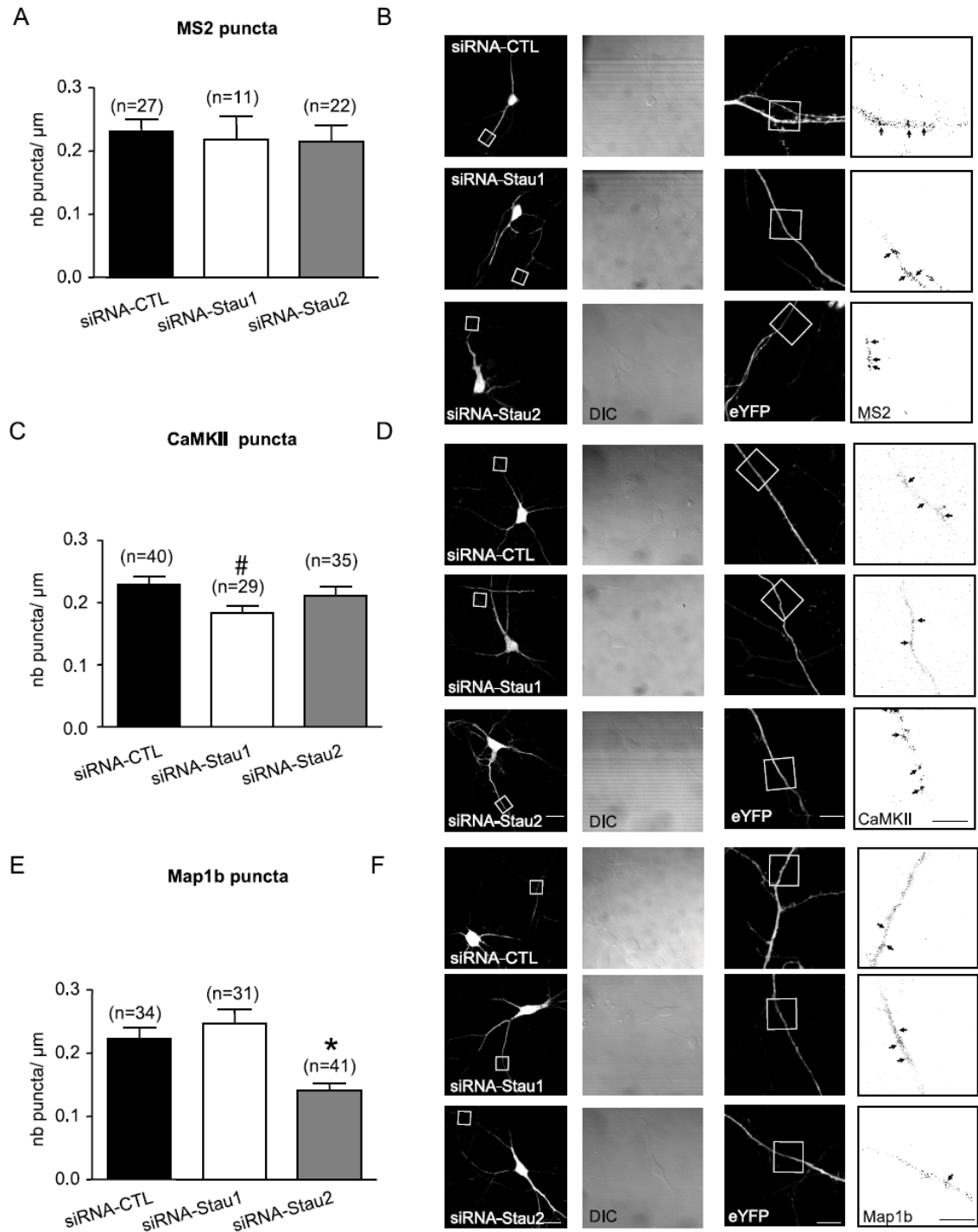


Figure 7. Stau2 knockdown reduces transport of Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR mRNA. (A, C, E) Summary bar graphs of the number of NLS-MS2-mCherry puncta / μm more than 50 μm from the cell body in cells transfected with EYFP and NLS-MS2-mCherry, siRNAs (siRNA-CTL, siRNA-STAU1, or siRNA-STAU2-1), and mRNA reporters (Luc-24xMS2bs (A), Luc-24xMS2bs-CaMKII 3'UTR (C), or Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR (E)). siRNA-STAU1 significantly decreases Luc-24xMS2bs-CaMKII 3'UTR mRNA (C) and siRNA-STAU2-1 significantly reduces Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR mRNA (E). (B, D, F) Confocal images of representative neurons transfected with siRNA-CTL (top panels), siRNA-STAU1 (middle panels) or siRNA-STAU2-1 (bottom panels), EYFP (cell - left panels, dendrite boxed area - center right panels) and NLS-MS2-mCherry (right panels). DIC images are in the center left panels. Arrows point to mCherry puncta marking Luc-24xMS2bs mRNA (B), Luc-24xMS2bs-CaMKII 3'UTR mRNA (D), or Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR mRNA (F). n = number of segments from 3-4 experiments. * = $P < 0.05$, ANOVA; # = $P < 0.05$, ANOVA one tailed test. Error bars represent s.e.m. Scale bars, 20 μm and 10 μm .

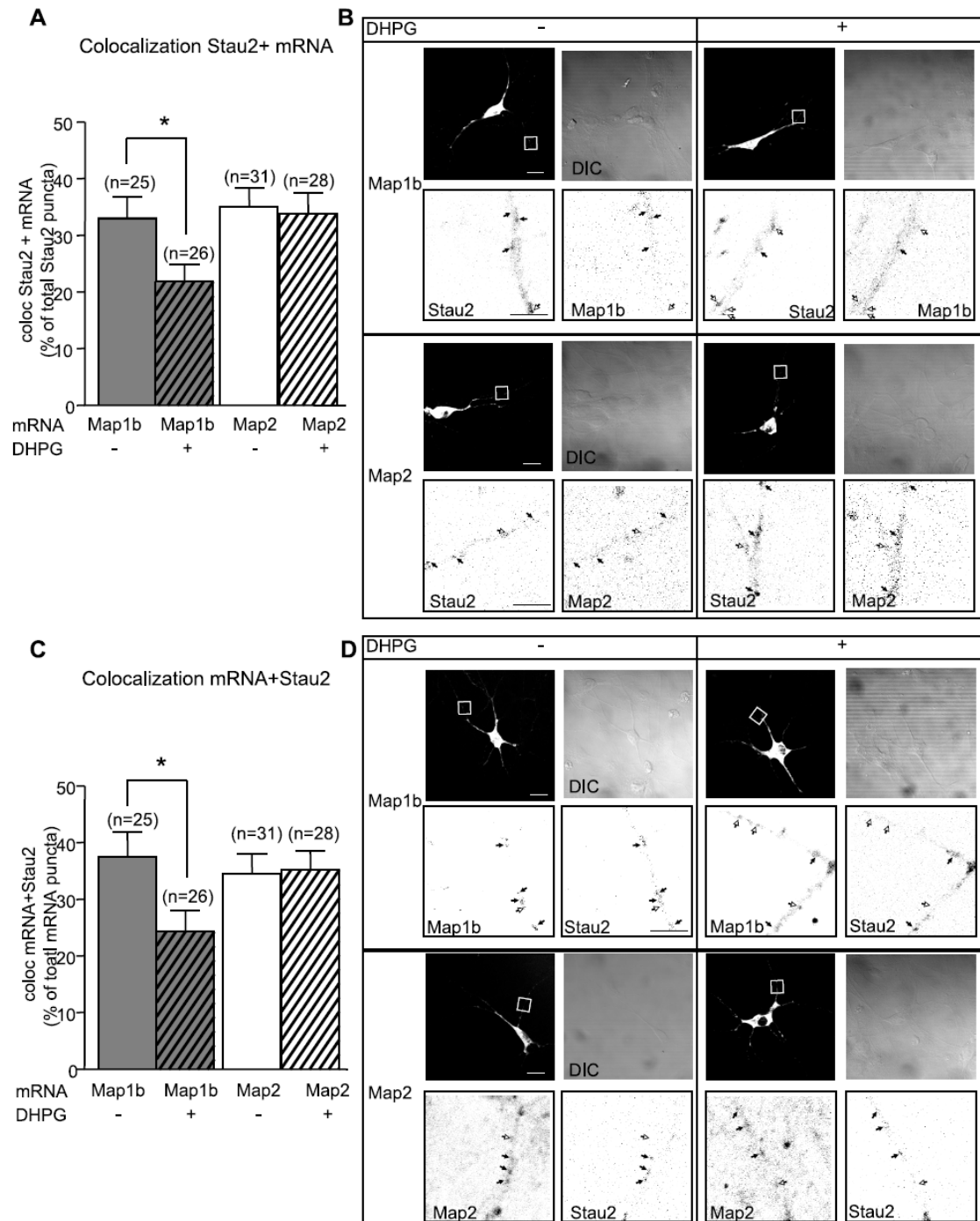


Figure 8. Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR mRNA dissociates from Stau2 upon application of DHPG. (A, B) Co-localization of Stau2-GFP with NLS-MS2-mCherry-labelled mRNA puncta in relation to Stau2 puncta in dendrites (more than 50 μ m from the cell body), with and without DHPG treatment. (A) Summary bar graph of co-localization of Stau2-GFP and NLS-MS2-mCherry-labelled mRNA puncta as

percentage of total Stau2-GFP puncta. (B) Confocal images of representative neurons transfected with Stau2-GFP (left images) and Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR or Luc-24xMS2bs-Map2 3'UTR (bottom right images). DIC images are in the top right. Boxed area in the top left image indicates region shown in bottom images. Filled arrows indicate co-localized puncta and open arrows indicate Stau2-GFP puncta alone. (C, D) Co-localization of NLS-MS2-mCherry-labelled mRNA puncta with Stau2-GFP in relation to mRNA presence. (C) Summary bar graph of co-localization of Stau2-GFP and NLS-MS2-mCherry-labelled mRNA puncta as percentage of total mRNA puncta. (D) Confocal images of representative neurons transfected with Stau2-GFP (left images) and Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR or Luc-24xMS2bs-Map2 3'UTR (bottom right images). DIC images are in the top right. Boxed area in the top left image indicates region shown in bottom images. Filled arrows indicate co-localized puncta and open arrows indicate mRNA puncta alone. Co-localization of Stau2-GFP and Luc-24xMS2bs-Map1b mRNA is decreased after DHPG treatment. n= number of segments from 4 experiments. *, $P < 0.05$, t-test. Error bars represent s.e.m. Scale bars, 20 μm and 10 μm .

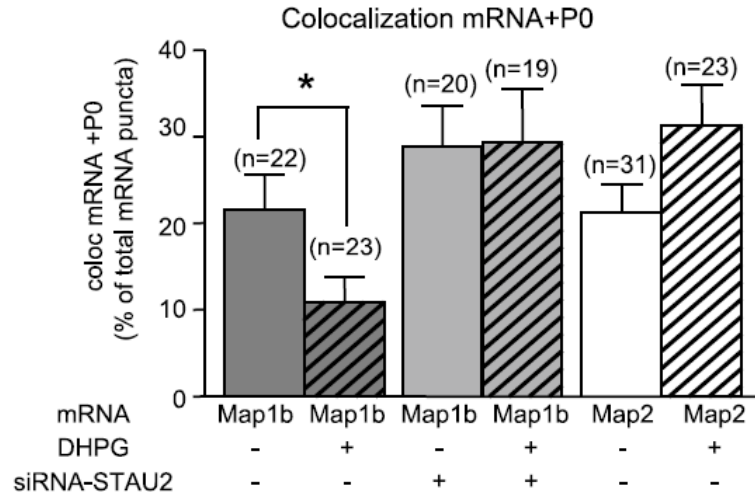
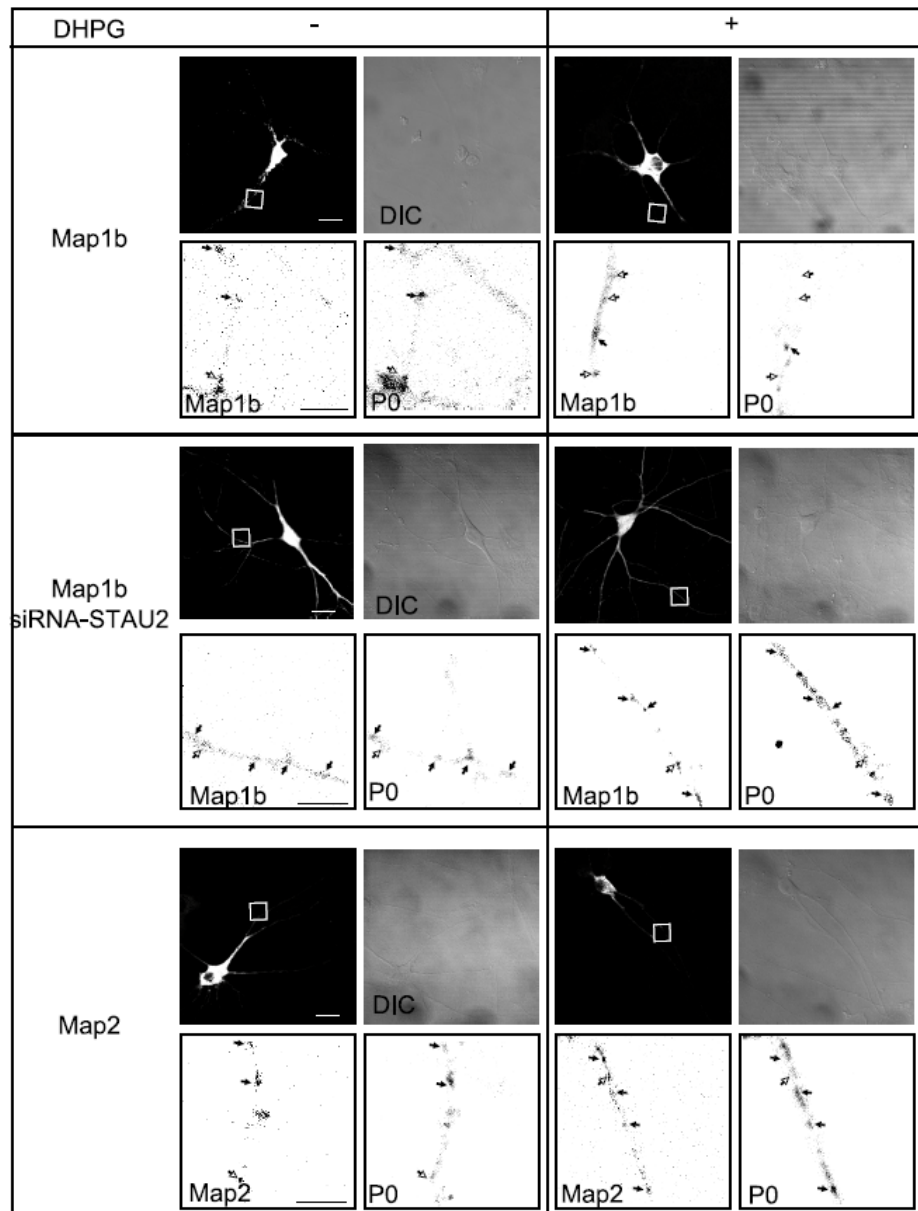
A**B**

Figure 9. Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR mRNA dissociation from P0 upon application of DHPG is prevented by Stau2 siRNA knockdown. (A, B) Co-localization of NLS-MS2-mCherry-labelled mRNA puncta with P0 in relation to mRNA puncta, with and without DHPG treatment. (A) Summary bar graph of co-localization of NLS-MS2-mCherry-labelled mRNA puncta with P0 as percentage of total mRNA puncta (more than 50 μm from the cell body), showing that DHPG treatment decreases Luc-24xMS2bs-Map1b, but not Luc-24xMS2bs-Map2, mRNA and P0 co-localization and the effect is blocked after Stau2 siRNA knockdown. (B) Confocal images of representative neurons transfected with Stau2-GFP or siRNA-STAU2-1 with EYFP (top left images) and Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR or Luc-24xMS2bs-Map2 3'UTR (bottom left images) and immuno-stained for endogenous P0 (bottom right images). DIC images are in the top right. Boxed area in the top left image indicates region shown in bottom images. Filled arrows indicate co-localized puncta and open arrows indicate mRNA puncta alone. n = number of segments from 4 experiments. *, $P < 0.05$, t-test. Error bars represent s.e.m. Scale bars, 20 μm and 10 μm .

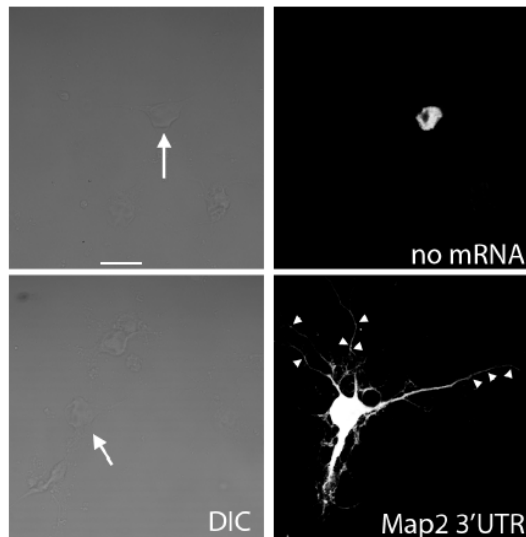


Figure S1. Export of NLS-MS2-mCherry when mRNA is present. DIV 7 hippocampal neurons transfected with NLS-MS2-mCherry with or without Luc-24xMS2bs-Map2 3'UTR. Arrows in the DIC images (left panels) indicate the transfected

neurons. Arrows in the NLS-MS2-mCherry images (right panels) indicate Luc-24xMS2bs-Map2 3'UTR mRNA puncta. Calibration bar 20 μm .

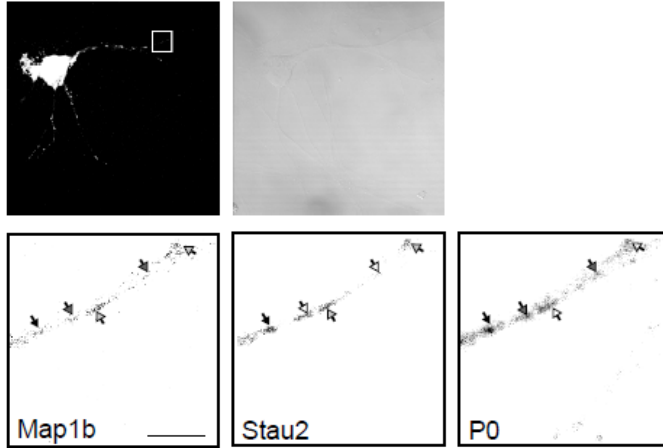


Figure S2. Luc-24xMS2bs-Map1b 3'UTR mRNA co-localization with Stau2 and P0. Some Luc-24xMS2bs-Map1b positive mRNA puncta colocalize with both Stau2 and P0 (black arrows), Stau2 only (light gray arrows) or P0 only (dark gray arrows).

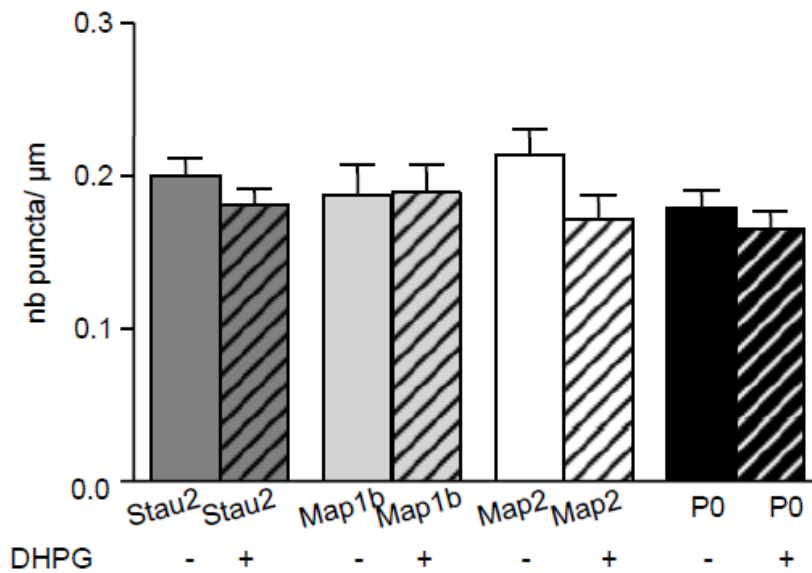
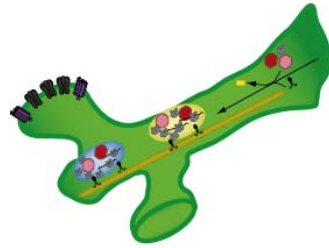
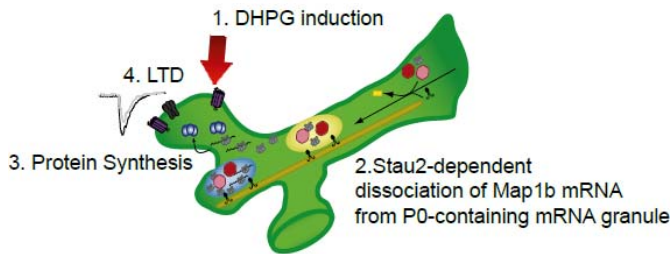


Figure S3. DHPG treatment does not affect the number of Stau2 puncta, mRNA puncta and P0 puncta. Summary bar graph of number of puncta more than 50 μm from the cell body with or without DHPG treatment. n = number of segments from 3-4 experiments. $P > 0.05$, t-test. Error bars represent s.e.m.

A 'Constitutive' Stau2 dependent mRNA trafficking

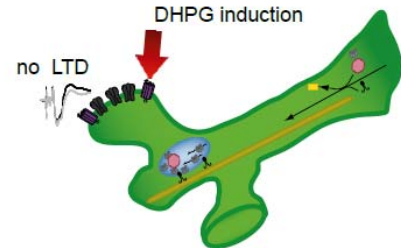


DHPG-induced LTD

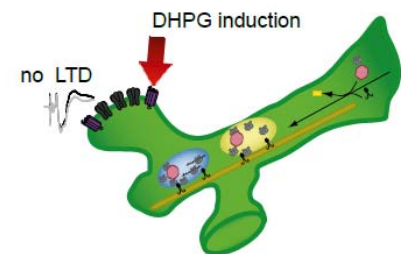


B Block of mGluR LTD after Stau2 knockdown

① granules with mGluR LTD-specific mRNAs are not formed in the absence of Stau2



② Stau2 is necessary for Map1b mRNA loading into granules



③ Stau2 is required for translational activation (dissociation of Map1b mRNA/ribosomes)

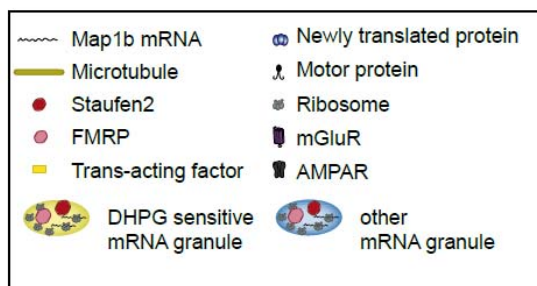
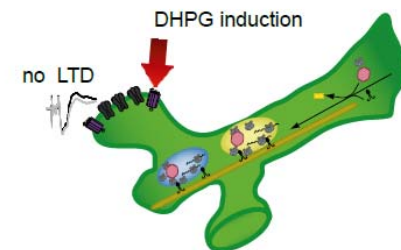


Figure S4. Model of Stau2 regulation of Map1b mRNA granules and mGluR-LTD.

(A) Following export of transcripts from the nucleus (top), Stau2 and FMRP associate and form an mRNA-protein complex containing ribosomes. This RNA granule is transported along microtubules into dendrites with the help of motor proteins (kinesins and dyneins). In response to mGluR-LTD induction (bottom) (1), Stau2 regulates the dissociation of Map1b mRNA and ribosomes with the granule (2), subsequently mRNA

is locally translated into new protein (3) to cause AMPAR internalization and LTD (4).
(B) Possible mechanisms explaining the block of mGluR-LTD after knockdown of Stau2: (1) mRNA granules sensitive to DHPG are not formed in the absence of Stau2; (2) Stau2 is necessary for Map1b mRNA loading into granules; (3) Stau2 is required for translational activation (dissociation of Map1b mRNA and ribosomes).

CHAPITRE VI. DISCUSSION

6.1 RAPPEL DES PRINCIPAUX RÉSULTATS

Nos résultats révèlent l'importance de Staufen pour le transport et la régulation d'ARNm dans la plasticité synaptique. Nous avons identifié des fonctions spécifiques à chaque isoforme, Stau1 et Stau2 étant respectivement impliquées dans la L-LTP et la LTD dépendante des mGluR. Cette spécificité s'applique également au rôle que chaque isoforme joue dans la morphogenèse des épines dendritiques, puisque Stau1 semble nécessaire au maintien des épines dendritiques matures, alors que Stau2 serait davantage engagée dans le développement des épines. D'autre part, nos travaux ont permis d'établir que la morphogenèse des épines dendritiques dépendante de Stau1 était médiée par une plasticité synaptique endogène dépendante des récepteurs NMDA. Finalement, nous avons précisé les mécanismes de régulation de l'ARNm de Map1b par Stau2 et démontré l'importance de Stau2 pour la production et l'assemblage des granules contenant les transcrits de Map1b nécessaires pour la LTD dépendante des mGluR. Dans la discussion générale qui suit, la contribution de nos résultats à l'avancement des connaissances ainsi que des perspectives de recherche seront abordées.

6.2 LE RÔLE DE STAUFEN 1 DANS LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE

Stau1 forme un complexe RNP en association avec les protéines de transport, protéines ribosomales et différents transcrits. Ces granules contenant Stau1 participent, entre autre, au transport de l'ARNm de la CaMKII α , un ARN nécessaire pour la phase tardive de la LTP (Lisman et al., 2002; Miller et al., 2002). Il était donc reconnu que Stau1 est impliquée dans le transport d'ARNm. Toutefois, aucune étude antécédente ne s'était penchée sur le rôle de Staufen 1 dans la plasticité synaptique à long-terme. En conséquence, nos travaux ont permis d'identifier un rôle de la protéine Stau1 dans la plasticité synaptique.

6.2.1 STAUFEN 1 EST IMPLIQUÉE DANS LA LTP

Nous avons utilisé un ARN interférent afin de supprimer l'expression de Stau1 dans les tranches organotypiques. De plus, nous avons utilisé la forskoline (FSK), un activateur de l'adénylate cyclase pour provoquer une activité synaptique synchrone et l'induction de la L-LTP. Dans ces conditions, nous avons pu observer que la suppression de l'expression de Stau1 ne bloquait que la phase tardive de la LTP. En effet, la transmission synaptique de base, la E-LTP induite selon deux différents protocoles de stimulation électrique (HFS ou TBS) et la LTD dépendante des mGluR n'ont pas été affectées. Ces résultats suggèrent que Stau1 aurait un rôle particulier dans la régulation des ARNm requis pour la L-LTP.

6.2.2 STAUFEN1 PARTICIPE AU MAINTIEN DES ÉPINES MATURES ET DES CONNEXIONS SYNAPTIQUES

Les modifications synaptiques persistentes seraient à la base de la consolidation de certaines formes d'apprentissage et de la mémoire (Bliss and Collingridge, 1993). Le maintien de la plasticité à long-terme implique une insertion des récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique (Bliss and Collingridge, 1993; Malinow and Malenka, 2002) ainsi que des changements de la morphologie des épines (Matsuzaki et al., 2004). Ainsi, il y aurait une corrélation entre le nombre de récepteurs AMPA et la taille de l'épine dendritique (Matsuzaki et al., 2004; Nagerl et al., 2004). Tel que mentionné dans la section 1.4.1.1, une épine de type *stubby* ou *mushroom* est considérée comme stable et mature, le type *thin* serait plus plastique, et les filopodes représenteraient des épines immatures.

Nos travaux démontrent que Stau1 est important pour la morphogénèse des épines matures puisque la suppression de l'expression de la protéine provoque une réduction du pourcentage d'épines matures (*stubby* et *mushroom*) et une augmentation du nombre d'épines de type *thin* (Lebeau et al., 2008). D'autre part, la diminution de la fréquence et de l'amplitude de l'activité synaptique unitaire observée suggère que la suppression de l'expression de Stau1 est associée à une réduction de l'efficacité de transmission postsynaptique, ainsi qu'à une diminution du nombre de synapses fonctionnelles ou à

des changements présynaptiques au niveau de la relâche de neurotransmetteurs. La diminution de l'activité synaptique unitaire est en accord avec les changements au niveau des épines dendritiques et suggère que Stau1 est indispensable pour le maintien de connexions synaptiques fonctionnelles.

Une récente étude suggère que Stau1 serait également essentielle pour le développement des synapses (Vessey et al., 2008). L'équipe du Dr Kiebler a développé un modèle de souris mutante chez laquelle le domaine RBD3 (domaine responsable de la liaison de l'ARNm) de la protéine Stau1 a été tronqué. Leurs travaux démontrent que chez les neurones hippocampiques de ces souris, la distribution des complexes RNP contenant Stau1 est fortement diminuée dans les dendrites et que la formation des épines dendritiques est réduite (Vessey et al., 2008). Aucun déficit de mémoire dépendante de l'hippocampe n'est observé dans ce modèle. Cependant, des mécanismes compensatoires impliquant d'autres protéines pourraient pallier à l'absence de la protéine Stau1 fonctionnelle. Néanmoins, il serait très intéressant d'étudier les phénomènes de plasticité synaptique à long-terme en utilisant la technique d'électrophysiologie dans ces animaux transgéniques. Il est important de mentionner que nos travaux ont été effectués sur des tranches organotypiques matures, et que la suppression de Stau1 par ARN interférent n'a lieu qu'après le développement (4 à 6 jours *in vitro*), suggérant que Stau1 continue de jouer un rôle post-développemental dans la morphogenèse des épines dendritiques.

6.2.2.1 L'action de Staufen 1 sur les épines dendritiques implique la plasticité synaptique dépendante des récepteurs NMDA

Il est connu qu'une certaine activité spontanée survient dans notre modèle de tranches organotypiques en culture et induit une forme de plasticité dépendante des récepteurs NMDA (*spontaneous activity-driven potentiation* - SAP) (Barria and Malinow, 2005). Lors de cette plasticité synaptique, l'activation des récepteurs NMDA provoque l'insertion des sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique (Barria and Malinow, 2005) et l'augmentation de la taille des épines dendritiques (Li et al., 2007). Ces deux changements sont également observés dans la L-LTP (Kopeck et al.,

2007). Nos résultats confirment que Stau1 participe à la morphogenèse des épines via la plasticité synaptique SAP dépendante des récepteurs NMDA. De plus, nos observations révèlent que le rôle de Stau1 dans la phase tardive de la LTP est indépendant de cette implication dans la morphogenèse des épines dendritiques.

Suite aux résultats obtenus dans cette étude, nous proposons un modèle illustrant l'implication de Stau1 dans la morphogenèse des épines dendritiques matures en tranche organotypique (**Figure 13**). La L-LTP et la plasticité synaptique SAP augmentent le nombre d'épines de types matures (*stubby* et *mushroom*) (Kopec et al., 2007; Li et al., 2007; Yang et al., 2008) (**Figure 13**), ce qui expliquerait en partie l'augmentation de l'efficacité de transmission synaptique. La suppression de l'expression de Stau1 par ARN interférent favorise une réduction du pourcentage d'épines matures (*stubby* et *mushroom*) et une augmentation du nombre d'épines moins matures (*thin*) (**Figure 13**). En supprimant la plasticité synaptique SAP par un bloqueur des récepteurs NMDA, les mêmes effets sont observés sur les différentes populations d'épines (augmentation d'épines immatures et diminution d'épines matures) (**Figure 13**). D'autre part, le blocage des récepteurs NMDA par le Mg^{2+} empêche les effets du siRNA-Stau1 (**Figure 13**) puisqu'aucun effet supplémentaire n'est observé par la suppression de l'expression de Stau1 lors du blocage des récepteurs NMDA par le Mg^{2+} . Ces résultats suggèrent que Stau1 est impliquée dans le maintien des épines matures via la plasticité synaptique dépendante des récepteurs NMDA.

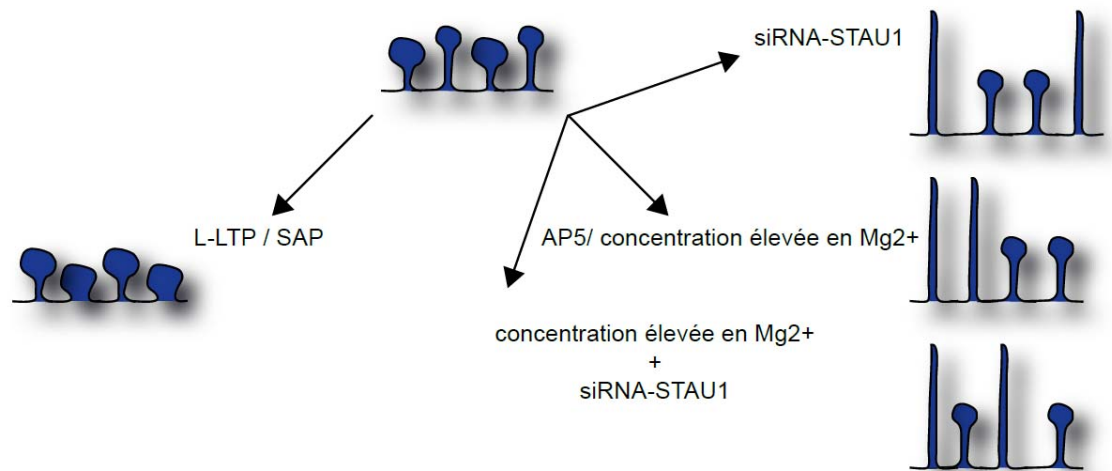


Figure 13. Modèle illustrant l'implication de Stau1 dans la morphogénèse des épines dendritiques. Morphologie des épines dendritiques selon différentes conditions.

6.2.3 MODÈLE DE RÉGULATION D'ARNm PAR STAU1 DANS LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE

Quels sont les mécanismes dépendants de Stau1 qui sous-tendent le ciblage dendritique des ARNm et leur traduction locale aux synapses? Bien que le mécanisme précis par lequel les ARNm sont transportés reste méconnu, quelques aspects de ce phénomène ont toutefois été confirmés. Il est aujourd'hui reconnu qu'il existe une multitude de RBP et plusieurs types de complexes RNP. En effet, il y a les granules et les particules d'ARN, définis selon la présence ou non de ribosomes. Il y a également des granules de stress et des *P bodies*. Dans un premier temps, l'ARNm est exporté du noyau lorsque sa séquence *cis* est reconnue par un facteur *trans*, permettant ainsi l'assemblage du complexe RNP (Dahm et al., 2007). Ensuite, le complexe RNP s'associe avec des protéines motrices et est transporté le long des microtubules. Durant le transport, la traduction du transcrite est réprimée. Des signaux spécifiques permettront l'ancrage du complexe RNP à la synapse activée où la traduction aura lieu (Klann and Dever, 2004; Schuman et al., 2006).

Nos travaux nous permettent de suggérer un modèle qui intègre Stau1 dans la L-LTP (Figures 14 et 15). Premièrement, Stau1 semble participer au transport constitutif de l'ARNm CaMKII α puisque la suppression de l'expression de Stau1 affecte les niveaux d'ARNm CaMKII α détectés dans les dendrites (Kanai et al., 2004; Lebeau et al., 2008) (Figure 14). D'ailleurs, l'induction de la L-LTP est non seulement suivie d'une

augmentation rapide de la phosphorylation mais également du niveau d'expression de CaMKII α , témoignant d'une traduction rapide de l'ARNm CaMKII α déjà présent dans les dendrites (Lisman et al., 2002). Stau1 pourrait donc jouer un rôle à ce niveau. Selon ce modèle (**Figure 14B**), les ARNm de la CaMKII α déjà présents à la synapse dans les granules-Stau1 (**1**) peuvent être traduits en réponse à l'induction de la LTP par l'activation synaptique des récepteurs NMDA et l'entrée de Ca²⁺ (**2**). À ce moment, il y a l'ARNm serait dissocié du granule-Stau1 afin qu'il puisse être traduit grâce à la machinerie traductionnelle déjà présente à la synapse (**3**). Nos travaux démontrent que Stau1 serait nécessaire au transport de l'ARNm de la CaMKII α puisque la suppression de l'expression de Stau1 diminue la quantité de l'ARNm détectée dans les dendrites (**Figure 14C**).

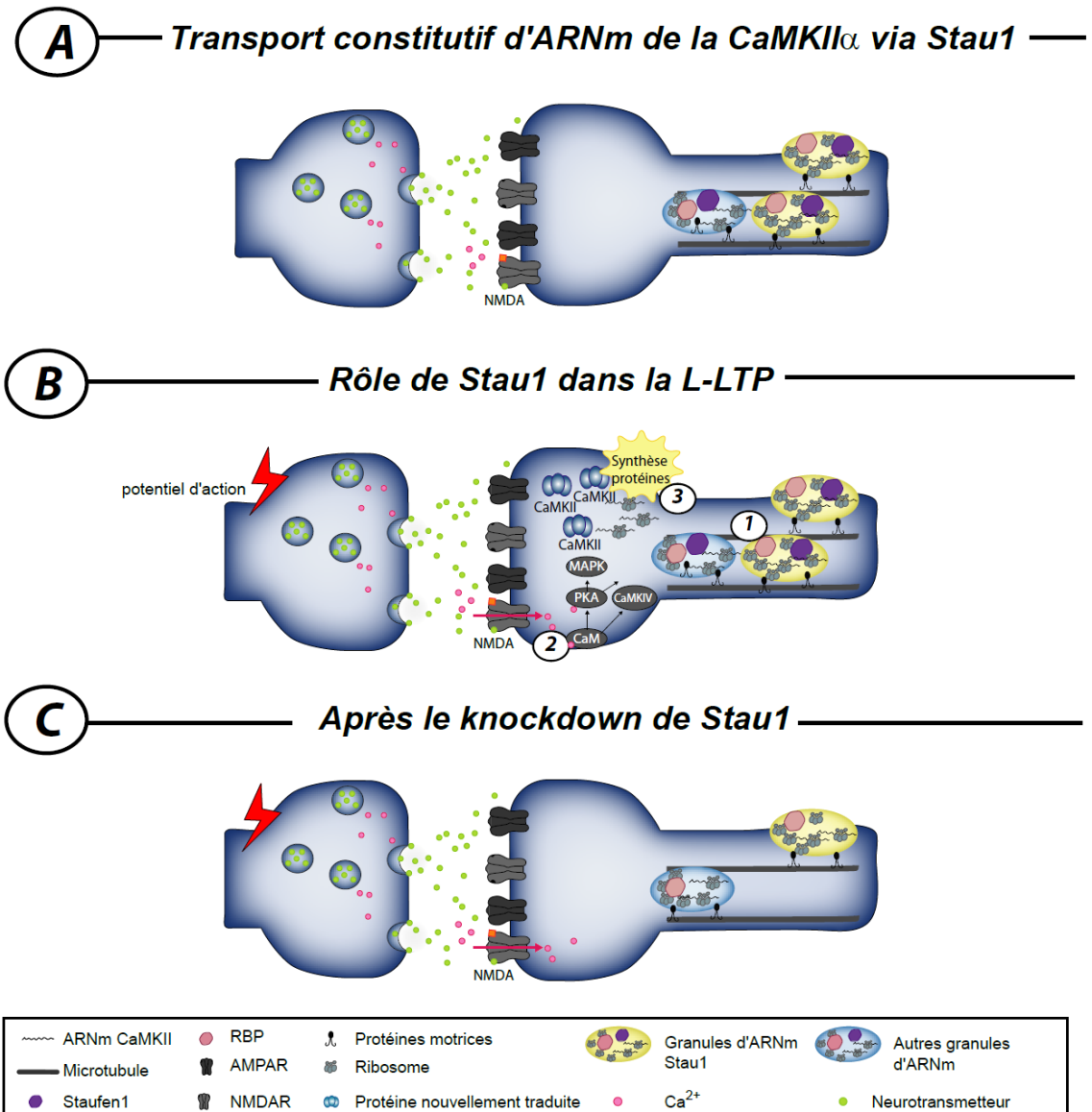


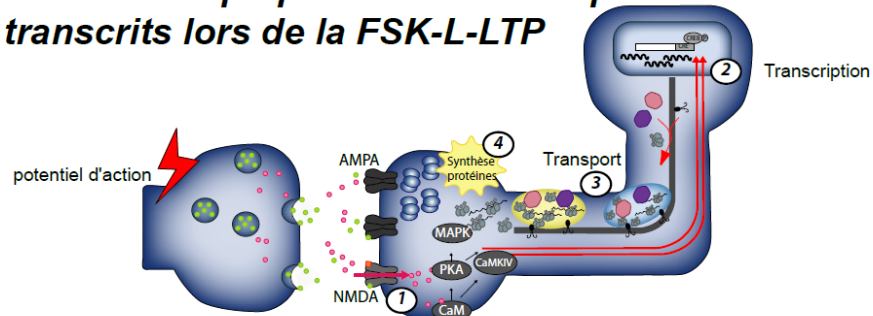
Figure 14. Modèle illustrant l'implication de Stau1 dans le transport constitutif d'ARNm. **A)** Les granules-Stau1 sont transportés de façon constitutive aux dendrites le long des microtubules. **B)** Le rôle de Stau1 dans la LTP. **C)** Lorsque l'expression de Stau1 est supprimée, la quantité d'ARNm de la CaMKII α détectée dans les dendrites est fortement diminuée, empêchant la synthèse de protéines durant la L-LTP.

Deuxièmement, Stau1 pourrait aussi participer au transport d'ARNm nouvellement transcrit suite à l'activité synaptique et l'activation des récepteurs NMDA. Ce modèle (**Figure 15**) suggère l'existence d'une voie de signalisation dépendante de l'activation des récepteurs NMDA qui assurerait par Stau1 le transport aux dendrites et la régulation d'ARNm nouvellement synthétisés. Durant l'induction de la L-LTP (**Figure 15A 1**),

l'activation des récepteurs NMDA et l'entrée de Ca^{2+} déclenchent une cascade de signalisation qui contribue au renforcement synaptique. L'activation et la translocation au noyau de la PKA, la MAPK et la CaMKVI joue un rôle dans la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription CREB, conduisant à une nouvelle transcription de gènes (2). Suivant l'exportation des transcrits du noyau, Stau1 forme un complexe RNP contenant des ribosomes. Ces granules d'ARNm sont transportés aux dendrites le long des microtubules (3) par des protéines motrices (kinésines et dynéines) et l'ARNm est localement traduit en nouvelle protéine (4) contribuant au renforcement synaptique des synapses activées et à la FSK-L-LTP (5). Stau1 occupe un rôle prépondérant dans la L-LTP puisque la suppression de la protéine bloque la phase tardive de la LTP.

Les mécanismes exacts impliquant Stau1 dans ce phénomène demeurent encore inconnus, toutefois nos résultats montrant que la suppression de l'expression de Stau1 diminue la quantité d'ARNm de la CaMKII α dans les dendrites nous permettent d'élaborer certaines hypothèses. Quelques mécanismes peuvent être proposés expliquant le blocage de la FSK-L-LTP après la suppression de l'expression de Stau1 (**Figure 15B**): (a) les granules d'ARNm spécifiques à la LTP ne sont pas formées en absence de Stau1; (b) Stau1 est nécessaire au chargement de l'ARNm de la CaMKII α dans les granules; (c) Stau1 est indispensable pour l'activation de la traduction (dissociation de l'ARNm de la CaMKII α et des ribosomes).

A — *Stau1* est impliquée dans le transport de nouveaux transcrits lors de la FSK-LTP



B — Après le knockdown de *Stau1*

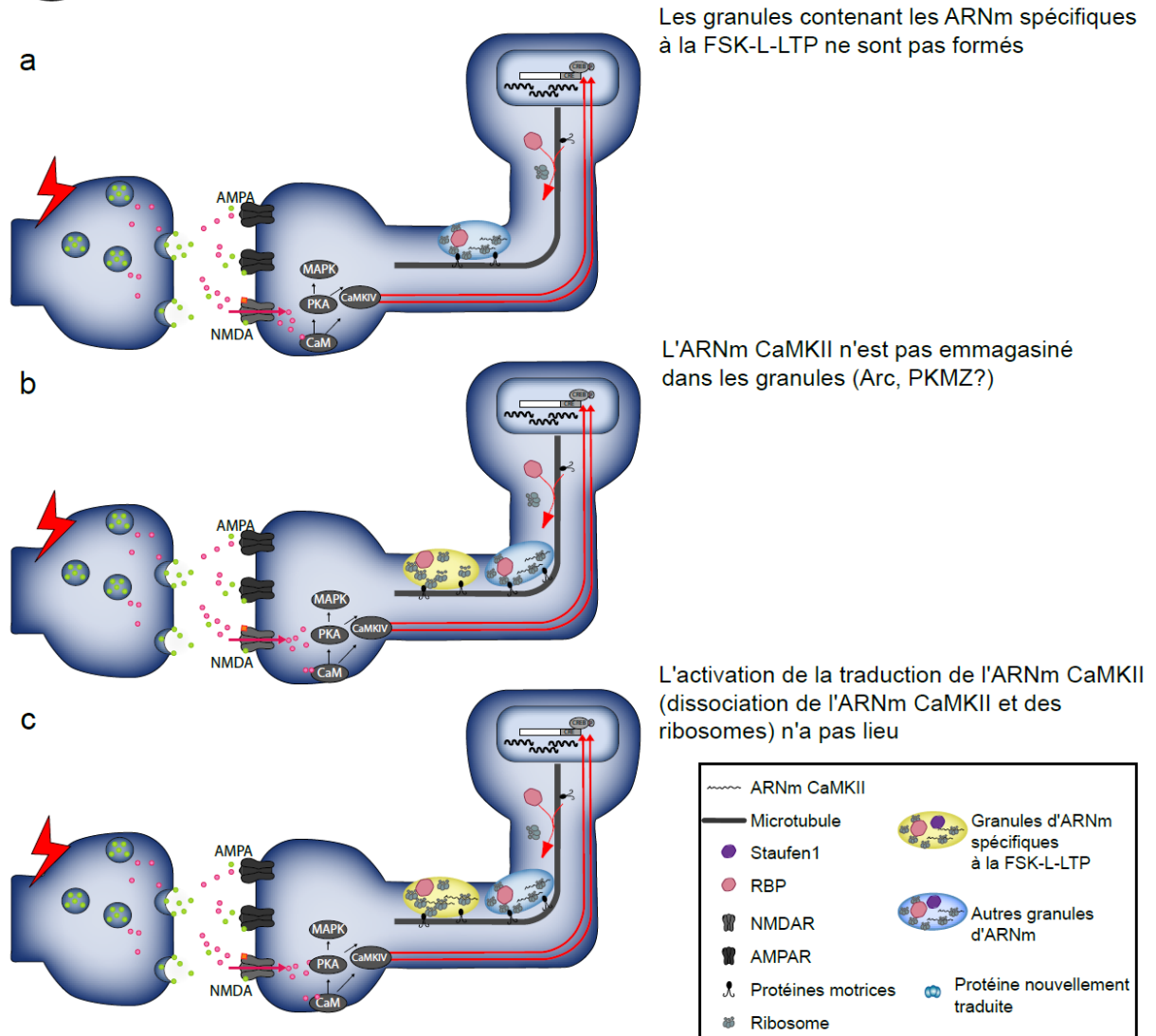


Figure 15. Modèle illustrant le rôle de Stau1 dans le transport d'ARNm nouvellement transcrit lors de la L-LTP induite par la FSK. A) Le rôle de Stau1 dans la L-LTP induite par la FSK B) Hypothèses de mécanismes expliquant le blocage de la L-LTP après la suppression de l'expression de Stau1.

Il existe déjà quelques données démontrant que l'activité neuronale peut moduler la distribution des complexes RNP (Steward et al., 1998; Mori et al., 2000; Rook et al., 2000; Steward and Worley, 2001b; Tang et al., 2001; Kim and Kim, 2006). Plus spécifiquement, il a été démontré que la dépolarisation de neurones en culture augmente la présence de complexes RNP-Stau2 dans les dendrites (Kim and Kim, 2006). Il est donc possible de croire qu'une voie de signalisation induite par l'activation des NMDAR durant la LTP et la plasticité synaptique SAP entraînerait le transport de complexes RNP-Stau1 contenant certains ARNm nouvellement synthétisés. La traduction locale de ces nouveaux transcrits participerait à la réorganisation/stabilisation de la synapse en permettant le trafic de récepteurs glutamatergiques à la synapse, entraînant des changements morphologiques des épines dendritiques. Il serait intéressant d'utiliser des techniques d'immunohistochimie et de biologie moléculaire, comme l'immunobuvardage pour déterminer les changements au niveau des récepteurs AMPA et de protéines d'ancrage aux synapses avec ou sans ARN interférent contre Stau1 lors de la L-LTP et de la plasticité synaptique SAP.

6.2.4 LES ARNm ASSOCIÉS À STAUFEN1

Quels sont les ARNm sujets à régulation qui sont importants pour la L-LTP et transportés par Stau1? Une étude a identifié plusieurs ARNm associés aux protéines Stau1 et Stau2 par la technique de micropuces d'ADN dans des cellules humaines HEK293. Les résultats révèlent que Stau1 et Stau2 s'associent principalement à différentes populations d'ARNm avec toutefois quelques ARNm en commun. L'analyse de ces ARNm indique que Stau1 et Stau2 sont principalement impliquées dans la régulation du métabolisme cellulaire et dans divers processus cellulaires tels que le transport, la transcription et des activités catalytiques (Furic et al., 2008).

Des données démontrent que Stau1 est impliquée dans le transport de l'ARNm de la CaMKII α de façon constitutive (Kanai et al., 2004). En effet, en utilisant la technique

des ARN interférents, cette étude a révélé que Stau1 est important pour la localisation dendritique de l'ARNm CaMKII α . De plus, nos travaux démontrent également que Stau1 est associée au transport de l'ARNm de la CaMKII α puisque la suppression de l'expression de Stau1 diminue la quantité d'ARNm de la CaMKII α détectée dans les dendrites de neurones en culture. Un autre candidat est la protéine PKM ζ qui est à la fois nécessaire et suffisante pour le maintien de la L-LTP (Ling et al., 2002). Il a été démontré que l'ARNm de la PKM ζ est transporté au niveau des dendrites (Muslimov et al., 2004) et que la traduction de PKM ζ est régulée localement (Osten et al., 1996). D'autre part, une récente étude révèle que PKM ζ est une protéine associée à la plasticité (*plasticity related protein* – PRP) qui doit être «capturée» par une synapse marquée (*synaptic tagging*) afin de permettre le maintien de la L-LTP (Sajikumar et al., 2005). Ainsi, le transport et la traduction locale de cet ARNm qui pourraient être régulés par Stau1 seraient importants pour la L-LTP. L'ARNm de la protéine Arc représente un autre candidat potentiel. En effet, la transcription du gène *Arc* est rapidement stimulée par l'activation neuronale lors de l'induction de la LTP (Lyford et al., 1995) et l'exploration spatiale (Guzowski et al., 1999) et les nouveaux transcrits sont rapidement transportés aux synapses activées (Steward et al., 1998). Puisque Stau2 semble jouer un rôle dans le transport dépendant de l'activité neuronale (Kim and Kim, 2006), il est possible que Stau1 soit également impliquée dans ce type de transport. La suppression de l'expression de Stau1 pourrait occasionner l'absence de ces ARNm dans les dendrites lors de l'induction de la plasticité synaptique et un blocage des phénomènes de LTP et de SAP.

Une approche similaire à celle qui a été employée dans la deuxième partie de la thèse permettrait d'examiner si Stau1 est colocalisée avec les ARNm PKM ζ et Arc. En effet, nous avons utilisé une méthode qui nous permet de visualiser Stau1, marquée par une protéine fluorescente (eYFP), et l'ARNm, observé grâce au système de marquage MS2 (voir chapitre V). Par la suite, la suppression de l'expression de Stau1 par un ARN interférent, tel qu'utilisé dans nos travaux, fournirait des informations sur le rôle de Stau1 dans la régulation du transport des ARNm de PKM ζ et Arc. La mise au point d'une méthode nous permettant d'effectuer ces expériences en temps réel serait

avantageuse, comme par exemple, la technique de microinjection d'ARN marqués (Shan et al., 2003; Gao et al., 2008) dans les neurones. Cette méthode diffère de la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (*Fluorescent in situ hybridization* - FISH) sur tissu fixé pour étudier la localisation de l'ARNm endogène. La microinjection permet de visualiser l'assemblage des particules d'ARN en temps réel et la cinétique du transport de ces complexes RNP dans les neurones vivants. Quant au système de marquage MS2, il serait difficile d'étudier plus d'un ARN à la fois, puisque cette technique nécessiterait l'expression de plusieurs plasmides en même temps. Une récente étude a utilisé la technique de microinjection d'ARN marqués afin de visualiser différents ARNm et de comparer leur association dans des complexes RNP et leur cinétique de transport (Tubing et al., 2010).

6.3 LE RÔLE DE STAUFEN2 DANS LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE

Stau1 et Stau2 se retrouvent à l'intérieur de différents granules d'ARN, suggérant que les deux protéines sont associées à différents ARNm (Duchaine et al., 2002). Alors que nous avons démontré que Stau1 est nécessaire pour la L-LTP, le rôle de Stau2 dans la plasticité synaptique était encore inconnu. Nos travaux révèlent que Stau2 est impliquée dans la LTD dépendante des mGluR et dans la morphogenèse des épines dendritiques au stade développemental. De plus, nous avons démontré que Stau2 participe au transport et à la régulation des granules contenant l'ARNm de la Map1b, un transcrit spécifique à la LTD dépendante des mGluR.

6.3.1 STAUFEN 2 EST IMPLIQUÉE DANS LA LTD DÉPENDANTE DES mGLUR

Nous avons démontré que la suppression de l'expression de Stau2 n'affecte pas la phase tardive de la LTP induite par la forskoline mais induit un blocage de la LTD dépendante des mGluR et de la synthèse de protéines. Donc, Stau1 et Stau2 contribuent à la régulation de la plasticité synaptique mais sont impliquées dans différents types de plasticité synaptique : la L-LTP et la LTD dépendante des mGluR, respectivement. Ces

résultats sont les premiers à démontrer clairement que les deux protéines jouent des rôles différents dans la plasticité synaptique.

La L-LTP et la LTD dépendante des mGluR nécessitent la traduction de nouvelles protéines. Cependant, il demeure incertain si la L-LTP et la L-LTD entraînent la synthèse des mêmes protéines ou si chaque processus génère la traduction de protéines distinctes. En effet, certains travaux ont démontré que la régulation traductionnelle est indépendante du type de stimuli et que la forme de plasticité induite serait déterminée par des modifications particulières à des synapses spécifiques (Frey and Morris, 1998). Un phénomène de marquage synaptique croisé (*cross-tagging*) suggère que la L-LTP et la L-LTD engendrent la synthèse d'un même groupe de protéines qui seront par la suite sélectionnées selon les modifications synaptiques (Sajikumar and Frey, 2004). Pourtant, les protéines CaMKII α et PKM ζ ont été identifiées comme candidates spécifiques à la L-LTP (Osten et al., 1996; Ouyang et al., 1999) alors que les protéines Map1b et Arc seraient associées à la L-LTD (Rial Verde et al., 2006; Davidkova and Carroll, 2007). Il est possible que la L-LTP et la L-LTD utilisent une combinaison de ces deux mécanismes traductionnels. Ainsi, il y aurait à la fois une synthèse d'un groupe commun de protéines et une synthèse de protéines particulières à chaque forme de plasticité afin de répondre aux besoins spécifiques. Les résultats obtenus dans notre étude supportent l'existence de différents mécanismes de régulation d'ARNm associés à différentes protéines et suggèrent la régulation de complexes de transport spécifiques par Stau1 et Stau2 pour chaque forme de plasticité synaptique.

Nos résultats corroborent non seulement ce qui avait été observé précédemment par rapport à la localisation des deux protéines à l'intérieur de différents granules (Duchaine et al., 2002) mais confortent l'idée que Stau1 et Stau2 seraient associés à des ARNm distincts (Furic et al., 2008). Dans cette étude, l'identification d'ARNm associés à Stau1 et Stau2 dans des cellules HEK293 a révélé qu'un haut pourcentage d'ARNm est spécifique à chacune des protéines. Nos travaux sont en accord avec ces données. En effet, dans notre modèle de neurones hippocampiques, la suppression de l'expression de Stau1 diminue spécifiquement la quantité d'ARNm de la CaMKII α dans les dendrites,

un transcrit important pour la L-LTP alors que la suppression de Stau2 affecte de façon distincte les niveaux d'ARNm de Map1b, ARNm qui est associé à la LTD dépendante des mGluR.

6.3.2 STAUFEN2 JOUE UN RÔLE DANS LE DÉVELOPPEMENT DES ÉPINES DENDRITIQUES

La plasticité synaptique exerce des changements au niveau de la morphologie des épines dendritiques, entre autre par le trafic des récepteurs AMPA à la membrane (Shi et al., 1999). L'induction de la LTD provoque une déphosphorylation et un retrait des récepteurs AMPA de la membrane postsynaptique, mécanisme jouant un rôle important dans l'expression de la LTD (Malinow and Malenka, 2002; Collingridge et al., 2004). De récentes études ont également démontré que l'induction de la LTD provoquait un rétrécissement et la rétraction des épines dendritiques (Nagerl et al., 2004; Okamoto et al., 2004; Zhou et al., 2004). Toutefois, même si ces propriétés physiologiques et morphologiques sont souvent associées l'une à l'autre, elles semblent être régulées par différents mécanismes (Zhou et al., 2004).

Suite à la suppression de l'expression de Stau2, nous avons observé une augmentation du pourcentage d'épines de type *thin* dans les tranches organotypiques plus jeunes (voir chapitre V). À un stade plus mature, la suppression de Stau2 n'a aucun effet sur la morphogénèse des épines, alors que la LTD dépendante des mGluR est bloquée, suggérant que ces modifications synaptiques sont des processus indépendants. Ces données soulèvent la possibilité d'une dissociation du rôle de la protéine dans les mécanismes qui sous-tendent le rétrécissement des épines et la LTD dépendante des mGluR. Donc, nos résultats indiquent que Stau2 jouerait un rôle au niveau du développement synaptique des épines dendritiques et dans ce cas, Stau2 aurait un rôle analogue à Stau1 puisque nos travaux démontrent que la suppression de l'expression de Stau1 augmente également le pourcentage d'épines de type *thin* à ce stade. Au stade plus mature, lorsque la LTD dépendante des mGluR requiert la présence de Stau2, nous aurions pu nous attendre à un changement de morphologie de épines correspondant au blocage de la LTD dépendante des mGluR, comme nous l'avons observé pour Stau1 avec la L-LTP. Mais la suppression de Stau2 n'a pas affecté la morphogénèse des épines

dendritiques à ce stade plus mature. Ceci pourrait être dû à une absence de «dépression synaptique induite par l'activité spontanée» (*spontaneous activity-driven depression - SAD*) puisque nous avons démontré que le rôle de Stau1 dans la morphogenèse des épines est dépendant de la plasticité synaptique SAP. L'absence de changement au niveau de l'activité synaptique unitaire après la suppression de l'expression de Stau2 concorde avec le maintien de la morphologie des épines dendritiques observé à ce stade. Contrairement aux travaux de Goetze et al. (2006), nous n'avons pas observé de changement au niveau de la densité des épines dendritiques chez les tranches plus jeunes. La différence pourrait être due au fait que nous avons utilisé des tranches organotypiques et que leur étude a été effectuée sur des neurones en culture.

6.3.3 STAUFEN2 EST IMPLIQUÉE DANS LE TRANSPORT ET LA RÉGULATION DES GRANULES CONTENANT L'ARNm DE LA MAP1B

Il est connu que les ARNm sont transportés aux dendrites à l'intérieur de complexes RNP. Dans la présente étude, les complexes RNP ont été distingués en granules et particules d'ARNm, selon la présence ou non de ribosomes (Sossin and DesGroseillers, 2006). Nos observations faites à l'aide d'un marqueur ribosomal (P0) démontrent que Stau2 se retrouve à la fois dans les granules et les particules d'ARN. Il est donc vraisemblable que Stau2 soit associée à différentes fonctions de régulation d'ARNm.

6.3.3.1 Les ARNm associés à Staufen2

Trois ARNm sont présentement connus comme étant traduits suite à l'induction de la LTD dépendante des mGluR : Arc, STEP et Map1b (Luscher and Huber, 2010). Ces protéines semblent être essentielles au processus d'internalisation des récepteurs AMPA, supportant une implication de ce mécanisme dans la LTD dépendante des mGluR (Davidkova and Carroll, 2007). D'ailleurs, il a été démontré que les niveaux d'expression de la protéine Map1b augmentent pendant la LTD dépendante des mGluR dans la région CA1 de l'hippocampe (Lu et al., 2004; Davidkova and Carroll, 2007). De plus, cette augmentation est nécessaire pour la LTD dépendante des mGluR sans être le cas pour la LTD dépendante des récepteurs NMDA (Davidkova and Carroll, 2007) qui ne dépend pas de la synthèse de protéines (Huber et al., 2000). En accord avec ces

données, nous avons trouvé que la protéine Stau2 est associée à l'ARNm de la Map1b. Nos résultats démontrent que la suppression de l'expression de Stau2 diminue la distribution dendritique des granules contenant l'ARNm de la Map1b. Stau2 ne participe pas au transport de tous les ARNm puisque nos résultats démontrent que la suppression de l'expression de Stau2 ne modifie pas les niveaux d'ARNm de la CaMKII et de la Map2. Il existe donc des mécanismes distincts pour le transport constitutif d'ARNm nécessaire à la L-LTD (dépendant de Stau2) et à la L-LTP (dépendant de Stau1).

Une hypothèse intéressante reposant sur une diversification des populations d'ARNm transportées selon la maturité du neurone pourrait être explorée. Selon ce principe, dans le neurone en développement, Stau2 participerait à la formation de complexes RNP et contribuerait à la morphogénèse des épines dendritiques en transportant l'ARNm de la β -actine aux sites ciblés. Dans le neurone mature, Stau2 participerait au transport d'ARNm spécifiques aux synapses activées et également à la régulation de la traduction des ARNm associés à la plasticité synaptique, comme Map1b. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en comparant les niveaux de colocalisation de Stau2 et de l'ARNm de la β -actine entre des neurones de différents âges ou encore l'analyse de la quantité d'ARNm de la β -actine transporté/traduit dans les neurones. Ces expériences nous apporteraient davantage d'information sur le rôle de Stau2 selon le degré de maturité des neurones.

Il existe deux formes de LTD : la LTD dépendante des récepteurs NMDA et la LTD dépendante des mGluR. Dans la LTD dépendante des NMDAR, la calmoduline détecte l'entrée de Ca^{2+} via les récepteurs NMDA. Par la suite, l'activation de la calcineurine suivie de celle de la protéine phosphatase 1 (PP1) (Mulkey et al., 1993) provoque, entre autre, la déphosphorylation de la sous-unité GluRA1 des récepteurs AMPA (Collingridge et al., 2004) menant à la LTD. Dans le cadre de notre étude, nous avons porté notre attention sur la LTD dépendante des mGluR. Ce type de L-LTD dépend de l'activation de protéines tyrosine phosphatases (PTP), de la synthèse de protéines, et est associé à l'activation des voies de signalisation Erk-MAPK et PI3K-mTOR (Gallagher et al., 2004; Hou and Klann, 2004). Finalement, l'induction de la LTD dépendante des mGluR est indépendante du Ca^{2+} (Fitzjohn et al., 2001).

Il a été démontré en culture neuronale que le transport des complexes RNP contenant Stau2 est modulé par la voie de signalisation de MAPK (Jeong et al., 2007). Suite à l'induction de la LTD dépendante des mGluR, est-ce que cette voie joue un rôle dans l'assemblage du complexe RNP-Stau2, dans la liaison de ce complexe aux protéines motrices, dans la phosphorylation de Stau2 ou dans les mécanismes de transport et de traduction? Avec les techniques de marquage d'ARNm employées dans notre étude, et des méthodes d'immunoprécipitation, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de MAPK aiderait à préciser la contribution de la voie MAPK dans la formation ou le transport des complexes RNP-Stau2.

6.3.4 MODÈLE DE RÉGULATION D'ARNm PAR STAU2 DANS LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE

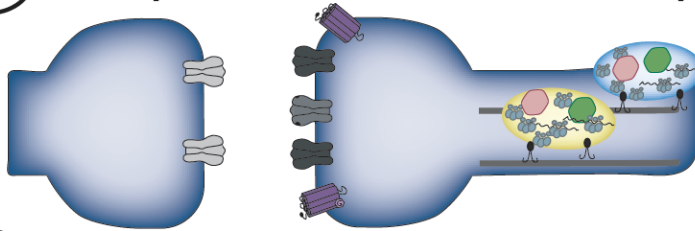
Nos résultats démontrent que Stau2 agit comme un régulateur de la traduction. En effet, nous avons démontré qu'un protocole d'induction chimique de la LTD dépendante des mGluR par application de DHPG provoquait une dissociation de l'ARNm de la Map1b des granules-Stau2 chez des neurones en culture. De plus, cette dissociation s'observe également entre l'ARNm de la Map1b et la protéine ribosomale P0. Finalement, nous avons montré que la dissociation des granules contenant l'ARNm de la Map1b et P0 est abolie lorsque l'expression de Stau2 est supprimée. Ces résultats suggèrent d'une part que les granules Stau2 comportent des polysomes ancrés à l'étape d'élongation de la traduction et d'autre part, qu'il existe une régulation des granules contenant l'ARNm de la Map1b dépendante de Stau2 lors de l'induction de la LTD dépendante des mGluR.

Ces résultats nous permettent d'élaborer un modèle dans lequel Stau2 est impliquée dans la régulation d'ARNm dans la LTD dépendante des mGluR (**Figure 16**). Contrairement à la L-LTP, la LTD dépendante des mGluR dépend de la synthèse de protéines locale et ne requiert pas la transcription de nouveaux gènes. En effet, il est possible d'induire la LTD dépendante des mGluR dans des dendrites qui ont été isolés du corps cellulaire (Huber et al., 2000), suggérant l'existence d'un transport constitutif des ARNm. Selon notre modèle, suite à l'exportation des transcrits du noyau, Stau2 forme un complexe RNP contenant l'ARNm de la Map1b, des ribosomes et des protéines motrices

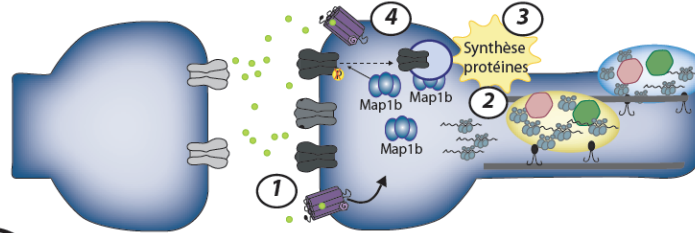
(kinésines et dynéines). Ce granule d'ARNm est transporté de façon constitutive aux dendrites le long des microtubules (**Figure 16A**). En réponse à l'induction de la LTD par le DHPG (**Figure 16B; 1**), un mécanisme dépendant de Stau2 provoque la dissociation de l'ARNm de la Map1b et des ribosomes du granule (**2**), et l'ARNm est localement traduit en nouvelle protéine (**3**). Ceci mène à l'internalisation des récepteurs AMPA et une réduction de l'efficacité de transmission synaptique (**4**).

Il existe différents modèles qui pourraient expliquer le blocage de la LTD dépendante des mGluR après la suppression de l'expression de Stau2 (**Figure 16C**): les granules d'ARNm spécifiques à la LTD induite par le DHPG ne sont pas formés en absence de Stau2 (**a**); Stau2 est nécessaire au chargement de l'ARNm de la Map1b dans les granules (**b**); Stau2 est indispensable pour l'activation de la traduction (dissociation de l'ARNm de la Map1b et des ribosomes) (**c**). Cette dernière option est moins probable puisque nos observations ont révélé qu'après la suppression de l'expression de Stau2, la quantité d'ARNm de la Map1b détectée dans les dendrites était grandement diminuée.

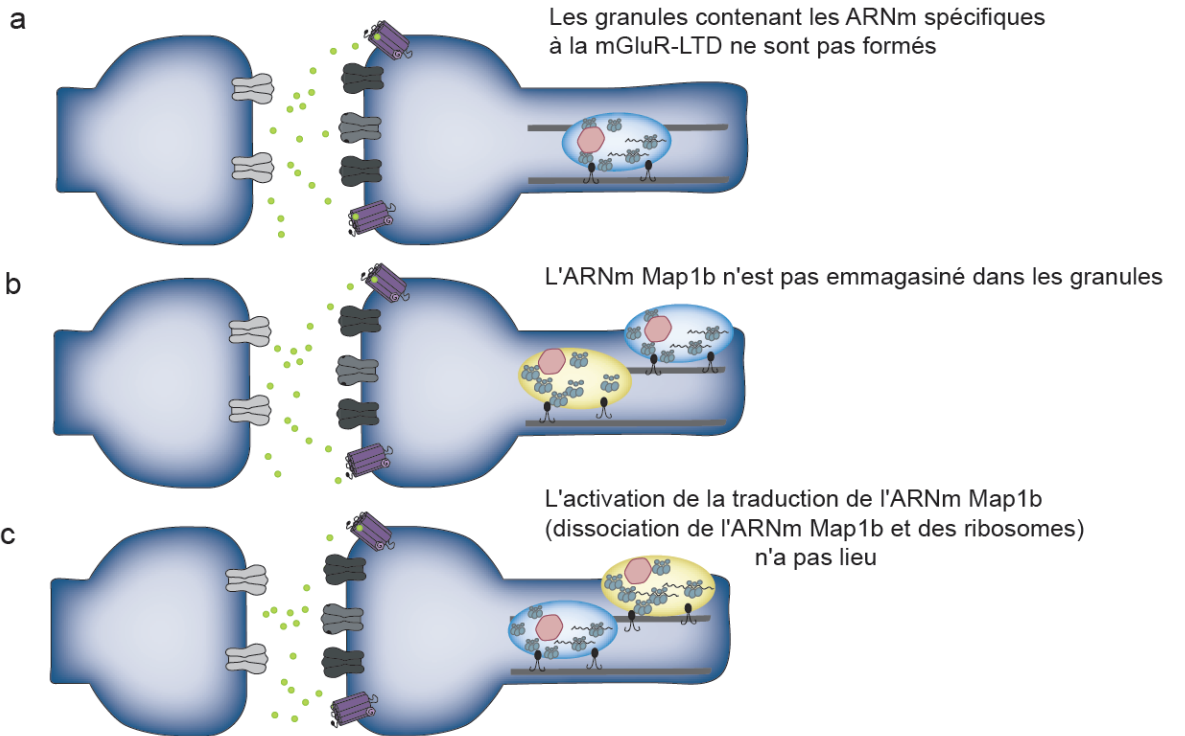
A — Transport constitutif d'ARNm de Map1b via Stau2



B — Stau2 est impliquée dans la mGluR-LTD



C — Après le knockdown de Stau2



ARNm Map1b	RBP	mGluR	Granules d'ARNm spécifiques à la mGluR-LTD	Autres granules d'ARNm
Microtubule	AMPAR	Protéines motrices	DHPG	Protéine nouvellement traduite
Staufen2	NMDAR	Ribosome		

Figure 16. Modèle illustrant le rôle de Stau2 dans la régulation des granules d'ARNm de la Map1b lors de la mGluR-LTD. **A)** Les granules-Stau2 sont transportés de façon constitutive aux dendrites le long des microtubules. **B)** Le rôle de Stau2 dans la LTD dépendante des mGluR induite par DHPG **C)** Hypothèses de mécanismes expliquant le blocage de la LTD dépendante des mGluR après la suppression de l'expression de Stau2.

Puisqu'il a été démontré que l'expression de la protéine Arc est fortement augmentée pendant la LTD dépendante des mGluR et qu'elle participe au maintien de cette forme de plasticité synaptique (Park et al., 2008; Waung et al., 2008), il serait intéressant d'étudier la colocalisation de l'ARNm de Arc avec Stau2. Pour ce faire, nous pourrions utiliser différentes techniques de marquage d'ARNm, comme le système de marquage MS2 ou la technique FISH. De plus, des expériences d'immunoprécipitation pourraient également être effectuées.

Il faut mentionner que la traduction de l'ARNm de Arc est impliquée à la fois dans la L-LTP et la LTD mGluR-dépendante. Dans la L-LTP, l'ARNm de Arc nouvellement transcrit est transporté et traduit localement afin de contribuer à la phase tardive de la LTP (Guzowski et al., 2000). Dans le cas de la LTD dépendante des mGluR, se sont les transcrits déjà présents à la synapse qui sont traduits localement et qui participent à l'endocytose des récepteurs AMPA, permettant l'expression de la LTD dépendante des mGluR (Waung et al., 2008). Est-ce que l'ARNm de Arc est associé à différents complexes RNP selon le type de plasticité induite? Il serait intéressant d'examiner si l'ARNm de Arc stocké aux synapses et l'ARNm de Arc nouvellement synthétisé pour la L-LTP sont transportés/régulés par différents complexes RNP. Des expériences d'imagerie étudiant la colocalisation de l'ARNm avec différents complexes RNP (Stau1 et Stau2) et protéines ribosomales comme les protéines P0, DEAD box 1 et 3 (DDX1, DDX3) fourniraient certaines informations quant au type de complexe RNP. En effet, il a été démontré que la présence de marqueurs comme DDX1 et DDX3 dans un même complexe RNP peut servir d'identification pour un granule d'ARN. D'autre part, la colocalisation de DDX1 et de la protéine CGI-99 déterminerait un autre complexe RNP (Miller et al., 2009) dans les neurones. Il est donc possible de croire que la liaison

spécifique de Stau1 et Stau2 à un ARNm et la présence de marqueurs spécifiques pourraient déterminer la localisation et la régulation de chaque complexe RNP.

6.3.5 STAUFEN2 ET FMRP

FMRP est la RBP la plus étudiée, étant donné son implication dans le syndrome «*Fragile X mental retardation*». Cette protéine lie plusieurs transcrits, dont celui de la protéine Map1b (Antar et al., 2005), PSD95 (Muddashetty et al., 2007) et son propre ARNm (Antar et al., 2004). Le trafic des granules et particules de transport contenant FMRP dans les dendrites est dépendant de l'activation des récepteurs mGluR (Antar et al., 2004) et il a été démontré que la protéine s'associe directement avec une kinésine (Ohashi et al., 2002; Davidovic et al., 2007; Dichtenberg et al., 2008). De plus, la protéine s'associe à des polyribosomes et réprime la traduction des transcrits (Bassell and Warren, 2008). En effet, chez la souris *FMRI* knockout, le niveau de protéines localement traduites est grandement augmenté et la LTD mGluR-dépendante n'est plus dépendante de la synthèse de protéines (Bear et al., 2004). De plus, la morphologie des épines dendritiques est affectée dans les souris *FMRI* knockout et se traduit par une augmentation de la densité et la longueur des épines ainsi que du nombre de filopodes (Grossman et al., 2006).

Plusieurs études permettent de mieux saisir la contribution des RBP comme FMRP dans les processus de localisation et de traduction d'ARNm. Deux récentes études suggèrent un mécanisme par lequel FMRP pourrait affecter la traduction via une distribution sélective des ARNm aux sites de traduction ciblés en réponse à l'activité synaptique. La localisation des ARNm peut être induite par différentes voies de signalisation neuronale (Bramham and Wells, 2007; Dichtenberg et al., 2008) et il a été proposé que les RBP pourraient servir de maillon reliant le trafic des ARNm aux sites de traduction ciblés (Kiebler and Bassell, 2006). Les récents travaux de Bassell et collègues (Dichtenberg et al., 2008) proposent un mécanisme par lequel FMRP agirait en tant que protéine adaptatrice pour la chaîne légère de la kinésine (*kinesin light chain*), afin que les ARNm puissent être acheminés à destination à la suite d'un stimulus. Dans ce modèle, lorsque l'activité des neurones est à son niveau de base, les transcrits sont acheminés par

diverses RBP de façon constitutive aux synapses. À leur arrivée, les ARNm sont normalement réprimés par FMRP, mais sont traduits immédiatement en absence de FMRP. Donc en situation normale, suite à l'activation des mGluR, la dé-répression de FMRP assure une traduction des ARNm locaux alors que les protéines FMRP au soma participent activement au transport d'ARNm vers les dendrites (Dicthenberg et al., 2008).

Ainsi, il est fort probable que la traduction durant la plasticité synaptique soit régulée à différents niveaux par FMRP. Premièrement, le transport dendritique et l'ancrage synaptique (*synaptic docking*) de l'ARNm pourraient influencer l'initiation de la traduction en régulant la disponibilité d'ARNm spécifiques pour la synthèse locale de protéines. Une récente étude démontre d'ailleurs que FMRP peut faciliter la distribution de l'ARNm de la CaMKII α aux épines dendritiques pour traduction future, supportant l'hypothèse d'une fonction pour FMRP dans la régulation synaptique du transport d'ARNm (Kao et al., 2010). Deuxièmement, l'état de phosphorylation de FMRP influence grandement le processus d'élongation de la traduction (Ceman et al., 2003).

Est-ce que Stau2 pourrait réguler les ARNm par des mécanismes similaires à FMRP? Comme FMRP, Stau2 est également associée à la kinésine (Jeong et al., 2007). De plus, l'induction de l'activité neuronale augmente le nombre de RNP-Stau2 dans les dendrites (Jeong et al., 2007). Donc Stau2 pourrait ainsi réguler le transport d'ARNm. D'autre part, nos travaux démontrent que Stau2 régule la traduction de l'ARNm de la Map1b suite à l'activation des mGluR par le DHPG. Pourtant, alors que la suppression d'expression de FMRP augmente la LTD et favorise la formation d'épines et de filopodes, la suppression d'expression de Stau2 bloque la L-LTD et n'affecte pas la morphologie des épines dendritiques à ce stade mature. Les deux protéines occuperaient donc une fonction complémentaire plutôt que redondante.

6.4 L'IMPORTANCE DES DOMAINES RBD POUR LA FONCTION DE STAUFEN

Quels sont les mécanismes moléculaires qui participent à la régulation d'ARNm par Staufen? L'analyse de l'organisation structure-fonction de Staufen permettrait d'approfondir nos connaissances sur les rôles de la protéine. Les RBD sont des motifs communs de liaison à l'ARN qui se retrouvent dans plusieurs protéines impliquées dans la maturation et la localisation des ARNm (St Johnston et al., 1992). Staufen possède quatre différents domaines RBD. Le domaine RBD3 est responsable de la liaison à l'ARNm (Ramos et al., 2000). Une mutation à ce RBD entrave l'association de Staufen avec des ARNm (Ramos et al., 2000; Vessey et al., 2008) et prévient l'association de Staufen avec des ribosomes pour le contrôle de la traduction (Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999; Luo et al., 2002; Martel et al., 2006). La délétion ou une mutation du RBD3 nous permettraient de déterminer l'importance du RBD3 dans la liaison des ARNm impliqués dans les mécanismes associés à la plasticité synaptique.

Le RBD4 est impliqué dans les interactions protéines-protéines associant Stau1 aux ribosomes (Luo et al., 2002) et à la protéine ribosomale P0 (Brendel et al., 2004). Les conséquences encourues par une délétion du RBD4 permettrait d'établir l'importance du domaine par rapport aux interactions protéines-protéines, plus particulièrement P0. En effet, puisque nous avons démontré que Stau2 régule la dissociation de la protéine avec l'ARN Map1b pendant la LTD dépendante des mGluR, il serait intéressant de vérifier si Stau1 participe également à la dissociation de P0 et de l'ARNm de la CaMKII α pendant la L-LTP.

Finalement, les domaines RBD4 et TBD contiennent également le site de liaison de la protéine au facteur Upf1, impliqué dans le «*Staufen-mediated decay*» (SMD) (Kim et al., 2005). Une mutation associée à ces domaines nous renseignerait sur l'importance de Upf1 dans le transport des transcrits associés à la L-LTP (CaMKII α , PKM ζ) et la LTD dépendante des mGluR (Map1b, Arc). D'autre part, la délétion du domaine TBD déterminerait l'importance de la liaison de la protéine aux microtubules.

Toutes ces constructions mentionnées ci-haut pourraient être testées en culture neuronale et en tranche organotypique avec des techniques d'immunohistochimie qui permettraient d'évaluer la présence de Staufen dans les dendrites, la présence de la protéine dans les complexes RNP ainsi que la localisation de transcrits associés à la plasticité synaptique. De plus, la surexpression des différentes constructions (mutation ou délétion des RBD) dans notre modèle de tranches organotypique pourrait également fournir des informations sur la fonction des RBD dans le maintien de la morphologie des épines dendritiques, sur l'activité synaptique unitaire ainsi que sur leur responsabilité dans la L-LTP et la LTD dépendante des mGluR. Les différentes techniques pour étudier ces phénomènes (système de transfection, microscopie confocale, enregistrements électrophysiologiques) ont déjà été testées. D'autre part, en combinant la transfection de chacune des constructions (mutation ou délétion des RBD) avec le siRNA contre Staufen, il serait alors possible de déterminer quelles constructions peuvent rétablir le phénotype induit par la suppression de l'expression de Staufen.

6.5 RÔLE DE STAUFEN *IN VIVO*

Nos travaux en tranche organotypique et en culture neuronale ont mis en lumière les rôles de Staufen 1 et 2 dans la plasticité synaptique. Par contre, notre approche expérimentale peut susciter quelques questionnements puisque l'usage de la forskoline pour induire la L-LTP provoque une activation importante et générale du réseau synaptique *in vitro*. Plusieurs études ont démontré que ce type de LTP chimique partage plusieurs propriétés avec la LTP induite selon des protocoles standards (Lisman, 2003; Otmakhov et al., 2004; Kopec et al., 2006). L'utilisation d'un modèle de souris knockout (inductible, de préférence) serait un modèle intéressant, qui nous permettrait d'étudier le rôle de Stau1 et Stau2 dans l'organisme entier, incluant le comportement chez le mammifère. En effet, une souris knockout pour la protéine Stau1, ou Stau2, pourrait apporter de l'information sur leur rôle dans la plasticité synaptique et l'apprentissage dépendant de l'hippocampe. Toutefois, aucune souris knockout pour Staufen présentement disponible et il est possible que ces mutations soient léthales. D'autre part,

un modèle knockout inductible permettrait d'éclaircir leurs rôles aux stades développemental et mature. Le système Cre/LoxP permettrait d'induire une mutation de façon spatiotemporelle. Cette technique de mutation conditionnelle repose sur l'utilisation *in vitro* de l'enzyme recombinase Cre pour recombinaison de deux fragments d'ADN flanqués d'un site loxP. L'activité de la recombinase Cre est contrôlée par l'utilisation d'un promoteur spécifique, permettant d'induire l'excision du gène floxé uniquement dans un tissu donné, au moment désiré.

À ce jour, il n'existe que très peu d'études comportementales associant Staufen à la mémoire à long-terme. Des recherches effectuées sur la drosophile ont démontré de façon intéressante l'implication de Stau1 dans la mémoire olfactive (Dubnau et al., 2003). De récents travaux ont été réalisés sur une souris transgénique exprimant la protéine Stau1 tronquée au niveau du domaine RBD3, important pour la liaison de l'ARNm. Par contre, ces travaux n'ont révélé aucun changement notable au niveau de la mémoire dépendante de l'hippocampe (Vessey et al., 2008). Toutefois, l'absence d'effets dans ce modèle peut potentiellement être attribué à un phénomène de compensation. Il serait donc important d'utiliser un modèle knockout inductible ou des double knockout Stau1/Stau2.

Dans l'ensemble, nos recherches suggèrent une dichotomie dans les mécanismes régulateurs des ARNm par les protéines de la famille Staufen, Stau1 étant impliquée dans la L-LTP induite par la forskoline alors que Stau2 est nécessaire à la LTD dépendante des mGluR. De plus, nos travaux révèlent que Stau2 participe au transport de l'ARNm de la Map1b et régule la traduction de l'ARNm suite à l'induction de la LTD induite par DHPG.

CHAPITRE VII. CONCLUSION

En conclusion, les travaux de cette thèse ont contribué à l'avancement des connaissances dans le domaine de la régulation de la plasticité synaptique par les RBP Staufen 1 et 2 dans la L-LTP et la LTD mGluR-dépendante, respectivement. Nos travaux permettent de mieux connaître les processus à la base de la fonction de l'hippocampe dans la mémoire chez les mammifères. Nos travaux ont permis d'approfondir les connaissances actuelles sur les liens existant entre la régulation des ARNm par les protéines Staufen et la plasticité synaptique. Plusieurs questions demeurent concernant le rôle de Staufen dans la régulation de la fonction synaptique, de la plasticité synaptique à long-terme et de la mémoire. Les réponses à ces interrogations permettront de mieux comprendre le rôle précis des protéines Staufen dans le cerveau.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- Alvarez VA, Ridenour DA, Sabatini BL (2006) Retraction of synapses and dendritic spines induced by off-target effects of RNA interference. *J Neurosci* 26:7820-7825.
- Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, Jiang C, Schuman EM (2001) Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 30:489-502.
- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtschouladze R (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88:615-626.
- Alarcon JM, Hodgman R, Theis M, Huang YS, Kandel ER, Richter JD (2004) Selective modulation of some forms of schaffer collateral-CA1 synaptic plasticity in mice with a disruption of the CPEB-1 gene. *Learn Mem* 11:318-327.
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.
- Andersen P (2007) *The hippocampus book*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Andersen P, Bliss TV, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK (1969) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand* 76:4A-5A.
- Anderson P, Kedersha N (2006) RNA granules. *J Cell Biol* 172:803-808.
- Andreassi C, Riccio A (2009) To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol* 19:465-474.
- Antar LN, Afroz R, Dictenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ (2004) Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci* 24:2648-2655.
- Antar LN, Dictenberg JB, Plociniak M, Afroz R, Bassell GJ (2005) Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes Brain Behav* 4:350-359.
- Banker G, Goslin K (1988) Developments in neuronal cell culture. *Nature* 336:185-186.
- Barco A, Patterson S, Alarcon JM, Gromova P, Mata-Roig M, Morozov A, Kandel ER (2005) Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of LTP and its synaptic capture. *Neuron* 48:123-137.

- Barnard DC, Ryan K, Manley JL, Richter JD (2004) Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. *Cell* 119:641-651.
- Barria A, Malinow R (2005) NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* 48:289-301.
- Barria A, Derkach V, Soderling T (1997) Identification of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J Biol Chem* 272:32727-32730.
- Bashir ZI, Bortolotto ZA, Davies CH, Berretta N, Irving AJ, Seal AJ, Henley JM, Jane DE, Watkins JC, Collingridge GL (1993) Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* 363:347-350.
- Bassell GJ, Warren ST (2008) Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* 60:201-214.
- Baude A, Nusser Z, Roberts JD, Mulvihill E, McIlhinney RA, Somogyi P (1993) The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11:771-787.
- Bear MF, Huber KM, Warren ST (2004) The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* 27:370-377.
- Ben-Ari Y, Cossart R (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 23:580-587.
- Berger-Sweeney J, Zearfoss NR, Richter JD (2006) Reduced extinction of hippocampal-dependent memories in CPEB knockout mice. *Learn Mem* 13:4-7.
- Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21:13-26.
- Bhattacharyya S, Biou V, Xu W, Schluter O, Malenka RC (2009) A critical role for PSD-95/AKAP interactions in endocytosis of synaptic AMPA receptors. *Nat Neurosci* 12:172-181.
- Blichenberg A, Schwanke B, Rehbein M, Garner CC, Richter D, Kindler S (1999) Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J Neurosci* 19:8818-8829.
- Blichenberg A, Rehbein M, Muller R, Garner CC, Richter D, 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* 13:1881-1888.

- Bliss TV, 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* 232:331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bliss TV, Collingridge GL, Laroche S (2006) Neuroscience. ZAP and ZIP, a story to forget. *Science* 313:1058-1059.
- Bliss TV, Douglas RM, Errington ML, Lynch MA (1986) Correlation between long-term potentiation and release of endogenous amino acids from dentate gyrus of anaesthetized rats. *J Physiol* 377:391-408.
- Boda B, Alberi S, Nikonenko I, Node-Langlois R, Jourdain P, Moosmayer M, Parisi-Jourdain L, Muller D (2004) The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J Neurosci* 24:10816-10825.
- Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Huganir RL, Malinow R (2006) Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* 51:213-225.
- Bolshakov VY, Golan H, Kandel ER, Siegelbaum SA (1997) Recruitment of new sites of synaptic transmission during the cAMP-dependent late phase of LTP at CA3-CA1 synapses in the hippocampus. *Neuron* 19:635-651.
- Boss BD, Turlejski K, Stanfield BB, Cowan WM (1987) On the numbers of neurons in fields CA1 and CA3 of the hippocampus of Sprague-Dawley and Wistar rats. *Brain Res* 406:280-287.
- Bourdeau ML, Morin F, Laurent CE, Azzi M, Lacaille JC (2007) Kv4.3-mediated A-type K⁺ currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 27:1942-1953.
- Bozdagi O, Shan W, Tanaka H, Benson DL, Huntley GW (2000) Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron* 28:245-259.
- Bradshaw KD, Emptage NJ, Bliss TV (2003) A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP. *Eur J Neurosci* 18:3150-3152.
- Bramham CR (2008) Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr Opin Neurobiol* 18:524-531.
- Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76:99-125.

- Bramham CR, Wells DG (2007) Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 8:776-789.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF (2008) The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* 28:11760-11767.
- Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp HJ, Buck F, Richter D, Kindler S (2004) Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* 384:239-246.
- Broadus J, Fuerstenberg S, Doe CQ (1998) Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391:792-795.
- Brownawell AM, Macara IG (2002) Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol* 156:53-64.
- Buchner G, Bassi MT, Andolfi G, Ballabio A, Franco B (1999) Identification of a novel homolog of the *Drosophila* staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* 62:113-118.
- Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J (2002) The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35:625-641.
- Calverley RK, Jones DG (1990) Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 15:215-249.
- Carson JH, Gao Y, Tatavarty V, Levin MK, Korza G, Francone VP, Kosturko LD, Maggipinto MJ, Barbarese E (2008) Multiplexed RNA trafficking in oligodendrocytes and neurons. *Biochim Biophys Acta* 1779:453-458.
- Castellucci V, Kandel ER (1976) Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science* 194:1176-1178.
- Castellucci V, Pinsker H, Kupfermann I, Kandel ER (1970) Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 167:1745-1748.
- Castellucci VF, Carew TJ, Kandel ER (1978) Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Science* 202:1306-1308.
- Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J, Warren ST (2003) Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum Mol Genet* 12:3295-3305.
- Chavez-Noriega LE, Stevens CF (1992) Modulation of synaptic efficacy in field CA1 of the rat hippocampus by forskolin. *Brain Res* 574:85-92.

- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408:936-943.
- Chetkovich DM, Gray R, Johnston D, Sweatt JD (1991) N-methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca²⁺ channel activity in area CA1 of hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6467-6471.
- Chetkovich DM, Chen L, Stocker TJ, Nicoll RA, Brecht DS (2002) Phosphorylation of the postsynaptic density-95 (PSD-95)/discs large/zona occludens-1 binding site of stargazin regulates binding to PSD-95 and synaptic targeting of AMPA receptors. *J Neurosci* 22:5791-5796.
- Chevalyere V, Siegelbaum SA Strong (2010) CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron* 66:560-572.
- Chotiner JK, Khorasani H, Nairn AC, O'Dell TJ, Watson JB (2003) Adenylyl cyclase-dependent form of chemical long-term potentiation triggers translational regulation at the elongation step. *Neuroscience* 116:743-752.
- Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF (2006) Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* 52:445-459.
- Colgin LL, Moser EI, Moser MB (2008) Understanding memory through hippocampal remapping. *Trends Neurosci* 31:469-477.
- Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT (2004) Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:952-962.
- Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT (2010) Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 11:459-473.
- Collingridge GL, Kehl SJ, Loo R, McLennan H (1983) Effects of kainic and other amino acids on synaptic excitation in rat hippocampal slices: 1. Extracellular analysis. *Exp Brain Res* 52:170-178.
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5401-5404.
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.
- Contractor A, Swanson G, Heinemann SF (2001) Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 29:209-216.

- Coss RG, Brandon JG, Globus A (1980) Changes in morphology of dendritic spines on honeybee calycal interneurons associated with cumulative nursing and foraging experiences. *Brain Res* 192:49-59.
- Dahm R, Kiebler M (2005) Cell biology: silenced RNA on the move. *Nature* 438:432-435.
- Dahm R, Kiebler M, Macchi P (2007) RNA localisation in the nervous system. *Semin Cell Dev Biol* 18:216-223.
- Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB (2001) Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* 107:489-499.
- Davidkova G, Carroll RC (2007) Characterization of the role of microtubule-associated protein 1B in metabotropic glutamate receptor-mediated endocytosis of AMPA receptors in hippocampus. *J Neurosci* 27:13273-13278.
- Davidovic L, Jaglin XH, Lepagnol-Bestel AM, Tremblay S, Simonneau M, Bardoni B, Khandjian EW (2007) The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum Mol Genet* 16:3047-3058.
- Derkach V, Barria A, Soderling TR (1999) Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3269-3274.
- DesGroseillers L, Lemieux N (1996) Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 36:527-529.
- Dicthenberg JB, Swanger SA, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ (2008) A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev Cell* 14:926-939.
- Dominguez R, Hu E, Zhou M, Baudry M (2009) 17beta-estradiol-mediated neuroprotection and ERK activation require a pertussis toxin-sensitive mechanism involving GRK2 and beta-arrestin-1. *J Neurosci* 29:4228-4238.
- Doyle M, Jantsch MF (2003) Distinct in vivo roles for double-stranded RNA-binding domains of the *Xenopus* RNA-editing enzyme ADAR1 in chromosomal targeting. *J Cell Biol* 161:309-319.
- Dubnau J, Chiang AS, Grady L, Barditch J, Gossweiler S, McNeil J, Smith P, Buldoc F, Scott R, Certa U, Broger C, Tully T (2003) The staufer/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* 13:286-296.

- Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L (2002) Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115:3285-3295.
- Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4363-4367.
- Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33:4797-4812.
- Elvira G, Wasiak S, Blandford V, Tong XK, Serrano A, Fan X, del Rayo Sanchez-Carbente M, Servant F, Bell AW, Boismenu D, Lacaille JC, McPherson PS, DesGroseillers L, Sossin WS (2006) Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* 5:635-651.
- Eom T, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ (2003) Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. *J Neurosci* 23:10433-10444.
- Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Huganir RL, Malinow R (2003) PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci* 6:136-143.
- Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca²⁺ stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* 23:80-88.
- Farina KL, Singer RH (2002) The nuclear connection in RNA transport and localization. *Trends Cell Biol* 12:466-472.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18:8900-8911.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20:847-854.
- Fitzjohn SM, Kingston AE, Lodge D, Collingridge GL (1999) DHPG-induced LTD in area CA1 of juvenile rat hippocampus; characterisation and sensitivity to novel mGlu receptor antagonists. *Neuropharmacology* 38:1577-1583.
- Fitzjohn SM, Palmer MJ, May JE, Neeson A, Morris SA, Collingridge GL (2001) A characterisation of long-term depression induced by metabotropic glutamate receptor activation in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 537:421-430.
- Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.

- Frey U, Krug M, Reymann KG, Matthies H (1988) Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res* 452:57-65.
- Frey U, Morris RG (1997) Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385:533-536.
- Frey U, Morris RG (1998) Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci* 21:181-188.
- Frey U, Huang YY, Kandel ER (1993) Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 260:1661-1664.
- Fukazawa Y, Saitoh Y, Ozawa F, Ohta Y, Mizuno K, Inokuchi K (2003) Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38:447-460.
- Fukunaga K (1993) [The role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the cellular signal transduction]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 102:355-369.
- Furic L, Maher-Laporte M, DesGroseillers L (2008) A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *Rna* 14:324-335.
- Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, Bertrand E (2003) Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol* 13:161-167.
- Fyhn M, Molden S, Hollup S, Moser MB, Moser E (2002) Hippocampal neurons responding to first-time dislocation of a target object. *Neuron* 35:555-566.
- Gallagher SM, Daly CA, Bear MF, Huber KM (2004) Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J Neurosci* 24:4859-4864.
- Gao Y, Tatavarty V, Korza G, Levin MK, Carson JH (2008) Multiplexed dendritic targeting of alpha calcium calmodulin-dependent protein kinase II, neurogranin, and activity-regulated cytoskeleton-associated protein RNAs by the A2 pathway. *Mol Biol Cell* 19:2311-2327.
- Garber K, Smith KT, Reines D, Warren ST (2006) Transcription, translation and fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 16:270-275.
- Garey LJ, Ong WY, Patel TS, Kanani M, Davis A, Mortimer AM, Barnes TR, Hirsch SR (1998) Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:446-453.

- Garner CC, Tucker RP, Matus A (1988) Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* 336:674-677.
- Garthwaite J (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 27:2783-2802.
- Gelinas JN, Nguyen PV (2005) Beta-adrenergic receptor activation facilitates induction of a protein synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* 25:3294-3303.
- Gladding CM, Fitzjohn SM, Molnar E (2009) Metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression: molecular mechanisms. *Pharmacol Rev* 61:395-412.
- Glantz LA, Lewis DA (2000) Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57:65-73.
- Gobert D, Topolnik L, Azzi M, Huang L, Badeaux F, Desgroseillers L, Sossin WS, Lacaille JC (2008) Forskolin induction of late-LTP and up-regulation of 5' TOP mRNAs translation via mTOR, ERK, and PI3K in hippocampal pyramidal cells. *J Neurochem* 106:1160-1174.
- Goetze B, Tuebing F, Xie Y, Dorostkar MM, Thomas S, Pehl U, Boehm S, Macchi P, Kiebler MA (2006) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* 172:221-231.
- Gonzalez-Billault C, Jimenez-Mateos EM, Caceres A, Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J (2004) Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system. *J Neurobiol* 58:48-59.
- Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci* 7:364-372.
- Grant SG, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel ER (1992) Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice. *Science* 258:1903-1910.
- Greenough WT, Klintsova AY, Irwin SA, Galvez R, Bates KE, Weiler IJ (2001) Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7101-7106.
- Grossman AW, Aldridge GM, Weiler IJ, Greenough WT (2006) Local protein synthesis and spine morphogenesis: Fragile X syndrome and beyond. *J Neurosci* 26:7151-7155.

- Grover LM, Teyler TJ (1990) Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature* 347:477-479.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (1999) Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 2:1120-1124.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000) Inhibition of activity-dependent *arc* protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993-4001.
- Hake LE, Richter JD (1994) CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* 79:617-627.
- Harris EW, Cotman CW (1986) Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett* 70:132-137.
- Harris KM, Stevens JK (1988) Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 8:4455-4469.
- Harris KM, Stevens JK (1989) Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* 9:2982-2997.
- Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17:341-371.
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B (1992) Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12:2685-2705.
- Harris SL, Gallyas F, Jr., Molnar E (2004) Activation of metabotropic glutamate receptors does not alter the phosphorylation state of GluR1 AMPA receptor subunit at serine 845 in perirhinal cortical neurons. *Neurosci Lett* 372:132-136.
- Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287:2262-2267.
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior : a neuropsychological theory*. New York: Wiley.

- Hengst U, Deglincerti A, Kim HJ, Jeon NL, Jaffrey SR (2009) Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein. *Nat Cell Biol* 11:1024-1030.
- Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2:880-888.
- Hernandez AI, Blace N, Crary JF, Serrano PA, Leitges M, Libien JM, Weinstein G, Tcherapanov A, Sacktor TC (2003) Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *J Biol Chem* 278:40305-40316.
- Hirokawa N (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279:519-526.
- Hirokawa N (2006) mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J Neurosci* 26:7139-7142.
- Hirokawa N, Takemura R (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6:201-214.
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-853.
- Holt CE, Bullock SL (2009) Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* 326:1212-1216.
- Holtmaat A, Svoboda K (2009) Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10:647-658.
- Holtmaat A, Bonhoeffer T, Chow DK, Chuckowree J, De Paola V, Hofer SB, Hubener M, Keck T, Knott G, Lee WC, Mostany R, Mrcic-Flogel TD, Nedivi E, Portera-Cailliau C, Svoboda K, Trachtenberg JT, Wilbrecht L (2009) Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat Protoc* 4:1128-1144.
- Holtmaat AJ, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, Shepherd GM, Zhang X, Knott GW, Svoboda K (2005) Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 45:279-291.
- Horne EA, Dell'Acqua ML (2007) Phospholipase C is required for changes in postsynaptic structure and function associated with NMDA receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* 27:3523-3534.

- Hou L, Antion MD, Hu D, Spencer CM, Paylor R, Klann E (2006) Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron* 51:441-454.
- Hou L, Klann E (2004) Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* 24:6352-6361.
- Hrabetova S, Sacktor TC (2001) Transient translocation of conventional protein kinase C isoforms and persistent downregulation of atypical protein kinase Mzeta in long-term depression. *Brain Res Mol Brain Res* 95:146-152.
- Hu JY, Meng X, Schacher S (2003) Redistribution of syntaxin mRNA in neuronal cell bodies regulates protein expression and transport during synapse formation and long-term synaptic plasticity. *J Neurosci* 23:1804-1815.
- Huang YS, Carson JH, Barbarese E, Richter JD (2003) Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes Dev* 17:638-653.
- Huang YY, Li XC, Kandel ER (1994) cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* 79:69-79.
- Huber G, Marz W, Martin JR, Malherbe P, Richards JG, Sueoka N, Ohm T, Hoffmann MM (2000a) Characterization of transgenic mice expressing apolipoprotein E4(C112R) and apolipoprotein E4(L28P; C112R). *Neuroscience* 101:211-218.
- Huber KM, Sawtell NB, Bear MF (1998) Effects of the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG on phosphoinositide turnover and synaptic plasticity in visual cortex. *J Neurosci* 18:1-9.
- Huber KM, Kayser MS, Bear MF (2000) Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* 288:1254-1257.
- Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF (2002) Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7746-7750.
- Huettner JE (2003) Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 70:387-407.
- Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438:512-515.
- Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15:427-434.

- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 295:580-623.
- Isokawa M (1998) Remodeling dendritic spines in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* 258:73-76.
- Jaworski J, Kapitein LC, Gouveia SM, Dortland BR, Wulf PS, Grigoriev I, Camera P, Spangler SA, Di Stefano P, Demmers J, Krugers H, Defilippi P, Akhmanova A, Hoogenraad CC (2009) Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61:85-100.
- Jeong JH, Nam YJ, Kim SY, Kim EG, Jeong J, Kim HK (2007) The transport of Stauf2-containing ribonucleoprotein complexes involves kinesin motor protein and is modulated by mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurochem* 102:2073-2084.
- Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23:457-462.
- Jung MW, McNaughton BL (1993) Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus* 3:165-182.
- Kameyama K, Lee HK, Bear MF, Huganir RL (1998) Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression. *Neuron* 21:1163-1175.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-525.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci Rep* 21:565-611.
- Kandel ER, Pittenger C (1999) The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:2027-2052.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) Principles of neural science, 4th Edition. New York ; Montréal: McGraw-Hill Health Professions Division.
- Kang H, Schuman EM (1996) A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273:1402-1406.
- Kang H, Sun LD, Atkins CM, Soderling TR, Wilson MA, Tonegawa S (2001) An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory. *Cell* 106:771-783.

- Kanhema T, Dagestad G, Panja D, Tiron A, Messaoudi E, Havik B, Ying SW, Nairn AC, Sonenberg N, Bramham CR (2006) Dual regulation of translation initiation and peptide chain elongation during BDNF-induced LTP in vivo: evidence for compartment-specific translation control. *J Neurochem* 99:1328-1337.
- Kao DI, Aldridge GM, Weiler IJ, Greenough WT (2010) Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15601-15606.
- Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J (2010) Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci* 33:121-129.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H (2003) Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26:360-368.
- Kauer JA, Malenka RC, Nicoll RA (1988) A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron* 1:911-917.
- Kedersha N, Anderson P (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30:963-969.
- Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169:871-884.
- Keinanen K, Wisden W, Sommer B, Werner P, Herb A, Verdoorn TA, Sakmann B, Seeburg PH (1990) A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* 249:556-560.
- Kelleher RJ, 3rd, Govindarajan A, Tonegawa S (2004) Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* 44:59-73.
- Kerchner GA, Nicoll RA (2008) Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci* 9:813-825.
- Kharrat A, Macias MJ, Gibson TJ, Nilges M, Pastore A (1995) Structure of the dsRNA binding domain of E. coli RNase III. *Embo J* 14:3572-3584.
- Kiebler MA, DesGroseillers L (2000) Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* 25:19-28.
- Kiebler MA, Bassell GJ (2006) Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* 51:685-690.

- Kiebler MA, Jansen RP, Dahm R, Macchi P (2005) A putative nuclear function for mammalian Staufen. *Trends Biochem Sci* 30:228-231.
- Kiebler MA, Hemraj I, Verkade P, Kohrmann M, Fortes P, Marion RM, Ortin J, Dotti CG (1999) The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* 19:288-297.
- Kim KC, Kim HK (2006) Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci Lett* 397:48-52.
- Kim MJ, Futai K, Jo J, Hayashi Y, Cho K, Sheng M (2007) Synaptic accumulation of PSD-95 and synaptic function regulated by phosphorylation of serine-295 of PSD-95. *Neuron* 56:488-502.
- Kim VN (2004) MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 14:156-159.
- Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120:195-208.
- Kindler S, Wang H, Richter D, Tiedge H (2005) RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:223-245.
- Klann E, Dever TE (2004) Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:931-942.
- Knobloch M, Mansuy IM (2008) Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 37:73-82.
- Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K (2006) Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci* 9:1117-1124.
- Knowles RB, Sabry JH, Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bassell GJ, Kosik KS (1996) Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci* 16:7812-7820.
- Kohrmann M, Luo M, Kaether C, DesGroseillers L, Dotti CG, Kiebler MA (1999) Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 10:2945-2953.
- Kopec CD, Real E, Kessels HW, Malinow R (2007) GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses. *J Neurosci* 27:13706-13718.

- Kopec CD, Li B, Wei W, Boehm J, Malinow R (2006) Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci* 26:2000-2009.
- Korkotian E, Schwarz A, Pelled D, Schwarzmann G, Segal M, Futerman AH (1999) Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. *J Biol Chem* 274:21673-21678.
- Kornau HC, Seeburg PH, Kennedy MB (1997) Interaction of ion channels and receptors with PDZ domain proteins. *Curr Opin Neurobiol* 7:368-373.
- Kovacs KA, Steullet P, Steinmann M, Do KQ, Magistretti PJ, Halfon O, Cardinaux JR (2007) TORC1 is a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector involved in hippocampal long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4700-4705.
- Kress TL, Yoon YJ, Mowry KL (2004) Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *J Cell Biol* 165:203-211.
- Krichevsky AM, Kosik KS (2001) Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* 32:683-696.
- Krug M, Lossner B, Ott T (1984) Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull* 13:39-42.
- Kullmann DM, Nicoll RA (1992) Long-term potentiation is associated with increases in quantal content and quantal amplitude. *Nature* 357:240-244.
- Kumaran D, Maguire EA (2007) Which computational mechanisms operate in the hippocampus during novelty detection? *Hippocampus* 17:735-748.
- Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U (2001) Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* 10:329-338.
- Larkman A, Hannay T, Stratford K, Jack J (1992) Presynaptic release probability influences the locus of long-term potentiation. *Nature* 360:70-73.
- Lashley KS (1929) *Brain mechanisms and intelligence; a quantitative study of injuries to the brain.* Chicago, Ill.,: The University of Chicago Press.
- Le S, Sternglanz R, Greider CW (2000) Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell* 11:999-1010.
- Lebeau G, Maher-Laporte M, Topolnik L, Laurent CE, Sossin W, Desgroseillers L, Lacaille JC (2008) Stauf1 regulation of protein synthesis-dependent long-term

potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Molecular and cellular biology* 28:2896-2907.

- Lebeau G, Miller LC, Tartas M, McAdam R, Laplante I, Badeaux F, DesGroseillers L, Sossin W, Lacaille JC (2011) Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons. *Learn Mem*, 18:314-326.
- Lee HK, Kameyama K, Huganir RL, Bear MF (1998) NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 21:1151-1162.
- Lee SJ, Escobedo-Lozoya Y, Szatmari EM, Yasuda R (2009) Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* 458:299-304.
- Leung KM, van Horck FP, Lin AC, Allison R, Standart N, Holt CE (2006) Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nat Neurosci* 9:1247-1256.
- Li B, Woo RS, Mei L, Malinow R (2007) The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron* 54:583-597.
- Li XG, Somogyi P, Ylinen A, Buzsaki G (1994) The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol* 339:181-208.
- Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y (2001) The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res* 29:2276-2283.
- Liao D, Hessler NA, Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375:400-404.
- Lin AC, Holt CE (2007) Local translation and directional steering in axons. *Embo J* 26:3729-3736.
- Lin B, Kramar EA, Bi X, Brucher FA, Gall CM, Lynch G (2005) Theta stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus. *J Neurosci* 25:2062-2069.
- Ling DS, Benardo LS, Serrano PA, Blace N, Kelly MT, Crary JF, Sacktor TC (2002) Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nat Neurosci* 5:295-296.
- Lisman J (2003) Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:829-842.

- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3:175-190.
- Lisman JE, Otmakhova NA (2001) Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus* 11:551-568.
- Liu J, Hu JY, Wu F, Schwartz JH, Schacher S (2006) Two mRNA-binding proteins regulate the distribution of syntaxin mRNA in *Aplysia* sensory neurons. *J Neurosci* 26:5204-5214.
- Lorente de No R (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex : Continuation of the study of the ammonic system. Leipzig: Johann Ambrosius Barth.
- Lu R, Wang H, Liang Z, Ku L, O'Donnell W T, Li W, Warren ST, Feng Y (2004) The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15201-15206.
- Lu Y, Christian K, Lu B (2008) BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem* 89:312-323.
- Luo M, Duchaine TF, DesGroseillers L (2002) Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J* 365:817-824.
- Luscher C, Huber KM (2010) Group 1 mGluR-dependent synaptic long-term depression: mechanisms and implications for circuitry and disease. *Neuron* 65:445-459.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433-445.
- Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F (1983) Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305:719-721.
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.
- Macchi P, Brownawell AM, Grunewald B, DesGroseillers L, Macara IG, Kiebler MA (2004) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J Biol Chem* 279:31440-31444.
- Maher-Laporte M, DesGroseillers L (2010) Genome wide identification of Staufen2-bound mRNAs in embryonic rat brains. *BMB Rep* 43:344-348.

- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285:1870-1874.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 340:554-557.
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-126.
- Malinow R, Madison DV, Tsien RW (1988) Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature* 335:820-824.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862-866.
- Mallardo M, Deitinghoff A, Muller J, Goetze B, Macchi P, Peters C, Kiebler MA (2003) Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2100-2105.
- Manabe T, Renner P, Nicoll RA (1992) Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* 355:50-55.
- Marion RM, Fortes P, Beloso A, Dotti C, Ortin J (1999) A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology* 19:2212-2219.
- Marr D (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262:23-81.
- Martel C, Macchi P, Furic L, Kiebler MA, Desgroseillers L (2006) Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem J* 393:245-254.
- Martin KC, Zukin RS (2006) RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci* 26:7131-7134.
- Martin KC, Ephrussi A (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136:719-730.
- Martin KC, Casadio A, Zhu H, Yaping E, Rose JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1997) Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor

synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 91:927-938.

Matsuzaki F, Ohshiro T, Ikeshima-Kataoka H, Izumi H (1998) *miranda* localizes *staufen* and *prospero* asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development* 125:4089-4098.

Matsuzaki M (2007) Factors critical for the plasticity of dendritic spines and memory storage. *Neurosci Res* 57:1-9.

Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, 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* 4:1086-1092.

Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766.

Matus A, Brinkhaus H, Wagner U (2000) Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses. *Hippocampus* 10:555-560.

Matus A, Ackermann M, Pehling G, Byers HR, Fujiwara K (1982) High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7590-7594.

Mayford M, Baranes D, Podsypanina K, Kandel ER (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* 93:13250-13255.

McEvoy M, Cao G, Llopis PM, Kundel M, Jones K, Hofler C, Shin C, Wells DG (2007) Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1-mediated mRNA translation in Purkinje neurons is required for cerebellar long-term depression and motor coordination. *J Neurosci* 27:6400-6411.

McKinney RA (2005) Physiological roles of spine motility: development, plasticity and disorders. *Biochem Soc Trans* 33:1299-1302.

McKinney RA, Capogna M, Durr R, Gahwiler BH, Thompson SM (1999) Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat Neurosci* 2:44-49.

McNaughton, B. C. and Morris, R. G. M. (1987). Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed system. *Trends in Neurosciences*, 10, 408- 415.

Mendez R, Richter JD (2001) Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:521-529.

- Micklem DR, Adams J, Grunert S, St Johnston D (2000) Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *Embo J* 19:1366-1377.
- Miki T, Yoneda Y (2004) Alternative splicing of Staufen2 creates the nuclear export signal for CRM1 (Exportin 1). *J Biol Chem* 279:47473-47479.
- Miki T, Takano K, Yoneda Y (2005) The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleocytoplasmic shuttling function. *Cell Struct Funct* 30:51-56.
- Miller LC, Blandford V, McAdam R, Sanchez-Carbente MR, Badeaux F, DesGroseillers L, Sossin WS (2009) Combinations of DEAD box proteins distinguish distinct types of RNA: protein complexes in neurons. *Mol Cell Neurosci* 40:485-495.
- Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M (2002) Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36:507-519.
- Milner B (1972) Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin Neurosurg* 19:421-446.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468.
- Miniaci MC, Kim JH, Puthanveetil SV, Si K, Zhu H, Kandel ER, Bailey CH (2008) Sustained CPEB-dependent local protein synthesis is required to stabilize synaptic growth for persistence of long-term facilitation in Aplysia. *Neuron* 59:1024-1036.
- Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, Becker KG, Barret T, Liu L, Carbonetto S, Weiler IJ, Greenough WT, Eberwine J (2003) RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. *Neuron* 37:417-431.
- Monshausen M, Gehring NH, Kosik KS (2004) The mammalian RNA-binding protein Staufen2 links nuclear and cytoplasmic RNA processing pathways in neurons. *Neuromolecular Med* 6:127-144.
- Mori Y, Imaizumi K, Katayama T, Yoneda T, Tohyama M (2000) Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat Neurosci* 3:1079-1084.
- Morita T, Sobue K (2009) Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J Biol Chem* 284:27734-27745.
- Morris RG (1989) Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* 9:3040-3057.

- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774-776.
- Moult PR, Gladding CM, Sanderson TM, Fitzjohn SM, Bashir ZI, Molnar E, Collingridge GL (2006) Tyrosine phosphatases regulate AMPA receptor trafficking during metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression. *J Neurosci* 26:2544-2554.
- Muddashetty RS, Kelic S, Gross C, Xu M, Bassell GJ (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* 27:5338-5348.
- Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC (1993) An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* 261:1051-1055.
- Muller RU, Finkelstein A (1974) The electrostatic basis of Mg⁺⁺ inhibition of transmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:923-926.
- Murphy N, Bonner HP, Ward MW, Murphy BM, Prehn JH, Henshall DC (2008) Depletion of 14-3-3 zeta elicits endoplasmic reticulum stress and cell death, and increases vulnerability to kainate-induced injury in mouse hippocampal cultures. *J Neurochem* 106:978-988.
- Muslimov IA, Nimmrich V, Hernandez AI, Tcherepanov A, Sacktor TC, Tiedge H (2004) Dendritic transport and localization of protein kinase Mzeta mRNA: implications for molecular memory consolidation. *J Biol Chem* 279:52613-52622.
- Nagerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44:759-767.
- Nakashiba T, Young JZ, McHugh TJ, Buhl DL, Tonegawa S (2008) Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science* 319:1260-1264.
- Narayanan U, Nalavadi V, Nakamoto M, Pallas DC, Ceman S, Bassell GJ, Warren ST (2007) FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A. *J Neurosci* 27:14349-14357.
- Nassel DR, Strausfeld NJ (1982) A pair of descending neurons with dendrites in the optic lobes projecting directly to thoracic ganglia of dipterous insects. *Cell Tissue Res* 226:355-362.

- Nguyen PV, Woo NH (2003) Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol* 71:401-437.
- Nguyen PV, Abel T, Kandel ER (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265:1104-1107.
- Nicoll RA, Malenka RC (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118.
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64:313-353.
- Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H (2005) Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. *Neuron* 46:609-622.
- Nosyreva ED, Huber KM (2006) Metabotropic receptor-dependent long-term depression persists in the absence of protein synthesis in the mouse model of fragile X syndrome. *J Neurophysiol* 95:3291-3295.
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21:545-559.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171-175.
- Ohashi S, Koike K, Omori A, Ichinose S, Ohara S, Kobayashi S, Sato TA, Anzai K (2002) Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem* 277:37804-37810.
- Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A, Hayashi Y (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* 7:1104-1112.
- Oleynikov Y, Singer RH (2003) Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* 13:199-207.
- Oliet SH, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Bidirectional control of quantal size by synaptic activity in the hippocampus. *Science* 271:1294-1297.
- Oliet SH, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 18:969-982.

- Osten P, Valsamis L, Harris A, Sacktor TC (1996) Protein synthesis-dependent formation of protein kinase Mzeta in long-term potentiation. *J Neurosci* 16:2444-2451.
- Ostroff LE, Fiala JC, Allwardt B, Harris KM (2002) Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* 35:535-545.
- Otani S, Marshall CJ, Tate WP, Goddard GV, Abraham WC (1989) Maintenance of long-term potentiation in rat dentate gyrus requires protein synthesis but not messenger RNA synthesis immediately post-tetanization. *Neuroscience* 28:519-526.
- Otmakhov N, Griffith LC, Lisman JE (1997) Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing-induced long-term potentiation. *J Neurosci* 17:5357-5365.
- Otmakhov N, Khibnik L, Otmakhova N, Carpenter S, Riahi S, Asrican B, Lisman J (2004) Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J Neurophysiol* 91:1955-1962.
- Otmakhova NA, Otmakhov N, Mortenson LH, Lisman JE (2000) Inhibition of the cAMP pathway decreases early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci* 20:4446-4451.
- Ouyang Y, Kantor D, Harris KM, Schuman EM, Kennedy MB (1997) Visualization of the distribution of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II after tetanic stimulation in the CA1 area of the hippocampus. *J Neurosci* 17:5416-5427.
- Ouyang Y, Rosenstein A, Kreiman G, Schuman EM, Kennedy MB (1999) Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 19:7823-7833.
- Palmer MJ, Irving AJ, Seabrook GR, Jane DE, Collingridge GL (1997) The group I mGlu receptor agonist DHPG induces a novel form of LTD in the CA1 region of the hippocampus. *Neuropharmacology* 36:1517-1532.
- Pang PT, Lu B (2004) Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev* 3:407-430.
- Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD (2004) Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 305:1972-1975.

- Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD (2006) Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52:817-830.
- Park S, Park JM, Kim S, Kim JA, Shepherd JD, Smith-Hicks CL, Chowdhury S, Kaufmann W, Kuhl D, Ryazanov AG, Haganir RL, Linden DJ, Worley PF (2008) Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron* 59:70-83.
- Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313:1141-1144.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat* 127:321-355.
- Pfeiffer BE, Huber KM (2006) Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity. *J Neurosci* 26:7147-7150.
- Pierce JP, van Leyen K, McCarthy JB (2000) Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:311-313.
- Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, Kobalz U, Stawrakakis A, Fernandez E, Waltereit R, Bick-Sander A, Therstappen E, Cooke SF, Blanquet V, Wurst W, Salmen B, Bosl MR, Lipp HP, Grant SG, Bliss TV, Wolfer DP, Kuhl D (2006) Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52:437-444.
- Purves D, Roucoux A (1999) *Neurosciences*. Paris ; Bruxelles: De Boeck Université.
- Ramón y Cajal S (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, Vols. 1 and 2. A. Maloine : Paris
- Ramos A, Hollingworth D, Pastore A (2003) G-quartet-dependent recognition between the FMRP RGG box and RNA. *Rna* 9:1198-1207.
- Ramos A, Grunert S, Adams J, Micklem DR, Proctor MR, Freund S, Bycroft M, St Johnston D, Varani G (2000) RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *Embo J* 19:997-1009.
- Rao A, Kim E, Sheng M, Craig AM (1998) Heterogeneity in the molecular composition of excitatory postsynaptic sites during development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 18:1217-1229.

- Reymann KG, Frey JU (2007) The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications. *Neuropharmacology* 52:24-40.
- Rial Verde EM, Lee-Osbourne J, Worley PF, Malinow R, Cline HT (2006) Increased expression of the immediate-early gene *arc/arg3.1* reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron* 52:461-474.
- Richards DA, Mateos JM, Hugel S, de Paola V, Caroni P, Gahwiler BH, McKinney RA (2005) Glutamate induces the rapid formation of spine head protrusions in hippocampal slice cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6166-6171.
- Richter JD (2007) CPEB: a life in translation. *Trends Biochem Sci* 32:279-285.
- Richter JD, Lorenz LJ (2002) Selective translation of mRNAs at synapses. *Curr Opin Neurobiol* 12:300-304.
- Riedel G, Platt B, Micheau J (2003) Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140:1-47.
- Rolls ET (1996) A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus* 6:601-620.
- Rolls ET, Kesner RP (2006) A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog Neurobiol* 79:1-48.
- Rook MS, Lu M, Kosik KS (2000) CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J Neurosci* 20:6385-6393.
- Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Molecular and cellular biology* 17:2158-2165.
- Ryazanov AG, Shestakova EA, Natapov PG (1988) Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation. *Nature* 334:170-173.
- Sabatini BL, Maravall M, Svoboda K (2001) Ca(2+) signaling in dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 11:349-356.
- Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, Sublette E (1993) Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8342-8346.
- Sajikumar S, Frey JU (2004) Late-associativity, synaptic tagging, and the role of dopamine during LTP and LTD. *Neurobiol Learn Mem* 82:12-25.

- Sajikumar S, Navakkode S, Sacktor TC, Frey JU (2005) Synaptic tagging and cross-tagging: the role of protein kinase Mzeta in maintaining long-term potentiation but not long-term depression. *J Neurosci* 25:5750-5756.
- Sanchez-Carbente Mdel R, Desgroseillers L (2008) Understanding the importance of mRNA transport in memory. *Prog Brain Res* 169:41-58.
- Sans N, Petralia RS, Wang YX, Blahos J, 2nd, Hell JW, Wenthold RJ (2000) A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20:1260-1271.
- Sarnat HB, Netsky MG (1985) The brain of the planarian as the ancestor of the human brain. *Can J Neurol Sci* 12:296-302.
- Scannevin RH, Huganir RL (2000) Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 1:133-141.
- Scanziani M, Capogna M, Gahwiler BH, Thompson SM (1992) Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* 9:919-927.
- Scheetz AJ, Nairn AC, Constantine-Paton M (1997) N-methyl-D-aspartate receptor activation and visual activity induce elongation factor-2 phosphorylation in amphibian tecta: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in controlling protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14770-14775.
- Scheetz AJ, Nairn AC, Constantine-Paton M (2000) NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses. *Nat Neurosci* 3:211-216.
- Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Brecht DS, Nicoll RA (2002) Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13902-13907.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439:283-289.
- Schuman EM, Dynes JL, Steward O (2006) Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. *J Neurosci* 26:7143-7146.
- Schupbach T, Wieschaus E (1986) Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev Biol* 113:443-448.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.

- Sebeo J, Hsiao K, Bozdagi O, Dumitriu D, Ge Y, Zhou Q, Benson DL (2009) Requirement for protein synthesis at developing synapses. *J Neurosci* 29:9778-9793.
- Segal M (1995) Dendritic spines for neuroprotection: a hypothesis. *Trends Neurosci* 18:468-471.
- Serrano P, Yao Y, Sacktor TC (2005) Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta maintains late-phase long-term potentiation. *J Neurosci* 25:1979-1984.
- Shan J, Munro TP, Barbarese E, Carson JH, Smith R (2003) A molecular mechanism for mRNA trafficking in neuronal dendrites. *J Neurosci* 23:8859-8866.
- Shen W, Wu B, Zhang Z, Dou Y, Rao ZR, Chen YR, Duan S (2006) Activity-induced rapid synaptic maturation mediated by presynaptic cdc42 signaling. *Neuron* 50:401-414.
- Sheng M, Kim MJ (2002) Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298:776-780.
- Shepherd GM (2004) *The synaptic organization of the brain*, 5th Edition. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF (2006) Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 52:475-484.
- Sheth U, Parker R (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300:805-808.
- Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R (1999) Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284:1811-1816.
- Shin CY, Kundel M, Wells DG (2004) Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation. *J Neurosci* 24:9425-9433.
- Skoff RP, Hamburger V (1974) Fine structure of dendritic and axonal growth cones in embryonic chick spinal cord. *J Comp Neurol* 153:107-147.
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-839.
- Smith CC, McMahon LL (2005) Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J Neurosci* 25:7780-7791.

- Sonenberg N, Gingras AC (1998) The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 10:268-275.
- Sorra KE, Harris KM (2000) Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10:501-511.
- Sorra KE, Fiala JC, Harris KM (1998) Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation. *J Comp Neurol* 398:225-240.
- Sossin WS, DesGroseillers L (2006) Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* 7:1581-1589.
- Spacek J, Harris KM (1997) Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci* 17:190-203.
- Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82:171-177.
- Squire LR, Zola-Morgan S (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science* 253:1380-1386.
- Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5:169-177.
- Squire LR, Zola SM (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13515-13522.
- St Johnston D (1995) The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 81:161-170.
- St Johnston D (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:363-375.
- St Johnston D, Beuchle D, Nusslein-Volhard C (1991) *Staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66:51-63.
- St Johnston D, Brown NH, Gall JG, Jantsch M (1992) A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10979-10983.
- Stanton PK, Heinemann U, Muller W (2001) FM1-43 imaging reveals cGMP-dependent long-term depression of presynaptic transmitter release. *J Neurosci* 21:RC167.

- Stanton PK, Winterer J, Bailey CP, Kyrozis A, Raginov I, Laube G, Veh RW, Nguyen CQ, Muller W (2003) Long-term depression of presynaptic release from the readily releasable vesicle pool induced by NMDA receptor-dependent retrograde nitric oxide. *J Neurosci* 23:5936-5944.
- Stebbins-Boaz B, Richter JD (1997) Translational control during early development. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7:73-94.
- Steward O, Levy WB (1982) Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci* 2:284-291.
- Steward O, Wallace CS (1995) mRNA distribution within dendrites: relationship to afferent innervation. *J Neurobiol* 26:447-449.
- Steward O, Worley P (2001a) Localization of mRNAs at synaptic sites on dendrites. *Results Probl Cell Differ* 34:1-26.
- Steward O, Schuman EM (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* 24:299-325.
- Steward O, Worley PF (2001b) Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* 30:227-240.
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF (1998) Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21:741-751.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.
- Sutton MA, Schuman EM (2005) Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J Neurobiol* 64:116-131.
- Sutton MA, Schuman EM (2006) Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127:49-58.
- Svoboda K, Tank DW, Denk W (1996) Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts. *Science* 272:716-719.
- Sweatt JD (1999) Toward a molecular explanation for long-term potentiation. *Learn Mem* 6:399-416.
- Tada T, Sheng M (2006) Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:95-101.
- Tang SJ, Schuman EM (2002) Protein synthesis in the dendrite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:521-529.

- Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E (2001) A role for a rat homolog of stau1 in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 32:463-475.
- Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:467-472.
- Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna* 11:371-382.
- Thomas MG, Martinez Tosar LJ, Loschi M, Pasquini JM, Correale J, Kindler S, Boccaccio GL (2005) Stau1 recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* 16:405-420.
- Tiedge H, Brosius J (1996) Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 16:7171-7181.
- Tiruchinapalli DM, Oleynikov Y, Kelic S, Shenoy SM, Hartley A, Stanton PK, Singer RH, Bassell GJ (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* 23:3251-3261.
- Todd PK, Mack KJ, Malter JS (2003) The fragile X mental retardation protein is required for type-I metabotropic glutamate receptor-dependent translation of PSD-95. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14374-14378.
- Tongiorgi E, Righi M, Cattaneo A (1997) Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J Neurosci* 17:9492-9505.
- Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420:788-794.
- Treves A, Rolls ET (1992) Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus* 2:189-199.
- Tubing F, Vendra G, Mikl M, Macchi P, Thomas S, Kiebler MA (2010) Dendritically localized transcripts are sorted into distinct ribonucleoprotein particles that display fast directional motility along dendrites of hippocampal neurons. *J Neurosci* 30:4160-4170.
- Turrigiano GG (2000) AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity. *Neuron* 26:5-8.

- Valverde F (1967) Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse. *Exp Brain Res* 3:337-352.
- Vessey JP, Vaccani A, Xie Y, Dahm R, Karra D, Kiebler MA, Macchi P (2006) Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to dendritic stress granules. *J Neurosci* 26:6496-6508.
- Vessey JP, Macchi P, Stein JM, Mikl M, Hawker KN, Vogelsang P, Wiczorek K, Vendra G, Riefler J, Tubing F, Aparicio SA, Abel T, Kiebler MA (2008) A loss of function allele for murine *Staufen1* leads to impairment of dendritic *Staufen1*-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16374-16379.
- Villace P, Marion RM, Ortin J (2004) The composition of *Staufen*-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 32:2411-2420.
- Volk LJ, Daly CA, Huber KM (2006) Differential roles for group 1 mGluR subtypes in induction and expression of chemically induced hippocampal long-term depression. *J Neurophysiol* 95:2427-2438.
- Wang XB, Yang Y, Zhou Q (2007) Independent expression of synaptic and morphological plasticity associated with long-term depression. *J Neurosci* 27:12419-12429.
- Watkins JC (2000) l-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. *Biochem Soc Trans* 28:297-309.
- Waung MW, Pfeiffer BE, Nosyreva ED, Ronesi JA, Huber KM (2008) Rapid translation of *Arc/Arg3.1* selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron* 59:84-97.
- Wellmann H, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C (1999) Optimized protocol for biolistic transfection of brain slices and dissociated cultured neurons with a hand-held gene gun. *J Neurosci Methods* 92:55-64.
- Wells DG (2006) RNA-binding proteins: a lesson in repression. *J Neurosci* 26:7135-7138.
- Wells DG, Richter JD, Fallon JR (2000) Molecular mechanisms for activity-regulated protein synthesis in the synapto-dendritic compartment. *Curr Opin Neurobiol* 10:132-137.
- Wells DG, Dong X, Quinlan EM, Huang YS, Bear MF, Richter JD, Fallon JR (2001) A role for the cytoplasmic polyadenylation element in NMDA receptor-regulated mRNA translation in neurons. *J Neurosci* 21:9541-9548.

- Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J, II, Niedzielski AS (1996) Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16:1982-1989.
- West AE, Griffith EC, Greenberg ME (2002) Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci* 3:921-931.
- Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L (1999) Mammalian stau68 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology* 19:2220-2230.
- Wilhelm JE, Vale RD (1993) RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J Cell Biol* 123:269-274.
- Witter MP, Naber PA, van Haften T, Machielsen WC, Rombouts SA, Barkhof F, Scheltens P, Lopes da Silva FH (2000) Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippocampus* 10:398-410.
- Wong ST, Athos J, Figueroa XA, Pineda VV, Schaefer ML, Chavkin CC, Muglia LJ, Storm DR (1999) Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* 23:787-798.
- Wu L, Wells D, Tay J, Mendis D, Abbott MA, Barnitt A, Quinlan E, Heynen A, Fallon JR, Richter JD (1998) CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* 21:1129-1139.
- Xia Z, Storm DR (2005) The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6:267-276.
- Xu T, Yu X, Perlik AJ, Tobin WF, Zweig JA, Tennant K, Jones T, Zuo Y (2009) Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature* 462:915-919.
- Yang Y, Wang XB, Frerking M, Zhou Q (2008) Spine expansion and stabilization associated with long-term potentiation. *J Neurosci* 28:5740-5751.
- Yano H, Ninan I, Zhang H, Milner TA, Arancio O, Chao MV (2006) BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex. *Nat Neurosci* 9:1009-1018.
- Yao J, Sasaki Y, Wen Z, Bassell GJ, Zheng JQ (2006) An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca²⁺-dependent growth cone guidance. *Nat Neurosci* 9:1265-1273.

- Yuste R, Denk W (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682-684.
- Yuste R, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24:1071-1089.
- Yuste R, Bonhoeffer T (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* 5:24-34.
- Zalfa F, Achsel T, Bagni C (2006) mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:265-269.
- Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A, Reis S, Oostra B, Bagni C (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* 112:317-327.
- Zhang H, Xing L, Rossoll W, Wichterle H, Singer RH, Bassell GJ (2006) Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. *J Neurosci* 26:8622-8632.
- Zhang HL, Eom T, Oleynikov Y, Shenoy SM, Liebelt DA, Dictenberg JB, Singer RH, Bassell GJ (2001) Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNA complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* 31:261-275.
- Zhang W, Benson DL (2000) Development and molecular organization of dendritic spines and their synapses. *Hippocampus* 10:512-526.
- Zhang Y, Venkitaramani DV, Gladding CM, Zhang Y, Kurup P, Molnar E, Collingridge GL, Lombroso PJ (2008) The tyrosine phosphatase STEP mediates AMPA receptor endocytosis after metabotropic glutamate receptor stimulation. *J Neurosci* 28:10561-10566.
- Zhou Q, Homma KJ, Poo MM (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44:749-757.
- Zhou Y, Wu H, Li S, Chen Q, Cheng XW, Zheng J, Takemori H, Xiong ZQ (2006) Requirement of TORC1 for late-phase long-term potentiation in the hippocampus. *PLoS One* 1:e16.
- Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6:2950-2967.